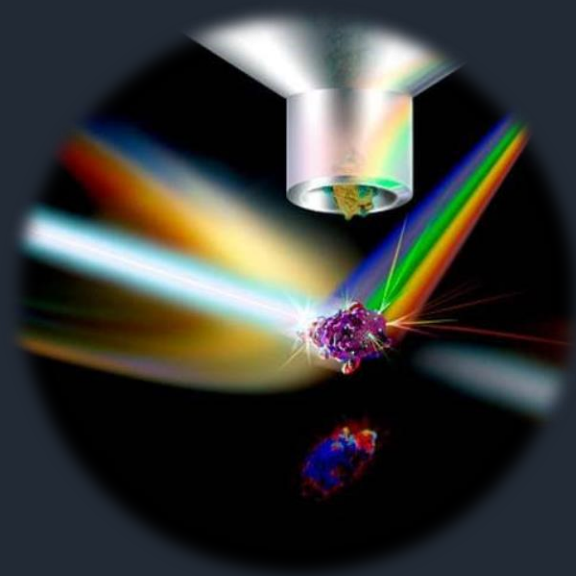




VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

2024

MIGUEL FERNÁNDEZ ZARZOSO

TESIS DOCTORAL



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología
Programa de doctorado 3139 en Medicina

ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE LA SERIE BLANCA Y ROJA EN PACIENTES GAUCHER TIPO 1

TESIS DOCTORAL

Miguel Fernández Zarzoso

Valencia, 2024



FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA
Programa de doctorado 3139 en Medicina

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE LA
SERIE BLANCA Y ROJA EN PACIENTES
GAUCHER TIPO 1**

Presentada por:
Miguel Fernández Zarzoso

Director: Javier de la Rubia Comos

Tutor: Guillermo Sáez Tormo

Febrero de 2024

INFORME DEL DIRECTOR, TUTOR PARA EL DEPÓSITO DE LA TESIS

Director

Dr. Javier de la Rubia Comos. N.I.F: 28461749P, Departamento: Hematología y Hemoterapia. Centro: Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia

Tutor

Guillermo Sáez Tormo. N.I.F: 73499594N, Departamento: Bioquímica Centro: Universitat de València

Como director y tutor de la tesis doctoral "Análisis inmunofenotípico de la serie blanca y roja en pacientes Gaucher tipo 1" de D. Miguel Fernández Zarzoso, estudiante del programa de doctorado 3139 Medicina (RD99/2011), de la Universitat de València, emiten informe favorable para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Valencia, 29 de febrero de 2024

Firmado: de la Rubia Comos, Javier

Javier de la Rubia
Firmado digitalmente por Javier de la Rubia
Fecha: 2024.02.29 16:58:41 +01'00'
Director

Firmado: Sáez Tormo, Guillermo

GUILLERMO MARIA|SAEZ|TORMO
Firmado digitalmente por GUILLERMO MARIA|SAEZ|TORMO
Fecha: 2024.02.29 18:44:20 +01'00'
Tutor

**ESCUELA DE DOCTORADO
UNIVERSITAT DE VALENCIA**

A mi madre

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Marta Parra, por existir gente buena, alma fundamental del desarrollo de esta tesis, sin cuya ayuda no hubiera sido posible llevar a cabo este trabajo.

Gracias a Amparolo, por su ayuda incondicional y desinteresada en la parte técnica del análisis y procesado de muestras.

Gracias a Elena Gras, por su generosidad y entusiasmo para seguir investigando en la enfermedad de Gaucher.

Gracias a mis dos "Pepitos grillo", Elena Gómez y Guillermo Sáez, por su apoyo moral incansable para gestar esta tesis.

Gracias a Pilar León, por confiar en mí para adentrarme y continuar vinculado a la enfermedad de Gaucher.

Gracias a los compañeros de otros hospitales que remitieron muestras.

Gracias a los pacientes.

INDICE

INTRODUCCIÓN	23
1. EL SISTEMA INMUNE	23
1.1. INMUNIDAD INNATA	23
1.1.1. Barreras físico-químicas	24
1.1.2. Células del sistema inmune innato.....	25
1.1.2.1. Granulocitos	25
1.1.2.2. Monocitos y macrófagos	26
1.1.2.3. Células dendríticas	27
1.1.2.4. Células natural Killer	31
1.2. INMUNIDAD ADAPTATIVA.....	32
1.2.1. Inmunidad humoral.....	33
1.2.1.1. Linfocitos B	34
1.2.2. Inmunidad celular.....	35
1.2.2.1. Linfocitos T	36
1.2.2.1.1. Linfocitos T citotóxicos	38
1.2.2.1.2. Linfocitos T helper o colaboradores	39
1.2.2.1.3. Linfocitos T reguladores o supresores.....	41
1.2.2.2. Linfocitos T $\gamma\delta$	42
1.2.2.3. Linfocitos NKT.....	43
2. LA ENFERMEDAD DE GAUCHER.....	44
3. ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS EN LA ENFERMEDAD DE GAUCHER.....	51
3.1. ANEMIA	51
3.2. TROMBOPENIA	56
3.3. LEUCOPENIA y ALTERACIÓN DEL SISTEMA INMUNE	58

3.4.	GAMMAPATÍAS Y NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	60
3.4.1.	Fisiopatología	60
3.4.2.	Riesgo relativo	62
4.	LA CITOMETRÍA DE FLUJO COMO MÉTODO DE ESTUDIO.....	63
	HIPÓTESIS	71
	OBJETIVOS	75
1.	OBJETIVO PRINCIPAL	75
2.	OBJETIVOS SECUNDARIOS	75
	MATERIAL Y MÉTODOS	79
1.	ÁMBITO	79
2.	DISEÑO	79
3.	POBLACIÓN.....	79
3.1.	GRUPO CONTROL	79
3.2.	GRUPO INTERVENCIÓN	80
3.2.1.	CRITERIOS DE INCLUSIÓN:.....	80
3.2.2.	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:	80
3.3.	TAMAÑO MUESTRAL	80
4.	ASPECTOS ÉTICOS	81
5.	MATERIAL	81
5.1.	MUESTRA.....	81
5.2.	ANALIZADOR Y REACTIVOS.....	82
5.2.1.	CITÓMETRO DE FLUJO	82
5.2.2.	REACTIVOS.....	84
5.2.3.	CONTROL DE CALIDAD.....	84
6.	VARIABLES	85
6.1.	MÉTODO DE RECOGIDA.....	85
6.2.	VARIABLES DEMOGRÁFICAS	85

6.3.	VARIABLES CLÍNICAS.....	85
6.4.	VARIABLES DE LABORATORIO	85
7.	ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO	87
7.1.	PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE HEMATÍES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE GAUCHER.	89
7.2.	PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE LA SERIE BLANCA EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE GAUCHER.....	91
8.	ANÁLISIS DE LOS DATOS	100
8.1.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	100
8.2.	ANÁLISIS DESCRIPTIVO NUMÉRICO.....	100
8.3.	ANÁLISIS DESCRIPTIVO GRÁFICO.....	100
9.	MEMORIA ECONÓMICA.	101
	RESULTADOS	105
1.	VARIABLES DEMOGRÁFICAS.....	105
2.	VARIABLES CLÍNICAS.....	105
3.	VARIABLES DE LABORATORIO	106
3.1.	ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE LA SERIE ROJA.....	107
3.1.1.	Análisis descriptivo numérico.....	107
3.2.	ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE LA SERIE BLANCA..	107
3.2.1.	Análisis descriptivo numérico.....	108
3.2.2.	Análisis descriptivo gráfico	118
3.2.2.1.	Protocolo 45RA-45RO-8-4-3-45.....	119
3.2.2.2.	Protocolo HLADR-LIN-123-85K-11C-45	125
3.2.2.3.	Protocolo TCRVG2-56-19-8-38-4-3-45	131
3.2.2.4.	Protocolo VB11-1D-14-8-VA24-3-45	142

DISCUSIÓN	151
CONCLUSIONES	161
BIBLIOGRAFÍA	165
ANEXOS.....	177

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpos
BCR	Receptor de célula B
CG	Células de Gaucher
CLP	Células progenitoras comunes linfoides
CMP	Células progenitoras comunes mieloides
DC	Células dendríticas
EG	Enfermedad de Gaucher
EG1	Enfermedad de Gaucher tipo 1
EG 2 y 3	Enfermedad de Gaucher tipos 2 y 3
Fc	Fracción constante
GBA	β -glucosidasa ácida o glucocerebrosidasa
GBA1	Gen de la glucocerebrosidasa
GC	Glucosilceramida
GCS	Glucosilceramida sintetasa
GMSI	Gammapatía monoclonal de significado incierto
ICGG	International Collaborative Gaucher Group
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-15	Interleucina-15
IL-17	Interleucina-17
IL-18	Interleucina-18
INF- γ	Interferón γ
iTreg	Células T reguladoras inducidas
LB	Linfocitos B
LT	Linfocitos T
LTCD4	Linfocitos T CD4
LTCD8	Linfocitos T CD8
mDC	Células dendríticas mieloides o monocitoides
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad

MM	Mieloma múltiple
MO	Médula ósea
NK	Linfocitos Natural Killer
NKT	Células Natural Killer T
nTreg	Células T reguladoras naturales
PBS	Tampón fosfato salino
pDC	Células dendríticas plasmocitoides
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RCT	Receptor de célula T
RFc	Receptor de la fracción constante
Tc	Linfocitos T citotóxicos
Th	Linfocitos T helper o colaboradores
Th1	Linfocitos T helper 1
Th2	Linfocitos T helper 2
Th3	Linfocitos T reguladores 3
Th17	Linfocitos TH17
TLR	Receptores Toll-like
TRE	Terapia de reemplazo enzimático
Treg	Linfocitos T reguladores
TRS	Terapia de reducción de sustrato
Tyδ	Linfocitos T gamma-delta

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Tipos de EG según la afectación neurológica.
Tabla 2	Bancada óptica Citómetro de Flujo NAVIOS, dotado de 3 láseres y 10 fluorescencias.
Tabla 3	Poblaciones celulares estudiadas.
Tabla 4	Panel de estudio por citometría de flujo.
Tabla 5	Tratamiento de los pacientes
Tabla 6	Número de pacientes incluidos por mutación del GBA1
Tabla 7	Resumen descriptivo de los resultados de las variables del protocolo CD235c, CD45 y CD47.
Tabla 8	Resumen descriptivo de los recuentos absolutos de las variables del protocolo 45RA-45RO-8-4-3-45.
Tabla 9	Resumen descriptivo de los recuentos absolutos de las variables del protocolo HLADR-LIN-123-85K-11C-45.
Tabla 10	Resumen descriptivo de los recuentos absolutos de las variables del protocolo HLADR-LIN-123-85K-11C-45.
Tabla 11	Resumen descriptivo de los recuentos absolutos y % expresión sobre leucocitos de las variables del protocolo TCRVG2-56-19-8-38-4-3-45.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Principales componentes de la inmunidad innata y adaptativa
- Figura 2** Activación de células de la inmunidad innata
- Figura 3** Inducción y modulación de la respuesta inmune adaptativa
- Figura 4** Supresión de la respuesta inmune
- Figura 5** Estructura de la glucosilceramida (GC) y su degradación en glucosa y ceramida por la glucocerebrosidasa (GBA)
- Figura 6** Prevalencia estimada de EG en países europeos
- Figura 7** Dianas terapéuticas en la EG 1
- Figura 8** Degradación de proteínas asociado al retículo endoplásmico
- Figura 9** Etiología multifactorial de la anemia en la EG
- Figura 10** Cambio conformacional de CD47 e inducción de la fagocitosis
- Figura 11** Análisis por citometría de flujo, FSC/SSC (A), y análisis por microscopía electrónica (B) de eritrocitos normales (N) y eritrocitos de pacientes Gaucher no tratados (G1 a G5)
- Figura 12** Análisis por citometría de flujo, FSC/SSC (A), y análisis por microscopía electrónica (B) de eritrocitos de pacientes antes (G6a-G7a) y después (G6b-G7b) de 9 meses de tratamiento con terapia enzimática sustitutiva
- Figura 13** Alteración inmune en el microambiente de la médula ósea.
- Figura 14** Posición de leucocitos según tamaño y granularidad
- Figura 15** Dispersión de la luz
- Figura 16** Principales componentes de un citómetro
- Figura 17** Ejemplo 1 de resultado de gráfico e histograma
- Figura 18** Ejemplo 2 de resultado de gráficos
- Figura 19** Selección de hematíes según perfil morfológico de dispersión de luz y según marcaje con CD235c, CD45 y CD47.
- Figura 20** Identificación de células dendríticas según perfil morfológico de dispersión de luz y según marcaje con los anticuerpos monoclonales detallados en tubo 1 de la tabla 4
- Figura 21** Identificación linfocitos, monocitos y granulocitos según perfil morfológico de dispersión de luz y según marcaje con los anticuerpos monoclonales detallados en tubo 2 de la tabla 4.
- Figura 22** Identificación linfocitos, monocitos y granulocitos según perfil morfológico de dispersión de luz y según marcaje con los anticuerpos monoclonales detallados en tubo 3 de la tabla 4

- Figura 23** Identificación linfocitos, monocitos y granulocitos según perfil morfológico de dispersión de luz y según marcaje con los anticuerpos monoclonales detallados en tubo 4 de la tabla 4
- Figura 24** Diagrama de distribución del recuento absoluto de leucocitos por grupo.
- Figura 25** Diagrama de distribución del recuento absoluto de CD3+CD4,8- por grupo.
- Figura 26** Diagrama de distribución del recuento absoluto de CD4CD45RA por grupo
- Figura 27** Diagrama de distribución del recuento absoluto de CD4CD45RO por grupo.
- Figura 28** Diagrama de distribución del recuento absoluto de CD8CD45RA por grupo.
- Figura 29** Diagrama de distribución del recuento absoluto de CD8CD45RO por grupo.
- Figura 30** Diagrama de distribución del recuento absoluto de dendriticas HLADR+LIN- por grupo.
- Figura 31** Diagrama de distribución del recuento absoluto de dendriticas HLADR+LIN-CD85K+ por grupo.
- Figura 32** Diagrama de distribución del recuento absoluto de Dendríticas Mieloides (DR+) por grupo.
- Figura 33** Diagrama de distribución del recuento absoluto de Dendríticas Plasmacitoides (DR+) por grupo.
- Figura 34** Diagrama de distribución del recuento absoluto de Dendríticas Mieloides (DR+CD85K+) por grupo
- Figura 35** Diagrama de distribución del recuento absoluto de Dendríticas Plasmacitoides (DR+CD85K+) por grupo.
- Figura 36** Diagrama de distribución del recuento absoluto de leucocitos por grupo.
- Figura 37** Diagrama de distribución del recuento absoluto de linfocitos por grupo.
- Figura 38** Diagrama de distribución del recuento absoluto de monocitos T por grupo.
- Figura 39** Diagrama de distribución del recuento absoluto de granulocitos por grupo.
- Figura 40** Diagrama de distribución del recuento absoluto de linfocitos B por grupo.
- Figura 41** Diagrama de distribución del recuento absoluto de NK por grupo.

- Figura 42** Diagrama de distribución del recuento absoluto de linfocitos T por grupo.
- Figura 43** Diagrama de distribución del recuento absoluto de NKT por grupo.
- Figura 44** Diagrama de distribución del recuento absoluto de CD4 por grupo.
- Figura 45** Diagrama de distribución del recuento absoluto de CD8 por grupo.
- Figura 46** Diagrama de distribución del recuento absoluto de TYd por grupo.
- Figura 47** Diagrama de distribución del recuento absoluto de linfocitos TCRV β 11 por grupo.
- Figura 48** Diagrama de distribución del recuento absoluto de linfocitos TCRV α 24 por grupo.
- Figura 49** Diagrama de distribución del recuento absoluto de monocitos CD1d+ por grupo.
- Figura 50** Diagrama de distribución del % expresión sobre leucocitos de monocitos CD1d+ por grupo.
- Figura 51** Diagrama de distribución del % expresión sobre leucocitos de CD1d+ (MEDIAN peak de MO) por grupo.
- Figura 52** Diagrama de distribución del % expresión sobre leucocitos de CD1d+ (MEAN peak de MO) por grupo.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. EL SISTEMA INMUNE

El sistema inmunológico en un sentido amplio es un mecanismo que permite a un organismo vivo discriminar entre lo propio y no propio. La vida multicelular compleja sería imposible sin la capacidad de excluir la vida externa del ambiente interno [1].

Se reconocen dos grandes tipos de respuesta inmunitaria, el sistema inmune innato y el adaptativo, que difieren tanto en el componente celular que los constituye como en el tipo de respuesta que ejecutan (Figura 1).

1.1. INMUNIDAD INNATA

La inmunidad innata constituida por procesos mecánicos, químicos y respuestas mediadas por células se encarga de combatir una amplia gama de agentes patógenos y limitar la progresión tumoral. Aunque no es específica y no conlleva a respuestas duraderas, es altamente eficaz [2].

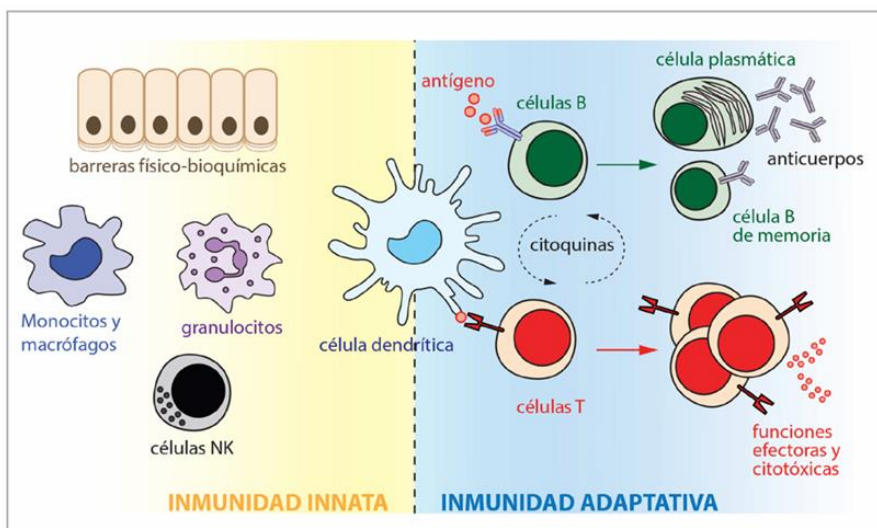


FIGURA 1: **Principales componentes de la inmunidad innata y adaptativa**
(Fuente: actividad de formación continuada, "Puesta al día síndromes linfoproliferativos crónicos y linfomas", formacionlinfomas.com).

1.1.1. Barreras físico-químicas

La primera línea de defensa del organismo la constituyen las barreras físico-químicas. La piel, mucosas, epitelio ciliar respiratorio, moco y pH gástrico, entre otras, forman parte de las barreras físicas. La piel humana, por ejemplo, funciona como una barrera física, química e inmunitaria contra el medio ambiente externo, al tiempo que proporciona un nicho protector para su microbiota residente, conocida como microbioma cutáneo. La cooperación entre la microbiota, las células de la piel huésped y el sistema inmunitario, es responsable del mantenimiento de la salud de la piel, y una alteración de este delicado

equilibrio, en el momento de la invasión por patógenos o una ruptura de la barrera cutánea, puede provocar un deterioro de la función cutánea [3]. Forman parte de las barreras químicas, las enzimas (fundamental la lisozima presente en la mayoría de las secreciones), proteínas de fase aguda, e interferones entre otros.

1.1.2. Células del sistema inmune innato

Las células de la inmunidad innata presentan la capacidad de reconocer agentes y organismos extraños o detectar el daño de sí misma o de las células vecinas [4]. Actúan contra patógenos que penetran a través de estas barreras mucocutáneas y forman parte de estas células los monocitos y macrófagos, granulocitos, células dendríticas (DC) y células natural killer (NK).

1.1.2.1. Granulocitos

Constituido por los neutrófilos, eosinófilos y basófilos, los neutrófilos, las células más abundantes, constituyen parte de la primera línea de defensa contra una amplia gama de patógenos, incluidos las bacterias, los hongos y los protozoos. Los neutrófilos contienen un repertorio de funciones efectoras antimicrobianas que incluyen fagocitosis, degranulación y formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET). Son fagocitos potentes y robustos, que tras la opsonización del microbio, la membrana del neutrófilo comienza a

ingerir al patógeno, mediado por una vía compleja de proteínas de membrana y cascadas de señalización. La fagocitosis es rápida y se produce en cuestión de minutos y se potencia aún más en presencia del sistema del complemento o anticuerpos IgG. Durante este proceso, los gránulos primarios y secundarios se fusionan con el fagosoma y liberan contenido antimicrobiano desempeñando un papel importante en la eliminación de patógenos. Aunque los neutrófilos son fagocitos efectivos, el flujo vascular, podría limitar este comportamiento, y para impedirlo, al detectar bacterias en la sangre, los neutrófilos pueden liberar su ADN en una configuración similar a una red para crear trampas conocidas como NET y, por lo tanto, aumentar la capacidad de captura del organismo en el que se liberan los NET. La captura y eliminación de patógenos parece ser la función principal de los NET [5].

1.1.2.2. Monocitos y macrófagos

Los monocitos son leucocitos que pueden diferenciarse en macrófagos y DC de linaje mieloide. Después de salir de la médula ósea (MO), los monocitos circulan en el torrente sanguíneo durante aproximadamente 1 a 3 días, pasando luego a los tejidos de todo el cuerpo, donde se diferencian en macrófagos y DC. La emigración de monocitos se produce constitutivamente en los tejidos no inflamados y aumenta sustancialmente durante la inflamación, cuando los propios monocitos adquieren un número de propiedades proinflamatorias. En estas circunstancias, los macrófagos que resultan de la maduración de los monocitos también presentan propiedades proinflamatorias y

funciones antiinflamatorias posteriores [6,7]. Este grupo de células cumple tres funciones principales en el sistema inmunitario: fagocitosis, presentación de antígenos y producción de citoquinas. Tanto la fagocitosis como la autofagia representan mecanismos de las células eucariotas para la ingestión y eliminación de materiales no deseados y potencialmente dañinos. Sin embargo, a diferencia de la fagocitosis, la autofagia además de aislar patógenos microbianos, también puede eliminarlos envolviéndolos en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, para luego ser entregados al lisosoma para su degradación a través de procesos catabólicos [7,8].

1.1.2.3. Células dendríticas

Las células dendríticas (DC), una clase de células derivadas de la MO que se encuentran en la sangre, los tejidos y los órganos linfoides, juegan un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune.

Las DC se originan a partir de progenitores hematopoyéticos medulares CD34+. Estos precursores CD34+ se diferencian en células progenitoras comunes mieloides (CMP) y células progenitoras comunes linfoides (CLP).

Un obstáculo para la detección y estudio de las DC hasta el descubrimiento de los antígenos específicos ha sido la ausencia de un marcador en la superficie celular específico de esta estirpe celular. Se caracterizan por la elevada expresión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II y la ausencia de marcadores de

linaje como CD14 (monocitos), CD3 (Linfocitos T), CD19, CD20 y CD24 (Linfocitos B), CD56 (NK) y CD56b (granulocitos). Presentan moléculas de adhesión comunes con monocitos y macrófagos (CD11a, CD11c, CD50, CD54, CD58, CD102) y moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86). Su fenotipo varía a lo largo de los diferentes estados de maduración y activación. Los precursores circulantes en la sangre pueden expresar CD2, CD4, CD13, CD16, CD32 y CD33, que van perdiendo gradualmente con la maduración. En sangre periférica circulan dos tipos de DC fenotípica y funcionalmente diferentes. Se distinguen por su expresión de CD11c y CD123. Las DC CD11c+CD123^{lo} tienen una morfología monocitoide, por lo que se denominan DC monocitoides o mieloides (mDC), mientras que las DC CD11c-CD123^{hi} presentan características morfológicas similares a las células plasmáticas, por lo que se han denominado DC plasmacitoides (pDC). Las mDC se clasifican según su localización: residentes en tejidos periféricos, residentes en órganos linfoides secundarios y mDC circulantes. Estas últimas en humanos sanos suponen un total de $14,2 \pm 3,9$ células/L [9]. Las pDC, importantes en las respuestas inmunes antivirales, circulan por el torrente sanguíneo y entran en los órganos linfoides a través de las vénulas de endotelio alto. En sujetos sanos suponen $8,9 \pm 1,7$ células/ L.

Las DC inician la respuesta inmune tanto innata como adaptativa, sin participar directamente en actividades efectoras de destrucción de patógenos. En un sentido amplio, la función de las DC es tender un puente entre los sistemas inmunológicos innato y adaptativo. Las DC participan en la inmunidad innata porque detectan

patógenos mediante receptores de reconocimiento de patrones. Son las principales células presentadoras antigénicas, por su capacidad de capturar, procesar y presentar antígenos (derivados de patógenos, células apoptóticas o tumorales) de forma óptima a Linfocitos T (LT), y generar respuestas inmunes específicas [10,11]. Las DC estimulan a los LT de una manera mucho más potente que los macrófagos o los Linfocitos B (LB), tras su activación, los LT vírgenes sufren una expansión clonal y una diferenciación a células efectoras secretoras de citoquinas y células memoria. Además de su papel central en la activación de los LT, las DC interactúan directamente con NK, células NKT (NKT) y LB. [9].

El reconocimiento de la mayoría de los microorganismos está mediado por varias familias de receptores que colectivamente “vigilan” espacios intra y extracelulares, siendo sensibles a la detección del mínimo signo de infección. Estos receptores de reconocimiento de patrones (PRR), codificados por genes de línea germinal, reconocen ligandos (“Patrones Moleculares Asociados a patógenos (PMAP)”) y activan células de la rama innata del sistema inmune, incluyendo DC. Son PRR los TLR (receptores Toll-like), RLR (receptores RIG-I-like) y NLR (receptores Nod-like), constituyendo la familia de los TLR uno de los grupos más importantes dentro de los PRR (Figura 2). Los ligandos microbianos que pueden activar DC, macrófagos y otras células presentadoras de antígenos permitiendo una presentación efectiva a células del sistema inmune adaptativo. Se han descrito 11 tipos diferentes de TLR, que reconocen una amplia variedad de componentes microbianos, ampliamente distribuidos la mayoría en diferentes tipos

celulares del sistema inmune, incluyendo DC, macrófagos, NK, mastocitos, neutrófilos y LT y B [11].

La presentación de antígenos por parte de las DC en estado atenuado podría provocar que los LT no respondan y podría promover la tolerancia. De ahí el papel de las DC en las infecciones microbianas, patologías autoinmunes, reacciones alérgicas, rechazo de trasplantes, y respuestas inmunes antitumorales, y las vías de diferenciación de las DC. La evidencia de estudios científicos y modelos experimentales, posiciona a las DC en la patogénesis de la mayoría de las enfermedades autoinmunes [11,12].

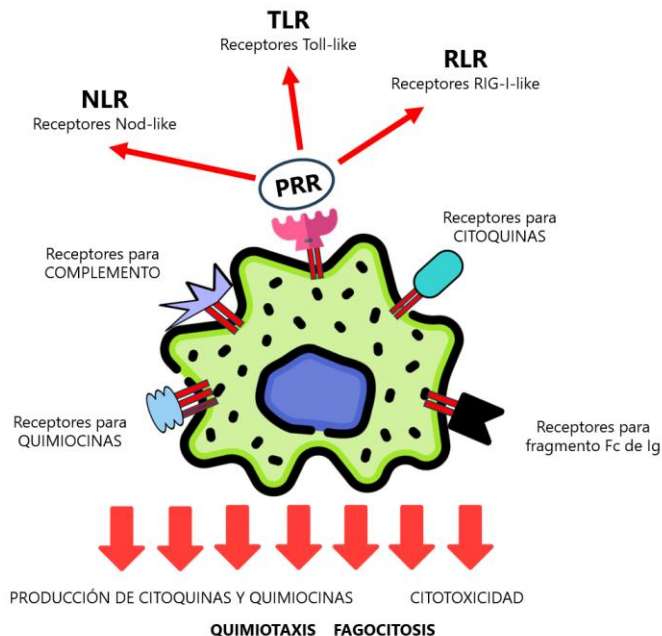


Figura 2: **Activación de células de la inmunidad innata.** Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) reconocen los patrones moleculares

asociados a patógenos (PMAP) y generan señales de alerta en el hospedador respecto de la presencia de un microorganismo infeccioso. (Fuente: figura adaptada de <https://inmunologiabasica2016.blogspot.com/2016/10/inmunidad-innata-frente-microorganismos.html>)

1.1.2.4. Células natural Killer

Las células natural killer (NK) son linfocitos grandes granulares que derivan de la MO capaces de eliminar microorganismos (protozoos y bacterias) y células infectadas por virus, así como lisar células tumorales de forma rápida y espontánea [13]. Las NK se distinguen de otros linfocitos al no expresar ni el receptor de la célula B (BCR) ni de las células T (TCR), y que no sufren procesos de reordenamiento genético para la expresión de sus receptores antigénicos. El fenotipo característico de una célula NK es CD16+, CD56+ y CD3-. Estas células se encuentran mayoritariamente en sangre periférica, donde constituyen alrededor del 10% de la población linfoide, pero también existen NK residentes en tejidos. En el torrente sanguíneo existen dos subpoblaciones de células NK, una con alta expresión de CD16 y baja expresión de CD56, y otra al contrario. La primera presenta una capacidad citotóxica mayor y la segunda, una mayor capacidad para la secreción de citocinas y quimiocinas [14,15].

La respuesta inmune mediada por las células NK está regulada de una forma muy precisa por el resultado final entre señales activadoras e inhibidoras, enviadas al interior celular por receptores de superficie específicos.

Hay dos eventos que inducen la activación de las células NK: el reconocimiento de la célula diana adecuada y la estimulación debida a ciertas citocinas. Las células NK vigilan los tejidos, eliminando aquellas células que no expresan moléculas propias del MHC de clase I o que presentan una expresión aberrante o disminuida de las mismas. En segundo lugar, las DC y macrófagos infectados o activados producen citocinas como IFN- α/β , interleucina-12 (IL-12), interleucina-15 (IL-15) e interleucina-18 (IL-18) que estimulan a las células NK a producir sus propias citocinas mediante un mecanismo de citotoxicidad efectiva basado en la secreción de gránulos de su citoplasma. Ambos procesos culminan en sus dos funciones efectoras más significativas, la lisis y la producción de citocinas [15].

1.2. INMUNIDAD ADAPTATIVA

El sistema inmune adaptativo es una parte crucial del sistema inmunológico que proporciona respuestas específicas y adaptativas contra patógenos concretos. Existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, llamadas inmunidad humoral e inmunidad celular, en las que intervienen componentes diferentes del sistema inmunitario y que sirven para eliminar microorganismos de distintos tipos. Las células que llevan a cabo esta respuesta junto con sus productos, son los LB y LT, que son responsables de la respuesta humoral y celular de la inmunidad adaptativa respectivamente, células capaces de reconocer y recordar patógenos específicos

Los linfocitos se generan en la MO y, en el caso de los LT, su maduración transcurre en el timo. Posteriormente, pasan a la circulación sanguínea y permanecen en alerta en los nódulos linfáticos ante la invasión de microorganismos extraños o células alteradas.

El proceso de la respuesta adaptativa consta de 5 fases [16]:

- Reconocimiento del antígeno extraño
- Identificación, activación y expansión de células con moléculas que reconocen específicamente a ese antígeno, dando lugar a clones antígeno específicos.
- Diferenciación de las células en reposo a células con fenotipo efector.
- Desarrollo de la respuesta propiamente dicha: las células o sus productos inactivan y eliminan a los patógenos.
- Inactivación de las células efectoras una vez resuelta la situación.

1.2.1. Inmunidad humoral

La inmunidad humoral cuenta con unas moléculas presentes en la sangre y en las secreciones mucosas, que reciben el nombre de anticuerpos (Ac), producidas por los LB. Los Ac reconocen los antígenos microbianos, neutralizando y marcando a los microorganismos para su eliminación por los fagocitos y el sistema del complemento. La inmunidad humoral es el principal mecanismo de

defensa contra los microorganismos extracelulares y sus toxinas debido a que los Ac secretados pueden unirse a ellos y contribuir a su destrucción [17].

1.2.1.1. Linfocitos B

Los LB son responsables de la inmunidad humoral. Su función principal es la defensa del huésped contra gérmenes por medio de la secreción de Ac que reconocen las moléculas antigénicas de los patógenos y dirigiendo contra ellos una serie de mecanismos efectores destinados a destruirlos. Transducen señales al interior de la célula B iniciándose así un programa de diferenciación y activación celular de la célula B. La célula B activada que reconoce antígenos con su BCR se diferencia en un clon de células plasmáticas secretoras de Ac específicos que reconocen a los patógenos y los neutralizan.

También tienen otras funciones como la presentación de antígenos a los LT. Las interacciones antígeno específicas entre células T y B requieren que la célula B internalice el antígeno unido a su BCR, lo procese, lo asocie a moléculas de histocompatibilidad de clase II y lo presente a los linfocitos T helper CD4.

También actúan como células inmunorreguladoras, existiendo una subpoblación de células B, las células B reguladoras, que contribuyen al mantenimiento de la tolerancia y que limitan las respuestas inflamatorias por medio de la secreción de interleucina 10 (IL-10) que inhibe las citoquinas proinflamatorias y favorece la diferenciación de las

células T CD4 en células T reguladoras (Treg) que también contribuyen al mantenimiento de la tolerancia y la inhibición de la inflamación.

Y como última función, la diferenciación hacia células B memoria. Estas células B memoria producen Ac de alta afinidad e isotipos cambiados que nos protegen permanentemente al recordar los antígenos que las estimularon y el tipo de respuesta (de IgG, IgA o IgE) y los patrones de producción de citoquinas que fueron eficientes en la resolución de la infección inicial.

La opsonización de partículas antigénicas se realiza por los isotipos IgG1 e IgG3. Esta función hace que las partículas antigénicas sean reconocidas por las células fagocíticas, facilitando así su fagocitosis. Las células fagocíticas presentan receptores para la fracción constante (Fc) de la IgG que intervienen en la fagocitosis de los complejos antígeno anticuerpo (inmunocomplejos) [18,19].

1.2.2. Inmunidad celular

Es mediada por LT y constituye el principal mecanismo de defensa contra microorganismos intracelulares (virus y algunas bacterias) promoviendo la destrucción de estos en fagocitos o eliminando células infectadas. Los LT se dividen en dos subtipos principales: linfocitos T CD4+ (LTCD4) cuya función principal es la secreción de citoquinas y los linfocitos T CD8+ (LTCD8) que eliminan células infectadas y tumorales [20].

El proceso de reconocimiento de antígenos, activación e inicio de la actividad efectora de los LT requiere su intercambio de información con la célula que ha identificado y atrapado al patógeno. Este campo de contacto entre células y diferentes moléculas constituye lo que se denomina sinapsis inmunitaria [16].

1.2.2.1. Linfocitos T

El desarrollo de los LT comienza con los progenitores tímicos derivados de la MO en el timo, donde las células T pasan por una serie de etapas de desarrollo que incluyen expresión de antígenos doble negativo (CD4–CD8–), doble positivo (CD4+CD8+) y positivo simple (CD4–CD8+ o CD4+CD8–). Después de la selección positiva, las células doble positivas portadoras de RCT MHC clase I o MHC clase II se diferencian en células T CD8+ o CD4+, dependiendo de la señalización de TCR o la estimulación de citocinas [21].

El proceso de activación del LT genera, a partir de un pequeño grupo de linfocitos vírgenes o *naïve* específicos frente a un antígeno, un gran número de linfocitos efectores con la misma especificidad que actúan para eliminar a ese antígeno y una población de linfocitos memoria de vida larga que pueden reaccionar rápidamente contra el antígeno en el caso de que se reintroduzca que pueden persistir durante años, e incluso toda la vida. Lo que define a los linfocitos memoria es su capacidad de sobrevivir en un estado quiescente después de que se ha eliminado el antígeno y de montar respuestas más rápidas y potenciadas a los mismos antígenos de los linfocitos

naïve. En los seres humanos, la mayoría de los LT *naïve* expresan la isoforma de 200 kDa de la molécula de superficie CD45 llamada CD45RA, y la mayoría de los linfocitos T memoria expresan una isoforma de 180 kDa llamada CD45RO.

Los linfocitos T se clasifican en 3 subgrupos según su capacidad funcional y fenotípica [16]:

- los linfocitos T citotóxicos (Tc), con capacidad efectora que expresan CD8,
- los linfocitos T helper (colaboradores) (Th), encargados de coordinar la acción efectora de los diferentes tipos celulares,
- y los linfocitos T reguladores (supresores) (Treg) encargados de desmontar la respuesta inmune una vez vencida la infección. Th y Treg expresan CD4.

1.2.2.1.1. Linfocitos T citotóxicos

Los Tc cumplen un papel central en la defensa inmunitaria, en particular contra células infectadas por virus, bacterias y protozoos; además, se han relacionado con la eliminación de algunas células tumorales y células con MHC clase I incompatible en trasplantes.

La respuesta específica de los Tc contra un patógeno se inicia a través del reconocimiento de antígenos presentados de modo adecuado por moléculas del MHC I y señales derivadas de coestimulación, sobre todo a través de CD40 expresado en las células presentadoras de antígenos [21,22]. Pese a ello, esta respuesta no es del

todo independiente de otros tipos celulares, es preciso un mecanismo que permita activar a las células T CD8+ para inducir su expansión clonal, el desarrollo de su función efectora y la generación de memoria. Para ello se ha señalado que existe un proceso regulado de cooperación entre las células T CD8+, CD4+ y DC.

El modelo planteado hasta el momento sobre la participación de DC en la activación de LTCD8 señala que las DC capturan el antígeno por varias vías y pueden fagocitarlo directamente si se encuentra libre en el medio extracelular o bien adquirirlo de células apoptóticas o necróticas. Con posterioridad lo procesan y presentan a través del MHC II a las células T CD4+, las cuales sobrerregulan la expresión de CD40L y, mediante la interacción con CD40, activan o inducen a las DC para estimular la respuesta de LTCD8 vírgenes que reconocen el antígeno MHC I en las DC.

Su función efectora se realiza a través de dos mecanismos básicos: citotoxicidad y liberación de citocinas. Para lograr su función citotóxica, los LTCD8 emplean dos mecanismos complementarios, uno mediado por la exocitosis de gránulos líticos que contienen moléculas como perforina y otro mediado por moléculas de los gránulos líticos de la familia de las catepsinas. El otro mecanismo de participación de los LTCD8 es la liberación de citocinas, como interferón γ (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 10 (IL-10) [22,23].

1.2.2.1.2. Linfocitos T helper o colaboradores

Los linfocitos T helper (Th) son los linfocitos T CD4+ encargados de coordinar la acción efectora de los diferentes tipos celulares. Existe una diferenciación en 3 subtipos celulares a partir de los linfocitos quiescentes, que se determina en la sinapsis inmunitaria, en función de las citocinas que están presentes y que funcionan como terceras señales durante el proceso de activación.

- Linfocitos Th1 (Th1) a los linfocitos secretores de IFN- γ e IL-2.
- Linfocitos Th2 (Th2) a los linfocitos que liberan IL-4 e interleucina 13 (IL-13).

Las Th1 son altamente efectivas en la eliminación de patógenos intracelulares y las Th2 son de gran importancia en la eliminación de microorganismos extracelulares y parásitos.

- Linfocitos Th17 (Th17), secretores de interleucina 17 (IL-17). Desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra bacterias de crecimiento extracelular y hongos. Asimismo, se ha descrito para ellas un efecto proinflamatorio que les permite hacer de puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa

Los Th se inactivan mutuamente, de modo que los Th1 (a través del IFN- γ) inhiben selectivamente la actividad de los Th2 y los Th17. A

su vez, los Th2 inhiben la proliferación de los Th1 y los Th17 mediante la IL-10 y la IL-4, y los Th17 inhiben a Th1 y a Th2 [16].

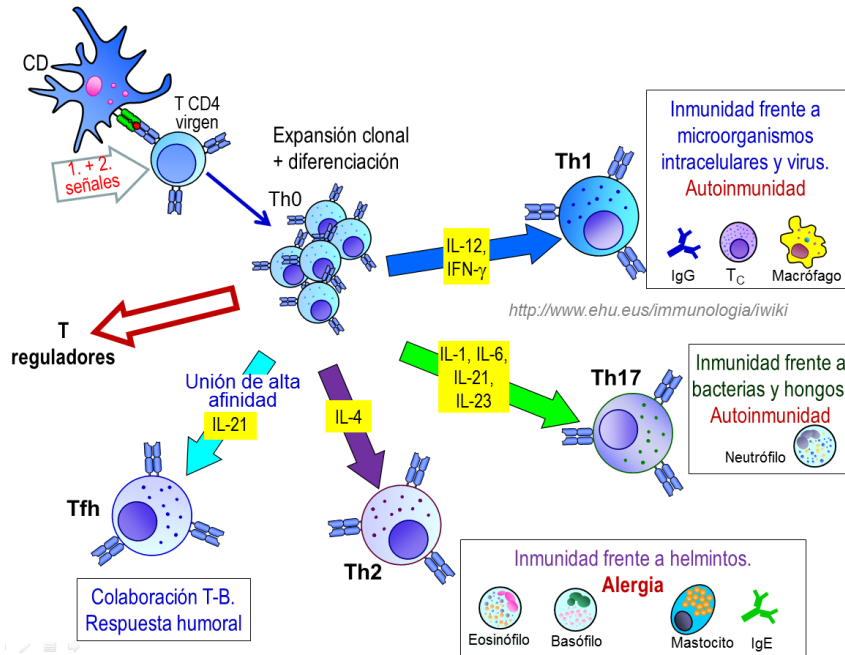


Figura 3: **Inducción y modulación de la respuesta inmune adaptativa.** Las células dendríticas presentan una característica común basada en recoger la información del tipo de patógeno que infecta el tejido mediante las señales del tipo de inflamación (citocinas y otras moléculas inflamatorias) producidas en el tejido infectado; seguidamente presentan antígenos a los LT vírgenes, para activar una respuesta inmune adaptada a las características del patógeno (extracelular, intracelular citosólico o intracelular intravacuolar) mediante la inducción de la diferenciación del LT CD4+ a Th1, o a Th17, o a Thf, o a Th2. (Fuente: <https://www.ehu.es/immunologia/iwiki/img/es/Th.png>)

1.2.2.1.3. Linfocitos T reguladores o supresores

Los linfocitos T reguladores (Treg) son las células con capacidad de suprimir las respuestas inmunes frente a antígenos específicos. Se considera que el fenotipo CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ es el mejor marcador de las Treg en humanos. Se caracterizan por una alta expresión de la cadena alfa del receptor de IL-2, citocina inhibidora de IL-10, TGF- β e IL-35, y factor de transcripción Foxp3.

Se identifican dos subtipos principales de células Treg en función de su origen en el desarrollo: las células Treg tímicas, también conocidas como células Treg naturales (nTreg) que derivan del timo, y las células Treg inducidas (iTreg) que se diferencian de las células T CD4⁺ convencionales en la periferia, después de la estimulación con antígenos y en presencia de TGF- β e IL-2 [21]. Las que mejor se conocen son las iTreg Tr1 y las Th3. Las Tr1 se diferencian tras la presentación del antígeno por DC inmaduras en presencia de citocinas como la IL-10. Se localizan en tejidos inflamados y realizan su función supresora de una forma no dependiente del antígeno, a través de citocinas supresoras como IL-10 y TGF- α . Las Th3 son productoras de TGF- β con un funcionamiento muy similar al de las Tr1[16] (Figura 4).

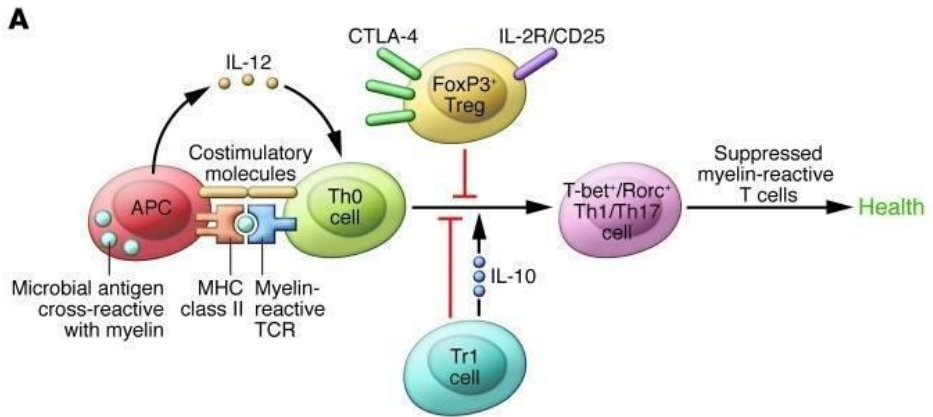


Figura 4: **Supresión de la respuesta inmune.** Las células presentadoras de antígenos digieren antígenos y los presentan a las células T *naïve* en el contexto de moléculas coestimuladoras. Un entorno apropiado de citoquinas conduce a la diferenciación de estos linfocitos T a un fenotipo de células Th1 o Th17. Estos LT son suprimidos a través de células reguladoras periféricas, como las células FoxP3⁺ Treg y las células Tr1 a través de la acción de moléculas coinhibidoras y citoquinas como IL-10 y TGF- β (Fuente: J Clin Invest. 2012;122(4):1180-1188. <https://doi.org/10.1172/JCI58649>).

1.2.2.2. Linfocitos T Y δ

Representan sólo un pequeño porcentaje del total de LT en sangre periférica. Se caracterizan por la expresión de un RCT heterodimérico, formado por las cadenas Y y δ que las distingue de las células T clásicas ($\alpha\beta$), LTCD4⁺, LTCD8⁺, que expresan un RCT formado por las cadenas α y β . La mayoría de los linfocitos T Y δ (LTY δ) periféricos son dobles negativos para CD4 y CD8. Las características fenotípicas y función, de los linfocitos T Y δ son mucho menos conocidas que las de los linfocitos T $\alpha\beta$.

Se localizan principalmente en epitelios, conocidos como linfocitos intraepiteliales Y δ . La ubicación de los LTY δ en las superficies

epiteliales, sugiere que estos forman parte de la primera línea de defensa del organismo, donde estas células no responderían a una diversidad de antígenos microbianos, sino a antígenos de estrés comunes, que serían marcadores de infección celular o transformación. Se ha demostrado que los LTY δ reconocen MHC de clase I y de clase II y moléculas relacionadas con MHC de clase I denominadas MIC, todas ellas con capacidad de presentación antigénica, permitiendo a los LTY δ una respuesta rápida y amplia (por su variedad en los modos de reconocimiento), lo que se corresponde con su importante papel en la inmunidad innata o inespecífica. Además del reconocimiento antigénico y la actividad citotóxica, las capacidades funcionales de los LTY δ en el sistema inmune innato incluyen la síntesis de quimiocinas que atraen células inflamatorias a los lugares de daño tisular y la secreción de citocinas, como el IFN- γ , que activan macrófagos y otras células relacionadas con la respuesta inmune innata. [24].

1.2.2.3. Linfocitos NKT

Las células NKT (NKT) son un subconjunto especializado de LT reactivos a los lípidos que desempeñan funciones directas e indirectas en la inmunovigilancia y la inmunidad antitumoral. Las NKT son LT que expresan, además del CD3 con receptor de linfocito T $\alpha\beta$, receptores propios de células NK como CD161. Su capacidad de inducir tolerancia no se conoce bien, aunque parece estar mediada por interacciones con otras células reguladoras y la secreción de citocinas moduladoras de la respuesta, como IL-4, IL-10 y TGF- α [16,25].

2. LA ENFERMEDAD DE GAUCHER

La enfermedad de Gaucher (EG) es una enfermedad de depósito lisosomal que ocurre por el déficit en la actividad de la enzima β -glucosidasa ácida, también conocida como glucocerebrosidasa (GBA), que conlleva el depósito de su sustrato la glucosilceramida (GC) en los lisosomas de los macrófagos [26]. La GBA escinde el glucolípido GC (también denominado glucocerebrósido) en glucosa y ceramida dentro de los lisosomas (Figura 5) [27]. El compromiso en el catabolismo de la GC y la congestión de los macrófagos por este sustrato conduce a las manifestaciones viscerales de la EG.

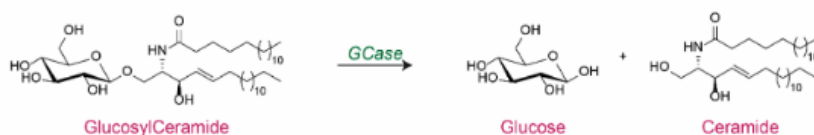


Figura 5. **Estructura de la glucosilceramida (GC) y su degradación en glucosa y ceramida por la glucocerebrosidasa (GBA) [27].**

La GBA está codificada por el gen de la glucocerebrosidasa (GBA1), localizado en el cromosoma 1q21 [28,29]. La EG es una enfermedad de herencia autosómica recesiva monogénica, producida por mutaciones en el GBA1. Se han descrito hasta el momento, más de 300 mutaciones asociadas al gen, y la identificación de estas mutaciones ofrece la oportunidad de desarrollar genotipos y correlaciones

fenotípicas, fundamentalmente en la caracterización de afectación neuropática. El alelo N370S en individuos afectados, incluso en combinación con un alelo mutante GBA1 diferente, es predictivo de enfermedad no neuropática conocida como EG tipo 1 (EG1). La segunda circunstancia es la correlación con la EG neuropática, los tipos 2 y 3 (EG 2 y 3), en la que, alelos que contienen la sustitución L444P son fuertemente, aunque no exclusivamente, asociados con el desarrollo de enfermedad neuropática [30]. Tabla 1.

Tabla 1: **Tipos de EG según la afectación neurológica.** EG tipo 2, afectación muy grave del sistema nervioso central (SNC). EG tipo 3, afectación grave del SNC.

Tipo	Mutaciones	Afectación neurológica	Inicio	Supervivencia
Tipo 1 (92% de casos)	N370S	No	Infancia/ Edad adulta	Variable
Tipo 2 (1% de casos)	L444P	SI	Infancia	≤ 2 años
Tipo 3 (7% de casos)	L444P homocigoto	SI	Infancia/ adolescencia	2ª a 4ª décadas

La incidencia de la EG se asocia con el origen étnico y se sabe que es más alta en la población de ascendencia judía Ashkenazi (estimada en 1 de cada 450 nacimientos de EG1). La alta frecuencia de la EG1 en los judíos Ashkenazi ha llevado a la caracterización de fenotipos de la enfermedad principalmente sobre la base de esa población. Sin embargo, la EG afecta a todos los grupos étnicos y es muy probable que en muchos

países se subestiman los grupos y la prevalencia. Los datos de incidencia estimada global de la EG en general, definen la EG en minoritaria y oscilan entre 0,45 y 25,0 por 100 000 nacidos vivos, con una prevalencia estimada por 100.000 habitantes entre 0,02 y 139,0, situándose en una prevalencia de 0,67 para España y Portugal (Figura 6) (datos derivados principalmente de estudios de cohortes en Europa y América del Norte) [31].

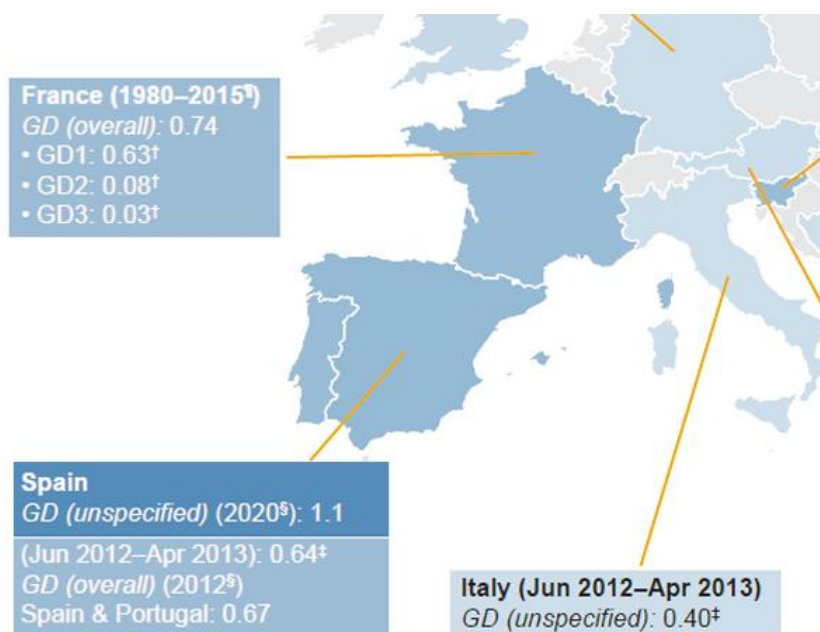


Figura 6. **Prevalencia estimada de EG en países europeos** [31].

Para el diagnóstico de la EG es preciso demostrar la disminución de la actividad de la GBA mediante análisis de leucocitos de sangre periférica o fibroblastos cultivados, y los alelos mutados del GBA1 mediante análisis molecular. Dos mutaciones son las responsables de hasta un 80-90 % de las mutaciones observadas en pacientes judíos ashkenazi con la EG:

N370S y 84GG. Las mutaciones L444P y N370S representan más de la mitad de las mutaciones en pacientes blancos no judíos.

Las manifestaciones clínicas de la EG son consecuencia del depósito de GC en los macrófagos en los diferentes territorios, y se caracteriza por hepatoesplenomegalia, citopenias, afectación ósea más o menos grave y, en los tipos 2 y 3, deterioro neurológico. La variabilidad en las presentaciones clínicas de la EG puede explicarse por la continuidad de fenotipos [32].

La esplenomegalia suele estar presente en el 90% de los pacientes en el momento del diagnóstico, estando aumentado el bazo hasta 15 veces el tamaño normal, alcanzando en ocasiones formas masivas según los datos del International Collaborative Gaucher Group (ICGG) [33]. La acumulación progresiva de macrófagos en tejido esplénico y el estado de inflamación crónica son la causa de la esplenomegalia [33]. Dolor abdominal, saciedad temprana y distensión abdominal serán los síntomas referidos por los pacientes.

Se ha descrito afectación hepática en la mayoría de los pacientes con EG (60-80%) [33], e incluye hepatomegalia, con o sin alteración de las enzimas hepáticas, fibrosis/cirrosis, hipertensión portal, lesiones hepáticas focales y colelitiasis. Además, la EG se asocia con varias alteraciones bioquímicas incluyendo hipergammaglobulinemia, hiperferritinemia y anomalías metabólicas, que pueden conducir a diagnósticos erróneos con enfermedades hepáticas crónicas de etiología común [34,35].

La afectación ósea es uno de los aspectos más prevalentes de la EG y una de las principales causas de dolor, discapacidad y reducción de la calidad de vida. Los mecanismos de la afectación ósea no se conocen

totalmente, pero son el resultado de la infiltración del espacio medular óseo por las células de Gaucher (CG) [36] afectando el comportamiento normal de la MO y a los componentes minerales del hueso. Los cambios incluyen infiltración de MO, anomalías en el modelado y remodelado de los huesos, lo que resulta en cambios en el desarrollo y pérdida de mineral óseo (osteopenia/osteoporosis), adelgazamiento cortical, lesiones líticas y fracturas por fragilidad; y en tercer lugar, osteonecrosis y fenómenos relacionados (infartos medulares, osteoesclerosis, infartos corticales y articulares, destrucción y deformidades) [37].

Las citopenias en la EG1 no tratada son casi constantes y están producidas tanto por secuestro de los productos sanguíneos en el bazo agrandado como por la mieloptisis. El acúmulo de CG en la MO provoca desplazamiento del tejido hematopoyético, proceso denominado mieloptisis, y citopenias periféricas. La anemia y la trombopenia son las citopenias más frecuentes.

La anemia es menos común, pero cuando es grave, se asocia con un fallo de la MO causada por la infiltración y reemplazo de médula hematopoyética.

Las dos opciones terapéuticas principales en la EG son la terapia de reemplazo enzimático (TRE) y la terapia de reducción de sustrato (TRS). La TRE, recupera la actividad de la enzima defectuosa GBA, mediante la administración de una enzima recombinante de forma exógena, eficaz para aliviar los síntomas viscerales y óseos, características del subtipo más frecuente de la enfermedad, mientras que no actúa en las manifestaciones del SNC en la EG tipo 2 y 3, ya que la proteína recombinante es incapaz de atravesar significativamente la barrera

hematoencefálica. [38,39]. En España disponemos de la aprobación de dos TRE, la imiglucerasa (Cerezyme®) obtenida del cultivo celular procedente de ovario de hámster chino [40], y la velaglucerasa (VPRIV®) sintetizada a partir de fibroblastos humanos, ambas aprobadas en la EG 1 y 3 y EG 1 respectivamente [41]. La segunda estrategia, la TRS, actúa como diana terapéutica inhibiendo la glucosilceramida sintetasa (GCS), la enzima responsable de la producción de la molécula de almacenamiento asociada GC [28,29] (Figura 7).

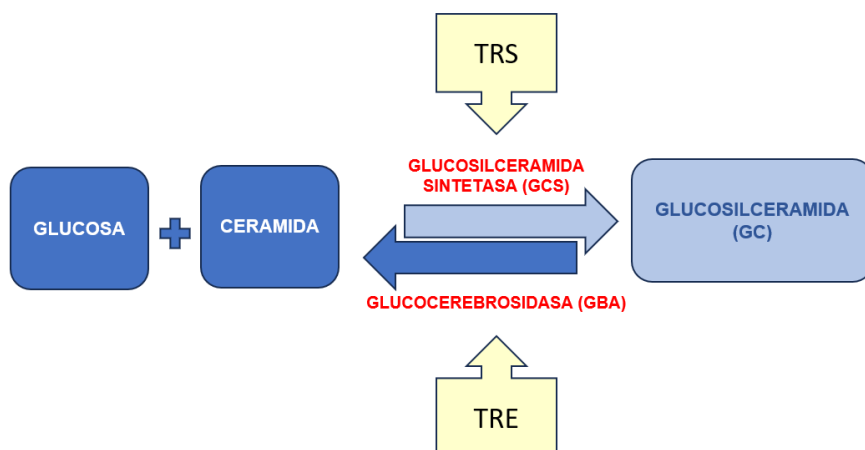


Figura 7. **Dianas terapéuticas en la EG 1.** TRE: terapia de reemplazo enzimático, TRS: terapia de reducción de sustrato. (Figura adaptada de JA Shayman. *Drugs Future*. 2010) [42].

Existen otros tratamientos con menos desarrollo clínico, que incluye la terapia con chaperonas cuya función es recuperar la actividad de la GBA mediante la corrección de las enzimas mal plegadas [43]. Recordemos que en la EG, la GBA, codificada por el GBA1, es degradada

en el retículo endoplásmico tras un mal plegamiento después de su síntesis, lo que conduce a una disminución de la actividad enzimática. (Figura 8).

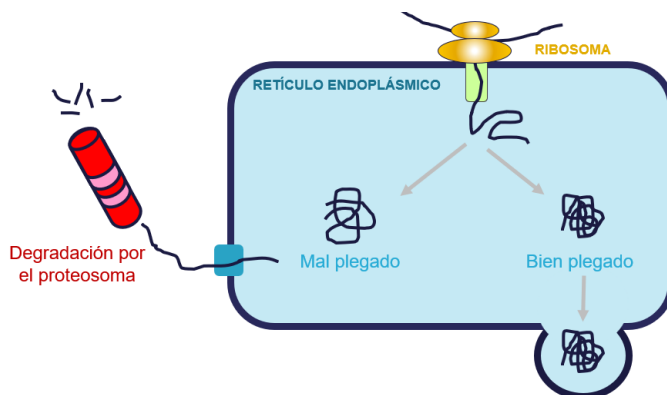


Figura 8. **Degradación de proteínas asociado al retículo endoplásmico.** En las células eucariotas, tras la síntesis de proteínas, o en este caso la enzima GBA en los ribosomas, estas se dirigen a la membrana del retículo endoplasmático (RE) después de su síntesis en el citosol. Después de la inserción en la membrana, las proteínas adquirirán su estructura tridimensional nativa, un elaborado proceso que a menudo falla. La célula ha desarrollado varios mecanismos para asegurar que sólo las proteínas correctamente plegadas permanezcan presentes. En primer lugar, una variedad de chaperonas asiste en el plegamiento de las proteínas. En segundo lugar, si las proteínas no pueden ser plegadas adecuadamente, una maquinaria especializada las identificará finalmente como mal plegadas para su posterior degradación por el proteosoma. (Fuente: Imagen creada tras adaptación de: Laboratorio Veit Goder, Sevilla. <https://personal.us.es/vgoder/SpanishResearchVG.html>).

La terapia génica y edición genómica están en vías de investigación en la EG. El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos ha relegado su uso al de la TRE y TRS dada la eficacia y poca toxicidad de estos últimos.

3. ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS EN LA ENFERMEDAD DE GAUCHER

Los parámetros hematológicos anormales son comunes en la EG y sus cambios sirven además para el seguimiento de la enfermedad y la respuesta a la terapia. El trastorno hematológico puede ser cuantitativo, manifestándose como citopenias, o cualitativo, alterando la función de los elementos sanguíneos, con una tendencia a la hemorragia, o alteraciones inmunológicas. Anemia, trombocitopenia y en menor medida leucopenia son consecuencia de infiltración de MO, agravada por secuestro esplénico y se puede observar de forma simultánea o independiente. La tendencia al sangrado no siempre está relacionada con el recuento de plaquetas, sino que a veces puede verse influenciado por déficits en la función o los niveles de factores de la coagulación [44].

3.1. ANEMIA

La causa principal de la anemia es el secuestro de los hematíes en el bazo y la infiltración de la MO por las CG. El hecho de que la anemia pueda estar presente en pacientes esplenectomizados, atribuye a la anemia otras causas con una etiología multifactorial, (Figura 9).

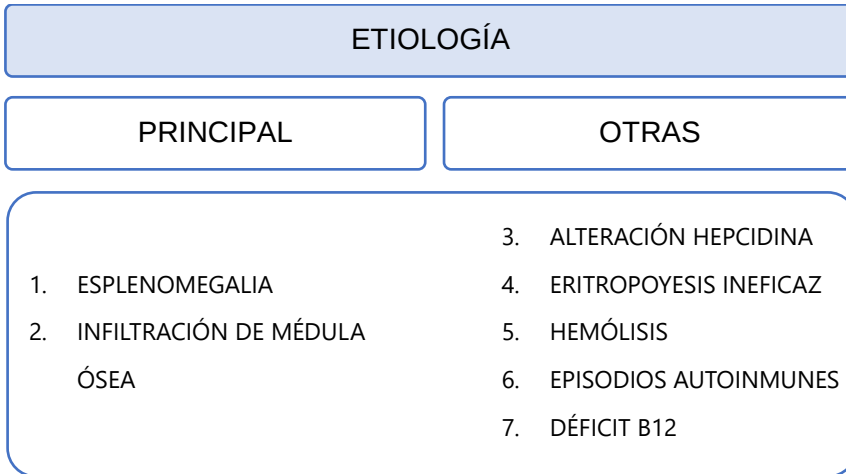


Figura 9. **Etiología multifactorial de la anemia en la EG.**

La eritropoyesis ineficaz y la hemólisis se han propuesto también como causas que contribuyen a la aparición de la anemia.

Estudios recientes sugieren que la acumulación de GC en otros tipos de células como las eritroides contribuirían en la fisiopatología de la anemia. Se ha detectado actividad de la GBA en estadios tempranos de la maduración normal de la línea eritroide y por tanto la acumulación de GC en eritroblastos ayudaría a la eritropoyesis ineficaz. La alteración en la composición de la membrana del hematíe impediría una normal deformabilidad a su paso por la microcirculación, produciéndose la hemólisis de los hematíes [44,45,46].

Una molécula de adhesión celular (MAC) se define como un receptor de la superficie celular capaz de unirse a otras células o a algún

sustrato de la matriz extracelular por medio de la interacción con su ligando. Una MAC altamente expresado en el glóbulo rojo es CD47, que además de participar en la migración transcelular y en la adhesión celular, inhibe la fagocitosis de los eritrocitos por los macrófagos del sistema fagocítico mononuclear, a través de la unión a proteínas regulatorias de las señales (SIRP α) en el macrófago que a su vez induce la señalización inhibitoria [47,48]. Durante el envejecimiento del hematíe, se induce un cambio conformacional en CD47, que le permite unirse a la trombospondina (TSP-1) creando un nuevo sitio de unión para SIRP α , que es capaz de reconocer a CD47 como una señal de fagocitosis en lugar de una señal inhibitoria de este mecanismo (Figura 10) [49].

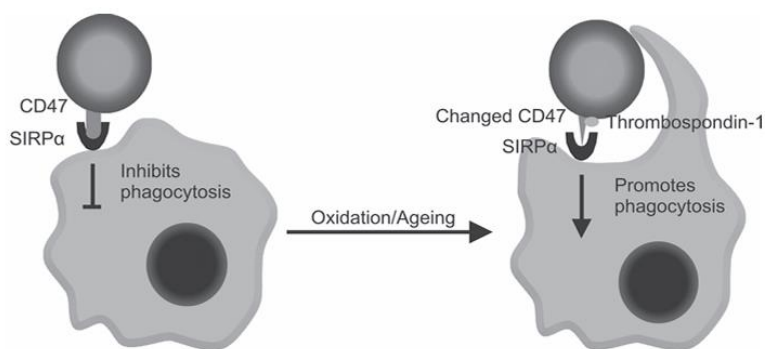


Figura 10. **Cambio conformacional de CD47 e inducción de la fagocitosis.** La oxidación y el envejecimiento provocan un cambio conformacional en CD47 sobre el cual TSP-1 puede unirse. En condiciones normales, CD47 en el eritrocito inhibe la fagocitosis por interacción con SIRP en el fagocito. Después del cambio conformacional en CD47, TSP-1 es capaz de unirse a CD47 y enviar una señal de fagocitosis a los macrófagos. (Fuente: imagen obtenida del artículo con referencia bibliográfica [49]).

La expresión de la molécula CD47 actúa como marcador de reconocimiento propio protegiendo a los glóbulos rojos de la fagocitosis, de modo que eritrocitos con expresión CD47 nula son rápidamente aclarados de la circulación por los macrófagos esplénicos, mientras que eritrocitos con expresión normal de CD47 no son destruidos por su interacción con SIRP α sobre los macrófagos.

Los pacientes con EG presentan fagocitosis anormal de los glóbulos rojos favoreciendo la anemia, aunque el grado de eritrofagocitosis extraesplénica claramente no es suficiente para explicar completamente la anemia, que se cree que se debe principalmente al hiperesplenismo. El aumento de la eritrofagocitosis extraesplénica en la EG puede deberse, al menos en parte, a anomalías en los propios glóbulos rojos que constituye otro de los múltiples mecanismos que derivan en anemia. Para investigar esta hipótesis, un grupo de trabajo liderado por Bratosin D. et al [46] utilizó la citometría de flujo *FSC/SSC* para estudiar los glóbulos rojos de 7 pacientes con EG en cuanto a su forma y la expresión de marcadores de senescencia y fagocitosis definidos por la expresión de la MAC CD47. (Figura 11).

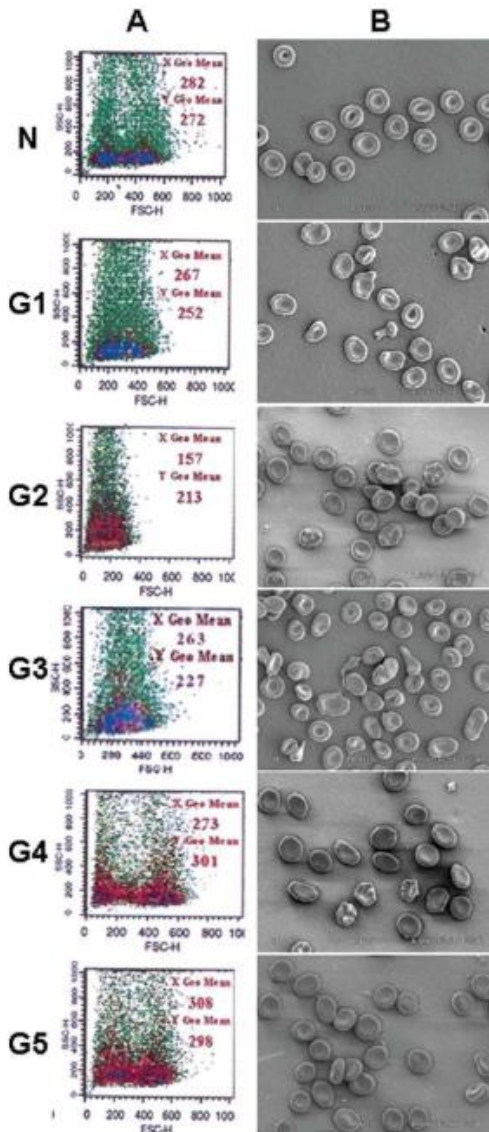


Figura 11. **Análisis por citometría de flujo, FSC/SSC (A), y análisis por microscopía electrónica (B) de eritrocitos normales (N) y eritrocitos de pacientes Gaucher no tratados (G1 a G5).** El análisis por citometría se evaluó a partir del receptor de superficie de expresión de los glóbulos rojos CD47, revelando cambios morfológicos notables de los glóbulos rojos de Gaucher en todos los pacientes no tratados [46].

Las células de dos de los siete pacientes fueron evaluadas antes y 9 meses después del inicio de la terapia de reemplazo enzimático, obteniendo resultados que sugieren que tras inicio del tratamiento se

reverten, en mayor o menor medida, estos cambios morfológicos de los hematíes. (Figura 12) [46].

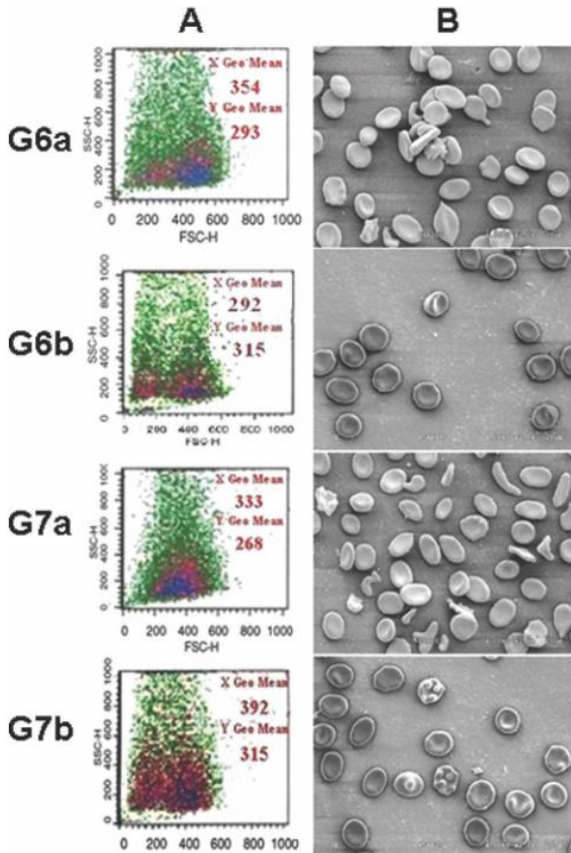


Figura 12. **Análisis por citometría de flujo, FSC/SSC (A), y análisis por microscopía electrónica (B) de eritrocitos de pacientes antes (G6a-G7a) y después (G6b-G7b) de 9 meses de tratamiento con terapia enzimática sustitutiva [46].**

3.2. TROMBOPENIA

La trombopenia en la EG suele ser leve-moderada. En el ICGG, en el momento del diagnóstico, un 15% de los pacientes presentaron trombopenia grave (plaquetas $<60,000/\mu\text{l}$), un 45% trombopenia moderada (plaquetas entre $60,000\text{-}120,000/\mu\text{l}$) y un 40% trombopenia

leve (plaquetas entre 120,000-150,000/ μ l) [33]. La alteración en las plaquetas puede ser cuantitativo o cualitativo:

- Alteraciones cuantitativas a causa del secuestro esplénico derivado de la esplenomegalia y la infiltración de la MO por las CG son las principales causas de la trombocitopenia, pero otras causas de tipo inmune o defectos intrínsecos en la hematopoyesis también contribuyen a ello [44].
- Se describen además, alteraciones cualitativas por anomalías en la función plaquetar (afecta en la agregación) como a defectos en la membrana plaquetar (afecta la adhesión), lo que explica la presencia de sangrados, en ocasiones, desproporcionados a la cifra de plaquetas. Característico de ello son las hemorragias mucocutáneas (epistaxis, menorragias...) y postquirúrgicas [44,50,51]. Se observan alteraciones de la agregación plaquetar hasta en un 20-40% de los pacientes [49]. Diferentes hipótesis justifican este trastorno, entre ellas: - el estado crónico de inflamación en la EG, que produce una activación crónica de la plaqueta, lo que la lleva al llamado "estado exhausto", - la interferencia provocada por diversas citoquinas y - los lisosomas plaquetarios que podrían causar defectos intrínsecos. En cambio, defectos de la adhesión plaquetar se han descrito con mayor frecuencia, en aproximadamente un 65% de los pacientes con EG, cuyo mecanismo fisiopatológico no está claro. En algún estudio se ha podido demostrar que las proteínas de adhesión plaquetar GP Ib y GPIIb-IIIa están intactas, llegando a la hipótesis del origen

inmune de la disfunción, por la presencia de autoanticuerpos contras estas proteínas [18]. Entre otros factores posibles, niveles elevados de GC en plasma podrían interferir en la activación plaquetar, aunque parece ser más debido a una alteración intrínseca de la plaqueta. La agregación plaquetar sí mejora tras la TES, al contrario que la adhesión plaquetar [53,54,55].

3.3. LEUCOPENIA y ALTERACIÓN DEL SISTEMA INMUNE

La leucopenia suele ser la citopenia menos presente en la EG, y se comporta como un déficit cualitativo más que cuantitativo [38] viéndose reducida la capacidad quimiotáctica de los neutrófilos, aunque raramente requiere intervención médica [56]. Se ha descrito un compromiso en la capacidad fagocítica del sistema monocito-macrófago con un discreto aumento en el riesgo de infecciones bacterianas por el acúmulo de GC [57].

Sin embargo, los datos existentes acerca de la deficiencia del sistema inmune en la EG son muy limitados y discordantes entre los diferentes estudios. Se han realizado estudios para determinar alteraciones de las diferentes poblaciones celulares del sistema inmune, mediante análisis inmunofenotípico por citometría de flujo.

Respecto a la inmunidad celular, hay datos que sostienen una disminución en el recuento absoluto de los LT en concreto los LTCD4 en la población global pero en el subanálisis de los pacientes con

afectación ósea, se comprueba una disminución significativa de los LTCD8. Estos hallazgos pudieran estar en relación con la implicación de los LT en la regulación de la actividad osteoblástica/osteoclástica en estudios in vitro [58]. En cambio otro estudio, por el contrario, describe un aumento en el número de LTCD4 además de disminución del número de NK y $TY\delta$ [59]. Probablemente la limitación en la obtención de resultados sólidos sea la alta variabilidad fenotípica de los pacientes que no permite obtener muestras de pacientes homogéneos, y sobre todo el bajo número de pacientes incluidos en los estudios, que en la mayoría de los casos no superan la decena.

El estudio del perfil de LT en pacientes con EG muestra interés con el fin de comprobar si las anomalías en el sistema inmune pueden estar asociadas a la expresión clínica de la enfermedad.

Pocos datos existen acerca de alteraciones en los LB, células que componen la inmunidad humoral, aunque también presentan defectos de maduración que se normalizan tras el inicio de la TRE. No se ha podido aclarar si estos defectos son intrínsecos a la enfermedad o en relación a la esplenectomía de los pacientes [60].

En cuanto a las células presentadoras de antígenos, las DC con una importante actividad fagocítica, como los monocitos/macrófagos, también podrían exhibir la función alterada en los pacientes con EG [59]. Tanto las mDC como las pDC de pacientes con EG, se encuentran significativamente disminuidas, en comparación con controles sanos, alteraciones principalmente cuantitativas, con un perfil inmunofenotípico similar al de la población sana. Queda por determinar

si la disminución de DC presente en los pacientes con EG, está relacionado con una reducción de la producción en la MO o con un aumento del reclutamiento de las DC de la circulación hacia los tejidos. En una situación de estimulación antigénica crónica, las DC de la sangre periférica pueden recibir estímulos continuos, induciendo su migración y el acceso a los órganos linfoides [61]. Especial interés existe en la potencial capacidad de recuperación del sistema inmune tras el inicio del tratamiento. No se ha podido comprobar si la TRE es capaz de revertir estas alteraciones cuantitativas de las DC [62], sólo un estudio concluye que la TRE no reestablece el número normal de DC [59].

3.4. GAMMAPATÍAS Y NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Es bien conocido que el aumento de citoquinas en la EG genera un ambiente inflamatorio, que conlleva a una hiperestimulación de LB y desbalance de NKT favoreciendo la expansión clonal de los LB y neoplasias, fundamentalmente hematológicas del tipo de gammapatías monoclonales (GMSI) y mieloma múltiple (MM).

3.4.1. Fisiopatología

La disregulación inmune de la MO está asociada al desarrollo de GMSI y MM. Las CG secretan citoquinas que generan un estado inflamatorio a nivel de la MO. La IL6 e IL10 presentan niveles

aumentados en la EG, con una relación estrecha en la patogenia de la GMSI. Estas citoquinas son factores importantes para la diferenciación y / o proliferación de células plasmáticas además de estar involucradas en la inflamación y en la remodelación ósea anormal en el MM. Todo este aumento y falta de regulación de citoquinas, deriva en la hiperestimulación de LB y disbalance de NKT creando un entorno que predispone a la expansión clonal de los LB (Figura 13) [63].

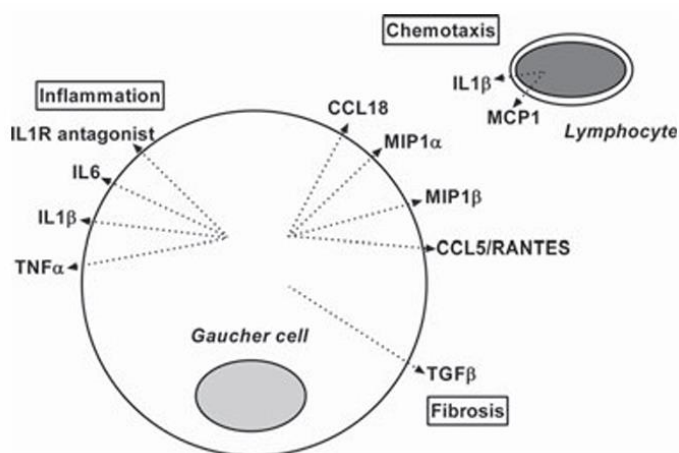


Figura 13. **Alteración inmune en el microambiente de la médula ósea:** secreción de citoquinas y quimiocinas por las células de Gaucher (CG) generando como resultado un microambiente inflamatorio.

Existe gran controversia y pocos datos sólidos en cuanto al papel del tratamiento en estos desórdenes inmunitarios. Si bien algunos trabajos confirman el beneficio de la TRE en las gammopatías policlonales pero no en las monoclonales [64], otros en cambio, apoyan el beneficio de la TRE en la prevención tanto de la aparición como

progresión de las GMSI a MM, siempre con la necesidad de realizar estudios multicéntricos internacionales que confirmen su utilidad [65].

3.4.2. Riesgo relativo

Un estudio que evaluó casi 3000 pacientes del ICGG, la mayoría en TRE, estableció que sí existe un mayor riesgo de padecer MM, con un riesgo relativo (RR) de 5,9 respecto a la población general, pero no hay incremento del riesgo de cáncer global incluidas otras neoplasias hematológicas diferentes a MM, al menos durante la edad temprana y mediana en estos pacientes [66]. En cambio, otro trabajo que recoge 131 pacientes europeos con EG, sí describe un riesgo incrementado de padecer cualquier cáncer en general, y en especial MM y hepatocarcinoma [67].

Aunque existe una gran controversia en cuanto al riesgo incrementado del cáncer global en la EG, sí queda establecido un aumento claro del riesgo de MM. Otras series llegan incluso a asociar ese aumento del RR de MM al estado homocigoto de la mutación N370S del GBA1, observando de 25-37 veces aumentado el riesgo de padecer MM a lo largo de la vida en estos pacientes con EG. Parece haber una secuencia temporal con aparición de gammapatía policlonal en una alta proporción de pacientes, seguida de GMSI en un menor número de casos y ocasionalmente desarrollo de MM [68].

4. LA CITOMETRÍA DE FLUJO COMO MÉTODO DE ESTUDIO.

La citometría de flujo (CMF) es una técnica que permite analizar y clasificar características físico-químicas de células o partículas en una suspensión en función de diversas características.

La CMF permite identificar diferentes poblaciones celulares simultáneamente, así como obtener gran información de ellas dependiendo de las proteínas que se expresen.

Para la medición, la técnica utiliza un haz de luz láser para iluminar partículas individuales en la suspensión, de modo que cuando las partículas o células pasan, alineadas de una en una, a través del haz de luz, dispersan la luz en diferentes direcciones de acuerdo con su tamaño y su granularidad y complejidad [69,70,71] Figura 14. Se mide la dispersión de luz en dos componentes principales: dispersión hacia adelante, del inglés *Forward Scatter* (FSC) y dispersión lateral, del inglés *Side Scatter* (SSC). La dispersión hacia adelante está relacionada con el tamaño de la partícula y la dispersión lateral está relacionada con la complejidad y la textura de la partícula [72], Figura 15.

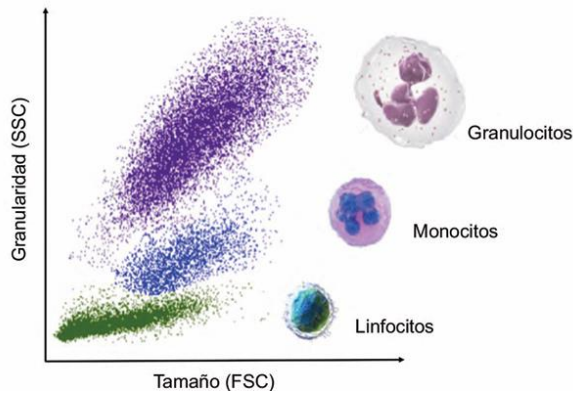


Figura 14: **Posición de leucocitos según tamaño y granularidad.** Fuente: Fundamentos de citometría de flujo: su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica [72].

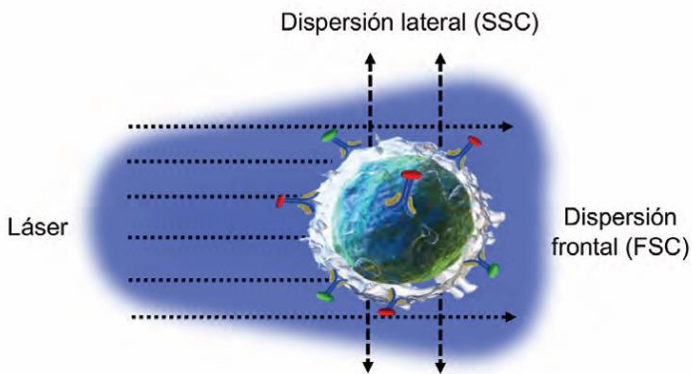


Figura 15. **Dispersión de la luz.** Las características celulares que contribuyen a la dispersión de la luz son el tamaño, la membrana celular, el núcleo y el material granular del interior de la célula. La imagen muestra la dispersión de la luz emitida al incidir sobre la membrana celular. La desviación frontal de la luz determina el tamaño celular (FSC) mientras que la dispersión lateral determina la complejidad (SSC) [72].

Un citómetro de flujo se encuentra compuesto por tres principales sistemas, el de fluidos, el óptico, y el electrónico [72], (Figura 16). La

principal función del sistema de fluidos es alinear y transportar a las células dentro de una cámara de flujo hacia el haz de luz; por tanto, es necesario que la muestra se encuentre suspendida en un fluido. El sistema óptico se encarga de iluminar a las células o partículas, que son marcadas con fluorocromos que emiten luz fluorescente con diferente longitud de onda cuando son excitados por el láser, detectando la fluorescencia mediante filtros específicos y fotomultiplicadores, permitiendo la medición de varias propiedades celulares [73,74],

Los marcadores fluorescentes pueden ser anticuerpos conjugados con fluorocromos específicos para la detección de proteínas celulares. También se utilizan sondas fluorescentes para medir la viabilidad, apoptosis, y otras características celulares.

Una vez que la señal luminosa es generada cuando el haz de luz incide en la célula, ésta se traduce en señales electrónicas. Gracias a los detectores de fluorescencia, la señal eléctrica es recibida por el sistema informático, los datos se adquieren, digitalizan y analizan mediante *software* especializado de citometría de flujo y representados en gráficos e histogramas [75].

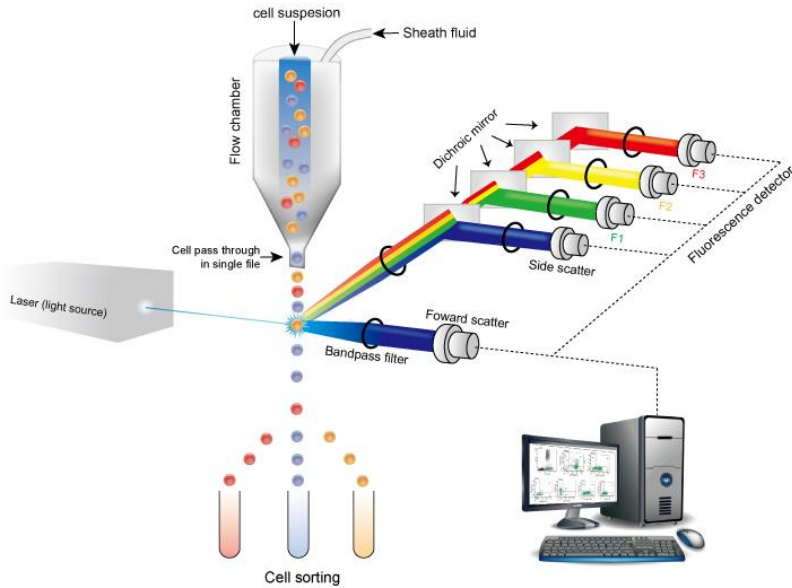


Figura 16. **Principales componentes de un citómetro: sistema de fluidos, sistema óptico (excitación y recolección) y una red electrónica (detectores)**
(Fuente: <https://www.creative-bioarray.com/support/principle-of-the-flow-cytometry.htm>).

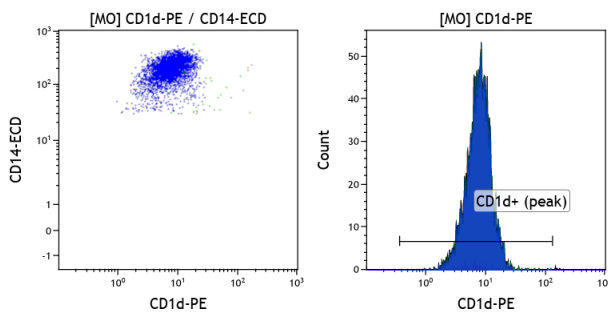


Figura 17. **Ejemplo 1 de resultado de gráfico e histograma.** Fuente propia

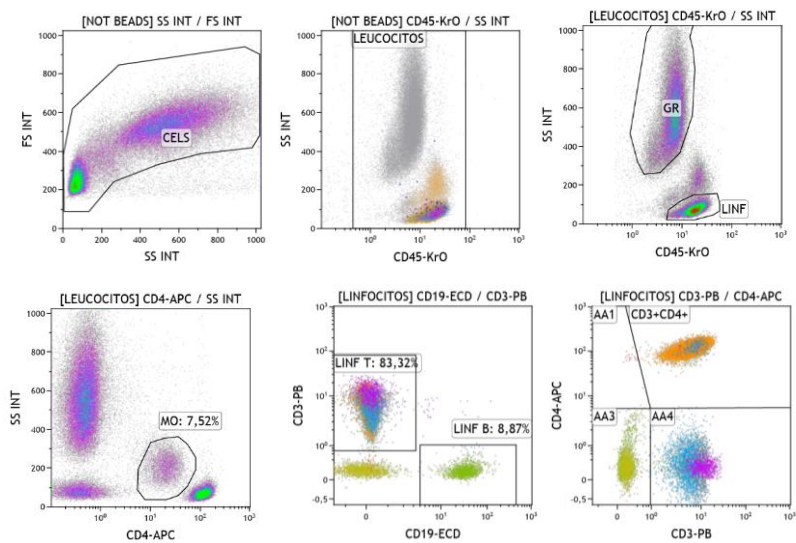


Figura 18. **Ejemplo 2 de resultado de gráficos.** Fuente propia

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Los parámetros hematológicos anormales son comunes en la EG encontrando muy frecuentemente alteraciones de la serie roja y plaquetar. La reducción en el número de glóbulos rojos parece ser debida en parte, a alteraciones en sus propiedades de deformabilidad, que promueven la fagocitosis por los macrófagos del bazo.

Menos frecuentes son los defectos cuantitativos que aparecen en la serie blanca al diagnóstico respecto al recuento del total de leucocitos, sin profundizar en subtipos celulares. A pesar de ello, está descrita una susceptibilidad aumentada al riesgo de infecciones atribuida en ocasiones, aunque no siempre, a la disminución en las cifras de neutrófilos o alteraciones en la capacidad microbicida del sistema mononuclear fagocítico.

La disregulación del sistema inmune es notoria, y ello se ve, reflejada en diferentes estudios clínicos, aunque con resultados dispares y obtenidos de muestras pequeñas, dada la dificultad de realizar estudios de grandes muestras de pacientes en esta enfermedad rara. Las alteraciones descritas más frecuentes ocurren en el número de células NK, LT CD4+ y CD8+, así como anomalías de las DC que constituyen las células presentadoras de antígenos más potentes.

La hipótesis del estudio, es que debe existir una correspondencia en las alteraciones descritas del perfil inmunológico de los pacientes con EG tipo 1 de otras series publicadas y la nuestra,

una serie más amplia de pacientes con EG tipo 1 reclutados en un estudio multicéntrico nacional.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. OBJETIVO PRINCIPAL

Demostrar que existen alteraciones cuantitativas de las células hematopoyéticas que constituyen la serie blanca en los pacientes con EG tipo 1, mediante un exhaustivo y completo análisis inmunofenotípico de sangre periférica.

2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Demostrar alteraciones en subpoblaciones celulares (linfocitos, monocitos y células dendríticas).
2. Encontrar propiedades anormales de la serie roja mediante el análisis inmunofenotípico en los pacientes con EG tipo 1.
3. Comparar nuestros resultados con otros estudios publicados para encontrar similitudes o diferencias en cuanto a reducción o aumento de los recuentos celulares.
4. Obtener una muestra de pacientes con EG tipo 1, mayor a los estudios de otras series, para encontrar valor estadístico.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ÁMBITO

Este proyecto se incluye dentro del análisis inmunofenotípico del estudio 'MONITORIZACIÓN E INDIVIDUALIZACIÓN POSOLÓGICA DE GLUCOCEREBROSIDASA EN PACIENTES GAUCHER TIPO I'; con código FIS-IMI-2012-01; versión/fecha: v2.0; 05/11/2013; con aprobación del CEIC del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia.

2. DISEÑO

Estudio analítico observacional de cohortes.

3. POBLACIÓN

3.1. GRUPO CONTROL

Personas adultas sin enfermedad genética o crónica conocida cuyo hemograma no presentara alteraciones cuantitativas. La selección se realizó a partir de muestras de sangre de pacientes, remitidas al laboratorio de Hematimetría del Hospital Doctor Peset, a los que se les había solicitado una analítica con hemograma y bioquímica básica desde atención primaria.

3.2. GRUPO INTERVENCIÓN

Pacientes adultos diagnosticados de enfermedad de Gaucher tipo 1.

3.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Pacientes adultos (> 18 años), diagnosticados de EG tipo 1 confirmada mediante diagnóstico enzimático, en tratamiento con imiglucerasa (Cerezyme®) o velaglucerasa (Vpriv®) según práctica clínica habitual, independiente de la participación del paciente en el estudio, con dosis estable de TRE al menos los últimos 6 meses previos a la inclusión.

3.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Pacientes con EG con afectación neurológica (tipo 2 y 3).
- Antígeno positivo para el virus de la hepatitis B y serología positiva para el virus de la inmunodeficiencia humana.
- Mujeres embarazadas.

3.3. TAMAÑO MUESTRAL

La previsión inicial del tamaño muestral de los centros participantes fue de 39 pacientes con EG. Finalmente se han incluido 19 pacientes y 10 controles sanos.

Entre las comunidades autónomas participantes se encuentran:

- Comunidad Valenciana
- Aragón
- Andalucía

No se ha calculado el tamaño muestral para el estudio, debido a la baja prevalencia de EG (enfermedad minoritaria).

4. ASPECTOS ÉTICOS

El estudio fue aprobado previamente por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Dr. Peset ("Análisis inmunofenotípico de la serie blanca y roja en pacientes Gaucher tipo 1". CEIC 44/17; Anexo 1.) y se realizó según la Declaración de Helsinki.

Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes para participar en el estudio y para la utilización de las muestras biológicas (Anexo 2).

5. MATERIAL

5.1. MUESTRA

Sangre periférica obtenida en un tubo de EDTA por venopunción en brazo y procesadas dentro de las primeras 24-48 horas tras la extracción, en función de la procedencia de la muestra.

5.2. ANALIZADOR Y REACTIVOS

5.2.1. CITÓMETRO DE FLUJO

El análisis de CMF se llevó a cabo mediante un citómetro equipado con un láser de 488 nm (azul), un láser de 638 nm (rojo) y un láser de 405 nm (violeta) y 10 fluorescencias, modelo NAVIOS (Beckman Coulter). En la tabla 2 se detallan especificaciones ópticas del citómetro. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa de análisis de datos de citometría Kaluza (Beckman Coulter). Se adquirieron 100.000 eventos por muestra en todos los tubos excepto en el tubo de estudio de células dendríticas donde se adquirieron 200.000 eventos al tratarse de células menos representadas.

Tabla 2. Bancada óptica Citómetro de Flujo NAVIOS, dotado de 3 láseres y 10 fluorescencias

Excitación	Fluorocromos	Emisión máxima (nm)	Canal de fluorescencia	Filtro óptico	Descripción fluorocromo (en inglés)
488 nm	FITC	520	FL1	525 BP 40	Fluorescein Isothiocyanate
	PE	575	FL2	575 BP 30	Phycoerythrin
	ECD	620	FL3	620 BP 30	Phycoerythrin-Texas Red
	PC5.5	694	FL4	695 BP 30	Phycoerythrin-Cyanin 5.5
	PC7	767	FL5	755 LP	Phycoerythrin-Cyanin 7
635nm	APC	660	FL6	660 BP 20	Allophycocyanin
	APC-A700	719	FL7	725 BP 20	Allophycocyanin-Alexa Fluor 700
	APC-A750	780	FL8	755 LP	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
405nm	PB	455	FL9	450 BP 40	Pacific Blue
	KrO	528	FL10	550 BP 40	Krome Orange

5.2.2. REACTIVOS

Para el estudio de las diferentes poblaciones celulares se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados con los fluorocromos indicados (Beckman Coulter®).

- HLA-DR-FITC (clon IMMU-357)
- Lineage-PE Cocktail: CD3 (clon UCHT1), CD14 (clon RMO52), CD19 (clon J3-119), CD20 (clon HRC20), CD56 (clon N901)
- CD123-ECD (clon SSDCLY107D2)
- CD85k (ILT3)-PC7 (clon ZM3.8)
- CD11c-APC (clon BU15)
- TCR V δ 2-FITC (clon IMMU 389)
- CD56-PE (clon N901 (NKH-1))
- CD19-ECD (clon J4.119)
- CD8-PC5.5 (clon SFCI21THY2D3(T8))
- CD38-PC7 (clon LS198-4-3)
- CD4-APC (clon 13B8.2)
- CD45-KrO/ Krome Orange (clon J.33)
- CD3-Pacific Blue (clon UCHT1)
- TCR V α 24-PC7 (clon C15)
- TCR V β 11-FITC (clon C21)
- CD14-ECD (clon RMO52)
- CD45RA-FITC (clon ALB11)
- CD45RO-PE (clon UCHL1)

5.2.3. CONTROL DE CALIDAD

La alineación óptica y la estabilidad fluidica del citómetro de flujo se verificó mediante las fluoroesferas Flow-Check Pro (Beckman Coulter) diariamente y antes de las mediciones de las muestras. Las fluoroesferas

Flow-Set Pro (Beckman Coulter) se utilizaron semanalmente para calibrar y monitorizar los tubos fotomultiplicadores del equipo. Las esferas VersaComp (Beckman Coulter) se emplearon para compensar los solapamientos de fluorescencia. Se utilizó una muestra control de sangre periférica para verificar la calibración del equipo, así como células de control Immuno-Trol (Beckman Coulter) para la verificación de la técnica de leucocitos.

6. VARIABLES

6.1. MÉTODO DE RECOGIDA

Los datos clínicos y biológicos de cada paciente necesarios para el estudio fueron facilitados por el responsable clínico de cada hospital extraídos de la historia clínica del paciente. Estos datos se incluyeron en una base de datos de Excel

6.2. VARIABLES DEMOGRÁFICAS

Las variables demográficas recogidas de los pacientes fueron la fecha de nacimiento, edad al diagnóstico y sexo del paciente

6.3. VARIABLES CLÍNICAS

Las variables clínicas registradas fueron el estudio genético de mutaciones del GBA1 al diagnóstico, tipo de tratamiento, y años del mismo

6.4. VARIABLES DE LABORATORIO

Las variables de laboratorio analizadas fueron diferentes estirpes de células hemoperiféricas pertenecientes a la serie roja y blanca, determinados por el marcaje de los anticuerpos monoclonales detallados anteriormente que definen el tipo celular. Las poblaciones celulares se detallan en la tabla 3.

Tabla 3: Poblaciones celulares estudiadas

SERIE BLANCA	
Estirpe celular	Descripción
Leucocitos	SS ^{bajo} /CD45 ^{alto}
Linfocitos	SS ^{bajo} /CD45 ^{alto}
Linfocitos T citotóxicos (Tc)	CD3+/ CD8+
Linfocitos T <i>helper</i> (Th)	CD3+/ CD4+
Linfocitos gamma-delta	CD3+CD4-CD8-
Linfocitos B	CD19+/CD3-
Linfocitos <i>Natural Killer</i> (NK)	CD56+/CD3-
Linfocitos <i>Natural Killer</i> T (NK)	CD3+/TCR V α 24+/TCR V β 11
Linfocitos T $\gamma\delta$	CD3+/ TCR V δ 2 +
Linfocitos Th memoria	CD3+/CD4+/CD45RA-/CD45RO+
Linfocitos Th <i>naïve</i>	CD3+/CD4+/CD45RA+/CD45RO-
Linfocitos Tc memoria	CD3+/CD48+/CD45RA-/CD45RO+
Linfocitos Tc <i>naïve</i>	CD3+/CD8+/CD45RA+/CD45RO-
Linfocitos TCRV β 11	CD3+TCRV β 11+
Linfocitos TCRV α 24	CD3+TCRV α 24+
Granulocitos	SS ^{alto} /CD45 ^{bajo}
Monocitos	CD14+/CD1d+

Dendríticas DR+	HLADR+LIN-
Dendríticas CD85k+	HLADR+LIN-CD85K+
Dendríticas plasmocitoides DR+	HLADR+/LIN-/CD123+
Dendríticas plasmocitoides CD85k+	HLADR+/LIN-/CD85k+/CD123+
Dendríticas mieloides DR+	HLADR+/LIN-/CD11c+
Dendríticas mieloides CD85k+	HLADR+/LIN-/CD85k+/CD11c+
SERIE ROJA	
Hematíes	CD235c+/CD47+/CD45-

7. ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO

El número absoluto de cada estirpe celular por μL de sangre se calculó utilizando fluoroesferas de recuento absoluto (esferas Flow-Count, Beckman Coulter) en un enfoque de plataforma única.

El fenotipo de las diferentes estirpes celulares se determinó según el marcaje por CMF de los diferentes anticuerpos monoclonales utilizados. Para el análisis inmunofenotípico se desarrollaron diferentes protocolos de combinación de anticuerpos para la detección de las diferentes poblaciones celulares que configuran el panel de estudio y que se muestra en la tabla 4.

En el apartado siguiente se detallan los protocolos de marcaje para el panel de estudio. Los tubos del 1 al 4 han seguido el mismo procedimiento a excepción del tubo 5 que requiere otro protocolo al trabajar con hematíes en vez de leucocitos.

Tabla 4. Panel de estudio por citometría de flujo.

		Excitación 488 nm					Excitación 633 nm			Excitación 405 nm	
	Fluorocromo	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC-AF700	APC-AF750	PB	KrO
Tubo	Poblaciones / Canal fluorescencia NAVIOS	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6	FL7	FL8	FL9	FL10
1	Células Dendríticas	HLADR	Lin-	CD123		CD85k(ILT3)	CD11c				CD45
2	Células TBNK/ Células T Vδ2	TCR Vδ2	CD56	CD19	CD8	CD38	CD4			CD3	CD45
3	Células NKT/ Monocitos	TCR Vβ11	CD1d	CD14	CD8	TCR Vα24	CD4			CD3	CD45
4	Células T memoria	CD45RA	CD45RO		CD8		CD4			CD3	CD45
5	Hematíes	CD47	CD235c								CD45

7.1. PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE HEMATÍES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE GAUCHER.

La expresión superficial del receptor CD47 (ver tabla 4, tubo 5) en los glóbulos rojos fue examinada mediante análisis de CMF siguiendo el protocolo modificado del grupo de trabajo de *Daniela Bratosin et al* [46]. Brevemente, se realizó una dilución de la muestra de sangre periférica al 1:100 y se dispensó 50 μ L de muestra diluida en un tubo de citometría de 12 x 75 mm. A dicho tubo se añadió 1 μ L de CD235c-PE, 10 μ L de CD47-FITC y 10 μ L de CD45-KrO. Posteriormente, se agitó suavemente en la propia gradilla deslizando el tubo para evitar la formación de agregados y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de la tinción, las células se lavaron 2 veces añadiendo 3 mL de tampón fosfato salino (PBS) seguido de una centrifugación de 3 minutos a 300 x g y decantación. El sedimento final se resuspendió en 1 mL de PBS y se analizó mediante CMF.

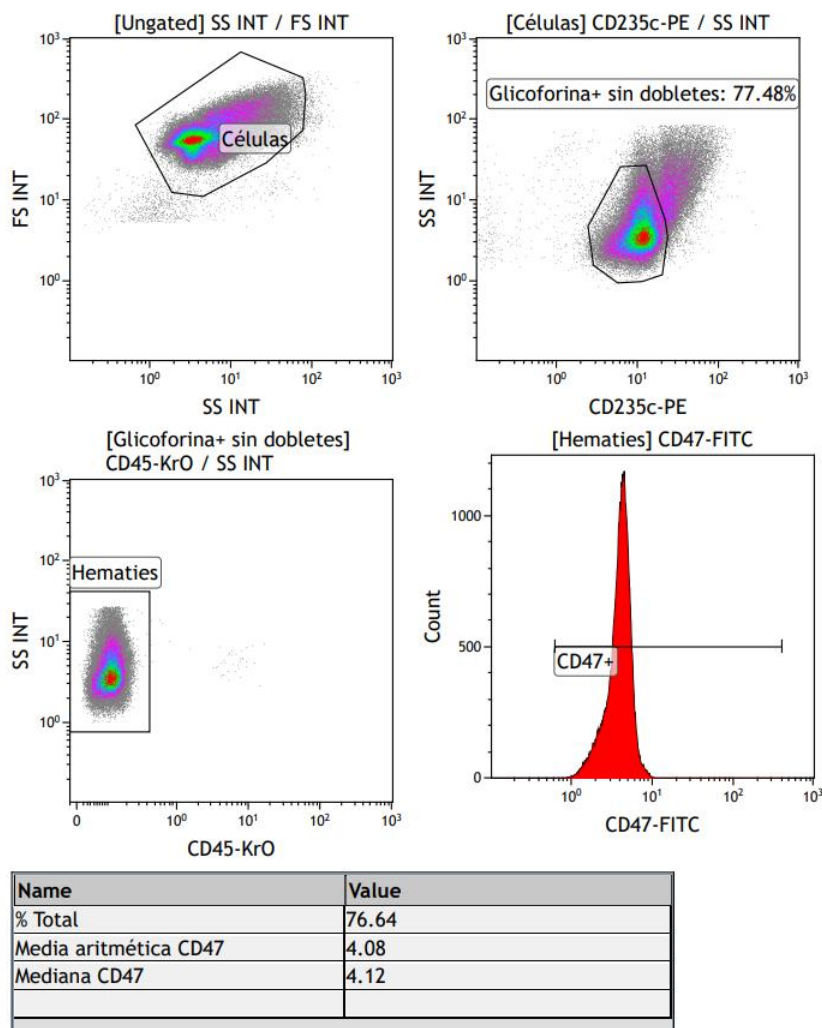


Figura 19. **Selección de hematíes según perfil morfológico de dispersión de luz y según marcaje con CD235c, CD45 y CD47.** Se ilustra la secuencia de selección de ventanas (del inglés *gating*) para la selección de hematíes según morfología (FS/SS en escala logarítmica) y marcaje positivo para CD235c (Glicoforina +) con exclusión de dobletes con mayor intensidad de fluorescencia para CD235c y negativo para el marcador pan-leucocitario CD45. Finalmente se valoró la expresión superficial del receptor CD47 para la población de hematíes anteriormente descrita en la tabla 3 (población CD45-/CD235c+/CD47+).

7.2. PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE LA SERIE BLANCA EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE GAUCHER.

La expresión superficial de los receptores indicados en la tabla 4 para la serie blanca (tubos del 1 al 4) fue examinada mediante análisis de CMF siguiendo varios protocolos modificados [59,62]. Brevemente, se homogenizó la muestra anticoagulada con EDTA por inversión y se ajustó a una concentración de leucocitos entre 7,5 y 10×10^3 células/ μL con PBS. Se rotularon 4 tubos y se dispensaron 100 μL de sangre homogenizada en cada tubo de citometría de 12 x 75 mm. A continuación, se añadió los anticuerpos monoclonales según el panel (Tabla 4) a cada tubo: 10 μL de anticuerpos conjugados con FITC, PE, ECD, PB y KrO y 5 μL del resto (PC5.5, PC7 y APC) y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras la tinción, los hematíes se lisaron mediante el equipo TQPrep (Beckman Coulter) que utiliza el reactivo Immunoprep (lisis por bajada de pH). Posteriormente se lavaron los tubos añadiendo 2 mL de PBS seguido de centrifugación de 5 minutos a $300 \times g$ y decantación. El sedimento final se resuspendió en 1 mL de PBS y se analizó mediante CMF.

A continuación, se ilustran las estrategias de análisis por citometría de flujo para los tubos de estudio de leucocitos. También se muestra la tabla de resultados en porcentaje y recuento absoluto mediante la cual se ha realizado el análisis estadístico de las poblaciones celulares, detalladas anteriormente.

MATERIAL Y MÉTODOS

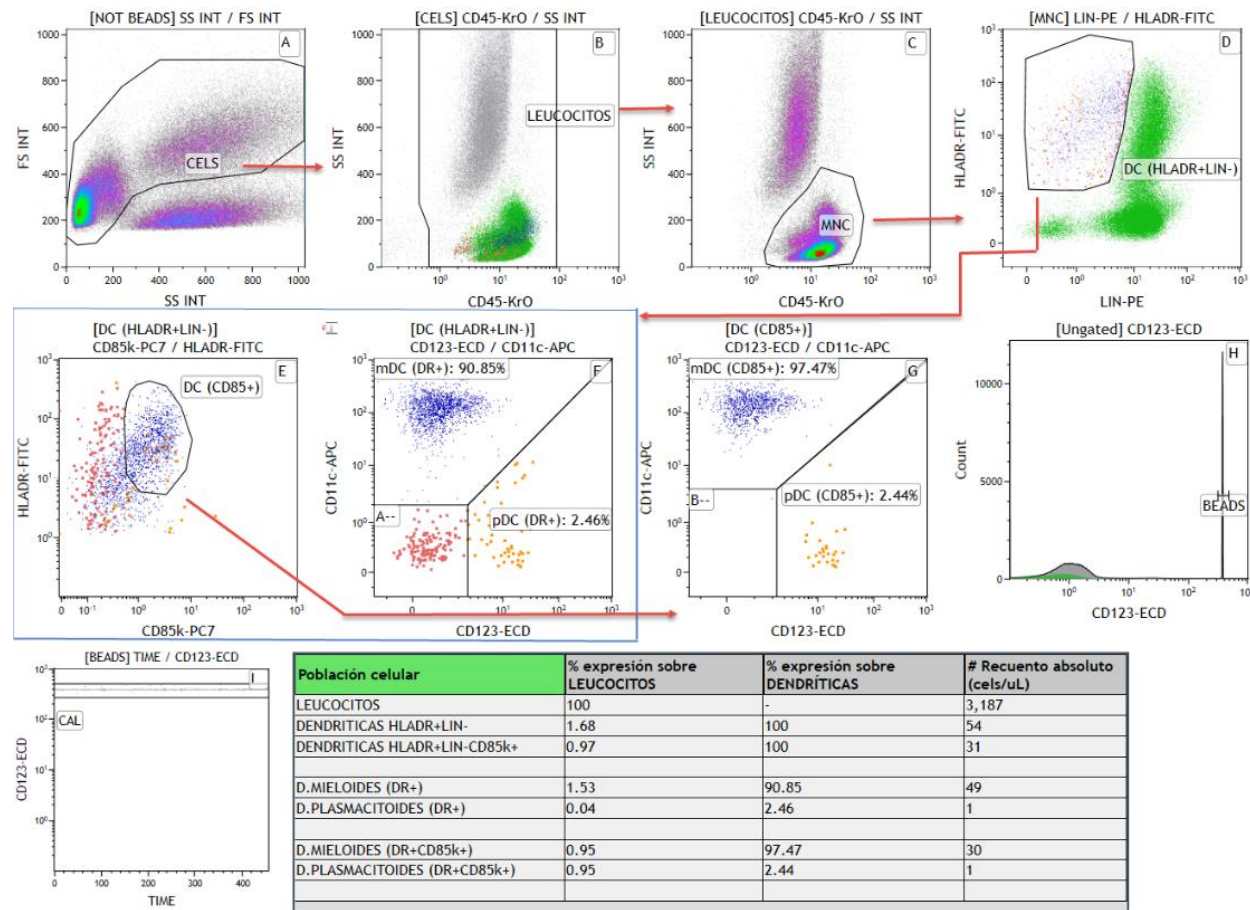


Figura 20. Identificación de células dendríticas según perfil morfológico de dispersión de luz y según marcaje con los

anticuerpos monoclonales detallados en tubo 1 de la tabla 4. Se ilustra la secuencia de ventanas o regiones (del inglés *gating*) mediante diagrama de flechas para la selección de células dendríticas. (A) Región de células viables por morfología para identificar leucocitos mediante tamaño (FS) y granularidad (SS). Las células pequeñas son excluidas. Este gráfico y los siguientes no incluye la región de esferas para el recuento absoluto. (B) Región de leucocitos por expresión de eventos CD45+. (C) Región de células mononucleadas (del inglés, MNC) por expresión de CD45+ y SS medio y bajo. (D) Región de células dendríticas identificadas como HLADR+ y LIN- (linfocitos CD3/CD19/CD20/CD56 negativos). (E) Región de células dendríticas por la expresión de HLADR+, LIN- y CD85k+. (F) Región de identificación de células dendríticas mieloides (azul) por la expresión de HLADR+, LIN- y CD11c+ y células dendríticas plasmacitoides (naranja) por la expresión de HLADR+, LIN- y CD123+. (G) Región de identificación de células dendríticas mieloides (azul) por la expresión de HLADR+, LIN-, CD85k+ y CD11c+ y células dendríticas plasmacitoides (naranja) por la expresión de HLADR+, LIN-, CD85k+ y CD123+. (H) Región de esferas de recuento absoluto. (I) Gráfico de la señal de fluorescencia de eventos en la región Beads o esferas. La región CAL está configurada para definir la señal de las fluoroesferas, realizar el cálculo celular absoluto y monitorizar la aparición de dobletes. NOTA: la población de células dendríticas se ha definido como la población HLADR+ y LIN-, así como la población HLADR+, LIN- y CD85k+. El anticuerpo CD85k se utilizó en base a la publicación de Heinze et al. pero en las muestras procesadas no se detectó una fluorescencia lo suficientemente positiva como para poder definir dicha población.

MATERIAL Y MÉTODOS

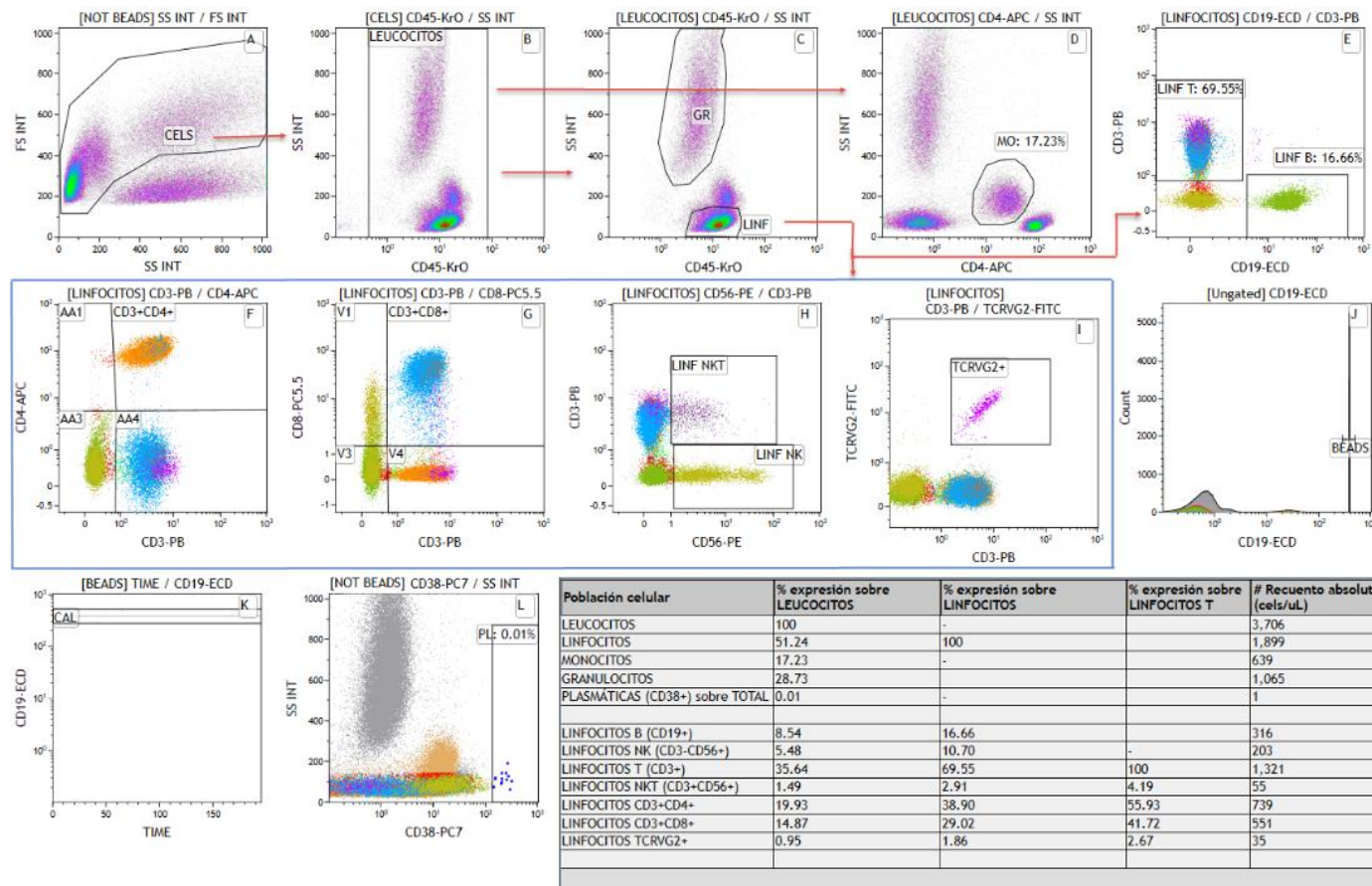


Figura 21. Identificación linfocitos, monocitos y granulocitos según perfil morfológico de dispersión de luz y según marcaje con

los anticuerpos monoclonales detallados en tubo 2 de la tabla 4. Se ilustra la secuencia de ventanas o regiones (del inglés *gating*) mediante diagrama de flechas para la selección de linfocitos, monocitos y granulocitos. (A) Región de células viables por morfología para identificar leucocitos mediante tamaño (FS) y granularidad (SS). Las células pequeñas son excluidas. Este gráfico y los siguientes no incluye la región de esferas para el recuento absoluto. (B) Región de leucocitos por expresión de eventos CD45+. (C) Región de granulocitos identificados por la expresión de CD45+bajo y SS alto y región de linfocitos identificados por la expresión de CD45+alto y SS bajo. (D) Región monocitos identificados como CD4+medio. (E) Región de linfocitos T identificados por la expresión de CD3+ y de linfocitos B identificados por la expresión de CD19+. (F) Región de identificación de linfocitos T colaboradores (Th) CD3+CD4+. (G) Región de identificación de linfocitos T citotóxicos (Tc) CD3+CD8+. (H) Región de identificación de linfocitos NK por la expresión de CD56+CD3- y de linfocitos NKT por la expresión de CD56+CD3+ (I) Región de identificación de linfocitos T TCR V δ 2 (J) Región de esferas de recuento absoluto. (K) Gráfico de la señal de fluorescencia de eventos en la región *Beads* o esferas. La región CAL está configurada para definir la señal de las fluoroesferas, realizar el cálculo celular absoluto y monitorizar la aparición de dobletes. (L) Región de células plasmáticas identificadas por la expresión CD38+alto.

MATERIAL Y MÉTODOS

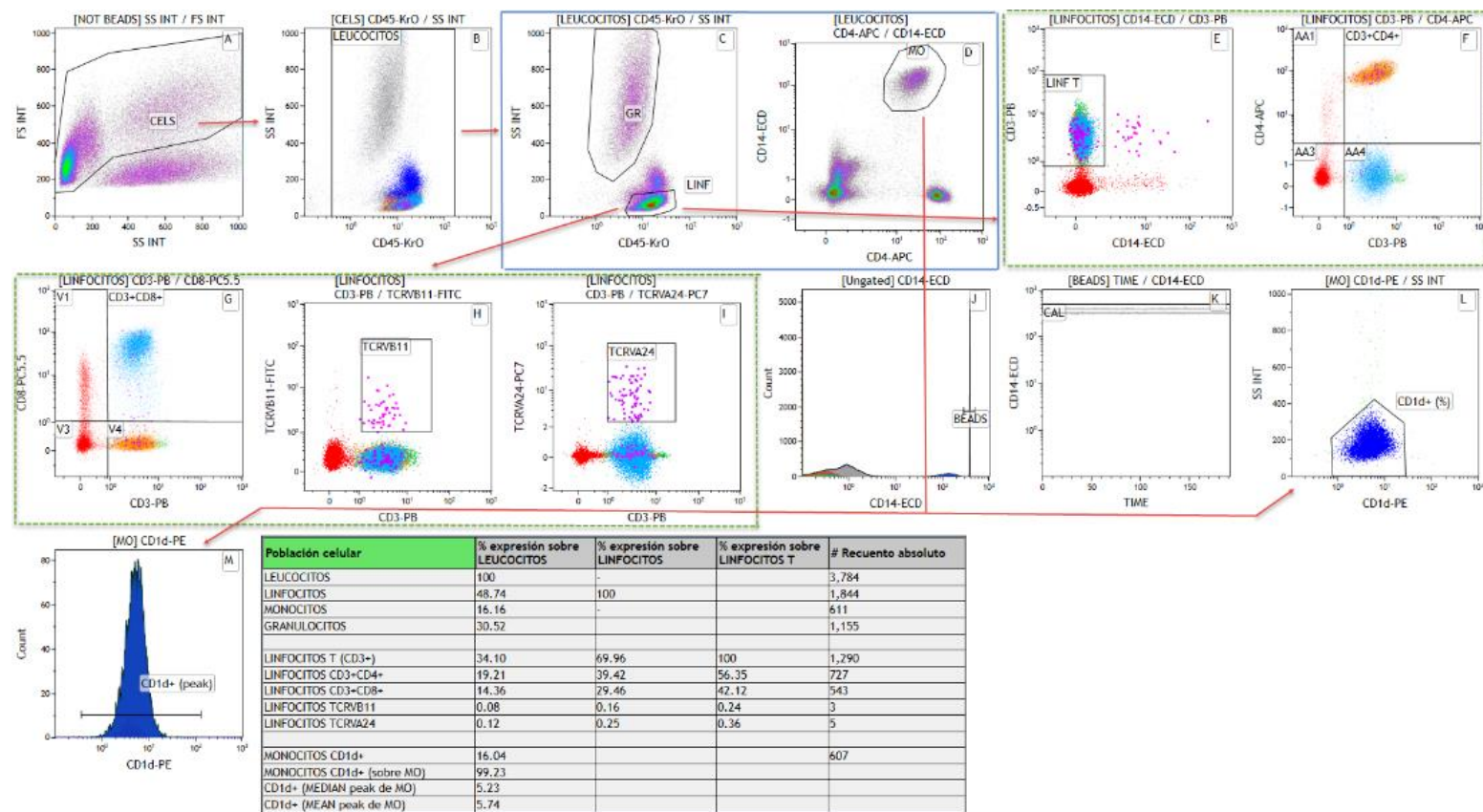


Figura 22. Identificación linfocitos, monocitos y granulocitos según perfil morfológico de dispersión de luz y según marcaje con

los anticuerpos monoclonales detallados en tubo 3 de la tabla 4. Se ilustra la secuencia de ventanas o regiones (del inglés *gating*) mediante diagrama de flechas para la selección de linfocitos, monocitos y granulocitos. (A) Región de células viables por morfología para identificar leucocitos mediante tamaño (FS) y granularidad (SS). Las células pequeñas son excluidas. Este gráfico y los siguientes no incluye la región de esferas para el recuento absoluto. (B) Región de leucocitos por expresión de eventos CD45+. (C) Región de granulocitos identificados por la expresión de CD45+bajo y SS alto y región de linfocitos identificados por la expresión de CD45+alto y SS bajo. (D) Región monocitos identificados como CD14+CD4+medio. (E) Región de linfocitos T identificados por la expresión de CD3+. (F) Región de identificación de linfocitos T colaboradores (Th) CD3+CD4+. (G) Región de identificación de linfocitos T citotóxicos (Tc) CD3+CD8+. (H) Región de identificación de linfocitos T TCRV β 11 (CD3+TCRV β 11+) (I) Región de identificación de linfocitos T TCRV α 24 (CD3+TCRV α 24+) (J) Región de esferas de recuento absoluto. (K) Gráfico de la señal de fluorescencia de eventos en la región *Beads* o esferas. La región CAL está configurada para definir la señal de las fluoroesferas, realizar el cálculo celular absoluto y monitorizar la aparición de dobletes. (L) Región de selección de monocitos que expresan CD1d+. (M) Región de selección de monocitos que expresan CD1d+ para recoger la información de intensidad media de fluorescencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

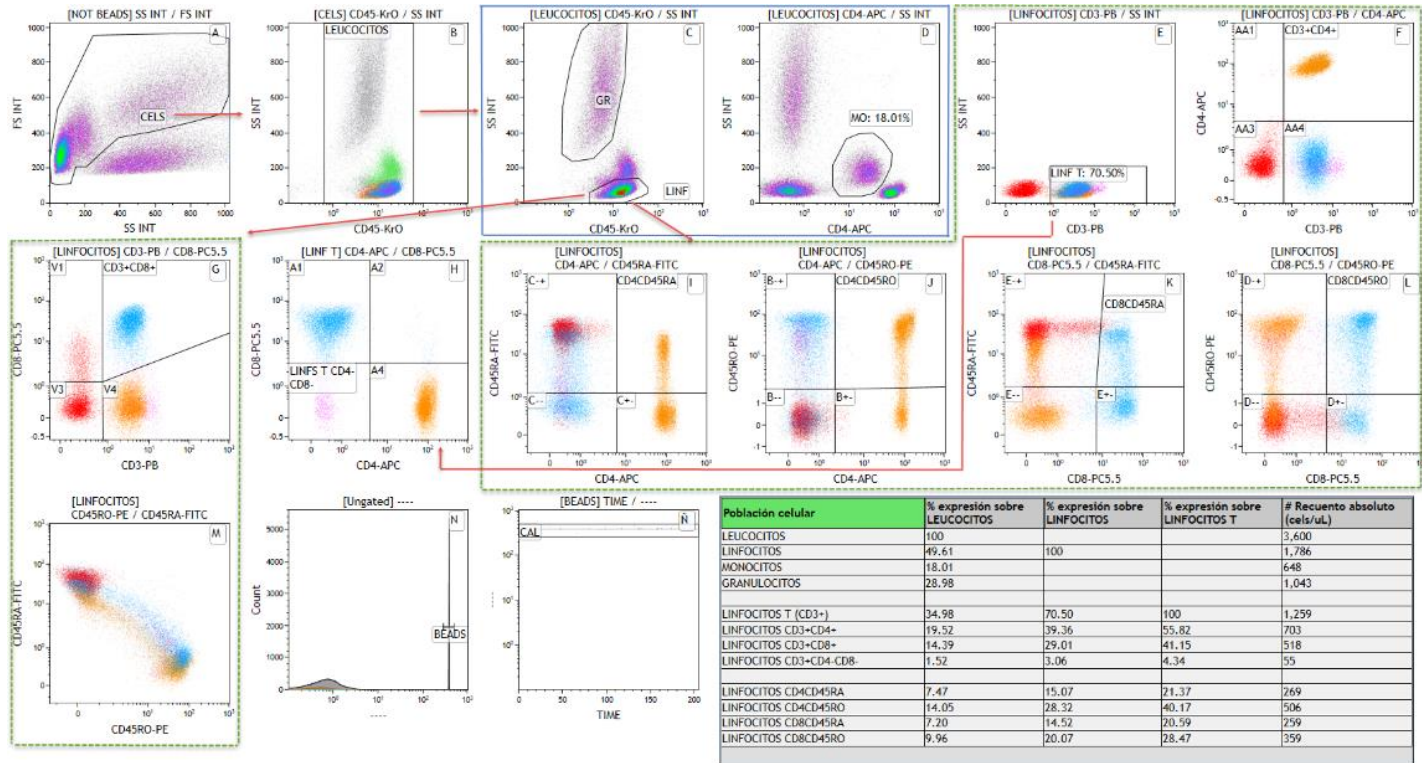


Figura 23. Identificación linfocitos, monocitos y granulocitos según perfil morfológico de dispersión de luz y según marcaje con los anticuerpos monoclonales detallados en tubo 4 de la tabla 4. Se ilustra la secuencia de ventanas o regiones (del inglés *gating*) mediante

diagrama de flechas para la selección de linfocitos, monocitos y granulocitos. (A) Región de células viables por morfología para identificar leucocitos mediante tamaño (FS) y granularidad (SS). Las células pequeñas son excluidas. Este gráfico y los siguientes no incluye la región de esferas para el recuento absoluto. (B) Región de leucocitos por expresión de eventos CD45+. (C) Región de granulocitos identificados por la expresión de CD45+bajo y SS alto y región de linfocitos identificados por la expresión de CD45+alto y SS bajo. (D) Región monocitos identificados como CD4+medio. (E) Región de linfocitos T identificados por la expresión de CD3+. (F) Región de identificación de linfocitos T colaboradores (Th) CD3+CD4+. (G) Región de identificación de linfocitos T citotóxicos (Tc) CD3+CD8+. (H) Región de identificación de linfocitos T gamma-delta por la expresión de CD4-CD8- respecto a linfocitos T CD3+. (I) Región de identificación de linfocitos T colaboradores vírgenes mediante la expresión de CD4+CD45RA+. (J) Región de identificación de linfocitos T colaboradores memoria mediante la expresión de CD4+CD45RO+. (K) Región de identificación de linfocitos T citotóxicos vírgenes mediante la expresión de CD8+CD45RA+. (L) Región de identificación de linfocitos T citotóxicos memoria mediante la expresión de CD8+CD45RO+ (M) Región que muestra el patrón de linfocitos vírgenes (expresión de CD45RA) y memoria (expresión de CD45RO). (N) Región de esferas de recuento absoluto. (Ñ) Gráfico de la señal de fluorescencia de eventos en la región *Beads* o esferas. La región CAL está configurada para definir la señal de las fluoroesferas, realizar el cálculo celular absoluto y monitorizar la aparición de dobletes.

8. ANÁLISIS DE LOS DATOS

8.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos, se ha utilizado el software **R** (versión 4.0.2).

Con el fin de comparar los recuentos de diferentes poblaciones celulares de la sangre de pacientes con la enfermedad de Gaucher y controles, se ha realizado la prueba U de Mann-Whitney. Se ha resumido en forma de tabla diferentes estadísticos que describen la distribución de las diferentes variables entre ambos grupos. También se resume el resultado del test mediante un intervalo de confianza de la mediana de las diferencias entre las muestras de ambas poblaciones y el p-valor de la prueba.

Por último, se representan gráficamente las distribuciones de cada grupo mediante gráficos de diagramas.

8.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO NUMÉRICO

Análisis de los recuentos absolutos (cels/ μ L) de las diferentes variables de laboratorio reflejadas en la tabla 2, distribuidas por protocolo (tabla 3).

8.3. ANÁLISIS DESCRIPTIVO GRÁFICO

Se han utilizado diagramas de cajas para representar las distribuciones de cada variable entre los dos grupos del estudio.

El diagrama de caja (también llamado, diagrama de caja y bigotes o box plot) es un método estandarizado para representar gráficamente una serie de datos numéricos a través de sus cuartiles. De esta manera, se muestran a simple vista la mediana y los cuartiles de los datos y también pueden representarse sus valores atípicos. Proporcionan una visión general de la simetría de la distribución de los datos.

9. MEMORIA ECONÓMICA.

1. GASTOS DE PERSONAL		
1. 1. INVESTIGADOR PRINCIPAL Y OTROS INVESTIGADORES		
Investigadores	0 € /pac	0 €
	TOTAL: 0 € /pac	TOTAL: 0 €
2. GASTOS PARA EL SERVICIO DE HEMATOLOGÍA		
	0 € / pac	0 €
3. COSTES DE PRUEBAS EFECTUADOS, ADICIONALES A PRÁCTICA CLÍNICA HABITUAL		
TOTAL COSTES PRUEBAS	0 € / pac	0€
4. OTROS GASTOS NO CONTEMPLADOS EN LOS APARTADOS ANTERIORES		
	0 € / pac	0 €
5. COSTE TOTAL DEL ESTUDIO (BASE IMPONIBLE)		
(1+2+3+4)	0 € / pac	0 €

La memoria económica es de 5986.20 euros, importe donado por la compañía GENZYME-SANOFI® a través de FISABIO, cantidad que hace frente al 100% del presupuesto emitido y adquirido por Beckman Coulter S.A.U

Todos los procedimientos se realizan en el hospital Universitario Dr. Peset en el Laboratorio de Hematología y los reactivos utilizados (anticuerpos monoclonales) y material fungible, ha sido adquirido tras la donación realizada por GENZYME-SANOFI®.

RESULTADOS

RESULTADOS

De los 19 pacientes incluidos en el estudio, se recogieron las variantes demográficas y clínicas de todos los pacientes, y aunque se obtuvo muestra sanguínea de los 19, el estudio inmunofenotípico y por tanto el análisis de la serie sólo se pudo completar de 18 pacientes.

1. VARIABLES DEMOGRÁFICAS

La edad media al diagnóstico de los pacientes fue de 23 años con extremos de 6 y 49 años. En la serie había 8 hombres (42%) y 11 mujeres (58%). La edad media de los pacientes en el momento del estudio fue de 46 años con extremos de 20 y 71 años.

2. VARIABLES CLÍNICAS

Todos los pacientes incluidos en la serie estaban bajo tratamiento con TRE y ninguno con TRS. La TRE era imiglucerasa o velaglucerasa, 15 pacientes (78%) recibían Imiglucerasa, y 4 (22%) velaglucerasa (Tabla 5). La media de años de tratamiento con TRE al momento del estudio fue de 15 años con extremos de 5 y 22 años.

La frecuencia de mutaciones de GBA1 se refleja en la tabla 6.

Tabla 5: Tratamiento de los pacientes. TRE: terapia de reemplazo enzimático. TRS: terapia de reducción de sustrato.

TIPO TRATAMIENTO		NÚMERO DE PACIENTES
TRE	IMIGLUCERASA	15
	VELAGLUCERASA	4
TRS		0

TABLA 6: Número de pacientes incluidos por mutación del GBA1

MUTACIÓN	NÚMERO PACIENTES
N370S/L444P	6
N370S/N370S	4
N370S/N188S	2
N370S/p.Arg159Trp	2
N370S/G195W	1
N370S/desconocido	1
N370S/DELTA 55	1
P.Leu375Arg/N370S	1
L444P/p.Gly416Ser	1

3. VARIABLES DE LABORATORIO

Se completó el análisis inmunofenotípico de la serie roja y blanca según los diferentes protocolos de combinación de anticuerpos para la detección de las diferentes poblaciones celulares que configuraron el panel de estudio y que se mostró anteriormente en la tabla 4.

3.1. ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE LA SERIE ROJA

3.1.1. Análisis descriptivo numérico

Las siguientes tablas muestran un resumen estadístico de la expresión de CD47 dentro de su protocolo en términos de media, mediana y porcentaje.

Tabla 7. Resumen descriptivo de los resultados de las variables del protocolo CD235c, CD45 y CD47

Variable	Estadístico	Control	Caso
CD47	Media	7.13	5.52
	(Desv. Típ.)	(1.57)	(1)
	Mediana	7,08	5,5
	(1r., 3r. Cuartil)	(6.12, 8.28)	(5.42, 6.1)
	Porcentaje	67,09	74,04

3.2. ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE LA SERIE BLANCA

3.2.1. Análisis descriptivo numérico

Las siguientes tablas muestran un resumen estadístico de los recuentos absolutos (cels/ μ L) de las diferentes variables de cada protocolo y el % expresión sobre LEUCOCITOS de algunas variables del protocolo TCRVG2-56-19-8-38-4-3-45.

Para comparar la distribución de las diferentes variables entre los individuos afectos y control, se ha realizado la prueba U de Mann-Whitney. Este test compara si las muestras de un grupo tienden a ser más grandes que las del otro. En las tablas, se representa el p-valor del resultado del test. Un p-valor por debajo del nivel de significación ($\alpha < 0.05$) indica que hay evidencias estadísticas para creer que las muestras de un grupo son superiores a las del otro. También se muestra un intervalo de confianza al 95% de la mediana de las diferencias entre muestras de cada grupo.

Tabla 8. Resumen descriptivo de los recuentos absolutos de las variables del protocolo 45RA-45RO-8-4-3-45.

Variable	Estadístico	Control	Caso	p-valor
LEUCOCITOS	Media	7199	5125	0.0050*
	(Desv. Típ.)	(1880)	(1610)	
	Mediana	7309	5054	
	(1r., 3r. Cuartil)	(5709, 8938)	(4018, 5655)	
	I.C. (95%)	(636, 3856)		
CD3+CD4,8-	Media	100	34.5	0.12
	(Desv. Típ.)	(145)	(20.3)	
	Mediana	46	27	
	(1r., 3r. Cuartil)	(25.5, 93.8)	(22.5, 49)	
	I.C. (95%)	(-2, 62)		
CD4CD45RA	Media	408	121	<0.001*
	(Desv. Típ.)	(251)	(86.7)	
	Mediana	348	92	
	(1r., 3r. Cuartil)	(210, 536)	(64, 134)	
	I.C. (95%)	(107, 399)		

RESULTADOS

Variable	Estadístico	Control	Caso	p-valor
CD4CD45RO	Media	630	381	0.069
	(Desv. Típ.)	(348)	(190)	
	Mediana (1r., 3r. Cuartil)	488 (436, 663)	396 (232, 505)	
	I.C. (95%)	(-9, 408)		
CD8CD45RA	Media	369	219	0.036*
	(Desv. Típ.)	(230)	(147)	
	Mediana (1r., 3r. Cuartil)	312 (162, 514)	156 (115, 270)	
	I.C. (95%)	(16, 344)		
CD8CD45RO	Media	219	217	1.0
	(Desv. Típ.)	(143)	(148)	
	Mediana (1r., 3r. Cuartil)	192 (114, 279)	173 (116, 279)	
	I.C. (95%)	(-91, 106)		

Tabla 9. Resumen descriptivo de los recuentos absolutos de las variables del protocolo HLADR-LIN-123-85K-11C-45.

Variable	Estadístico	Control	Caso	p-valor
DENDRITICAS HLADR+LIN-	Media	79.3	61.9	0.26
	(Desv. Típ.)	(37.8)	(51.6)	
	Mediana	80	49	
	(1r., 3r. Cuartil)	(43, 111)	(24, 82.2)	
	I.C. (95%)	(-15, 64)		
DENDRITICAS HLADR+LIN- CD85K+	Media	29.7	20.9	0.11
	(Desv. Típ.)	(14.1)	(17.7)	
	Mediana	27	19	
	(1r., 3r. Cuartil)	(23, 31)	(7, 25.2)	
	I.C. (95%)	(-4, 23)		
D. MIELOIDES (DR+)	Media	67.3	56.1	0.31
	(Desv. Típ.)	(35.3)	(48.7)	
	Mediana	70	44	
	(1r., 3r. Cuartil)	(31, 92)	(18.8, 70)	
	I.C. (95%)	(-21, 51)		

RESULTADOS

Variable	Estadístico	Control	Caso	p-valor
D. PLASMACITOIDES (DR+)	Media	8	2.38	<0.001*
	(Desv. Típ.)	(3.28)	(1.75)	
	Mediana	7	2	
	(1r., 3r. Cuartil)	(6, 10)	(1, 4)	
	I.C. (95%)	(3, 8)		
D. MIELOIDES (DR+CD85K+)	Media	22.9	19.2	0.28
	(Desv. Típ.)	(13.1)	(17.8)	
	Mediana	19	15.5	
	(1r., 3r. Cuartil)	(14, 25)	(5.75, 23.8)	
	I.C. (95%)	(-7, 16)		
D. PLASMACITOIDES (DR+CD85K+)	Media	6.67	1.81	<0.001*
	(Desv. Típ.)	(2.87)	(1.68)	
	Mediana	6	1	
	(1r., 3r. Cuartil)	(6, 9)	(0.75, 3.25)	
	I.C. (95%)	(2, 7)		

Tabla 10. Resumen descriptivo de los recuentos absolutos de las variables del protocolo HLADR-LIN-123-85K-11C-45.

Variable	Estadístico	Control	Caso	p-valor
LEUCOCITOS	Media	7149	5296	0.023*
	(Desv. Típ.)	(1842)	(1777)	
	Mediana	6996	5346	
	(1r., 3r. Cuartil)	(5672, 8829)	(4395, 5807)	
	I.C. (95%)	(321, 3701)		
LINFOCITOS	Media	1797	1259	0.087
	(Desv. Típ.)	(645)	(648)	
	Mediana	1742	1316	
	(1r., 3r. Cuartil)	(1320, 2315)	(682, 1766)	
	I.C. (95%)	(-43, 1087)		
MONOCITOS T	Media	522	458	0.29
	(Desv. Típ.)	(174)	(308)	
	Mediana	516	352	
	(1r., 3r. Cuartil)	(421, 640)	(256, 612)	

RESULTADOS

Variable	Estadístico	Control	Caso	p-valor
	I.C. (95%)	(-97, 282)		
GRANULOCITOS	Media	4435	3300	0.087
	(Desv. Típ.)	(1558)	(1022)	
	Mediana	4184	2969	
	(1r., 3r.	(3537,	(2652,	
	Cuartil)	5086)	4310)	
	I.C. (95%)	(-135, 2374)		
LINFOCITOS B	Media	208	203	0.70
	(Desv. Típ.)	(111)	(150)	
	Mediana	185	146	
	(1r., 3r.	(153, 248)	(97.5, 307)	
	Cuartil)			
	I.C. (95%)	(-96, 115)		
NK	Media	206	175	0.13
	(Desv. Típ.)	(75.5)	(153)	
	Mediana	179	108	
	(1r., 3r.	(152, 254)	(75.8, 215)	
	Cuartil)			
	I.C. (95%)	(-34, 135)		

RESULTADOS

Variable	Estadístico	Control	Caso	p-valor
LINFOCITOS T	Media	1359	853	0.031*
	(Desv. Típ.)	(520)	(450)	
	Mediana	1315	918	
	(1r., 3r. Cuartil)	(1000, 1853)	(438, 1157)	
	I.C. (95%)	(48, 914)		
NKT	Media	188	84.2	0.0061*
	(Desv. Típ.)	(145)	(85.5)	
	Mediana	148	55.5	
	(1r., 3r. Cuartil)	(105, 176)	(28.5, 105)	
	I.C. (95%)	(33, 136)		
CD4	Media	885	488	0.014*
	(Desv. Típ.)	(437)	(268)	
	Mediana	788	506	
	(1r., 3r. Cuartil)	(640, 982)	(259, 656)	
	I.C. (95%)	(115, 607)		

RESULTADOS

Variable	Estadístico	Control	Caso	p-valor
CD8	Media	428	354	0.36
	(Desv. Típ.)	(260)	(225)	
	Mediana	354	290	
	(1r., 3r. Cuartil)	(202, 595)	(171, 526)	
	I.C. (95%)	(-101, 289)		
TYd	Media	86.1	21.2	0.031*
	(Desv. Típ.)	(130)	(18.9)	
	Mediana	48.5	15	
	(1r., 3r. Cuartil)	(19.5, 65.8)	(9.75, 23)	
	I.C. (95%)	(2, 56)		

Tabla 11. Resumen descriptivo de los recuentos absolutos y % expresión sobre leucocitos de las variables del protocolo TCRVG2-56-19-8-38-4-3-45.

Variable	Estadístico	Control	Caso	p-valor
LINFOCITOS TCRVB11	Media	7.3	3.75	0.017*
	(Desv. Típ.)	(4.32)	(2.57)	
	Mediana (1r., 3r. Cuartil)	6.5 (3.5, 10)	3 (2, 4.25)	

RESULTADOS

Variable	Estadístico	Control	Caso	p-valor
	I.C. (95%)	(1, 6)		
	Media (Desv. Típ.)	8.8 (7.07)	4.75 (3.07)	
LINFOCITOS TCRVA24	Mediana (1r., 3r. Cuartil)	6 (4.25, 10.2)	4 (3, 5.25)	0.048*
	I.C. (95%)	(4.49e-05, 6)		
	Media (Desv. Típ.)	488 (193)	421 (274)	
MONOCITOS CD1d+	Mediana (1r., 3r. Cuartil)	460 (356, 622)	340 (238, 524)	0.22
	I.C. (95%)	(-92, 269)		
	Media (Desv. Típ.)	98.3 (0.419)	97.3 (3.03)	
MONOCITOS CD1d+ (%)	Mediana (1r., 3r. Cuartil)	98.4 (98, 98.6)	98.6 (97.8, 99)	0.54
	I.C. (95%)	(-0.66, 0.57)		

RESULTADOS

Variable	Estadístico	Control	Caso	p-valor
CD1d+ (MEDIAN peak de MO) (%)	Media	6.53	6.35	0.70
	(Desv. Típ.)	(2.1)	(2.18)	
	Mediana	6.53	5.83	
	(1r., 3r. Cuartil)	(4.6, 7.93)	(5.17, 7.36)	
	I.C. (95%)	(-1.49, 2.1)		
CD1d+ (MEAN peak de MO) (%)	Media	7.04	6.9	0.74
	(Desv. Típ.)	(2.23)	(2.3)	
	Mediana	7.21	6.29	
	(1r., 3r. Cuartil)	(4.98, 8.49)	(5.68, 7.87)	
	I.C. (95%)	(-1.66, 2.24)		

3.2.2. Análisis descriptivo gráfico

En esta sección se muestran diagramas de cajas para representar las distribuciones de cada variable entre los dos grupos del estudio.

3.2.2.1. Protocolo 45RA-45RO-8-4-3-45

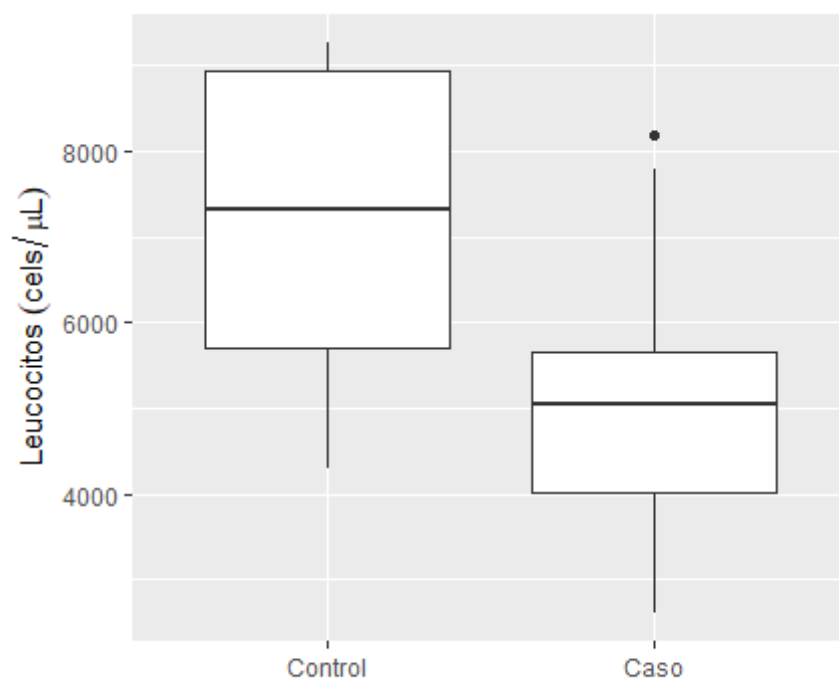


Figura 24. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de leucocitos por grupo.**

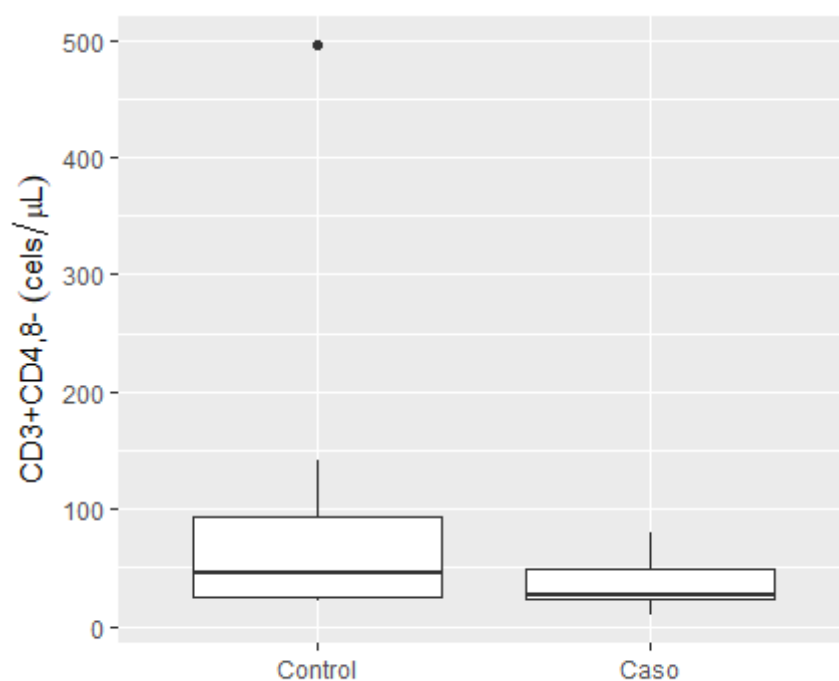


Figura 25. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de CD3+CD4,8- por grupo.**

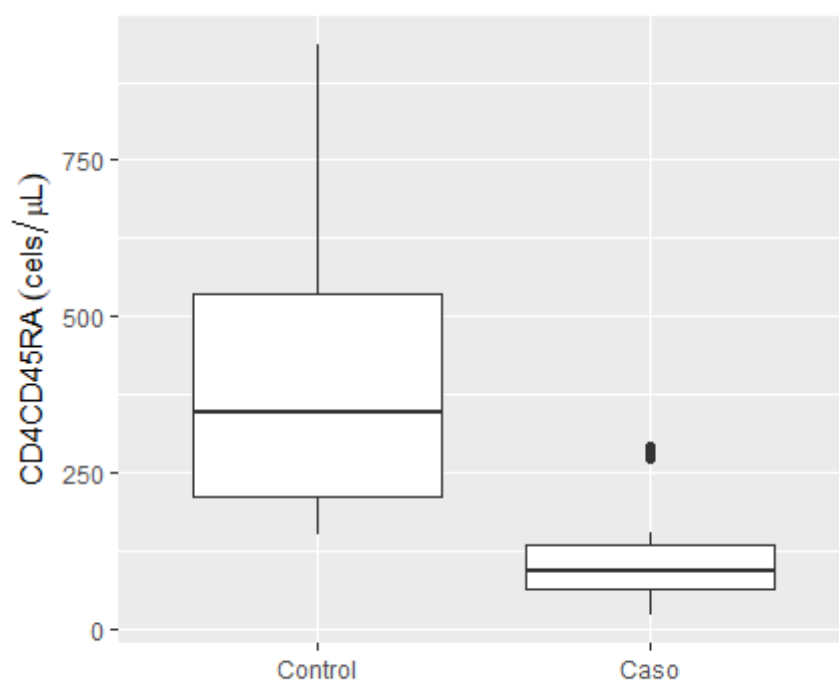


Figura 26. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de CD4CD45RA por grupo**

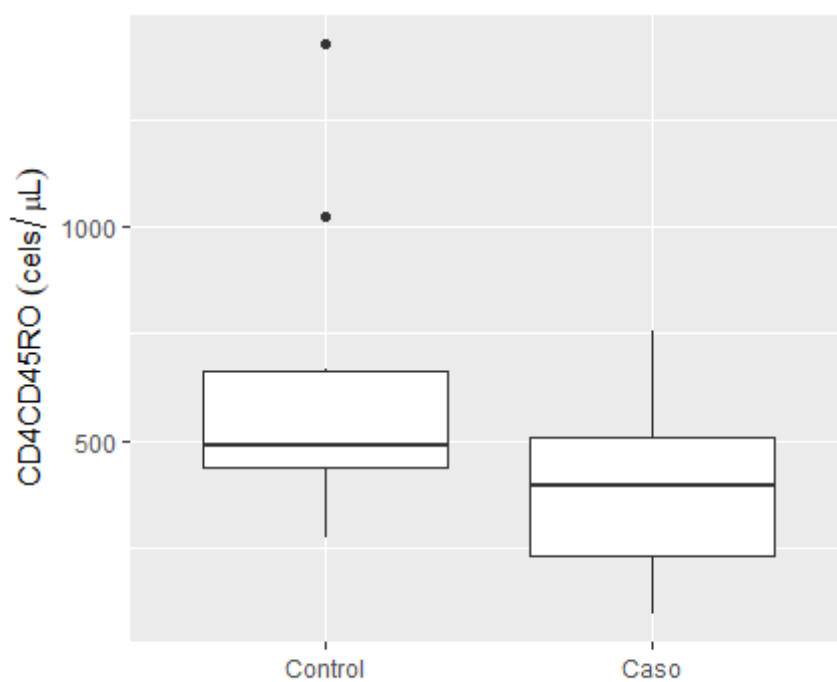


Figura 27. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de CD4CD45RO por grupo.**

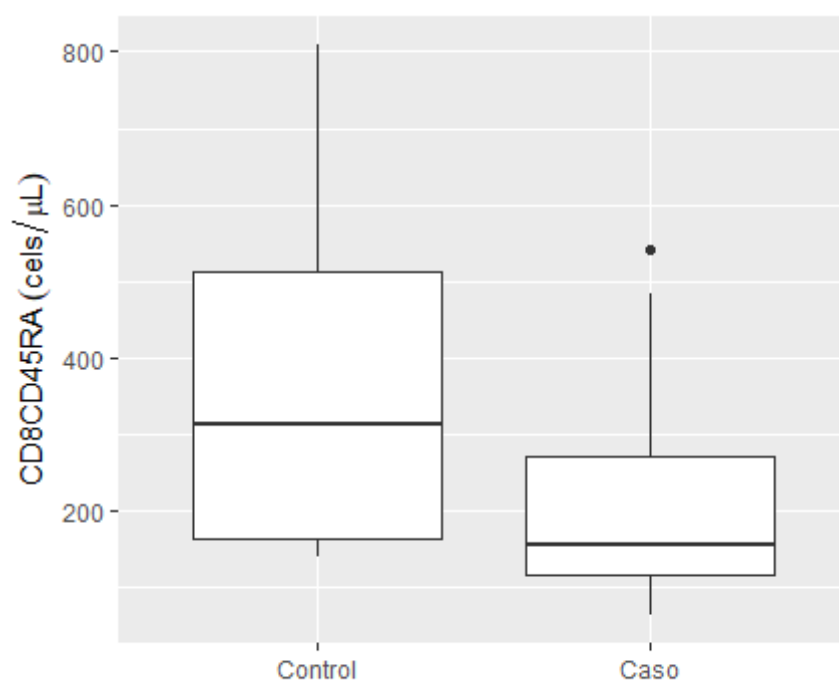


Figura 28. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de CD8CD45RA por grupo.**

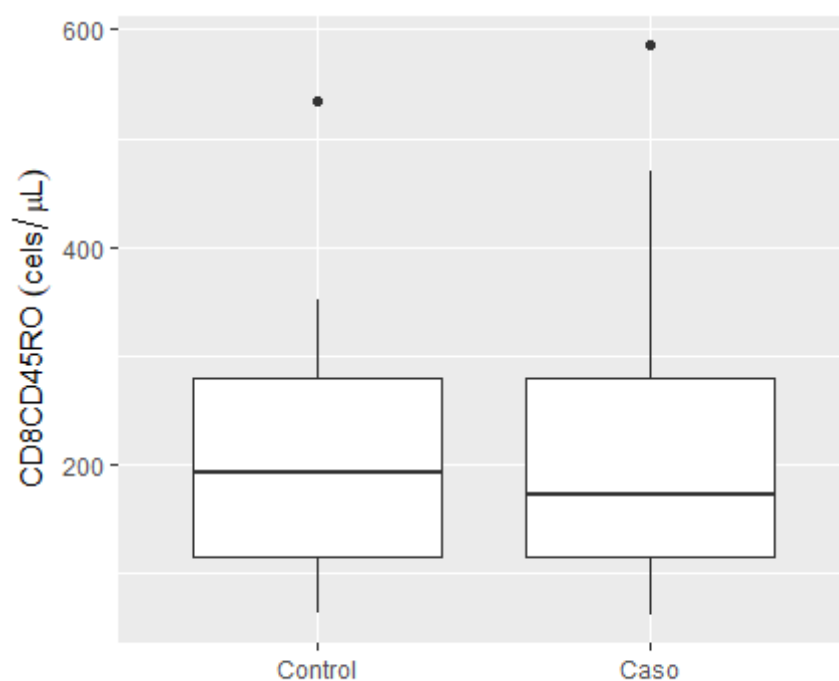


Figura 29. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de CD8CD45RO por grupo.**

3.2.2.2. Protocolo HLADR-LIN-123-85K-11C-45

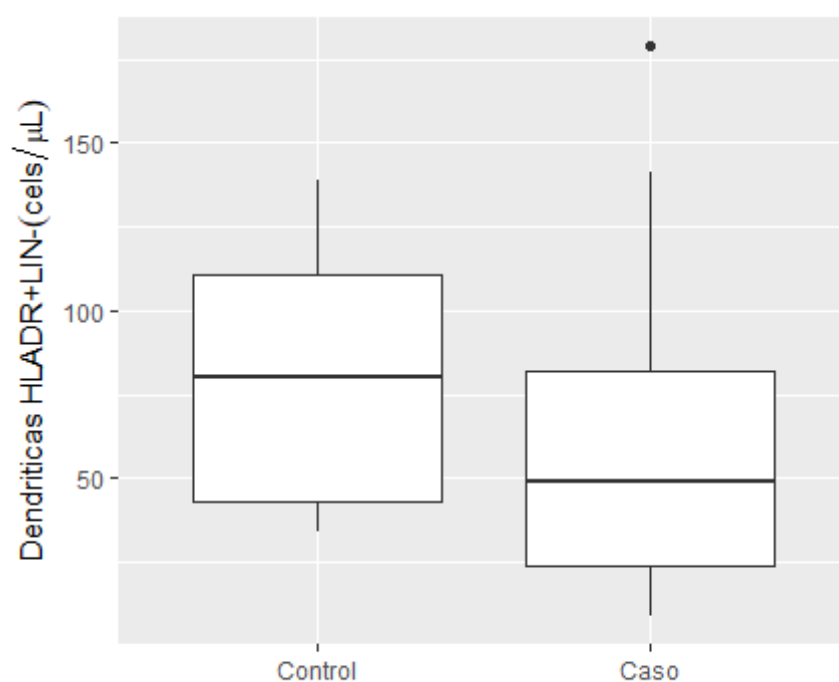


Figura 30. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de dendriticas HLADR+LIN- por grupo.**

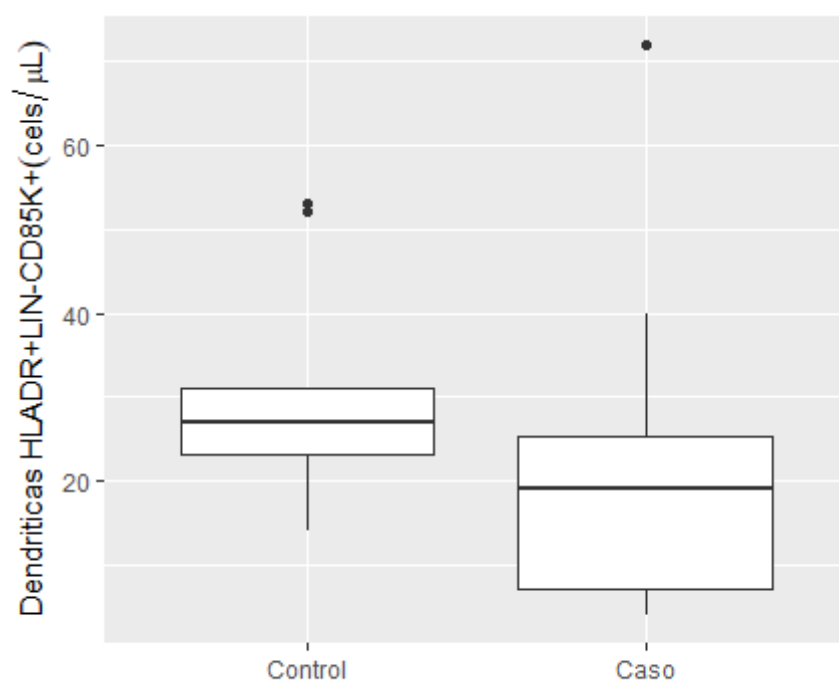


Figura 31. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de dendriticas HLADR+LIN-CD85K+ por grupo.**

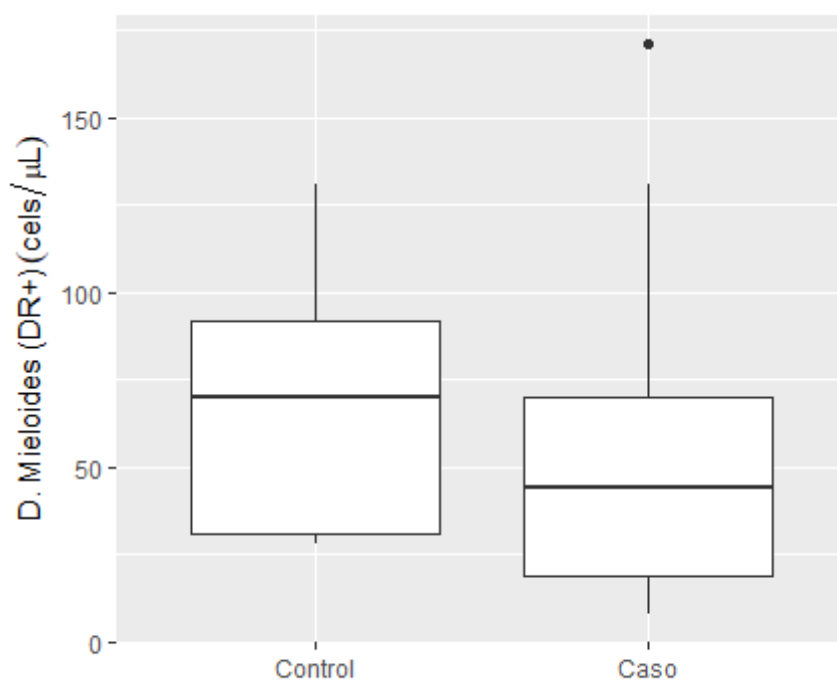


Figura 32. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de Dendríticas Mieloides (DR+) por grupo.**

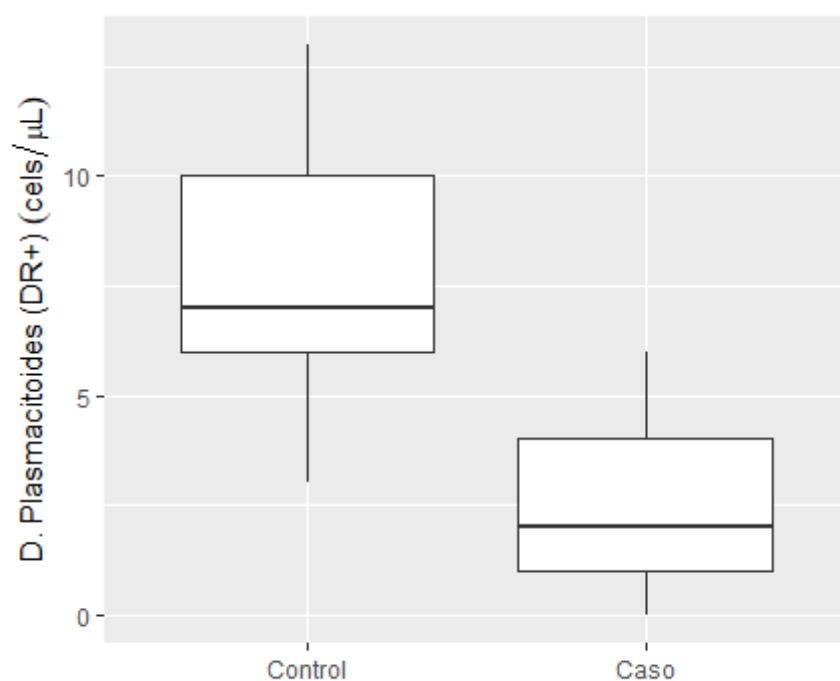


Figura 33. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de Dendríticas Plasmacitoides (DR+) por grupo.**

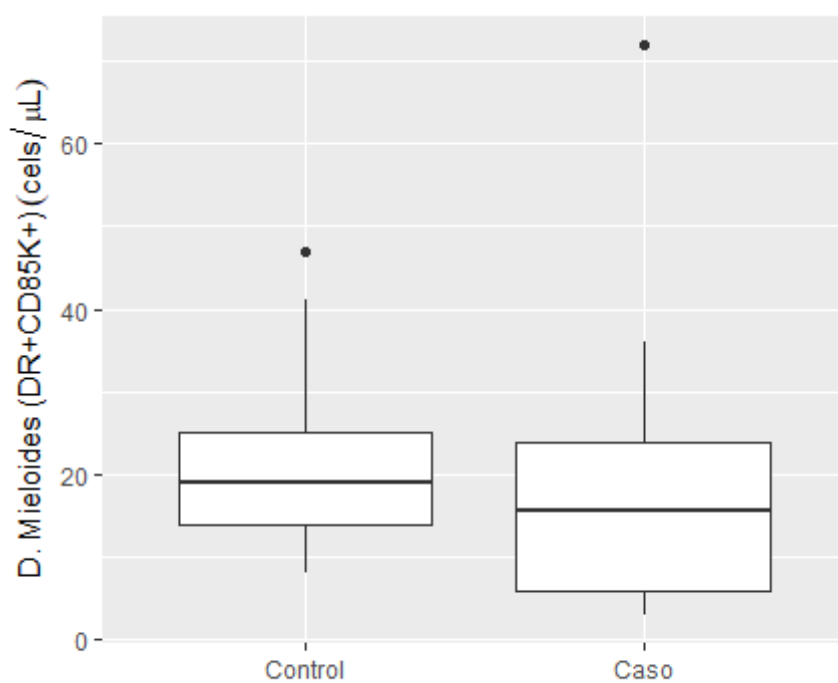


Figura 34. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de Dendríticas Mieloides (DR+CD85K+) por grupo.**

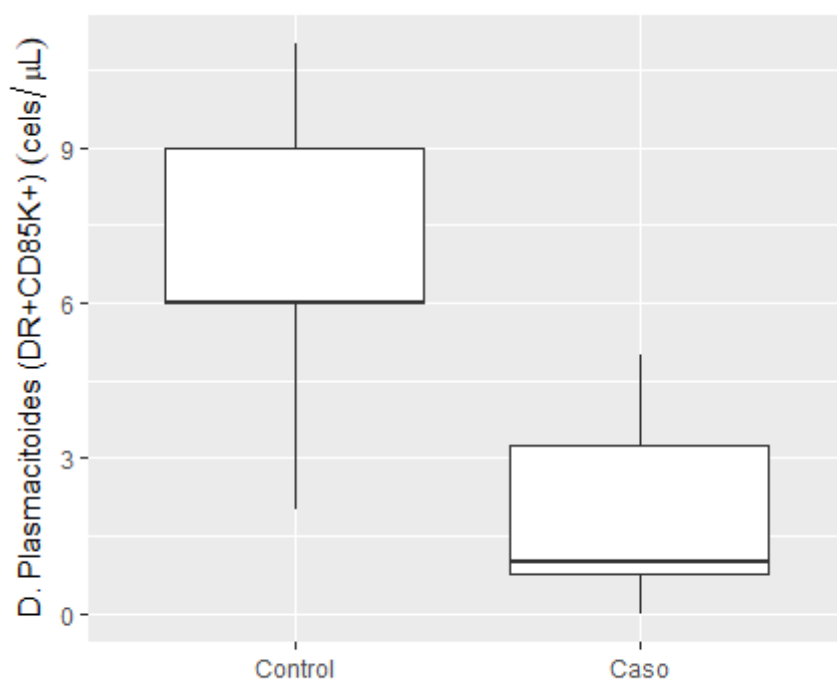


Figura 35. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de Dendríticas. Plasmacitoides (DR+CD85K+) por grupo.**

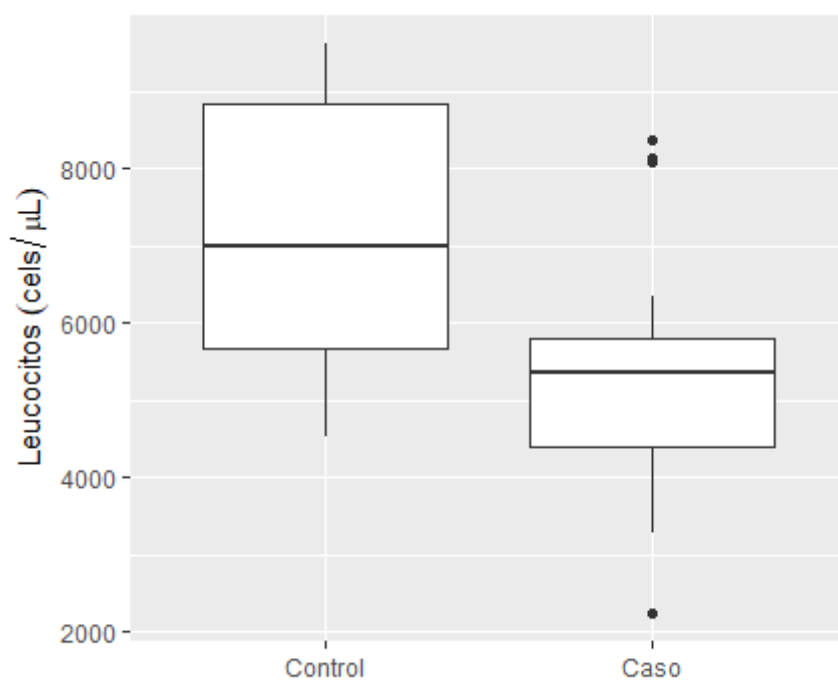
3.2.2.3. Protocolo TCRVG2-56-19-8-38-4-3-45

Figura 36. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de leucocitos por grupo.**

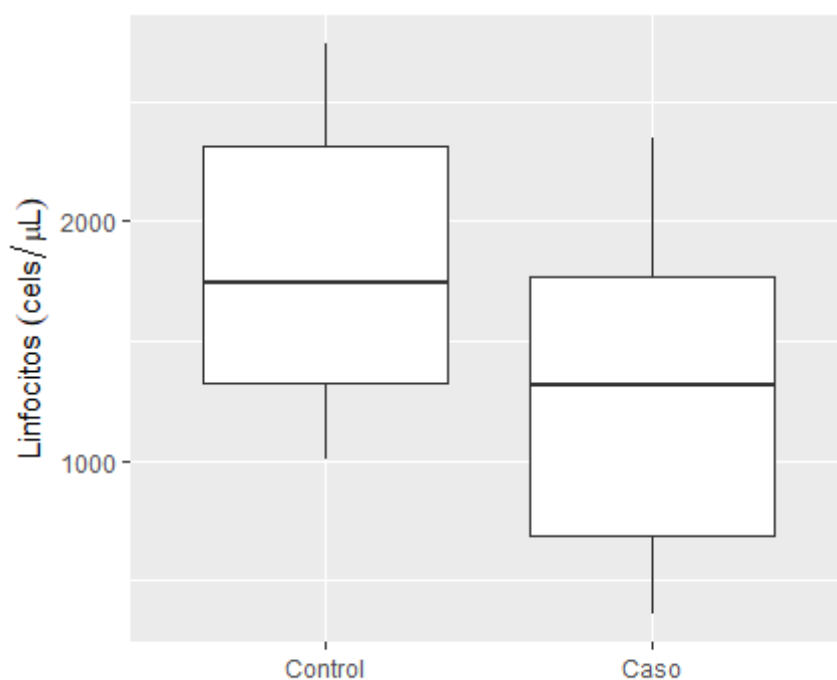


Figura 37. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de linfocitos por grupo.**

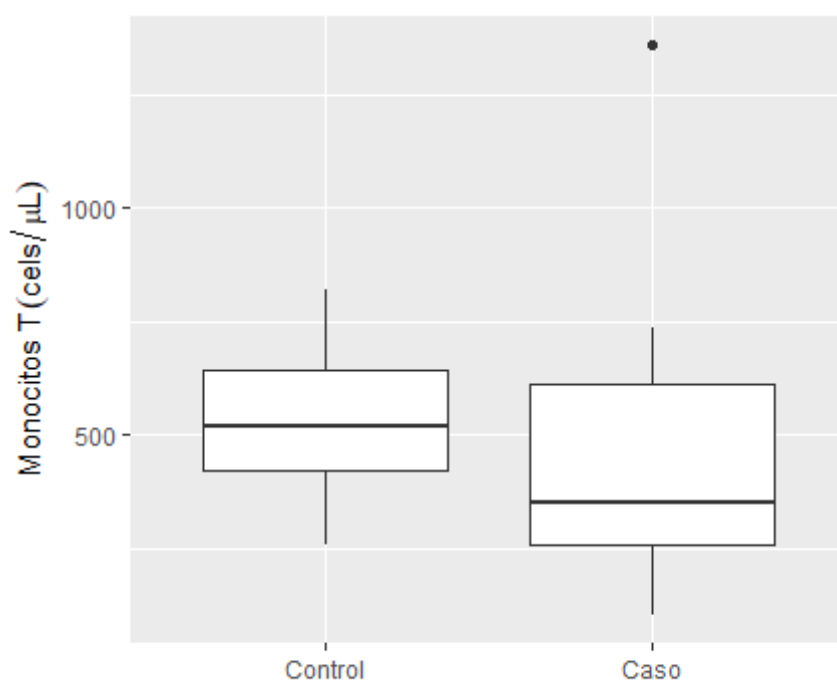


Figura 38. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de monocitos T por grupo.**

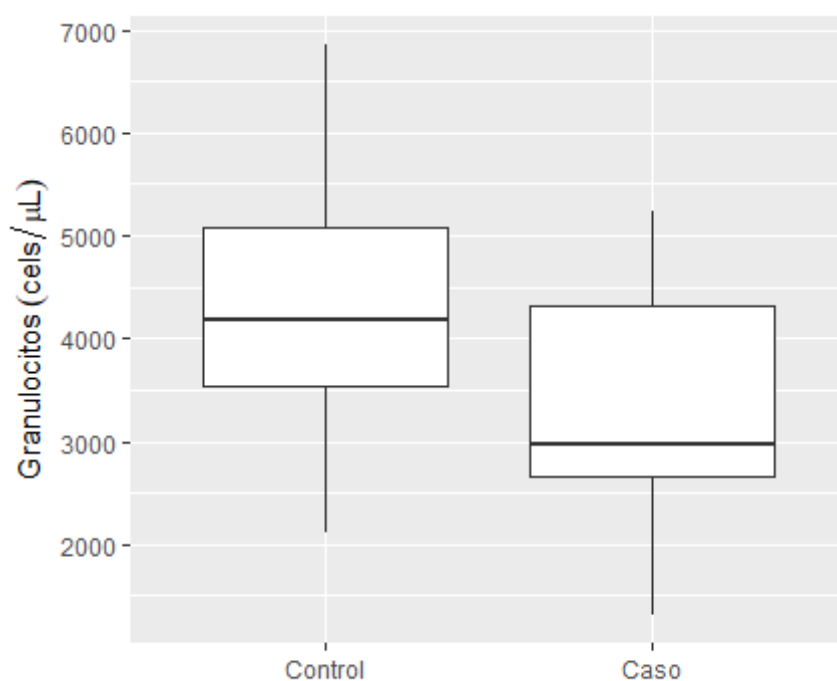


Figura 39. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de granulocitos por grupo.**

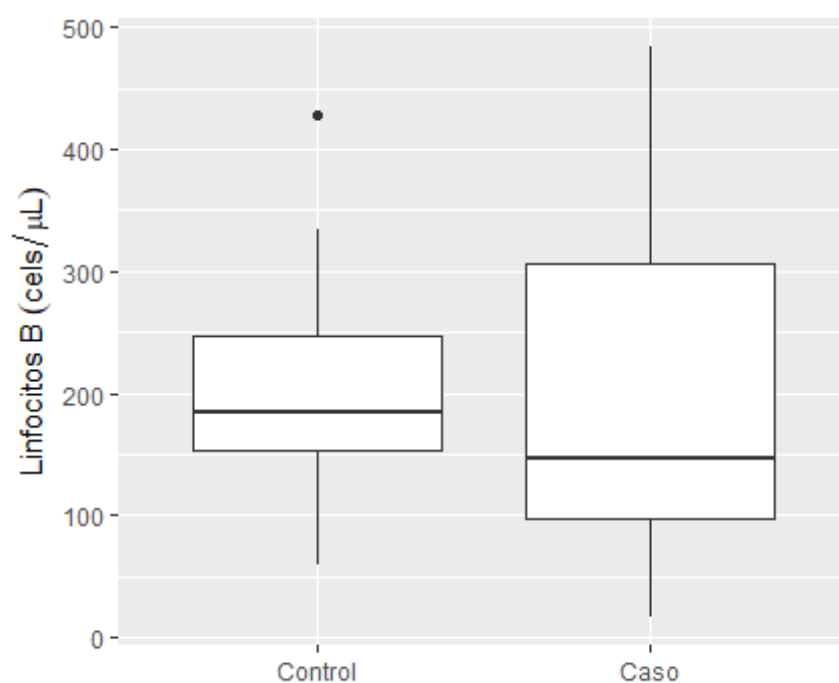


Figura 40. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de linfocitos B por grupo.**

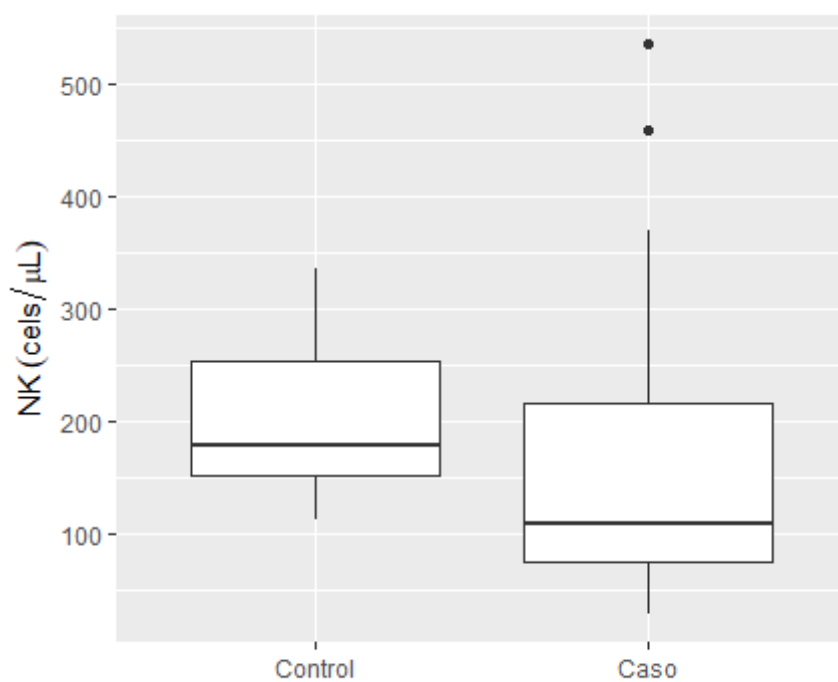


Figura 41. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de NK por grupo.**

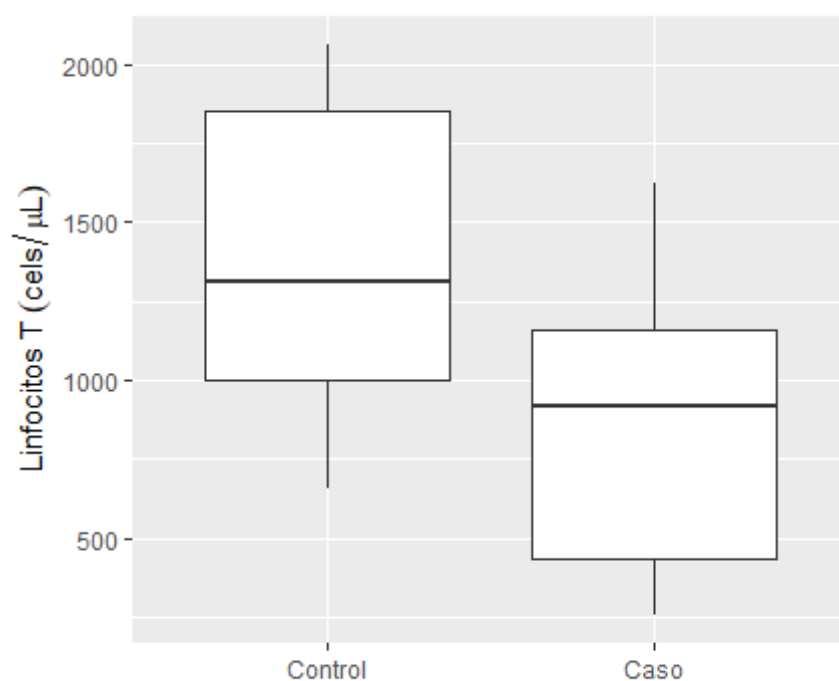


Figura 42. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de linfocitos T por grupo.**

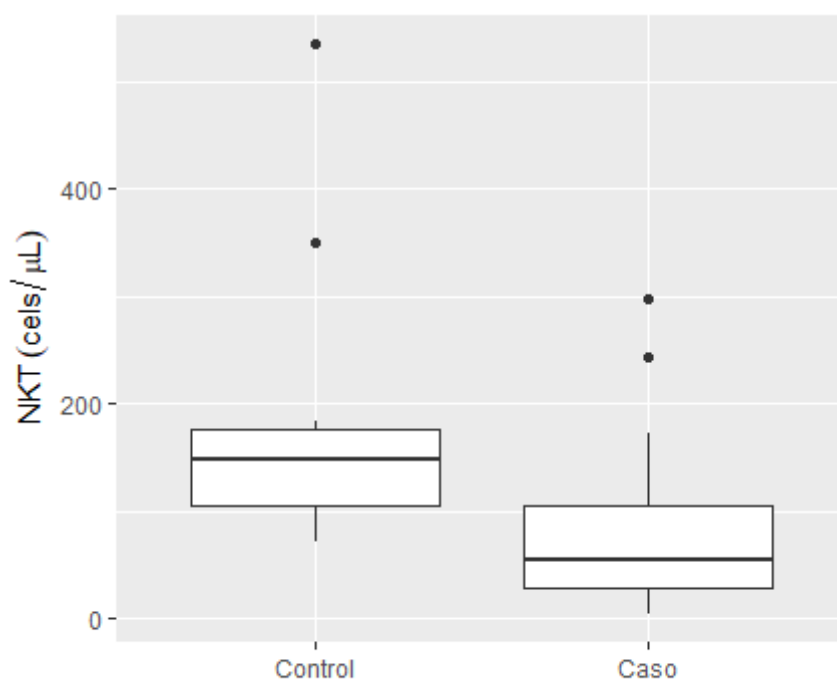


Figura 43. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de NKT por grupo.**

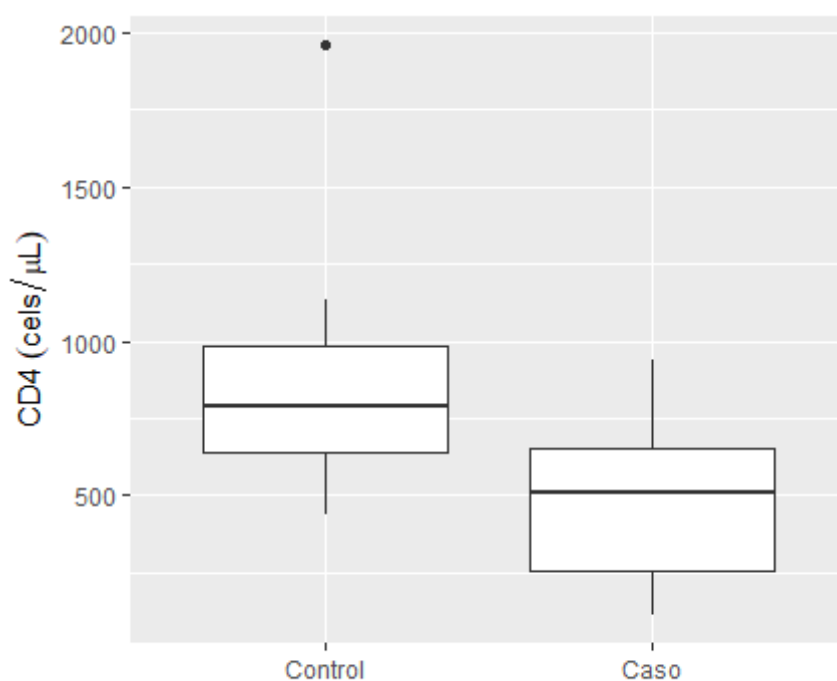


Figura 44. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de CD4 por grupo.**

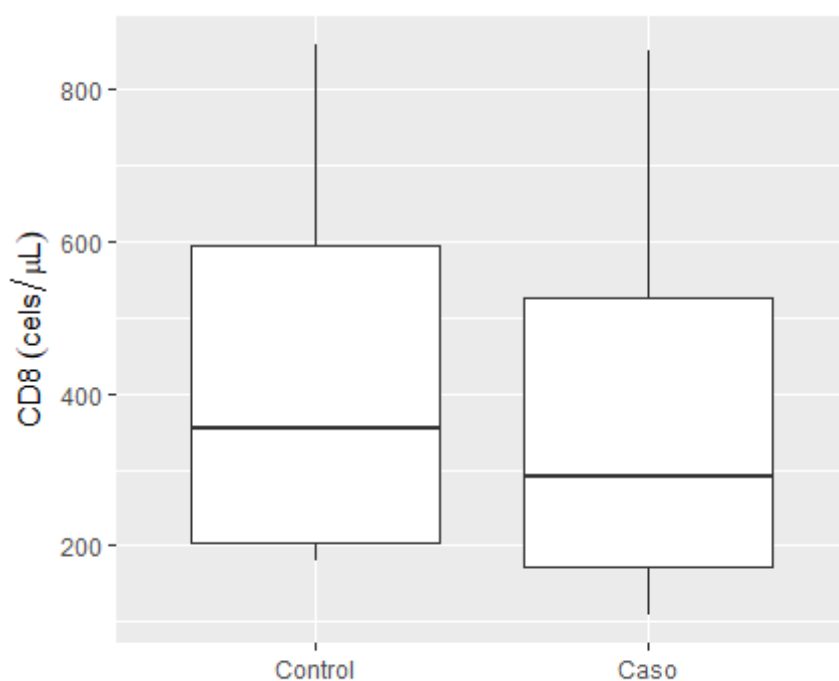


Figura 45. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de CD8 por grupo.**

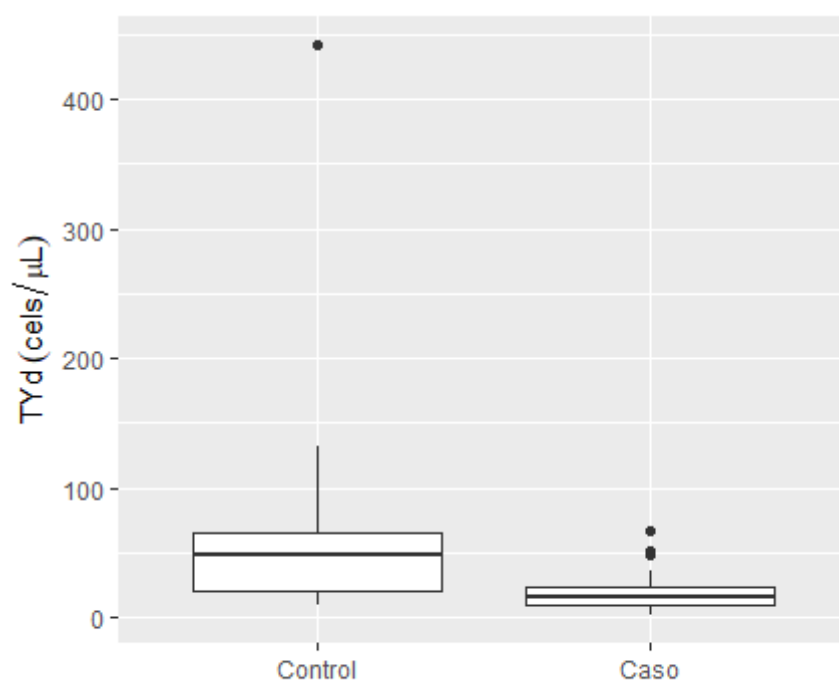


Figura 46. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de TYd por grupo.**

3.2.2.4. Protocolo VB11-1D-14-8-VA24-3-45

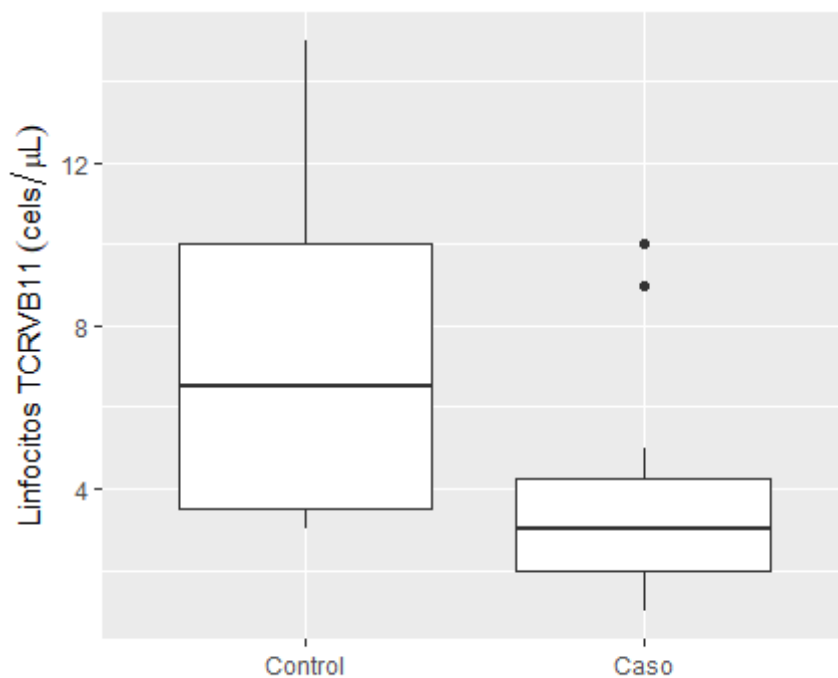


Figura 47. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de linfocitos TCRVβ11 por grupo.**

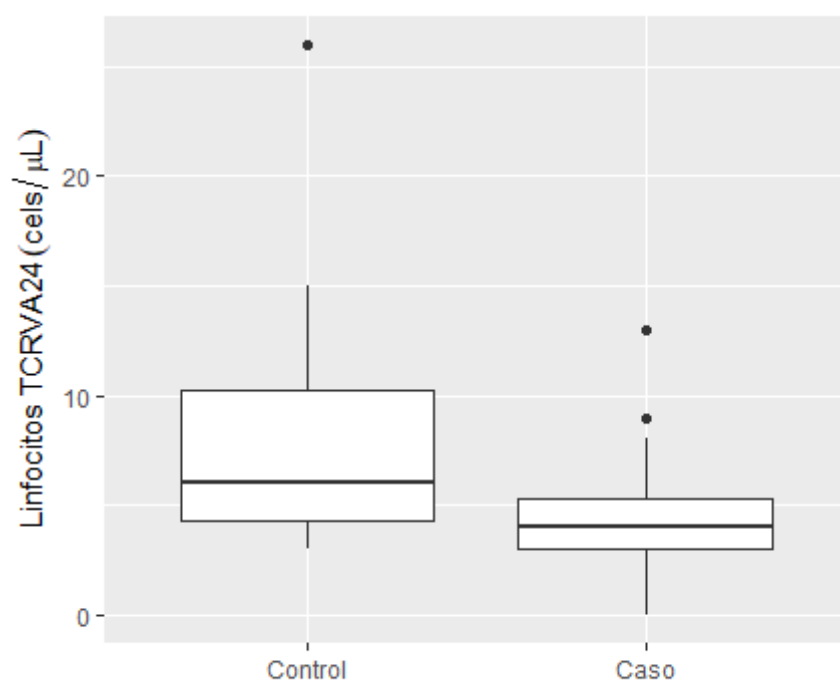


Figura 48. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de linfocitos TCRV α 24 por grupo.**

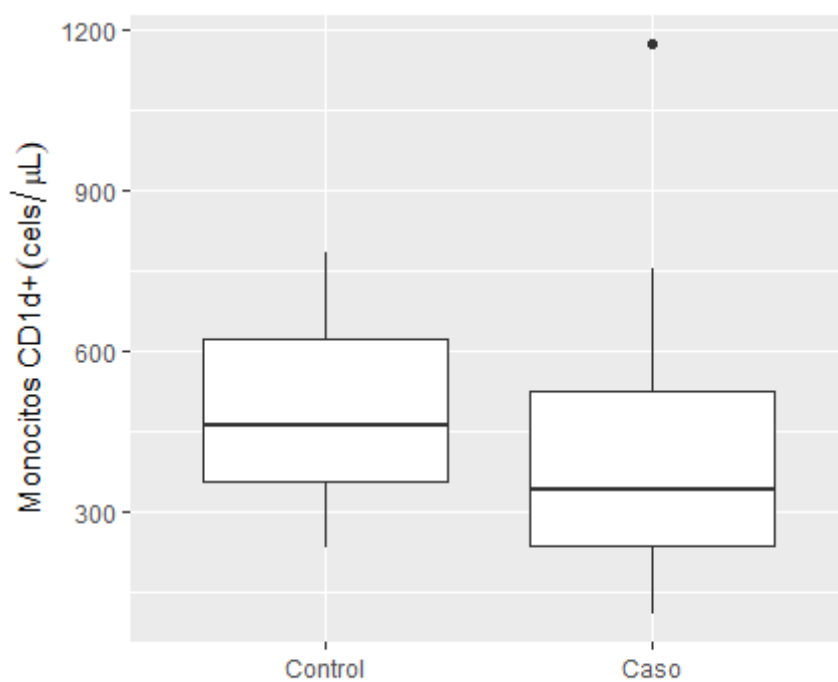


Figura 49. **Diagrama de distribución del recuento absoluto de monocitos CD1d+ por grupo.**

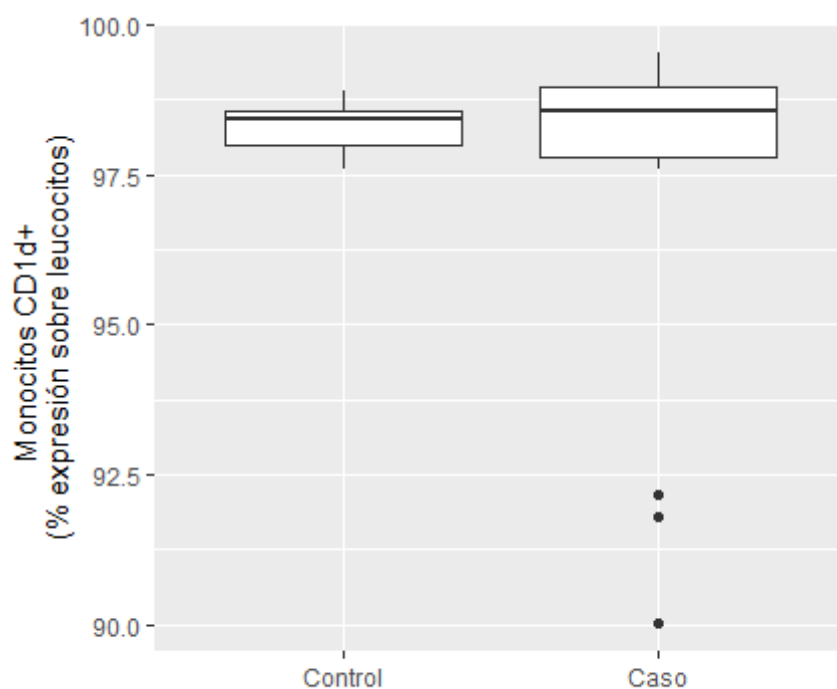


Figura 50. **Diagrama de distribución del % expresión sobre leucocitos de monocitos CD1d+ por grupo.**

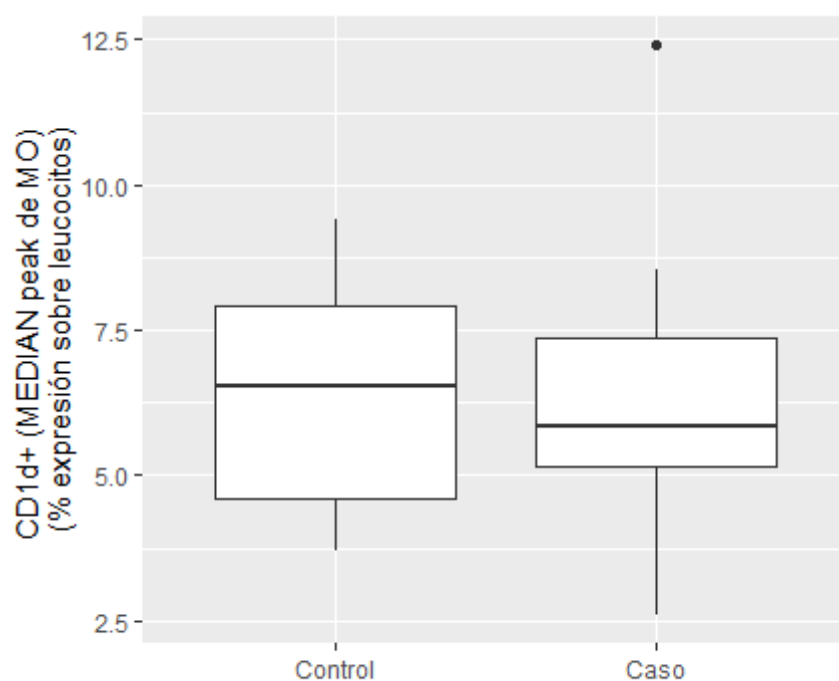


Figura 51. **Diagrama de distribución del % expresión sobre leucocitos de CD1d+ (MEDIAN peak de MO) por grupo.**

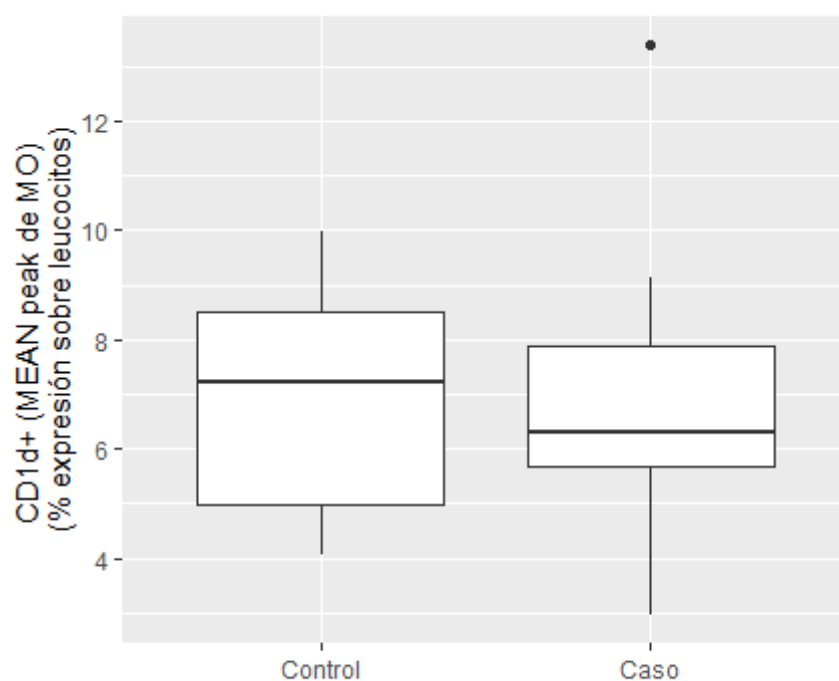


Figura 52. **Diagrama de distribución del % expresión sobre leucocitos de CD1d+ (MEAN peak de MO) por grupo.**

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La EG es la enfermedad de depósito lisosomal más común, causada por mutaciones en el GBA1, que conduce a una disminución de la actividad enzimática y a la acumulación de GC en los macrófagos.

Además de los síntomas clásicos de la EG tipo 1, como hepatoesplenomegalia, enfermedad esquelética, anemia y trombopenia, cada vez adquiere más interés y relevancia la existencia de otras comorbilidades menos conocidas y estudiadas en esta enfermedad, como son el riesgo incremento de cáncer y un perfil inmunológico alterado. Que los pacientes con EG presenten una mayor predisposición a las infecciones y aparición de determinados tumores, produce un impacto y predispone a tratar de averiguar las causas fisiopatológicas que derivan en esas alteraciones del sistema inmunitario, a día de hoy no bien conocidas. Además, tampoco se conoce bien el papel de la terapia en la posible corrección de la disfunción inmunitaria.

En vista de los datos bibliográficos previamente mencionados, este estudio se ha realizado para completar y apoyar lo referente a la presencia de alteraciones del sistema inmune de los pacientes con EG comprobándolo en nuestra serie de pacientes mediante un análisis minucioso y completo de las principales poblaciones celulares que constituyen el sistema inmune, y poder encontrar cambios en comparación a la población sana en cuanto a las alteraciones inmunes descritas en otros estudios

A su vez, y siguiendo en la línea de alteraciones hematológicas, hemos tratado de completar el estudio profundizando en parte de la etiopatogenia

menos conocida de la anemia en la EG, como son las alteraciones en receptores de membrana que pueden favorecer la predisposición a la eritrofagocitosis patológica, basándonos en modelos de otros trabajos presentes en la bibliografía en el momento del diseño de nuestro estudio.

El diseño de un estudio multicéntrico nacional, ha permitido reclutar y analizar un número mayor de pacientes a los incluidos en cualquier otra serie publicada, logrando un objetivo, siempre con limitaciones por las características heterogéneas que presentan estos pacientes ya que hay datos en estudios donde el recuento de poblaciones celulares se ve afectado en base al predominio de determinadas manifestaciones clínicas como la esplenectomía o la afectación ósea [59]. Obtener una serie amplia de pacientes con características clínicas homogéneas es difícil de alcanzar en una enfermedad minoritaria como es la EG.

En este estudio se ha podido demostrar que existe un compromiso en el recuento absoluto de una parte de las células que componen el sistema inmune de los pacientes con EG, al encontrarlas disminuidas en comparación al grupo control y esto se refleja tanto para componentes de la inmunidad innata como adquirida. Dentro de la inmunidad innata, se ha visto alteradas cuantitativamente, principalmente las subpoblaciones de DC, además de los LT δ Y y NKT. En cuanto a la inmunidad adquirida, hay una disminución absoluta en el global de LT, probablemente a expensas del bajo recuento absoluto de los LTCD4+.

Nuestros resultados, en general, se corresponden con los obtenidos por otros grupos de investigación en el momento de diseño y análisis de nuestro trabajo, si bien encontramos alguna discordancia en los resultados obtenidos de algún subtipo celular concreto.

En un primer análisis, ya observamos que el global de leucocitos, es diferente entre ambos grupos, y lo mismo pasa para el recuento total de LT. En los pacientes con EG se observa una disminución estadísticamente significativa de leucocitos respecto a la población sana (5125 cels/ μ L vs. 7199 cels/ μ L, $p < 0,05$), al igual que el total de LT (853 cels/ μ L vs. 1359 cels/ μ L, $p < 0,05$).

Nuestros resultados muestran disminución en el recuento de los LTCD4+ con valor estadísticamente significativo, pero sin diferencias en el caso de los LTCD8+. Las células T *naïve*/memoria se estudiaron en la sangre dentro de los subgrupos CD4 y CD8 utilizando los marcadores CD45RA y CD45RO. Los pacientes con EG mostraron una disminución importante de los LTCD4+ de memoria en comparación con el control sano (381 cels/ μ L frente a 630 cels/ μ L, $p > 0,05$) junto con una disminución significativa de los LTCD4+ *naïve* (121 cels/ μ L frente a 408 cels/ μ L, $p < 0,05$). Algo similar ocurrió con las frecuencias de medias en valores absolutos de LTCD8+ *naïve* en los pacientes con EG respecto a los controles (219 cels/ μ L frente a 369 cels/ μ L, $p < 0,05$) pero no para los LTCD8+ de memoria que no presentaban diferencias en ambos grupos (217 cels/ μ L frente a 219 cels/ μ L $p > 0,05$). Estos resultados difieren de otros publicados, con una *n* menor (7 pacientes) también bajo TRE a excepción de un paciente, que si bien obtienen disminuido el recuento de LTC4+ *naïve* al igual que los datos de nuestro estudio, el subgrupo de LTCD4+ de memoria está aumentado respecto al grupo control con valor estadísticamente significativo [59].

En cuanto al número de NK y frecuencias de LB en pacientes con EG no hubo diferencias respecto al grupo control. Se observó una disminución significativa en el número de células NKT ($p < 0,05$) y en el recuento de linfocitos $Ty\delta$ ($p < 0,05$) de los pacientes con EG de nuestra serie.

Destacar nuevamente, que las DC que tienen como los monocitos y macrófagos, actividad fagocítica importante, también podrían exhibir una función alterada en los pacientes con EG y nuestros resultados fueron similares a los obtenidos previamente en estudios. En el grupo de pacientes con EG la media del valor absoluto de ambas DC (DR+) estaba disminuida, y fue estadísticamente significativo en el caso de las pDC comparado con el grupo control (pDC 2,38 vs. 8 cels/ μ L, $p < 0,05$ y mDC 67,3 vs. 56,1 cels/ μ L, $p > 0,05$). Nuestros datos se aproximan a los descritos por otros grupos, sin alcanzar la significancia estadística para los dos subgrupos de DC que sí obtuvieron 2 grupos de investigación, tanto el liderado por Braudeau et al como por Micheva et al [59,61]. Las posibles causas de la reducción de las DC de la sangre periférica pueden ser centrales o periféricas.

Los resultados del análisis inmunofenotípico de la serie roja no se han podido completar. Si bien en estudios de glóbulos rojos para otras enfermedades como hemoglobinuria paroxística nocturna, mencionan la posibilidad de estudiar los hematíes hasta 48 horas tras la extracción, realizar el estudio en muestras extraídas más allá de las 24 horas, suponía un punto crítico que no podía asegurar la integridad de las células, dada la casuística de nuestro estudio que recibió muestras externas. Además, prácticamente el único estudio encontrado en la literatura remarca la gran variabilidad morfológica en cuanto a tamaño y granularidad entre pacientes, comparándolo con un único caso normal sin tener significancia. Esto nos hizo considerar el estudio escaso e incompleto (falta de moléculas estructurales del hematíe o microscopía electrónica para valorar el estado morfológico) para establecer conclusiones sin integrar todas las variables y supuso que no se completara el análisis estadístico. Aun así, se muestran los resultados descriptivos obtenidos con valores de media, mediana y porcentaje de la

expresión de CD47. Encontramos disminuida la expresión de CD47 medido (media y mediana), en pacientes con EG respecto al grupo control, pero no hay diferencias de la expresión medida en porcentaje respecto al grupo control. Dado que CD47 es un marcador de reconocimiento propio que protege a los glóbulos rojos de la fagocitosis, estos datos podrían explicar al menos parcialmente, el aumento de la eritrofagocitosis observado en algunos pacientes con EG

Nuestro estudio tiene varias limitaciones:

1) La primera está relacionada con el número de pacientes incluidos (n=18), que aunque es pequeño, probablemente sea el estudio que realiza un análisis inmunofenotípico cuantitativo exhaustivo más completo de las diferentes células del sistema inmune en EG tipo 1, incluyendo la mayor n de pacientes en comparación a los trabajos publicados en el momento del reclutamiento de nuestros pacientes. A pesar del bajo número de pacientes, hemos conseguido encontrar diferencias significativas en los recuentos de las células inmunitarias en comparación con la población control. Sería importante confirmar estos datos en cohortes más grandes de pacientes, aunque es complicado conseguir n mayores.

2) La solidez de nuestro estudio se basa en el hecho de que los análisis inmunológicos se realizaron en pacientes bajo tratamiento y todos con la misma estrategia terapéutica, todos recibían TRE, con un tiempo mínimo de exposición al tratamiento de 5 años en todos los pacientes. No se conoce bien si es posible la reversión en los subtipos celulares con la terapia, y cuál es el tiempo necesario para revertir las alteraciones inmunológicas una vez iniciado el tratamiento. Aunque la inclusión de pacientes bajo un mismo tratamiento con tiempo de exposición significativo es consistente, no nos ha permitido

conocer las variables de laboratorio basales previo al tratamiento, para evaluar si tras iniciar la terapia, esta podría potencialmente revertir o mejorar las alteraciones inmunes en el tiempo. Los escasos datos publicados acerca de este potencial beneficio, se muestran en un estudio que analiza los recuentos celulares tras meses de interrupción y meses después del reinicio del tratamiento, sin observar mejoría posterior. Aunque los tiempos tanto de interrupción como de reinicio de tratamiento, podrían ser cortos para establecer conclusiones a nuestro parecer [59]. En caso de que se confirmara que el tratamiento mejora las poblaciones celulares, aparte del beneficio obtenido en el paciente, podríamos utilizarlo como otra herramienta más en el seguimiento y evaluación de nuestros pacientes, utilizándolo de biomarcador en el control y manejo óptimo de la enfermedad.

3) Nuestro estudio muestra datos descriptivos de una población, sin profundizar en los mecanismos biológicos que conducen a la alteración de la función inmune en los pacientes con EG. Todos los pacientes incluidos en este estudio presentan EG tipo 1, pero la variabilidad clínica, fenotípica y molecular entre ellos, probablemente lleve intrínseco otras variables que condicionan el mayor o menor compromiso de la respuesta inmune entre estos pacientes, y que es difícil relacionar. Recordemos que los fenómenos de inflamación generan la liberación de citoquinas proinflamatorias que alteran el microambiente celular y por tanto el estado fisiológico de las células que participan en la función inmune, generando señales de hiperestimulación que en ocasiones conduce a un estado de fatiga celular.

La EG dispone de terapias efectivas y ha quedado demostrado que estas, reducen eficazmente la hepatoesplenomegalia, la enfermedad esquelética y la anemia y trombopenia. Ahora, es el momento de centrar la atención en nuevos retos, como la prevención y el tratamiento de otras comorbilidades asociadas

a la EG como son las alteraciones del sistema inmune, base fundamental en el control de infecciones y detección y eliminación de clonas tumorales celulares, que derivan en la aparición de neoplasias, fundamentalmente hematológicas. Esto requiere un gran esfuerzo y sería conveniente realizar un estudio multicéntrico internacional cuyo objetivo debe ser establecer si estas complicaciones a largo plazo pueden prevenirse y modificarse mediante la TRE y TRS y si esto justificaría el inicio temprano del tratamiento, en pacientes que no cumplen los estándares actuales de inicio de tratamiento.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se ha llevado a cabo un estudio comparativo de poblaciones celulares hematopoyéticas de sangre periférica, en pacientes con EG tipo 1 frente a sujetos sanos, realizando un análisis inmunofenotípico de la serie roja y blanca, para demostrar alteraciones inmunofenotípicas cualitativas en la serie roja o déficits cuantitativos celulares en la serie blanca en los pacientes.
2. El estudio de las células de la serie roja se realizó mediante la medición de la expresión del antígeno CD47, un marcador de reconocimiento propio que protege a los glóbulos rojos inhibiendo su fagocitosis por los macrófagos del sistema fagocítico mononuclear, a través de la unión a proteínas regulatorias de las señales. Aunque la expresión de CD47 estaba disminuida medido (media y mediana) en pacientes con EG respecto a controles, no consideramos estos resultados lo suficientemente sólidos para establecer conclusiones, al considerar que faltan datos descriptivos, fundamentalmente morfológicos que añadan un valor a los datos obtenidos,
3. El análisis inmunofenotípico de las principales células de la serie leucocitaria que constituyen la inmunidad innata y adquirida, demuestra una disminución de la celularidad, con diferencias estadísticamente significativas en el recuento global de leucocitos y en algunas de las subpoblaciones leucocitarias analizadas, en comparación al grupo control.

4. Entre los subtipos celulares disminuidos con valor estadístico frente al grupo control, encontramos:
 - a. los LTCD4+ totales y dentro de estos los LTCD4+RA
 - b. Los LTCD8+RA
 - c. Los NKT
 - d. Los T $\gamma\delta$
 - e. Las pDC
5. Los resultados de nuestro estudio no son exactos a los obtenidos en análisis inmunofenotípicos de otras series, aunque en líneas generales siguen patrones parecidos compartiendo parte de los resultados.
6. Especial mención merece los resultados obtenidos en el análisis de las DC, que constituye la principal célula presentadora de antígeno, con claras diferencias estadísticamente significativas para el subtipo plasmocitoide (pDC) de los pacientes frente al grupo control. Estos resultados sí son fieles y concordantes con los que obtienen otros grupos de investigación en todas las series publicadas.
7. Sería interesante evaluar bien la evolución de las alteraciones inmunológicas de los pacientes con EG tras recibir tratamiento de cara a garantizar un control óptimo de la enfermedad, y por qué no, si potencialmente hay reversión de las alteraciones tras la terapia, utilizar estos parámetros como biomarcadores de la EG.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. McComb S., Thiriot A., Akache B., Krishnan L., Stark F. Introduction to the Immune System. *Methods Mol Biol.* 2019;2024:1-24.
2. Janeway CA Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:197-216.
3. Mary Hannah Swaneya and Lindsay R. Kalan. Living in Your Skin: Microbes, Molecules, and Mechanisms. *Infect Immun.* 2021 Apr; 89(4): e00695-20.
4. Faenza I, L Blalock W. Innate Immunity: A Balance between Disease and Adaption to Stress. *Biomolecules* 2022 May 23;12(5):737.
5. Pei Xiong Liew, Paul Kubes. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev.* 2019 Apr 1;99(2):1223-1248.
6. Jakubzick, CV., Randolph GJ., Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol.* 2017 Jun;17(6):349-362.
7. Germic N., Frangez, Shida Yousefi Z., Hans-Uwe S. Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation. *Cell Death Differ.* 2019 Mar;26(4):715-727.
8. Zhigang G., Lixue W., Hongjian L., Yuhuai X.. Innate Immune Memory in Monocytes and Macrophages: The Potential Therapeutic Strategies for Atherosclerosis. *Cells.* 2022 Dec 15;11(24):4072.

9. Vázquez MB, Sureda M, Rebollo J. Células dendríticas I: aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunología* 2012;31(1): 21-30.
10. Ganguly D., Haak S., Sisirak V. and Reizis B. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2013 August; 13(8): 566–577.
11. Herrero MJ. ABC de los "Toll-like receptors": relación con el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes. *Semin Fund Esp Reumatol.* 2010;11(4):135–143136.
12. Matthew Collin and Venetia Bigley. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* 2018 May; 154(1): 3–20.
13. Taborda NA., Hernández JC., Montoya CJ., Rugeles MT. Las células *natura killer* y su papel en la respuesta inmunitaria durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1. *Inmunología* 2014 January–March 2014; 33(1): 11-20.
14. Can Kucuksezer U., Aktas Cetin E., Esen F., Tahralli I, Akdeniz N., Yusuf Gelmez M., et al. The Role of Natural Killer Cells in Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2021; 12: 622306.
15. Roda-Navarro P., Fernández-Ruiz E. Células natural killer. Concepto. Mecanismos de activación. Capacidades funcionales. Mecanismos de citotoxicidad. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado.* Volume 9, Issue 33, May 2005, Pages 2174-2180. Serrano Hernández A., Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatol Clin.* 2009;5(S1):1–5.
16. Bonilla FA., Oettgen HC., Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2): S33-40.

17. Prieto Martín A, Barbarroja Escudero J, Barcenilla Rodríguez J., Díaz Martín D. Funciones de los linfocitos B. - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado. Volume 11, Issue 28, March 2013, Pages 1752-1759.
18. Rincón-Arévalo H, Yassin-Noreña L, Vásquez G, Castaño D. Linfocitos B reguladores en enfermedades humanas y modelos murinos de autoinmunidad. *Inmunología* 2013;32(4): 129-138.
19. Paola Toche P. Visión panorámica del Sistema inmune. *Rev Med Clin. Condes-* 2012; 23(4) 446-457.
20. Sun, Yanhong Su L., Jiao, Xin Wang A., Zhang B., T cells in health and disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2023 Jun 19;8(1):235.
21. Hernández-Ruiz J., Becker Ingeborg. Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea. *Salud pública Méx* [revista en la Internet]. 2006 Oct [citado 2024 Feb 16]; 48 (5): 430-439. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342006000500009&lng=es.
22. Bourgeois C., Rocha B., and Tanchot C. A Role for CD40 Expression on CD8+ T Cells in the Generation of CD8+ T Cell Memory. *Science, New Series*, Vol. 297, No. 5589 (Sep. 20, 2002), pp. 2060-2063.
23. León, F., Villarrubia, N., & Bootello, A. (2002). Los linfocitos T $\gamma\delta$ y su papel en procesos de hipersensibilidad en la mucosa digestiva y respiratoria. *Allergologia et Immunopathologia*, 30(5), 273-282.
24. Nelson A., Lukacs JD., Johnston B. The Current Landscape of NKT Cell Immunotherapy and the Hills Ahead. *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 15;13(20).

25. Stirnemann J., Belmatoug N., Camou F., Serratrice C., Froissart R., Caillaud C., et al. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments *Int J Mol Sci.* 2017 Feb; 18(2): 441.
26. Boer D, van Smeden J., Bouwstra JA., and Aerts J. Glucocerebrosidase: Functions in and Beyond the Lysosome. *J. Clin. Med.* 2020, 9(3), 736.
27. Siebert M., Sidransky, E., and Westbroek W. Glucocerebrosidase is shaking up the synucleinopathies. *Brain.* 2014 May; 137(5): 1304–1322.
28. Beutler E, Grabowski GA. Gaucher disease. In: Scriver CBA, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic & molecular bases of inherited disease.* New York: McGraw-Hill; 2001. pp. 3635–68.
29. Grabowski GA. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet* 2008 Oct 4;372(9645):1263-71.
30. Castillon G., Chang SC., and Moride Y. Global Incidence and Prevalence of Gaucher Disease: A Targeted Literature Review. *J Clin Med* 2022 Dec 22;12(1):85.
31. Stirnemann J, Belmatoug N., Camou F., Serratrice C., Froissart R., Caillaud C., et al. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *Int J Mol Sci* 2017 Feb 17;18(2):441.
32. Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, Pastores G et al. The Gaucher Registry: demographics and disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease. *Arch Intern Med.* 2000; 160:1754–1760.

33. Carubbi F., Cappellini MD., Fargion S., Fracanzani AL, Nascimbeni F. Liver involvement in Gaucher disease: A practical review for the hepatologist and the gastroenterologist. *Dig Liver Dis* 2020 Apr;52(4):368-373.
34. Lachmann RH., Wight DG., Lomas DJ., Fisher NC, Schofield JP., Elias E., Cox TM., et al. Massive hepatic fibrosis in Gaucher's disease: clinico-pathological and radiological features. *QJM*. 2000 Apr;93(4):237-44.
35. Roca Espiau M., Bone disease in Gaucher's disease. *Med Clin (Barc)*. 2011 Sep;137 Suppl 1:23-31.
36. Hughes D., Mikosch P., Belmatoug N, Carubbi F., M Cox T., Goker-Alpan O., et al. Gaucher Disease in Bone: From Pathophysiology to Practice. *J Bone Miner Res*. 2019 Jun;34(6):996-1013.
37. KongW., Lu C., Ding Y., Meng Y. Update of treatment for Gaucher disease. *Eur J Pharmacol*. 2022 Jul 5;926:175023.
38. Prencipe F, Barzan C., Savian C., Spalluto G., Carosati E., De Amici M., et al. Gaucher Disease: A Glance from a Medicinal Chemistry Perspective. *ChemMedChem*. 2024 Feb 8:e202300641. doi: 10.1002/cmdc.202300641. Online ahead of print.
39. **CEREZYME®**. Ficha técnica o resumen de las características del producto. Agencia Española de Medicamento y Productos Sanitarios.
https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/97053003/FT_97053003.html.pdf.
40. **VPRIV®**. Ficha técnica o resumen de las características del producto. Agencia Española de Medicamento y Productos Sanitarios.

https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/10646002/FT_10646002.html.pdf.

41. Shayman JA. ELIGLUSTAT TARTRATE: Glucosylceramide Synthase Inhibitor Treatment of Type 1 Gaucher Disease. *Drugs Future*. 2010 Aug 1;35(8):613-620.
42. Suzuki Y. Chaperone therapy for molecular pathology in lysosomal diseases. *Brain Dev*. 2021 Jan;43(1):45-54.
43. Linari S. and Castaman G. Hematological manifestations and complications of Gaucher disease *Expert Rev. Hematol*. 9(1), 51–58 (2016).
44. Franco M, Collec E, Connes P, Akker E, Billette de Villemeur T, Belmatoug N, et al. Abnormal properties of red blood cells suggest a role in the pathophysiology of Gaucher disease. *Blood* (2013); 121 (3): 546–555.
45. Bratosin D, Tissier JP., Lapillonne H., Hermine O., Billette de Villemeur T., Cotoraci C., et al. Cytometric Study of the Red Blood Cells in Gaucher Disease Reveals their Abnormal Shape that May Be Involved in Increased Erythrophagocytosis. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011 Jan;80(1):28-37.
46. Oldenborg, PA.; Zheleznyak, A., Fang, YF. et al Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*; (2000) 288:2051-2054. 119
47. Tsai RK., Rodriguez PL., Discher, DE. Self inhibition of phagocytosis: the affinity of 'marker of self' CD47 for SIRPalpha dictates potency of inhibition but only at low expression levels. *Blood Cells Mol.Dis*; (2010) 45:67-74.

48. Burger P., de Korte D., van den Berg T., van Bruggen R. CD47 in Erythrocyte Ageing and Clearance – the Dutch Point of View *Transfus Med Hemother*; (2012) 39:348–352.
49. Zimran, A., Altarescu, G., Rudensky, B., Abrahamov, A. & Elstein, D. Survey of hematological aspects of Gaucher disease. *Hematology*, 2005. 10, 151–156.
50. Spectre G., Roth B., Ronen G., Rosengarten D., Elstein D., Zimran A., et al. Platelet adhesion defect in type I Gaucher Disease is associated with a risk of mucosal bleeding. *Br J Haematol*. 2011 May;153(3):372-8.
51. HKelsey, CC., Gray AA. and Machin SJ. Acquired pseudo-pseudo-Bernard-Soulier syndrome complicating Gaucher's disease. *J Clin Pathol* 1994; 47:162-165.
52. Gillis S., Hyam E., Abrahamov A., Elstein D., and Zimran A. Platelet Function Abnormalities in Gaucher Disease Patients *American Journal of Hematology* 61:103±106 (1999)
53. Giona F., Palumbo G., Amendola A., Santoro C., Mazzuconi MG. Platelet function and coagulation abnormalities in type 1 Gaucher disease patients: effects of enzyme replacement therapy (ERT). *J Thromb Haemost*. 2006 Aug;4(8):1831-3.
54. Spectre G, Roth B, Ronen G, Rosengarten D, Elstein D, Zimran A. et al. Platelet adhesion defect in type I Gaucher Disease is associated with a risk of mucosal bleeding. *British Journal of Haematology*. 2011 March. 153(3):372-8.
55. Zimran A, Elstein D, Abrahamov A, et al. Significance of abnormal neutrophil chemotaxis in Gaucher's disease. *Blood*. 1994; 84:2374–2375.

56. Marodi L, Kaposzta R, Toth J, et al. Impaired microbicidal capacity of type 1 Gaucher disease: partial correction by enzyme replacement therapy. *Blood*. 1995; 86:4645–4649.
57. Lacerda L, Arosa FA, Lacerda R, Cabeda J, Porto G, Amaral O, et al. T cell numbers relate to bone involvement in Gaucher disease, *Blood Cells Mol. Dis.* 25 (1999) 130–138.
58. Braudeau C, Graveleau J, Rimbart M, Néel A, Hamidou M, Grosbois B, et al. Altered innate function of plasmacytoid dendritic cells restored by enzyme replacement therapy in Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis.* 2013 Apr;50(4):281-8.
59. Limgala RP, Jani C, Ioanou C, Alpan O, Goker-Alpan O. Enzyme replacement therapy reverses B lymphocyte and dendritic cell dysregulations in patients with Gaucher Disease. *Blood Cells Mol Dis.* 2018 Feb; 68:81-85.
60. Dakic A, Wu L. Hemopoietic precursors and development of dendritic cell populations, *Leuk. Lymphoma* 44 (2003) 1469–1475.
61. Micheva I, Marinakis T, Repa C, Kouraklis-Symeonidis A, Vlacha V, Anagnostopoulos N, et al. Dendritic cells in patients with type I Gaucher disease are decreased in number but functionally normal. *Blood Cells Mol Dis.* 2006 Mar-Apr;36(2):298-307
62. Alison S. Thomas, Atul Mehta and Derralynn A. Hughes. Gaucher disease: haematological presentations and complications. *British Journal of Haematology*, 2014, 165, 427–440
63. Brautbar A, Elstein D, Pines G, Abrahamov A, and Zimran A. Effect of enzyme replacement therapy on gammopathies in Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 32 (2004) 214–217.

64. de Fost M, Out TA, de Wilde FA, Tjin EPM, Pals ST, MH, Van Oers J. et al. Immunoglobulin and free light chain abnormalities in Gaucher disease type I: data from an adult cohort of 63 patients and review of the literature *Ann Hematol* (2008) 87:439–449.
65. Rosenbloom BE, Weinreb NJ, Zimran A, Kacena KA, Charrow J, Ward E. Gaucher disease and cancer incidence: a study from the Gaucher Registry. *Blood* .2005 Jun 15;105(12):4569-72.
66. Fost M, Vom Dahl S, Weverling G J, Brill N, Brett S, Häussinger D et al. Increased incidence of cancer in adult Gaucher disease in Western Europe. *Blood Cells Mol Dis*. Jan-Feb 2006;36(1):53-8.
67. Taddei TH, Kacena KA, Yang M, Yang R, Malhotra A, Boxer M et al. The underrecognized progressive nature of N370S Gaucher disease and assessment of cancer risk in 403 patients. *Am J Hematol*. 2009 Apr;84(4):208-14.
68. Cossarizza, A., Chang, H. D., Radbruch, A., Acs, A., Adam, D., Adam-Klages, S. et al Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *European Journal of Immunology*. (2017). 47(10), 1584-1797.
69. Maecker, H. T., Trotter, J. Flow Cytometry Standards Task Force of the International Society for Advancement of Cytometry. (2012). Flow
70. cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity. *Cytometry Part A*, 81(12), 1021-1030
71. Hoffman RA. Flow Cytometry: Instrumentation, Applications, Future Trends and Limitations. *Springer Ser Fluoresc* (2008) 6:307–342.
72. Pérez Lara J, Santiago Cruz W, Romero-Ramírez H, Rodríguez-Alba J, Fundamentos de citometría de flujo: su aplicación

- diagnóstica en la investigación biomédica y clínica. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana* (2018), 18 (2).
73. Shapiro, H. M. (2003). *Practical Flow Cytometry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471722731>.
74. Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., Nalbant, A. (2016). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176. doi:10.3109/07388551.2015.112887.
75. Marti, G. E., Stetler-Stevenson, M., Bleesing, J. J., & Fleisher, T. A. (2001). In trodution to flow cytometry. *Seminars in Hematology*, 38(2), 93–99.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1



A/A.: Dr. Miguel Fernández Zarzoso
Servicio de Hematología

Dña. Pilar Codoñer Franch, Presidenta del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Dr. Peset.

CERTIFICA:

Que este comité en su reunión celebrada el día 2 de Agosto de 2017 ha evaluado y ha aprobado el estudio titulado: Análisis inmunofenotípico de la serie blanca y roja en pacientes Gaucher tipo I.

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Son adecuados la Hoja de información al paciente, el procedimiento para obtener el consentimiento informado, y el modo de reclutamiento previsto.



Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en función de las características del estudio

Proyecto de investigación. Tesis doctoral

Código Ceic: 44/17

Valencia 3 de Agosto de 2017



Fdo.: Dra. Pilar Codoñer Franch

ANEXO 2

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Versión 1.0 01/09/2012

TÍTULO: "MONITORIZACIÓN E INDIVIDUALIZACIÓN POSOLÓGICA DE GLUCOCEREBROSIDASA EN PACIENTES GAUCHER TIPO I"

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Elena Gras Colomer del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia.

PROMOTOR: Fundación para el fomento de la investigación sanitaria y biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO)

La enfermedad de Gaucher es una enfermedad debido a la falta total o parcial de una proteína en el organismo, que produce un acúmulo de ciertas sustancias, que hacen que el organismo no funcione adecuadamente. El tratamiento es la reposición de esa proteína vía intravenosa con Imiglucerasa (Cerezyme®) o Velaglucerasa (Vprp®). Pero las dosis adecuadas para cada paciente todavía no están claras, por lo que deseamos llevar a cabo un estudio para investigar sobre el ajuste de la dosis de medicamento en pacientes con Enfermedad de Gaucher.

Considerando la enfermedad que usted padece, EL INVESTIGADOR/ RESPONSABLE CLÍNICO que le informa.....del HOSPITAL.....le invita a participar en este proyecto de investigación, para lo que solicitamos su consentimiento.

Su participación es totalmente voluntaria. Antes de decidir si quiere participar o no, le rogamos lea detenidamente este documento que incluye la información sobre este estudio. Queremos asegurarnos de que está perfectamente informado sobre el propósito y lo que implica para usted la participación en el mismo. Puede formular todas las preguntas que le surjan y solicitar aclaración sobre cualquier aspecto para asegurar que entiende todos los procedimientos del estudio, incluyendo los posibles

riesgos y/o los beneficios esperados. No firme antes de tener la seguridad de entender todos los aspectos y objetivos del estudio.

Propósito del estudio.

La posología actual de los fármacos empleados en la terapia enzimática sustitutiva en la enfermedad de Gaucher tipo I, está determinada de acuerdo al peso del paciente y se describen criterios para modificación de dosis basados en las situaciones clínicas del paciente. El objetivo del estudio es establecer dosis optimizadas en función de la cantidad de proteína del paciente y de su situación clínica, para obtener tratamientos personalizados y más coste-efectivos.

Procedimiento.

Para poder realizar el estudio usted NO tendrá que acudir más veces al hospital de las visitas establecidas por su médico para el seguimiento de su enfermedad.

Si desea participar, rellenará un cuestionario sobre su estado salud, y su médico recopilará su información médica necesaria para el estudio. Además se necesita extraer una muestra de su sangre cuando acuda al hospital a ponerse la medicación. Será procesada en la Unidad de Investigación Clínica del Servicio de Farmacia y en la Unidad de Citometría del Servicio de Hematología del Hospital Dr. Peset de Valencia. Con la muestra, se procederá a la determinación de la actividad de proteína y se correlacionará con sus antecedentes clínicos, con la sintomatología actual, con las características de las células donde se acumula el medicamento, con la cantidad de dosis recibida y comparando esa actividad con la cantidad de proteína que tienen los individuos sanos.

Con toda esa información su médico podrá decidir si considera adecuado modificar las dosis de su tratamiento. Si fuera así, le extraeríamos otro tubo de sangre, cuando acuda al hospital a ponerse la medicación, para comprobar si se ha modificado la cantidad de proteína de su organismo.

Muestras a recoger.

Como parte de este proyecto y al reunir una serie de condiciones definidas en el protocolo aprobado por un Comité de Ética de Investigación, se le va a extraer una muestra de sangre para utilizarla con fines de investigación. La investigación con

muestras biológicas tiene como objetivo aumentar los conocimientos sobre la patología o proceso objeto de estudio y la obtención y desarrollo de nuevas estrategias y terapias aplicables a pacientes

La extracción de sangre no conlleva más molestias que un simple pinchazo en la vena en el brazo. A veces, muy raramente, le puede ocasionar un pequeño hematoma o una leve inflamación que remitirán en pocos días. Además, en la medida de lo posible, coincidirá con alguna extracción de rutina que deba realizarse.

Beneficio y atención médica.

La participación en el estudio no conlleva ningún beneficio económico para el sujeto participante en el estudio y no le supone coste alguno. En cualquier caso, los datos recogidos en el mismo podrán derivar en un mayor conocimiento de su enfermedad y tratamiento.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria: Si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que pudiera necesitar y su relación con los equipos médicos que le atiendan no se verá afectada.

Aspectos Éticos.

La investigación se desarrollará con el máximo respeto de los derechos individuales, según los postulados aceptados internacionalmente por las Naciones Unidas y la Comisión Europea (Acta de Helsinki de 2008 y Convenio de Oviedo de 1997). Por ello, todas las investigaciones que se lleven a cabo contarán con la aprobación y supervisión de los diferentes Comités de Ética quienes velarán por el cumplimiento de los postulados anteriormente citados.

Tratamiento de los datos y confidencialidad.

Se solicita su consentimiento para la utilización de sus datos y su muestra para el desarrollo de este proyecto de investigación. Tanto los datos personales (edad, sexo, raza), como los datos de salud o la muestra para investigación, se recogerán empleando un procedimiento de codificación. Sólo su MEDICO RESPONSABLE podrá relacionar estos datos con usted, siendo responsable de custodiar el documento de consentimiento. Sólo a él/ella le corresponde garantizar el cumplimiento de su voluntad en relación al uso de la muestra biológica que usted cede para investigación.

La información será procesada durante el análisis de los datos obtenidos y aparecerá en los informes y/o memorias del Proyecto, aunque en ningún caso será posible identificarle, asegurando en todo momento el cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

En observancia a esta ley le informamos que los datos de carácter personal recogidos en este estudio pasarán a formar parte de un fichero automatizado que reúne las medidas de seguridad de nivel alto.

Asimismo, los resultados de esta investigación podrán publicarse en revistas científicas o presentarse en sesiones clínicas, pero siempre garantizando el completo anonimato.

El _____ Hospital
_____ garantiza que en
ningún caso saldrá del centro dato alguno que le identifique personalmente.

Se garantiza el respeto a la calidad de los proyectos de investigación biomédica y el respeto a la dignidad de las personas durante su consecución, en cumplimiento de la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, y la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

Revocación del consentimiento.

Puede revocar en cualquier momento su participación sin necesidad de dar explicaciones, sin que ello represente para usted ningún inconveniente y sin perder el derecho a recibir la atención médica necesaria para su estado de salud. No se procederá a recoger nuevos datos después del abandono del estudio. Si usted decidiera retirarse en cualquier momento del estudio o no desea participar en el mismo la relación con su médico NO se verá alterada en modo alguno.

Los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición puede ejercitarlos ante el

Dr./Investigador/Clínico que le informa _____cuyo lugar de
trabajo es_____.

Destino de la muestra tras su utilización en este proyecto de investigación.

Una vez finalizada la investigación, es posible que existan muestras sobrantes. En relación a las mismas, el investigador procederá a la destrucción de la muestra sobrante.

Información adicional.

Si usted precisa mayor información sobre este estudio puede contactar con el investigador principal Elena Gras Colomer (telf. 961622541) del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Dr. Peset.

ANEXO AL CONSENTIMIENTO INFORMADO (Versión 1.0 01/09/2012).

NOTA ACLARATORIA

El consentimiento informado utilizado en los pacientes para la obtención de muestras ha sido el mismo que el utilizado para el estudio "MONITORIZACIÓN E INDIVIDUALIZACIÓN POSOLÓGICA DE GLUCOCEREBROSIDASA EN PACIENTES GAUCHER TIPO I" dado que el proyecto de investigación actual, se complementa en este mismo, y en el apartado PROCEDIMIENTO, especifica que se realizará un estudio ~~inmunofenotípico~~ de estos pacientes:

"Si desea participar, rellenará un cuestionario sobre su estado salud, y su médico recopilará su información médica necesaria para el estudio. Además se necesita extraer una muestra de su sangre cuando acuda al hospital a ponerse la medicación. Será procesada en la Unidad de Investigación Clínica del Servicio de Farmacia y en la Unidad de Citometría del Servicio de Hematología del Hospital Dr. Peset de Valencia. Con la muestra, se procederá a la determinación de la actividad de proteína y se correlacionará con sus antecedentes clínicos, con la sintomatología actual, con las características de las células donde se acumula el medicamento, con la cantidad de dosis recibida y comparando esa actividad con la cantidad de proteína que tienen los individuos sanos".

Se adjunta el consentimiento informado del estudio "MONITORIZACIÓN E INDIVIDUALIZACIÓN POSOLÓGICA DE GLUCOCEREBROSIDASA EN PACIENTES GAUCHER TIPO I" (Versión 1.0 01/09/2012).

