



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE FIBROBLASTOS
DE PACIENTES CON ATP6V0A2-CDG

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

SANDRA R.MANRIQUE HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. IVÁN MARTÍNEZ DUNCKER RAMÍREZ
[Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM.](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES
[Instituto de Biotecnología, UNAM.](#)

DR. ALEJANDRO SÁNCHEZ FLORES
[Instituto de Biotecnología, UNAM.](#)

Ciudad de México. Enero, 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Glicobiología Humana y Diagnóstico Molecular del Centro de Investigación en Dinámica Celular de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la tutoría del Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez y como tutor invitado el Dr. Armando Hernández Mendoza.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco el apoyo otorgado para el desarrollo del presente trabajo:

- Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Red Temática de Glicociencia en Salud-CONACyT.
- Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México.

Dedico esta tesis a mi familia:

María de los Ángeles Hernández Camacho

Quintín R. Manrique Barenque

Ana Karen R. Manrique Hernández

Loreta Mendoza R Manrique

André Mendoza R Manrique

AGRADECIMIENTOS

Con todo mi amor, cariño y entusiasmo, a mis padres, **María de los Ángeles Hernández Camacho** y **Quintín R. Manrique Barenque**, gracias por su gran apoyo y motivación, por impulsarme a ser mejor persona y sobre todo por siempre estar presentes para mí.

Muy especialmente a mi hermana, **Ana Karen R. Manrique Hernández** por ser mi compañera de vida y por darme a los mejores sobrinos **Loreta Mendoza R Manrique** y **André Mendoza R Manrique**.

Con todo el amor y felicidad a mi novio, **Fernando Rodríguez García** porque siempre me motiva a ser una mejor persona, por el nuevo camino que recorreremos juntos.

Al **Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez**, por ser mi tutor, por su guía, apoyo, comprensión, tiempo y valiosos consejos a lo largo de mi etapa como estudiante, además por su confianza para trabajar juntos en diversos proyectos y darme la oportunidad de crecer en lo personal y en lo profesional.

A los miembros de mi comité tutor, al **Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles** y al **Dr. Alejandro Sánchez Flores**, por brindarme su asesoría con tan apreciables comentarios y sugerencias para enriquecer mi trabajo.

A los sinodales, el **Dr. Edgar Zenteno Galindo**, la **Dra. Laura Palomares Aguilera**, la **Dra. Sonia Dávila Ramos**, el **Dr. Adrián Ochoa Leyva** y la **Dra. Claudia Rodríguez Almazán** por sus aportaciones para la mejora de mi trabajo.

A mi grupo de trabajo a la **Dra. Roberta Salinas Marín** y a la **Lic. Ana María González**, por compartirme sus conocimientos y siempre brindarme su ayuda.

Al **Dr. Armando Hernández Mendoza** por su apoyo continuo para el desarrollo del proyecto, gracias por su compromiso.

A mi amiga **Lya Gutiérrez Valenzuela** por compartirme sus conocimientos en el laboratorio y alentarme a no rendirme cuando las cosas fueron difíciles y sobre todo por la gran amistad formada durante esta aventura, gracias por tu apoyo, te quiero.

A mis amigas **Brianda de la Sancha Pérez** y **Nadia Araceli Pedroza Ocampo** por su amistad, lealtad, apoyo, ánimos y consejos, gracias por siempre estar ahí, las quiero.

Al M. en T.I. **Juan Manuel Hurtado Ramírez** por su gran ayuda para la realización del presente trabajo, su apoyo fue fundamental para lograrlo.

A mis compañeros de trabajo, **Roberto Téllez García, Patricia González Morales, Mayra López Alarcón** que hicieron que con sus pláticas y risas el trabajo diario se hiciera más fácil.

ÍNDICE

RESUMEN.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. MARCO TEÓRICO	14
2.1 GLICOSILACIÓN	14
2.2 DESÓRDENES CONGÉNITOS DE LA GLICOSILACIÓN (CDG)	17
2.3 CUTIS LAXA	20
2.4 ATP6V0A2-CDG	27
2.5 HOMEOSTASIS DEL APARATO DE GOLGI	29
2.6 V-ATPASA.....	32
2.7 MATRIZ EXTRACELULAR.....	37
2.8 LOS FIBROBLASTOS	42
2.9 TRASTORNOS GENÉTICOS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR	47
2.10 SECUENCIACIÓN DE ARN.....	48
2.11 ANÁLISIS DE DATOS DE RNA-SEQ.....	51
3. ANTECEDENTES	61
4. HIPÓTESIS.....	71
5. OBJETIVOS	71
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	71
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	71
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	72
6.1 CONSENTIMIENTO INFORMADO	72
6.2 TRATAMIENTO DE BIOPSIAS PARA LA EXTRACCIÓN DE FIBROBLASTOS SANOS	73
6.3 PASAJE CELULAR.....	74
6.4 CULTIVO CELULAR DE QUERATINOCITOS (CÉLULAS HaCaT)	74
6.5 CRIOPRESERVACIÓN CELULAR.....	74
6.6 EXTRACCIÓN DE ARN.....	75
6.7 ANÁLISIS DE LA CALIDAD DEL ARN.....	76
6.8 VALIDACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS	77

6.9 SECUENCIACIÓN CON RNA-SEQ (SERVICIO PROPORCIONADO POR LA UUSMB)	79
6.10 ANÁLISIS DE DATOS DE RNA-Seq	79
7. RESULTADOS	81
7.1 CULTIVO CELULAR	81
7.2 COMPARATIVO DE MORFOLOGÍA DE FIBROBLASTOS Y QUERATINOCITOS (HaCaT)	82
7.3 VALIDACIÓN DE ADNc Y OLIGONUCLEÓTIDOS.	83
7.4 EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y MEDICIÓN DE LA CALIDAD DEL ARN.	84
7.5 ANÁLISIS DE LIBRERÍAS DE RNA-Seq	87
8. DISCUSIÓN	101
9. CONCLUSIONES	102
10. PERSPECTIVAS	103
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

RESUMEN

Los defectos congénitos de la glicosilación (CDG del acrónimo en inglés Congenital Disorders of Glycosylation) son un grupo cada vez más numeroso de enfermedades hereditarias, causadas por defectos en la síntesis de glicanos, en su unión a otros compuestos (proteínas y lípidos) y/o en el procesamiento posterior de los glicoconjugados; son enfermedades bioquímica y clínicamente heterogéneas, generalmente de presentación clínica multisistémica y con afectación del sistema nervioso central.

Hasta la fecha se han descrito más de 130 diferentes CDG en humanos afectando distintas vías de glicosilación. En México solamente han sido diagnosticados tres pacientes con mutación en el gen *ATP6V0A2*, dos de ellos reportados por Martínez-Duncker y colaboradores en el año 2014 a quienes se les identificó una mutación puntual sin sentido C>T.

Si bien, se ha descrito que las mutaciones en *ATP6V0A2* interrumpen el tráfico vesicular normal y producen una glicosilación anormal de las proteínas séricas, así como acumulación intracelular de tropoelastina dando como consecuencia una deposición reducida de elastina madura en la matriz extracelular, aún falta conocer qué otras alteraciones metabólicas causa dicha mutación; es por ello que con la finalidad de identificar genes potencialmente relacionados con el fenotipo clínico realizamos una secuenciación masiva de ARN (RNA-seq) de fibroblastos para comparar los transcriptomas de individuos sanos y los que presentan la mutación.

El perfil transcripcional ha sido uno de los enfoques más utilizados para investigar enfermedades humanas a nivel molecular ya que nos puede proporcionar evidencias importantes de cuáles son los genes expresados asociados a los mecanismos moleculares alterados en la patología.

El análisis de datos de los transcriptomas del presente trabajo reveló un total de 2,833 transcritos expresados diferencialmente, de los cuales son 1,158 transcritos sobre-expresados y 1,675 sub-expresados en pacientes con respecto a los individuos control. De los transcritos que mostraron expresión significativamente aumentada ($FDR < 0.01$) en pacientes con respecto a los controles, hay genes que codifican para colágenos, elastina, fibulina, fibrilina y proteínas asociadas a microfibrillas, así como lisil oxidasas y heparán sulfato, los cuales están implicados en la composición, ensamblaje y organización de la matriz extracelular, indicando así, que existe una desregulación de múltiples procesos en los que se encuentra involucrada lo que sugiere una contribución al fenotipo clínico que presentan los pacientes, debido a que la mayoría de las afectaciones que muestran son relacionadas a una defectuosa matriz extracelular en diversos tejidos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ApoCIII: Apolipoproteína C-III

ARCL-II / ARCL2: Cutis laxa autosómica recesiva tipo II

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

CDG: Desórdenes Congénitos de la Glicosilación

CL: Cutis laxa

FDR: Tasa de falsos positivos (False Discovery Rate)

GAG: Glicosaminoglicano

GalNAc: N-acetilgalactosamina

GBP: Proteínas de unión a glicanos

GlcNAc: N-acetilglucosamina

GO: Ontología de genes

IEF: Isoelectroenfoque

KEGG: Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

LogFC: Tasa de cambio expresada en logaritmo base 2 (log 2 fold change)

LOX: Lisil oxidasas

MEC: Matriz extracelular

OMS: Organización Mundial de la Salud

PTC: Codón de terminación prematuro

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RNA-seq: Secuenciación de ARN (RNA-sequencing)

RE: Retículo endoplásmico

SNC: Sistema Nervioso Central

TE: Tropoelastina

TMEM: Proteínas transmembranales

1. INTRODUCCIÓN

Los trastornos metabólicos hereditarios o errores innatos del metabolismo son un grupo de enfermedades de baja incidencia ($< 0.05\%$), que se definen como defectos de origen genético que afectan a la estructura y/o función del producto génico generando una serie de alteraciones en la homeostasis celular [1]. Los errores innatos del metabolismo han sido considerados dentro del grupo de enfermedades raras dados su baja frecuencia, desde un punto de vista individual; sin embargo, en su conjunto son relevantes debido a la mortalidad y morbilidad que éstos generan.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define como enfermedades raras a aquellas enfermedades con peligro de muerte o de invalidez crónica que tienen una prevalencia menor de 5 casos por cada 10,000 habitantes. Existen cerca de 7,000 enfermedades raras que afectan al 7% de la población mundial, lo cual se traduce en una estimación de 25 millones de afectados en Estados Unidos de América, 29 millones en la Unión Europea y 42 millones de individuos en América Latina [2].

Los desórdenes congénitos de la glicosilación (CDG) pertenecen al grupo de errores innatos del metabolismo, caracterizados por una actividad defectuosa de genes que participan directa o indirectamente en el proceso de la glicosilación, derivando en fenotipos de afectación multisistémica y generalmente con afectaciones al sistema nervioso central (SNC) [1].

En México, se realizó el primer diagnóstico de desórdenes congénitos de la glicosilación hasta el año 2014 [3], lo que sugiere que los pacientes afectados por estos trastornos sufren de una severa falta de diagnóstico.

El presente trabajo se enfoca específicamente en estudiar los fibroblastos de tejido conectivo dérmico de los pacientes diagnosticados en México con ATP6V0A2-CDG mediante un análisis de expresión diferencial entre individuos sanos e individuos que presentan mutación en *ATP6V0A2* (individuos enfermos) con la finalidad de detectar genes que codifiquen para proteínas de la matriz extracelular y que presenten una menor expresión con respecto a los individuos sanos para contribuir al entendimiento de la enfermedad, así como para aportar información con la intención de avanzar en un diagnóstico rápido y eficiente de la misma.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 GLICOSILACIÓN

La glicosilación es un proceso enzimático importante y complejo de modificación co- y post-traducciona, mediante el cual se unen, de forma covalente, carbohidratos (glicanos) a proteínas, lípidos u otros carbohidratos [4]. Los glicanos presentan numerosas posibilidades combinatorias, generadas por una variedad de glicosidasas y glicosiltransferasas que compiten y actúan secuencialmente; así como por los diversos enlaces que se forman entre los carbohidratos [4].

Adicionalmente, el ambiente metabólico celular y tisular influye en los procesos de biosíntesis de los glicanos. Es esta naturaleza variable y dinámica de la glicosilación, lo que la ha determinado evolutivamente como un mecanismo esencial para generar y modular la información biológica, particularmente relevante en organismos complejos, como el caso del ser humano. Las funciones biológicas de los glicanos pueden dividirse en tres grandes categorías: (1) propiedades estructurales y moduladoras, incluido el almacenamiento y secuestro de nutrientes; (2) reconocimiento específico por otras moléculas, más comúnmente, proteínas de unión a glicanos (GBP); y (3) mimetismo molecular de glicanos del huésped [4].

El perfil de glicosilación de una célula depende de la expresión tisular y espacio-temporal de genes (enzimas o transportadores) que conforman la maquinaria de glicosilación, responsable de la biosíntesis y ensamblaje de glicanos. Se calcula que la maquinaria de glicosilación está conformada por la participación de un 1-2% de los genes humanos. La glicosilación se lleva a cabo en tres compartimentos celulares (citosol, retículo endoplásmico y aparato de Golgi) y a través de ocho diferentes rutas;

entre ellas, las rutas de glicosilación proteica mejor caracterizadas son la *N*- y *O*-glicosilación [5][6].

La *N*-glicosilación es un proceso bioquímico que ocurre en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, la cual consiste en la unión glicosídica de un carbohidrato al grupo amino de un residuo de asparagina de la proteína, que habitualmente implica un resto de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) en eucariotas. El aminoácido asparagina (Asn) que participa en el proceso de *N*-glicosilación se encuentra en la secuencia consenso *Asn*-X-Ser/Thr/Cys, donde X representa a cualquier aminoácido excepto a la prolina [4].

A diferencia de la *N*-glicosilación, la *O*-glicosilación ocurre de manera postraducciona, este proceso de adición de carbohidratos se lleva a cabo en el aparato de Golgi y ocurre generalmente con la unión covalente del carbohidrato *N*-Acetilgalactosamina (GalNAc), al grupo hidroxilo de los aminoácidos Ser o Thr de la proteína. En contraste con la *N*-glicosilación en este tipo de glicosilación aún no se ha descrito la presencia de una secuencia consenso sobre la cual ocurra dicho proceso [4].

El proceso de glicosilación no solo requiere una distribución precisa de la maquinaria de procesamiento, como las glicosiltransferasas, las glicosidasas y los transportadores de nucleótido-azúcar, sino que también necesita una fábrica eficiente y bien organizada que sea responsable de la fidelidad y el control de calidad del procesamiento de la cadena de glicanos. Además, la glicosilación precisa debe de ocurrir en coordinación con el tráfico vesicular, estas actividades son llevadas a cabo por el aparato de Golgi, un organelo de membrana en el centro de la vía secretora [7]. Cada uno de los compartimentos de la vía endocítica y exocítica tienen su propio entorno con condiciones particulares que son importantes para su correcto funcionamiento. La homeostasis del Golgi

depende de múltiples factores y la pérdida de ella trae como consecuencia una alteración de todas sus funciones, incluida la glicosilación, en el caso particular de una homeostasis alterada del pH del Golgi da lugar a la enfermedad de cutis laxa, en donde además de la glicosilación, el tráfico vesicular se ve afectado [26][27].

2.2 DESÓRDENES CONGÉNITOS DE LA GLICOSILACIÓN (CDG)

Los desórdenes congénitos de la glicosilación o CDG (del acrónimo en inglés Congenital Disorders of Glycosylation) son enfermedades bioquímica y clínicamente heterogéneas, generalmente de presentación clínica multisistémica y con afectación del SNC. Se ha identificado que los CDG son causados por mutaciones que ocurren en distintos genes que codifican para proteínas involucradas de manera directa o indirecta en el proceso de glicosilación. Los defectos pueden presentarse en (1) la activación, presentación y transporte de precursores de azúcar; (2) las glicosidasas y glicosiltransferasas; y (3) en las proteínas que participan en el tráfico u homeostasis de los organelos [4].

Hasta la fecha se han descrito más de 140 diferentes CDG en humanos afectando distintas vías de glicosilación, muchos de los cuales se expresan fenotípicamente con afectación multiorgánica y especialmente con implicación del SNC. La transmisión de los CDG es autosómica recesiva en su mayoría, sin embargo hay algunos subtipos que son autosómicos dominantes, ligados al cromosoma X y algunos que han ocurrido por mutaciones *de novo* [6].

Los CDG se definieron originalmente como defectos genéticos en la N-glicosilación, pero ahora el término se aplica a cualquier defecto de glicosilación, indicando el gen mutado seguido del sufijo "-CDG"; de acuerdo con la nueva clasificación, los CDG se dividen en 4 categorías, defectos en la N-glicosilación, en la O-glicosilación, en las anclas de GPI y glicolípidos y los que afectan a múltiples vías de glicosilación (mixtos) [4].

La subpoblación de pacientes con afectaciones en la N-glicosilación y/o la O-glicosilación, puede ser identificada estableciendo la sospecha

bioquímica de hipoglicosilación de proteínas séricas como la transferrina (*N*-glicoproteína) y la ApoCIII (*O*-glicoproteína).

La transferrina sérica es especialmente conveniente para el estudio de los CDG, no por su implicación directa en la fisiopatología de la enfermedad sino porque tiene dos sitios de *N*-glicosilación, que contienen cada uno, *N*-glicanos biantenarios disialilados (los ácidos siálicos representan una familia de amino azúcares de nueve carbonos que tienen como característica principal la presencia de una carga negativa lo cual le confiere propiedades particulares) (Figura 1) y adicionalmente porque es una proteína accesible ya que se encuentra en sangre en concentraciones elevadas.

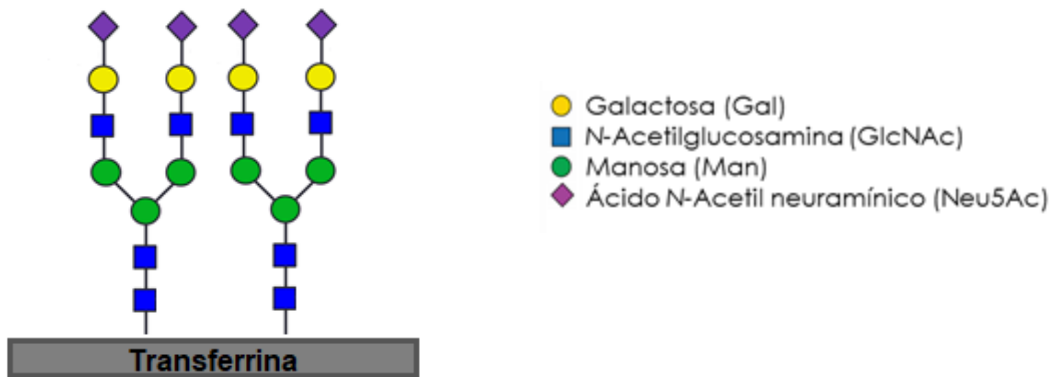


Figura 1. Representación de la proteína transferrina. La proteína está simbolizada por una barra gris horizontal y se muestran los *N*-glicanos ligados a la proteína, dicha estructura es una tetrasialotransferrina ya que contiene 4 ácidos siálicos.

Para estudiar defectos en la *O*-glicosilación, la proteína utilizada es la apolipoproteína C-III (apoC-III), es una proteína plasmática, tiene solamente un core-1 de tipo mucina (*O*-glicano) en la Thr-94 y no está *N*-glicosilada. Se pueden distinguir tres isoformas de la apolipoproteína C-III, apoC-III₀, apoC-III₁ y apoC-III₂ [8], en donde el número de la isoforma, representa el número de ácidos siálicos contenidos en su estructura (Figura 2).

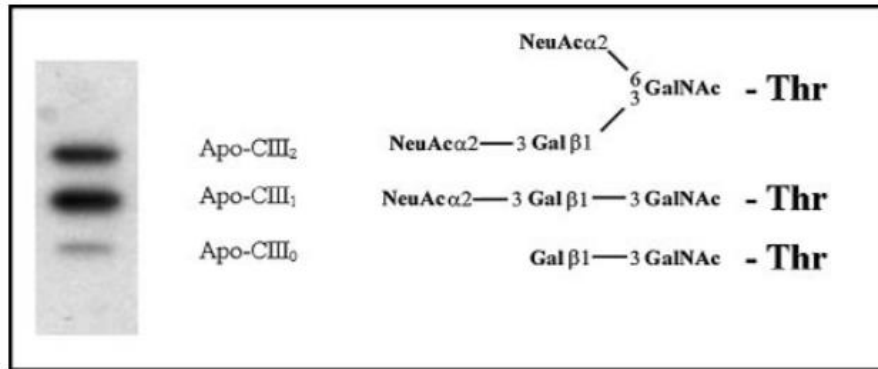


Figura 2. Isoformas de apoC-III en plasma humano y sus estructuras. El isoelectroenfoque de apoC-III de plasma humano muestra las tres isoformas apoC-III₀, apoC-III₁ y apoC-III₂, en donde se representa el número de ácidos siálicos contenidos en su estructura [8,59].

En general los CDG descritos a la fecha, han sido estudiados de forma particular en los genes que presentan mutaciones, sin embargo, no se ha dilucidado cómo es que afectan la desregulación del ciclo celular, cómo afectan al mantenimiento de la homeostasis, cómo se ven alteradas las vías de señalización o cómo estas condiciones de estrés pueden derivar en muerte celular.

Como se mencionó previamente, en México se realizó el primer diagnóstico de CDG en el año 2014, que corresponde a dos pacientes que presentaron un síndrome de cutis laxa causado por una mutación en *ATP6V0A2*, un gen que codifica para la subunidad α2 de una bomba de protones (H⁺) de tipo vacuolar (V-ATPasa)[3] que se encuentra en el aparato de Golgi, endosomas, lisosomas y vesículas secretoras; en el presente trabajo, utilizamos fibroblastos de estos pacientes con el fin de identificar, mediante transcriptómica, la desregulación genética que esta mutación causa, particularmente en torno a los componentes de la matriz extracelular (MEC).

2.3 CUTIS LAXA

El síndrome de cutis laxa (CL) – también llamado dermatomegalia, dermatochalazia y elastolisis generalizada congénita – es un trastorno del tejido conectivo, el cual es infrecuente y se caracteriza porque la piel es redundante, inelástica y muestra un aspecto de envejecimiento precoz, donde la piel cae a manera de pliegues flácidos (Figura 3), debido a la síntesis defectuosa de fibras elásticas o a la secreción deficiente de proteínas de la matriz extracelular; en algunas personas se afectan otros órganos, se ha reportado enfisema pulmonar, fibromas gástricos, aneurisma aórtico, entre otros [9].



Figura 3. Cutis laxa en pacientes con ATP6V0A2-CDG en donde se observa piel flácida y arrugada en el abdomen. Imágenes tomadas de [3].

La cutis laxa puede ser heredada o adquirida; las formas heredadas pueden ser autosómica dominante (ADCL), autosómica recesiva (ARCL), ligadas al cromosoma X (XLCL), síndrome macrocefalia, alopecia, cutis laxa y escoliosis (MACS) o síndrome de tortuosidad arterial (ATS) (Tabla 1).

Autosómica dominante.

La forma autosómica dominante es causada por mutaciones en el gen *ELN*, que codifica para la proteína denominada tropoelastina (TE), múltiples copias de dicha proteína se unen entre sí para formar una proteína madura llamada elastina, la cual es el componente principal de las fibras elásticas; su función es proporcionar fuerza y flexibilidad al tejido conectivo (tejido que soporta las articulaciones y órganos del cuerpo) [10].

Autosómica recesiva.

El espectro clínico de la cutis laxa autosómica recesiva (ARCL) es muy heterogéneo con respecto a la afectación y gravedad de los órganos y se divide en 3 tipos, ARCL-I, ARCL-II y ARCL-III; la de tipo I (ARCL-I) es un trastorno específico que amenaza la vida con afectación de órganos, atelectasia pulmonar y enfisema, divertículos de los sistemas gastrointestinal y genitourinario y anomalías vasculares (aneurismas arteriales, displasia de la arteria fibromuscular y estenosis); en menor medida presentan anomalías craneales, cierre tardío de la fontanela, laxitud articular, luxación. ARCL-I se subdivide en 3 tipos y es causada por mutaciones en los genes *FBLN5* (ARCL-IA), *EFEMP2* (ARCL-IB) y *LTBP4* (ARCL-IC o Síndrome Urban-Rifkin-Davis).

FBLN5 que codifica para la proteína de fibra elástica fibulina-5, la cual se encuentra en la interfaz entre la elastina y las microfibrillas, esta proteína se encarga de regular la deposición extracelular de la elastina, al prevenir grandes agregados y organizar su ubicación y reticulación a lo largo de las microfibrillas [11].

EFEMP2 (alias *FBLN4*) que codifica para la proteína de matriz extracelular, fibulina-4, que participa en el ensamblaje y la función de las fibras elásticas

y está relacionada con la diferenciación de las células del músculo liso y la contractilidad aórtica [12].

LTBP4 que codifica para la proteína 4 de unión al factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) latente, pertenece a la familia de las proteínas fibrilina y es necesario para el ensamblaje de las fibras elásticas en la matriz extracelular, así como regulador local de la señalización de TGFβ [13].

La ARCL de tipo II (ARCL-II) es un espectro de entidades clínicas caracterizado por una gravedad variable de cutis laxa, crecimiento anormal y retraso del desarrollo, así como anomalías esqueléticas asociadas como cierre tardío de fontanelas; de igual manera es común que presenten dislocación de cadera, escoliosis, hernia inguinal y pie plano [14]. ARCL-II se divide en 4 subtipos y es causada por mutaciones en los genes *ATP6V0A2* (ARCL-IIA), *PYCR1* (ARCL-IIB), *ATP6V1E1* (ARCL-IIC) y *ATP6V1A* (ARCL-IID).

ATP6V0A2 codifica la subunidad α2 del dominio V0 de una bomba de protones (H⁺) de tipo vacuolar (V-ATPasa), la cual es esencial para la acidificación de compartimentos celulares en lo que se encuentra como endosomas, lisosomas, vesículas secretoras y aparato de Golgi. Los pacientes que presentan este tipo de cutis laxa tienen hipoglicosilación de proteínas séricas con un perfil de N- y O-glicosilaciones anormales, es por eso que se considera un CDG [15].

PYCR1 codifica para la proteína pirrolina-5-carboxilato reductasa, es una enzima mitocondrial que cataliza el paso final de la biosíntesis de prolina y reduce la pirrolina-5-carboxilato a L-prolina usando NADH como cofactor [16].

ATP6V1E1 codifica la subunidad E1 del dominio V1 de la V-ATPasa, algunos pacientes que presentan este tipo de cutis laxa tienen hipoglicosilación de

proteínas séricas con un perfil de *N*- y *O*-glicosilaciones anormales, es por eso que se ha sugerido que se le considere un CDG [17].

ATP6V1A codifica la subunidad A del dominio V1 de la V-ATPasa, algunos pacientes que presentan este tipo de cutis laxa tienen hipoglicosilación de proteínas séricas con un perfil de *N*- y *O*-glicosilaciones anormales, es por eso que se ha sugerido que se le considere un CDG [17].

La ARCL de tipo III (ARCL-III) se caracteriza por presentar síntomas muy severos con una apariencia similar a la progeria, anomalías oftalmológicas, ortopédicas y retraso mental. ARCL-III es causada por la mutación en el gen *ALDH18A1* [18].

ALDH18A1 que codifica para la delta-1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa, encargada de catalizar los primeros 2 pasos de la de la síntesis *de novo* de prolina, ornitina, citrulina y arginina [19].

Ligada al cromosoma X (XLCL).

La forma de cutis laxa ligada al cromosoma X es causada por mutaciones en el gen *ATP7A* también conocido como ATPasa 1 transportadora de cobre (ATPasa Menkes), pertenece a la familia de ATPasas tipo P, esta bomba transporta activamente los cationes de cobre (Cu^{2+}) a través de las bicapas lipídicas, utilizando la energía obtenida de la hidrólisis de ATP, el Cu^{2+} es un cofactor esencial de las lisil oxidasas (LOX), una familia de enzimas necesarias para la reticulación de colágenos fibrilares y elastina [20].

Síndrome macrocefalia, alopecia, cutis laxa y escoliosis (MACS).

El síndrome MACS, es un trastorno hereditario muy raro del tejido conectivo caracterizado por macrocefalia, piel redundante e hiperextensible,

hipermovilidad de las articulaciones y escoliosis, es causado por la mutación en el gen *RIN2* [21].

RIN2 que codifica para la proteína de interacción con RAS y RAB 2, participa en la vía endocítica, en donde sirve como factor de intercambio de guanina para Rab5, una GTPasa que regula el tráfico vesicular [21].

Síndrome de tortuosidad arterial (ATS).

El síndrome ATS está caracterizado por el alargamiento y la tortuosidad de arterias principales y laxitud variable de la piel, las complicaciones que lo distinguen son aneurismas vasculares y estenosis, es causado por la mutación en el gen *SLC2A10* [21].

SLC2A10 que codifica para el transportador de glucosa GLUT10, que juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa [22], recientemente se demostró que participa en el transporte de ácido L-deshidroascórbico, una forma oxidada de la vitamina C, a las mitocondrias, asimismo aumenta la absorción celular de dicho ácido, que a su vez protege a las células contra el estrés oxidativo [23].

La mayoría de los genes mencionados anteriormente están involucrados en la formación y función de las fibras elásticas; por lo que la mutación en cualquiera de estos genes altera la formación, constitución o la función de las mismas (Figura 4).

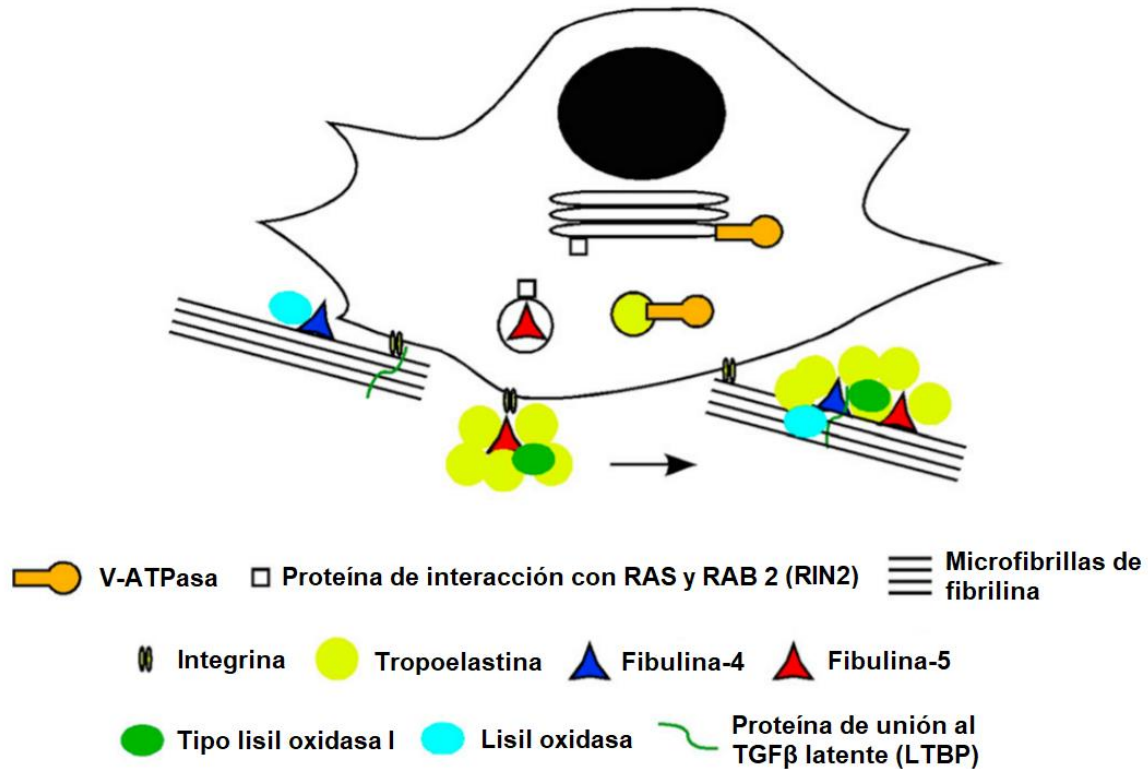


Figura 4. Modelo de funcionamiento de las moléculas relacionadas con cutis laxa. RIN2 y ATP6V0A2 (parte de la V-ATPasa) se encuentran en el aparato de Golgi y en las vesículas secretoras y pueden ser necesarios para una clasificación adecuada y una secreción eficiente de los componentes de fibra elástica. El ensamblaje extracelular de fibras elásticas es un proceso que ocurre en la plantilla de microfibrillas. El microensamblaje implica la formación de conjuntos globulares que contienen tropoelastina, que son depositados y moldeados en estructuras de largo alcance como parte del macroconjunto. Las fibulinas, la LTBP y las lisil oxidasas desempeñan un papel en diferentes etapas del proceso. Adaptada al español de [21].

TABLA 1. TIPOS DE CUTIS LAXA Y SUS MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

	ADCL	ARCL-IA	ARCL-IB	ARCL-IIA	ARCL-IIB	ARCL-III(DBS)	XLCL	ATS	URDS	MACS
GEN MUTADO	<i>ELN</i>	<i>FBLN4</i>	<i>FBLN5</i>	<i>ATP6V0A2</i>	<i>PYCR1</i>	<i>Desconocido</i>	<i>ATP7A</i>	<i>SLC2A10</i>	<i>LTBP4</i>	<i>RIN2</i>
Piel laxa	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Retrogantía	No	+++	No	+++	+++	No	No	+++	+++	No
Hipertelorismo	No	+++	No	No	No	No	No	++	+++	No
Orejas prominentes	+++	†	+++	No	No	No	++	†	†	No
Enfisema	++	++	+++	No	No	No	No	No	+++	No
Aneurismo aórtico	++	+++	No	†	No	No	No	++	No	No
SVAS	No	No	+++	No	No	No	No	No	No	No
Tortuosidad arterial	No	+++	†	No	No	No	++	+++	No	No
Hernias	++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	†
Vejiga diverticular	+++	No	†	†	No	No	+++	No	+++	No
Retraso mental	No	No	No	+++	+++	+++	+++	No	No	No
Retraso en el desarrollo motor	No	†	†	+++	No	+++	+++	No	No	No
Retraso en el crecimiento postnatal	No	++	†	+++	+++	+++	†	No	+++	No
Dislocación congénita de cadera	No	†	No	†	+++	++	No	No	No	No
Fontanela anterior patente	No	No	No	+++	No	++	++	No	++	No
Articulaciones laxas	No	†	No	+++	+++	++	++	+++	++	+++
IUGR	No	No	No	+++	+++	+++	No	No	†	No
Hipotonía	No	†	No	+++	No	++	++	No	+++	No
Defectos en la glicosilación	No	No	No	++	No	No	No	No	No	No
Movimientos atetoides	No	No	No	No	†	+++	No	No	No	No
Córnea opaca	No	No	No	No	†	+++	No	No	No	No
Cuernos Occipitales	No	No	No	No	No	No	+++	No	No	No
Clavículas cortas y anchas	No	No	No	No	No	No	+++	No	No	No
Osteoporosis	No	No	No	No	++	No	++	No	No	†
Macrocefalia	No	No	No	No*	No*	No*	No	No	No	+++
Alopecia	No	No	No	No	No	No	No	No	No	+++
Escoliosis	No	No	No	++	†	++	++	++	No	+++
Hiperplasia gingival	No	No	No	No	No	No	No	No	No	+++

ADCL: Cutis laxa autosómica dominante, ARCL: Cutis laxa autosómica recesiva, ATS: Síndrome de tortuosidad arterial, DBS: Síndrome de Barys, IUGR: Restricción del crecimiento intrauterino, MACS: Síndrome macrocefalia-alopecia-cutis laxa-escoliosis, No: no lo presenta, SVAS: Estenosis Aórtica Supraaórtica, URDS: Síndrome Urban-Rifkin-Davis, XLCL: Cutis laxa ligada a X, †: Reporte de casos raros, ††: Múltiples casos reportados, †††: Hallazgo común. *Puede tener microcefalia.

Tabla 1. Tipos de cutis laxa y sus manifestaciones. Adaptada al español de [21].

2.4 ATP6V0A2-CDG

Las mutaciones en *ATP6V0A2* además de dar como resultado cutis laxa y una glicosilación anormal de proteínas séricas, causan alteraciones en la homeostasis del aparato de Golgi en fibroblastos de los individuos afectados [24], hasta la fecha se han reportado 41 mutaciones en *ATP6V0A2* que causan cutis laxa de tipo autosómica recesiva (Figura 5).

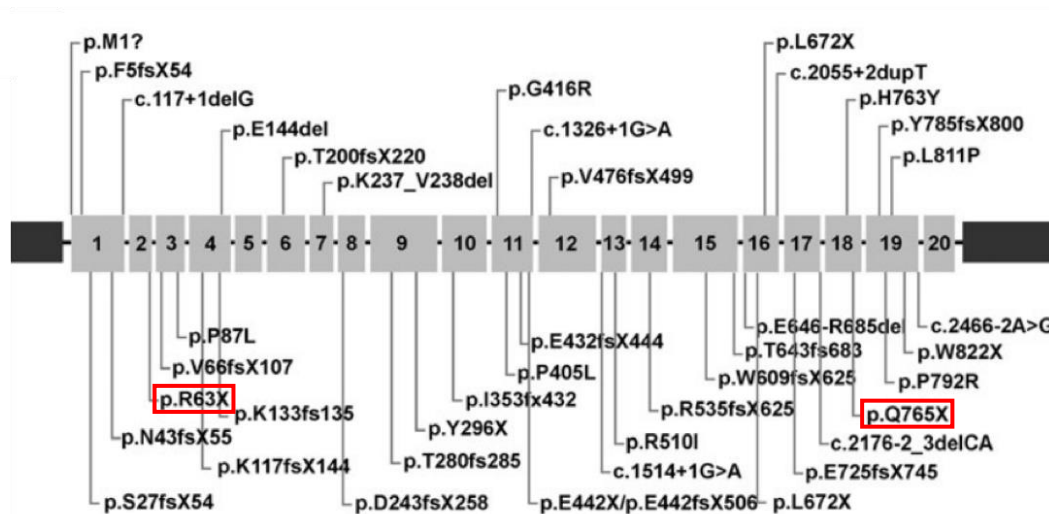


Figura 5. Mutaciones reportadas en el gen *ATP6V0A2* que provocan cutis laxa autosómica recesiva [25]. En rojo se señalan las mutaciones que presentan los dos pacientes mexicanos reportados [3].

Los dos pacientes con los que trabajamos en el presente estudio, presentan cutis laxa autosómica recesiva tipo II, ambos asociados a una mutación puntual sin sentido en *ATP6V0A2* [3] uno con la mutación (c.187 C>T; p.R63X) en el exón 2, la cual fue reportada previamente en dos pacientes de Turquía e identificada por Korank y colaboradores [14] y el otro paciente con una mutación (c.2293 C>T; p.Q765X) en el exón 18, también previamente reportada [24] (Figura 5).

La pérdida de función de la V-ATPasa causada por mutaciones en *ATP6V0A2*, resulta en un desorden congénito de la glicosilación de tipo II combinado (N- y O-glicosilaciones anormales); debido a la falta del

establecimiento del gradiente de concentración de H^+ para mantener el pH en los compartimentos celulares en lo que se encuentra (endosomas, lisosomas, vesículas secretoras y aparato de Golgi), particularmente en el aparato de Golgi [26]. El incremento en el pH en el aparato de Golgi, afecta la actividad de las glicosiltransferasas así como el tráfico vesicular causando la fragmentación de Golgi y la posible localización errónea de estas enzimas, generando la presencia del síndrome cutis laxa [26]. Las mutaciones en *ATP6V0A2* interrumpen el tráfico vesicular normal y producen una glicosilación anormal de las proteínas séricas, acumulación intracelular de TE posiblemente derivado del defecto de la bomba de protones, esto sugerido por el papel que tiene la subunidad $\alpha 2$ en las vesículas secretoras que contienen a esta proteína; y dando como consecuencia en una deposición reducida de elastina madura en la matriz extracelular, acumulación de lisosomas y cuerpos multivesiculares anormales y aumento de la autofagia [9]. La localización en el compartimento de Golgi hace probable que $\alpha 2$ influya directa o indirectamente en la formación de vesículas derivadas de Golgi, ya sea para el transporte anterógrado o retrógrado [26].

2.5 HOMEOSTASIS DEL APARATO DE GOLGI

La homeostasis del Golgi es vital para el buen funcionamiento del mismo, ya que a través de ella mantiene un equilibrio para poder llevar a cabo los procesos en los que está implicado; hay diversos factores que contribuyen a la homeostasis como es el caso de las bombas y canales de los iones H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , el estado de óxido-reducción, así como los niveles de óxido nítrico; estos últimos dos, a su vez dependen de los niveles de oxígeno en la célula [27]. Los cambios en cualquiera de estos factores tienen consecuencias en las funciones de este organelo; la homeostasis alterada del pH, da lugar a la cutis laxa, en la que la glicosilación y el tráfico vesicular se ven afectados [27].

El aparato de Golgi, requiere de una regulación estricta del pH interno (Figura 6) el cual es determinante para su función óptima en procesos como tráfico vesicular, glicosilación, proteólisis o clasificación de proteínas [28], [29]. En general, la acidez de algunos organelos, incluyendo el Golgi, es impulsada por una bomba de protones (H^+) de tipo vacuolar (V-ATPasa), la cual se encuentra contrarrestada por la entrada de aniones o la salida de cationes y la fuga de protones de vuelta al citoplasma a través de un "canal de fuga H^+ " cuya identidad sigue siendo difícil de dilucidar (Figura 7); una vez que el organelo se encuentra lo suficientemente ácido, el flujo de salida de protones es quien establece el pH del organelo, evitando una mayor acidificación del mismo [27][28][29].

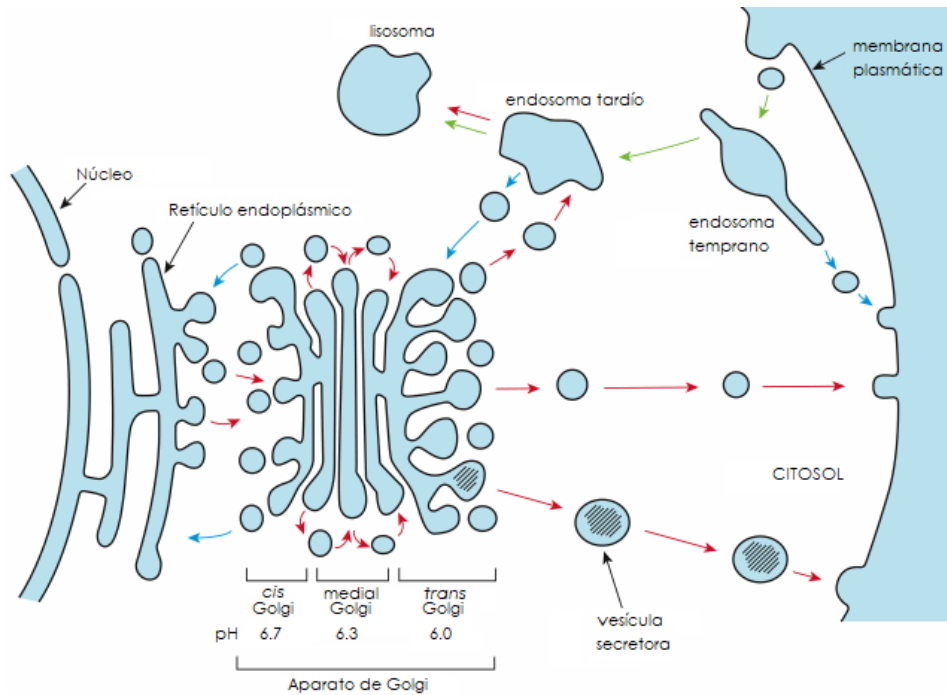


Figura 6. pH del aparato de Golgi. El pH varía en las diferentes regiones del aparato de Golgi, este pH se consigue gracias a bombas de protones que hay en sus membranas (V-ATPasa) ya que introducen protones acidificando su interior.

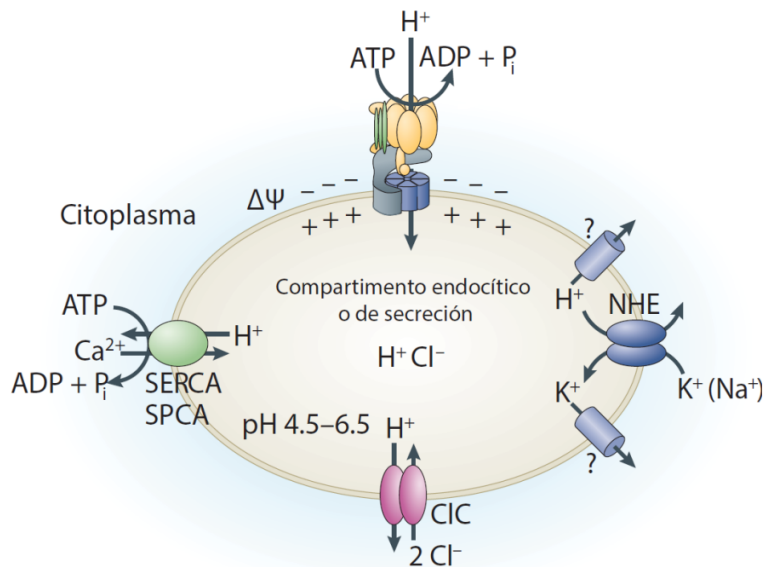


Figura 7. Regulación del pH en compartimentos endocíticos o de secreción. La acidificación de los compartimentos a lo largo de las vías endocíticas o secretoras implican un complejo equilibrio entre las vías de entrada y salida de H^+ , así como la entrada de aniones o la salida de cationes. Adaptada al español de [28].

Se ha demostrado que la neutralización del pH del Golgi con cloruro de amonio (NH_4Cl) o con bafilomicina A1, el cual es un inhibidor de la bomba de protones, inhibe la síntesis de O-glicanos y adicionalmente va acompañada de una relocalización de tres glicosiltransferasas en compartimentos endosómicos, N-acetilgalactosaminiltransferasa 2, β 1,2 N-acetilglucosaminiltransferasa I y β 1,4 galactosiltransferasa 1; las cuales normalmente se encuentran localizadas en las cisternas del Golgi, medial / trans-Golgi y trans-Golgi / TGN , respectivamente [30]. Por otro lado, Rivinoja y colaboradores evidenciaron que solamente un incremento en 0.2 unidades en el pH del lumen del Golgi es suficiente para interferir con la O-glicosilación de tipo mucina y la sialilación terminal α -2,3 de N-glicanos, asimismo observaron una localización errónea de la sialiltransferasa ST3Gal-III en compartimentos endosómicos [31]. De igual forma como ya se mencionó previamente los pacientes con mutaciones en *ATP6V0A2* muestran defectos en la sialilación terminal de N- y O-glicanos. Estas observaciones indican que la glicosilación en general es altamente sensible a los cambios en el pH luminal de Golgi y, si se altera, puede deberse a la localización incorrecta de un conjunto de glicosiltransferasas [27].

La ARCL-II es la primera enfermedad hereditaria identificada hasta el momento que está estrechamente relacionada con la homeostasis alterada del pH de Golgi. Esta cutis laxa está causada por la mutación de *ATP6V0A2* que codifica para la subunidad α 2 de la V-ATPasa que se encuentra en el Golgi y los pacientes previamente estudiados han demostrado tener defectos en la glicosilación y tráfico vesicular [15], [24], [32].

2.6 V-ATPASA

La V-ATPasa es una bomba de protones (H^+) rotativa de tipo vacuolar, que está conformada por múltiples subunidades conservadas que juegan papeles cruciales en la regulación del pH en las células y sus compartimentos intracelulares [33]. El complejo de la V-ATPasa consta de dos dominios, V_1 y V_0 de 8 y 5 subunidades diferentes respectivamente (Figura 8) [28].

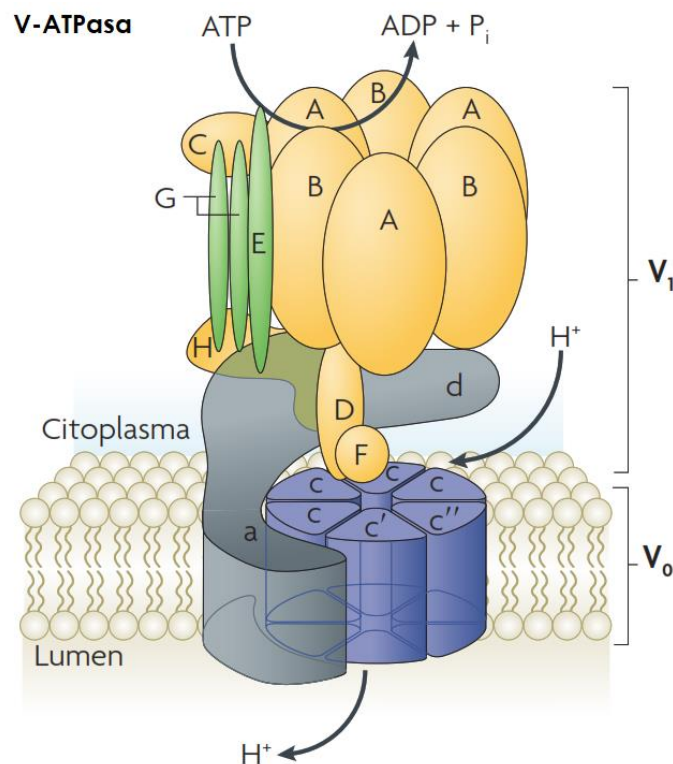


Figura 8. Estructura de la V-ATPasa y sus dominios. El complejo de la V-ATPasa consta de dos dominios, V_1 y V_0 de 8 y 5 subunidades diferentes respectivamente. Adaptada al español de [28].

El dominio V_1 es un complejo de ~640 kDa, tiene 3 subunidades A y B formando un hexámero, 1 subunidad C, D y F y 2 subunidades de E y G; este dominio alberga los tres sitios de unión catalíticos de ATP y está encargado de la hidrólisis de éste en ADP [34] para proporcionar la

energía para rotar un eje central de la V-ATPasa que impulsa la translocación de protones. El dominio V0 es un complejo de ~260 kDa que se compone de seis subunidades con una estequiometría de a_4c_2c' , es responsable de la translocación de protones al espacio intermembranal del organelo utilizando la energía liberada durante la hidrólisis del ATP [34]; el transporte de protones se acopla a la hidrólisis de ATP mediante un mecanismo rotatorio. Para disminuir o aumentar la eficiencia de la bomba, la V-ATPasa controla el acoplamiento entre la hidrólisis de ATP y el bombeo de protones, este proceso es provocado por la subunidad 'a' de la V-ATPasa. En mamíferos se han identificado cuatro isoformas de la subunidad 'a' (a1, a2, a3 y a4) con una identidad del 47-61% a nivel de aminoácidos, cada una de las subunidades tiene distribución distinta [35], [36].

La isoforma a1 se localiza tanto en la membrana pre-sináptica como en las vesículas sinápticas presentes en las terminales nerviosas, también se ha implicado en la fusión entre fagosomas y lisosomas durante la fagocitosis en el cerebro [35]. La isoforma a2 se ha identificado en los endosomas apicales de las células del túbulo proximal del riñón, se expresa de forma ubicua a través de los tejidos y está presente en los compartimentos de Golgi y endosomas tempranos. Las mutaciones en a2 causan cutis laxa autosómica recesiva tipo II [25]. La isoforma a3 se expresa fuertemente en los osteoclastos y es responsable de dirigir la V-ATPasa a la membrana plasmática de estas células, donde participa en la resorción ósea. En las células pre-osteoclasticas, a3 se localiza en los lisosomas y parece experimentar un movimiento hacia la membrana plasmática tras la diferenciación de estas células en osteoclastos maduros. Las mutaciones en a3 conducen al fenotipo defectuoso de resorción ósea asociado con osteopetrosis. La isoforma a3 también se ha localizado en vesículas secretoras que contienen insulina en las células de los islotes pancreáticos,

en las glándulas suprarrenales, paratiroideas, tiroideas y pituitarias y en melanosomas inmaduros [35]. La isoforma $\alpha 4$ se expresa casi exclusivamente en células renales y es responsable de dirigir las V-ATPasas a la membrana apical de las células alfa intercaladas del túbulo distal tardío y el conducto colector, las mutaciones en $\alpha 4$ causan la secreción defectuosa de ácido urinario asociada con la acidosis tubular renal. La isoforma $\alpha 4$ también participa en el direccionamiento de las V-ATPasas a la membrana apical de las células claras epididimarias, que son responsables de la acidificación de la luz epididimaria [35].

La V-ATPasa mantiene el gradiente de H^+ en los endosomas, lisosomas, el aparato de Golgi y vesículas secretoras donde se encuentra localizada (Figura 9) contribuyendo así a la homeostasis del pH intracelular. En el lisosoma, la acidificación adecuada permite la activación de hidrolasas que inician procesos de degradación o en la endocitosis mediada por receptores el cambio en el pH estimula cambios conformacionales que permiten la disociación ligando-receptor y el reciclaje del receptor.

Si bien, se han caracterizado las patologías moleculares antes descritas en la enfermedad causada por la mutación en *ATP6V0A2*, consideramos que la afectación tan severa de la homeostasis del Golgi induce la desregulación de múltiples procesos celulares, como parte de un mecanismo de compensación para mantener la función celular, sin embargo causando al mismo tiempo alteraciones patológicas, ya que estos pacientes en su historial clínico reportan infecciones recurrentes, principalmente en vías urinarias, daños cerebrales, retraso en el desarrollo motor, aneurisma aórtico, dislocación congénita de cadera, hipotonía y escoliosis, aunque se han reportado otros.

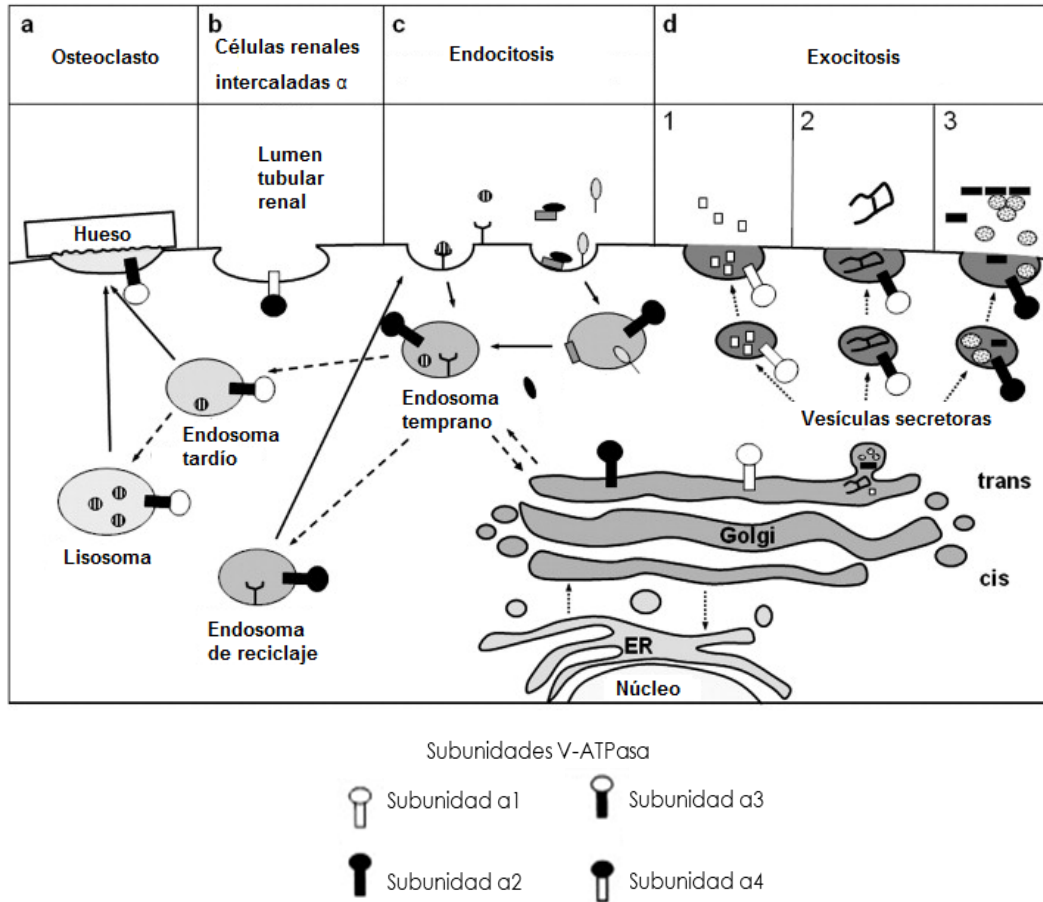


Figura 9. Múltiples roles de la V-ATPasa en la regulación del pH y la función vesicular. La función principal de las V-ATPasas es la regulación del pH luminal de diferentes compartimentos intracelulares, el espacio extracelular y el citoplasma. (a) En los osteoclastos, la V-ATPasa se recluta desde los endosomas / lisosomas tardíos a la membrana de la superficie celular donde acidifica la laguna de reabsorción, también llamada "lisosoma extracelular". (b) La V-ATPasa controla el equilibrio ácido-base bombeando protones a través de la membrana plasmática de células alfa-intercaladas en el túbulo renal. (c) Endocitosis mediada por receptor: la V-ATPasa proporciona el pH ácido en los endosomas necesarios para la liberación de ligandos internalizados de sus receptores y el reciclado de los receptores desocupados de vuelta a la superficie celular. La clasificación y el tráfico de diferentes tipos de endocitosis fisiológicamente (por ejemplo, factores de crecimiento) y patológicamente (por ejemplo, toxinas) también está influenciada por V-ATPasas. (d) Se sugiere que el dominio V0 desempeña un papel en diferentes eventos de exocitosis: (d1) La V-ATPasa con la subunidad a1 tiene especial importancia para la liberación de neurotransmisores en células neuronales. (d2) Se ha demostrado que la subunidad a3 está involucrada en la secreción de insulina. (d3) Posible

papel de la subunidad $\alpha 2$ para la secreción de los componentes de la matriz extracelular como lo indican las fibras elásticas defectuosas en pacientes con cutis laxa tipo 2 autosómica recesiva. Adaptada al español de [26].

Como ya se mostró en la tabla 1, los pacientes que presentan mutaciones en *ATP6V0A2* presentan retraso en el crecimiento y desarrollo, dismorfia facial, cierre retardado de la fontanela, anomalías estructurales cerebrales, convulsiones, deterioro mental frecuente y los pacientes presentan defectos en la glicosilación, probablemente derivado de la desregulación de pH y homeostasis del Golgi. De igual forma se sabe que cuando la V-ATPasa no funciona de manera adecuada existen afecciones al tráfico vesicular que en relación con cutis laxa, se ve afectada la secreción de proteínas a la matriz extracelular responsables de brindar a la piel esa rigidez y elasticidad ausente en pacientes con este síndrome, particularmente la TE, ya que no es transportada a la matriz extracelular, sino que se permanece en el aparato de Golgi, ocasionando una acumulación y eventualmente la disgregación del Golgi [32].

2.7 MATRIZ EXTRACELULAR

Los tejidos consisten en grupos de células con una estructura similar que trabajan en conjunto para una función específica; estas células se encuentran rodeadas por una compleja red de macromoléculas que constituyen a la MEC, la cual está integrada por una gran variedad de proteínas fibrosas (Figura 10), principalmente colágeno y elastina, glicosaminoglicanos como dermatán sulfato, queratán sulfato y hialuronano, proteoglicanos como sindecano y glicoproteínas como fibronectina y laminina.

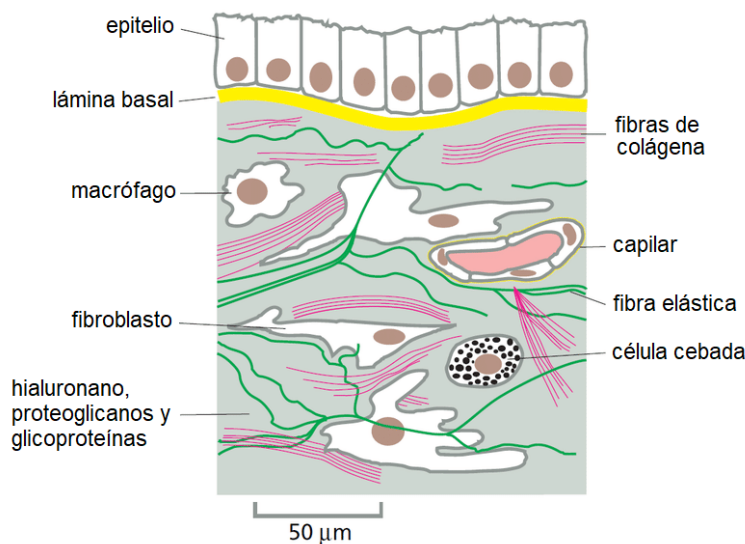


Figura 10. Representación esquemática que ilustra los componentes del tejido conectivo subyacente a un epitelio. Este tejido contiene diversas células y componentes de la matriz extracelular. El tipo celular predominante es el fibroblasto, el cual secreta una matriz extracelular abundante [37].

La MEC es el componente no celular presente en todos los tejidos y órganos; a los tejidos les provee sostén mecánico y estructural, de igual manera participa en aspectos importantes de la señalización celular en el crecimiento, desarrollo, remodelación y reparación del tejido conectivo [38], adicionalmente influye sobre la comunicación celular con la ayuda

de moléculas de adhesión, fija las células en los tejidos y provee vías para la migración celular; de igual forma la MEC tiene la capacidad de fijar y retener citocinas y factores de crecimiento que, a su vez, modulan la proliferación celular; asimismo está involucrada en los cambios estructurales del citoesqueleto en respuesta a cambios ambientales e inicio de cascadas de señalización [39]. Los componentes de la MEC (Figura 11) varían de acuerdo a las características físicas y de función de cada tejido, que se generan durante el desarrollo del mismo a través de un diálogo dinámico y recíproco, bioquímico y biofísico entre los diversos componentes celulares [40].

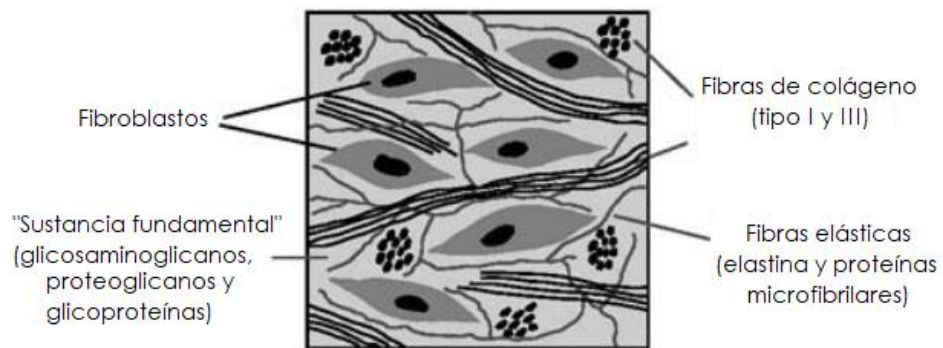


Figura 11. Componentes principales de la matriz extracelular sintetizados por fibroblastos dentro del tejido conectivo dérmico. Imagen adaptada de [41].

Los glicosaminoglicanos (GAG), proteoglicanos y glicoproteínas; son quienes conforman a la sustancia fundamental de la MEC, altamente hidratada y con apariencia de un gel, en la que están embebidas las proteínas fibrosas. Dicha sustancia fundamental opone resistencia a las fuerzas de compresión que afectan a la matriz, al mismo tiempo que facilita la rápida difusión de nutrientes, metabolitos y hormonas entre la sangre y las células que forman a los tejidos [37]. Las macromoléculas que constituyen a la MEC del tejido conectivo son secretadas principalmente por fibroblastos (Figura 11) y células musculares lisas.

Los GAG son los heteropolisacáridos más abundantes en la sustancia fundamental; estas moléculas son polisacáridos no ramificados de cadenas largas, las cuales están compuestas por unidades de disacárido que se repiten. Las unidades de disacárido se caracterizan porque uno de los dos azúcares que lo conforman es un amino-azúcar que en la mayoría de los casos se encuentra sulfatado y; generalmente el segundo residuo es un ácido urónico (glucurónico o idurónico) [42]. Los proteoglicanos están compuestos por GAG unidos de forma covalente a proteínas y se destacan por su gran diversidad, la cantidad de GAG unidos a una proteína varía desde uno, como es el caso de la decorina, hasta más de 200, como el agregano; se encuentran en la sustancia fundamental, pero adicionalmente también podemos encontrarlos como moléculas unidas a membranas en la superficie de diversos tipos celulares. Los proteoglicanos transmembrana como es el caso del sindecano, vincula a las células con moléculas de la MEC [40]. Las glicoproteínas adhesivas tienen sitios de fijación para una gran variedad de moléculas de la MEC, como los colágenos, GAG y proteoglicanos; también interactúan con receptores de la superficie celular, como las lamininas [37]. Las glicoproteínas adhesivas están encargadas de regular y modular las funciones de la MEC relacionadas con la migración celular [42]. Las proteínas fibrosas que conforman a la MEC son secretadas en grandes cantidades por las células del tejido conectivo y por otros tipos celulares pero en mucha menor cantidad, entre las más destacadas encontramos al colágeno; se denomina colágeno a una familia de proteínas muy abundante en el organismo de los animales, pudiendo representar del 25 al 30 % de todas las proteínas corporales; pueden organizarse formando fibras, mallas o especializarse en formar uniones entre moléculas. Proporcionan resistencia a la tracción, regulan la adhesión celular, apoyan la quimiotaxis y la

migración y dirigen el desarrollo de tejidos; la mayor parte del colágeno intersticial se secreta por fibroblastos [40].

Las fibras elásticas confieren elasticidad a los tejidos; una fibra elástica está compuesta por un núcleo amorfo, que a su vez está formado por elastina y éste se encuentra rodeado por microfibrillas elásticas. Las microfibrillas sirven para orientar la elastina en la formación de las fibras elásticas, las cuales son muy ramificadas y tienen muchas conexiones entre sí, lo que crea la estructura de red. La elastina es una proteína del tejido conectivo bien caracterizada que se forma mediante la reticulación de los monómeros de un polipéptido lineal de ~ 70 kDa, conocida como tropoelastina, dicha reticulación se logra a través de la acción de las enzimas lisil oxidasas (LOX), las cuales son dependientes de cobre. La elastina es una proteína clave de la matriz extracelular que es esencial para la elasticidad de muchos tejidos, incluidas las arterias, los pulmones, los ligamentos, los tendones, la piel y el cartílago [43]. El segundo componente de las fibras elásticas son las microfibrillas, aparecen antes que la elastina en tejidos en desarrollo y parece que funcionan como andamio que guía la deposición de la elastina; son elásticas por sí mismas y en algunas regiones persisten en ausencia de la elastina. Las microfibrillas están conformadas por distintas glicoproteínas, entre las que se encuentra la fibrilina, la cual interacciona con la elastina y parece que desempeñar un papel esencial en el mantenimiento de la integridad de las fibras elásticas [37]. La habilidad que tienen las células para degradar y destruir a la MEC es tan importante como la habilidad de formarla y unirse a ella, es por ello que defectos en cualquiera de estos procesos deriva en una amplia gama de síndromes, que pueden ser desde pequeños hasta graves [44].

La TE está altamente expresada durante el desarrollo, pero en adultos solo en respuesta a una lesión. La fragmentación o, de manera alternativa, un decremento de la elastina se encuentra en enfermedades como enfisema pulmonar, cutis laxa y envejecimiento de la piel (Robert K. Murray, David A. Bender, 2013). La fisiopatología de ATP6V0A2-CDG se explica por un deterioro en el transporte vesicular y la secreción de TE, así como por una función y transporte anormal de glicosiltransferasas que conducen a un estado hipoglicosilado de diversos componentes de la matriz extracelular, con la consiguiente alteración de proteínas de la misma, debido a una deficiencia o fragmentación de las fibras elásticas en los tejidos.

2.8 LOS FIBROBLASTOS

La matriz extracelular juega un papel esencial ya que permite la adhesión de las células para formar tejidos, pero no solo eso sino que también conserva la integridad de los mismos, mantiene e influye en la forma celular, permite la comunicación intercelular, modula la diferenciación celular y le confiere propiedades a algunos tejidos como resistencia, dureza o elasticidad. La composición de la MEC es típica de cada tejido y sus componentes son renovados continuamente por las células que los producen [46].

El tejido conectivo tiene su origen en el mesodermo; las células mesodérmicas proliferan y se diferencian en células mesenquimatosas, que a su vez proliferan, maduran y producen algunos de los tipos celulares del tejido conectivo (fibroblastos, fibrocitos, miofibroblastos, pericitos, células cebadas o mastocitos y macrófagos), (Figura 12); otros tipos celulares (macrófagos, plasmocitos y leucocitos) derivan de precursores situados en la médula ósea y migran al tejido conectivo para ahí desempeñar su función [46]. Las células que residen de manera permanente en el tejido conectivo (células fijas) son los fibroblastos, fibrocitos, miofibroblastos, pericitos, células cebadas o mastocitos y macrófagos; las células móviles son aquellas originadas en la médula ósea y que llegan al tejido conectivo para realizar sus diferentes funciones tras su paso por la sangre, como es el caso de los macrófagos, plasmocitos y leucocitos (linfocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos y monocitos) (Tabla 2)[46].

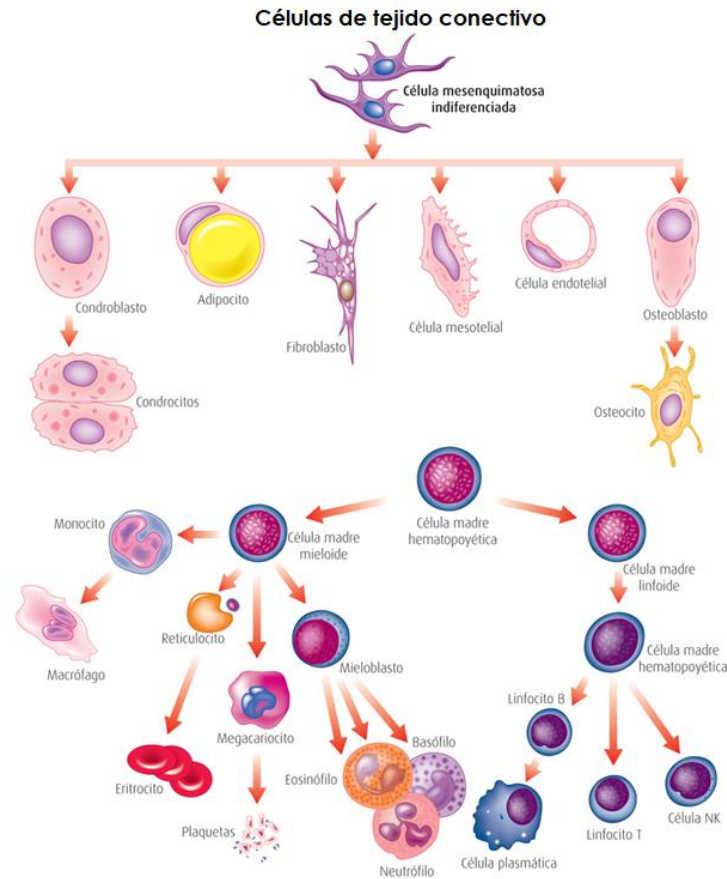


Figura 12. Esquema que muestra los tipos celulares que se encuentran en el tejido conectivo y que se derivan de las células mesenquimatosas y hematopoyéticas [46].

TABLA 2.	
FUNCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS TIPOS CELULARES PRESENTES EN EL TEJIDOCONECTIVO.	
Tipo celular	Función y características
Fibroblastos	Células más comunes del tejido conectivo; encargadas de producir las fibras de colágeno y elásticas y la sustancia amorfa de los tejidos conectivos.
Fibrocyto	Se le llama así al fibroblasto que reduce su actividad.
Miofibroblasto	Son fibroblastos especializados con un fenotipo similar al de las células del músculo liso, debido a que expresan actina en su citoesqueleto.
Pericitos	Se consideran células madre indiferenciadas que son capaces de diferenciarse a células de músculo liso o a fibroblastos.

Células cebadas o Mastocitos	Células que se originan en la médula ósea, contienen gránulos ricos en histamina y heparina, funcionan como defensa en infecciones bacterianas.
Macrófagos	Se originan de una célula madre común de la médula ósea, su función principal es la de fagocitar todos los cuerpos extraños que se introducen en el organismo.
Plasmocitos	Se originan a partir de los linfocitos B, son los encargados de la síntesis y secreción de inmunoglobulinas.
Leucocitos	Son elementos que se encuentran en la sangre y al recibir un estímulo adecuado migran al tejido conectivo a través de la pared de los capilares y las vénulas.

Los fibroblastos son células grandes, planas, alargadas con un núcleo plano y ovalado, con numerosas prolongaciones que se extienden entre haces de fibras extracelulares que la misma célula sintetiza, su tamaño es de 20 a 30 μm de largo por 10 μm de ancho (Figura 13); son células de origen mesodérmico presentes en todas las formas de tejido conectivo; de los tipos celulares presentes en el tejido conectivo, son los menos especializados. La apariencia morfológica del fibroblasto, como el de otras células, varía de acuerdo con su estado funcional. Así, la célula que está fabricando MEC es voluminosa y posee un núcleo de cromatina laxa, un nucléolo prominente, un notable aparato de Golgi; en resumen presenta todas las características de una célula que está elaborando muchas proteínas para su exportación [47].

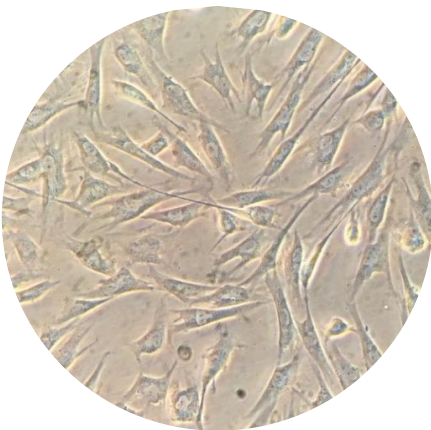


Figura 13. Microscopía de fibroblastos de tejido conectivo dérmico (x100).

El papel principal de los fibroblastos es la producción de proteínas fibrosas, como colágenos, elastina, fibronectina, lamininas, glicoproteínas, glicosaminoglicanos y proteoglicanos, que se secretan en el espacio extracelular de los tejidos conectivos para formar una MEC (Figura 11); así como el mantenimiento homeostático de la MEC del tejido u órgano en el que residen. Estas células producen múltiples tipos de colágeno, incluidos los colágenos fibrilares I y III, que en conjunto representan el 90% del colágeno total en el tejido conectivo de la piel [41]. En tejidos del ser humano se han identificado al menos 28 tipos de colágeno constituidos por más de 30 cadenas polipeptídicas distintas (cada una codificada por un gen separado) [45].

Los fibroblastos también funcionan como células accesorias en muchas respuestas inmunes e inflamatorias; pueden producir o responder a una amplia variedad de citocinas, y estos mediadores permiten que los fibroblastos y los leucocitos cooperen durante procesos complejos tales como la cicatrización de heridas [41]. El proceso inflamatorio, que empieza cuando hay una lesión, contribuye a la eliminación de los tejidos lesionados o muertos e inicia el depósito de nuevas proteínas de la MEC; durante las primeras fases de la inflamación, los neutrófilos y los monocitos infiltran la lesión; al mismo tiempo, en respuesta a factores de crecimiento locales, los fibroblastos y las células endoteliales vasculares comienzan a proliferar y a migrar dentro de la matriz de fibrina del coágulo sanguíneo y forman tejido de granulación, un tipo de tejido especializado característico del proceso de reparación. Este tejido está compuesto principalmente de vasos pequeños, fibroblastos, miofibroblastos y un número variable de células inflamatorias. Los fibroblastos son los encargados de reorganizar la matriz extracelular [42]. Existe evidencia de que los fibroblastos pueden sintetizar receptores tipo Toll (TLR), péptidos antimicrobianos, citocinas proinflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento, que son moléculas

importantes implicadas en la respuesta inmune innata contra microorganismos [48]; de acuerdo con sus atributos inmunológicos, se puede decir que los fibroblastos son células centinela que reconocen patógenos, inducen el reclutamiento de células inflamatorias a través de citocinas y factores de crecimiento, y liberan péptidos antimicrobianos, que cumplen con las características de los centinelas reales [48]. Muchas enfermedades se asocian con la desregulación de la respuesta de reparación de la lesión y la función de los fibroblastos, lo que conduce a una mayor o menor deposición de proteínas de la matriz extracelular, arquitectura alterada del tejido, función deteriorada y, en algunos casos, morbilidad y mortalidad significativas.

2.9 TRASTORNOS GENÉTICOS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

Mutaciones en los genes de los componentes de la MEC causan una amplia gama de trastornos genéticos del tejido conectivo, las consecuencias patológicas de las mutaciones de las proteínas de la MEC dependen de su distribución y función tisular [38]. El paradigma predominante para la patología molecular ha sido que existen dos mecanismos globales; primero, las mutaciones que reducen la producción de proteínas de la MEC, las cuales deterioran la integridad de la matriz en gran parte debido a defectos cuantitativos y en segundo lugar, las mutaciones que alteran la estructura de la proteína, que en ocasiones pueden reducir la secreción de proteína pero también introducen efectos negativos dominantes en la formación, estructura y / o estabilidad de la MEC [38].

Hasta la fecha se han reportado 105 mutaciones en genes asociados a proteínas de composición y estructura de la MEC, de los cuales 67 genes que codifican para glicoproteínas, 27 para colágenos y 11 para proteoglicanos [38]. Las mutaciones que introducen un codón de terminación prematuro (PTC), son causa de enfermedades genéticas; los PTC comúnmente desencadenan un proceso de vigilancia denominado degradación del ARN mensajero (ARNm) mediada por mutaciones terminadoras (NMD del acrónimo en inglés Non Mediated Decay), este proceso degrada el ARNm mutante lo que puede resultar en haploinsuficiencia funcional en el caso de mutaciones heterocigotas, o ausencia completa o casi completa de la proteína de la MEC en el caso de mutaciones homocigotas [49].

2.10 SECUENCIACIÓN DE ARN

Con la finalidad de obtener información biológica sobre la patogénesis de las manifestaciones clínicas de los pacientes, se decidió realizar un análisis transcriptómico de fibroblastos de pacientes que presentan mutación en *ATP6V0A2* y de individuos sanos que no presentan dicha mutación.

La transcripción es un proceso nuclear cuya activación depende de estímulos intra o extracelulares que activan cascadas de señalización para determinar cuáles genes deben expresarse o reprimirse de acuerdo con el tipo de estímulo inicial. En conjunto, todos los transcritos derivados de genes que se producen en una célula en un momento y bajo una condición fisiológica determinada se denomina transcriptoma [50].

El estudio del transcriptoma permite también establecer patrones de regulación génica coordinada, lo que contribuye no solo a dilucidar la función y agrupamiento de varios genes bajo un estímulo o condición específica, sino también a identificar elementos promotores comunes a varios genes [50].

Existen diversas herramientas para el análisis de la expresión génica de forma global, siendo las más comunes los microarreglos y la secuenciación de ARN (RNA-seq del acrónimo en inglés RNA-sequencing). Recientemente debido a las limitaciones de los microarreglos y al surgimiento de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS del acrónimo en inglés Next Generation Sequencing), el RNA-seq es el método de elección, debido a su alta sensibilidad y precisión [51].

El RNA-seq es una tecnología de secuenciación de alto rendimiento que permite una aproximación al perfil transcriptómico, que a diferencia de otras técnicas da una cobertura transcripcional completa, ya que permite

la detección de nuevos transcritos, pero además no solamente genera información de la secuencia, sino también de la estructura de exones, posibles eventos de splicing alternativo y la expresión específica de alelos. Puede detectar fusiones de genes, variantes de un solo nucleótido (el polimorfismo genético ha demostrado ser una información importante en la identificación de genes defectuosos asociados con enfermedades hereditarias), pequeñas inserciones y deleciones; de igual manera puede detectar un mayor porcentaje de genes expresados diferencialmente, especialmente genes con baja expresión, asimismo puede diferenciar la expresión de isoformas individuales en el perfil de transcriptoma [51].

En el RNA-seq se captura el ARN total o ARNm, el cual se fragmenta y convierte en una librería de ADN complementario (ADNc). Uno de los pasos fundamentales es la obtención de un ARN de buena calidad que represente todos los transcritos que se producen en la condición y tejido de estudio. Para el aislamiento del ARN con frecuencia se emplean kits de extracción de ARNm, que aplican la captura a partir de la cola poli(A). Este ARNm se ve fragmentado y convertido en una genoteca (library en inglés) de ADNc al cual se le añaden adaptadores de secuencia que servirán en el proceso de secuenciación [52] (Figura 14). A partir de este momento se utilizan las tecnologías NGS para secuenciar los fragmentos de cada ADNc y obtener las secuencias o lecturas (reads), que se alinean con el genoma de referencia para clasificarlos en exones, secuencias de unión y secuencias poli(A). Por último se utilizan las posiciones de los fragmentos con respecto al genoma de referencia y su clasificación para obtener la expresión diferencial por cada uno de los genes que se quieran estudiar.

Para el desarrollo del presente trabajo utilizamos RNA-seq, el cual nos permite determinar los niveles de expresión de ARN con una gran precisión,

con lo cual es posible detectar genes que se expresan diferencialmente a través de diversas condiciones biológicas.

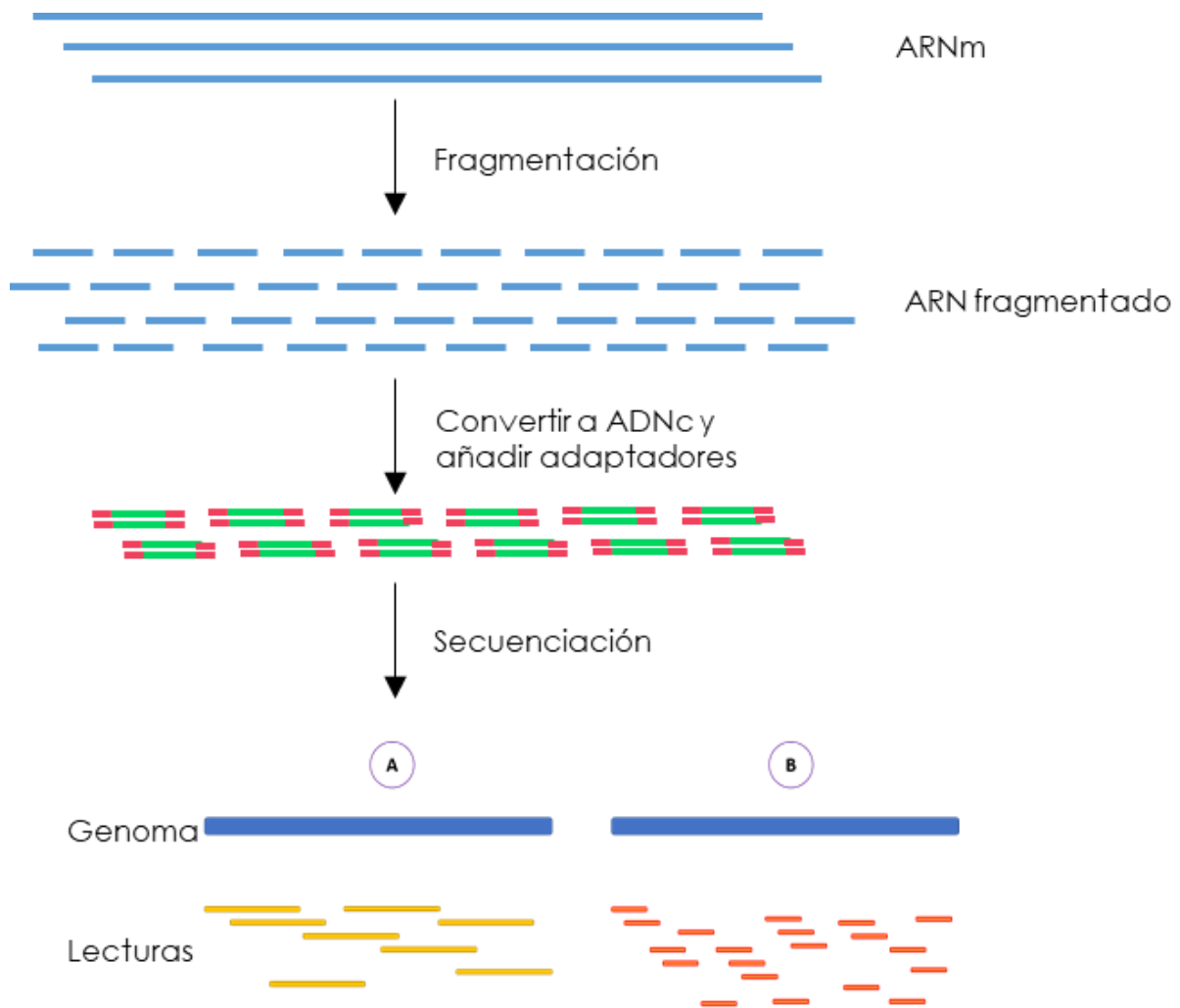


Figura 14. Esquema de la metodología para RNA-seq. El ARNm se fragmenta, posteriormente se convierte a ADNc para finalmente secuenciar dichos fragmentos, los cuales tras el proceso de secuenciación y alineación se obtiene el número de secuencias por cada gen.

2.11 ANÁLISIS DE DATOS DE RNA-SEQ

El primer paso para llevar a cabo un análisis de datos de RNA-Seq, es analizar la calidad de las lecturas obtenidas de la secuenciación; para ello se utiliza el programa FastQC, una herramienta de control de calidad de datos de secuenciación de nueva generación, el cual permite obtener a través de gráficos y tablas una primera impresión de posibles problemas en las lecturas, dichos datos deben de ser considerados antes de seguir con el análisis, con la finalidad de depurar las lecturas de mala calidad en caso de ser necesario.

FastQC proporciona una tabla con algunos datos estadísticos de las lecturas, entre los que cabe destacar: el nombre del fichero .fastq, el número de lecturas procesadas, la longitud de dichas lecturas (pueden tener distinto tamaño) y el porcentaje de GC global (es decir, el contenido de los nucleótidos Guanina-Citosina de todas las bases de todas las secuencias). Este porcentaje de GC se considera aceptable cuando supera el 45%. Además, es aconsejable que la longitud de las lecturas sea la misma para evitar complicaciones en el resto de comprobaciones de calidad (Figura 15).

La gráfica sirve para tener una visión de la calidad por base (nucleótido) de las lecturas. El eje Y representa la calidad de cada base, a mayor valor en el eje Y, mejor será la calidad de dicha base. Es normal que a medida que la secuenciación avanza ésta vaya cometiendo más errores. Esto es debido a que la tecnología de secuenciación utilizada por los secuenciadores más comunes (como la plataforma Illumina), cuando va incorporando nucleótidos a las lecturas, aumenta la posibilidad de error; el proceso de secuenciación mientras va avanzado es más probable que falle.

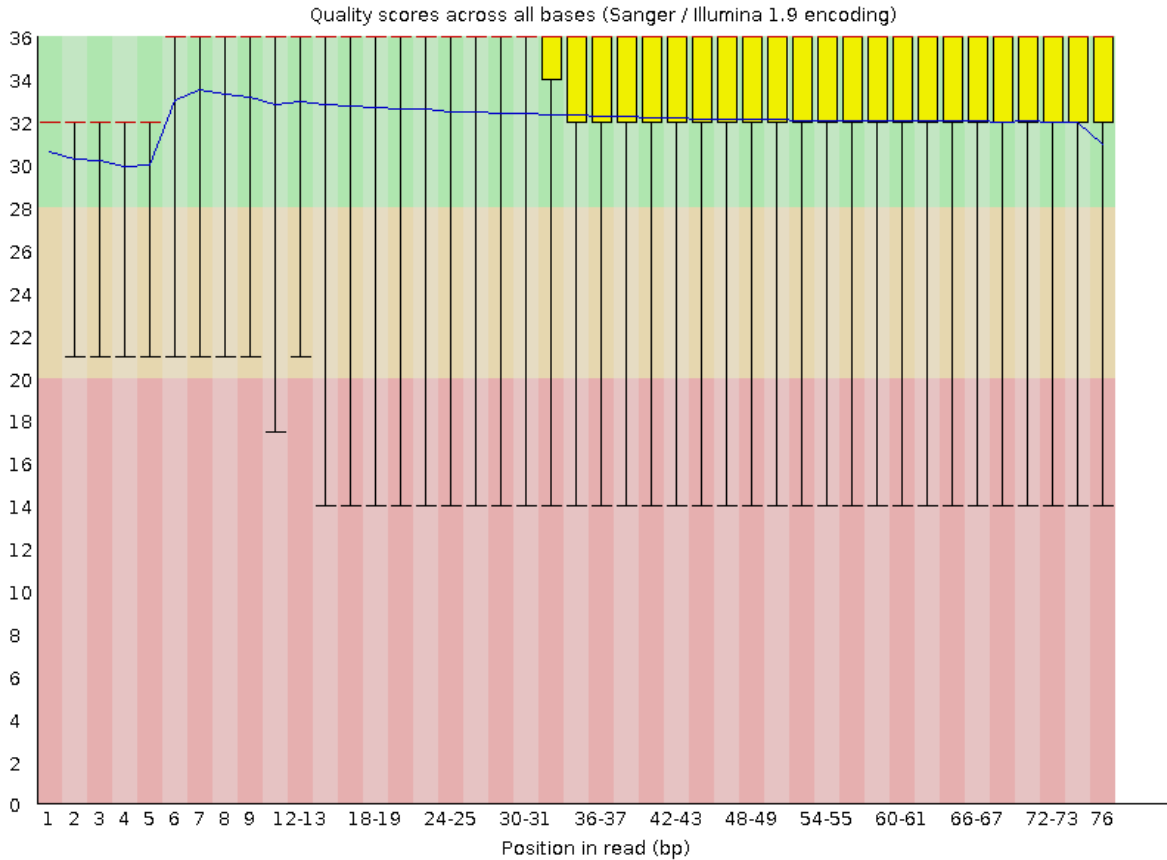


Figura 15. Gráfico de calidad (Q) de las secuencias por base (Per Base Sequence Quality). Se representa en amarillo los cuartiles, la línea azul es la mediana y en rojo, la media de la calidad. En el eje X, se representa las bases de las lecturas y cada lectura tiene 38 bases. Mientras que en el Y, se representan las calidades 0-34, distinguiéndose tres zonas: Zona verde: 28-34. Corresponden a una muy buena calidad. Zona naranja: zona de calidad intermedia (20-28). Zona roja: zona de mala calidad (0-20).

El gráfico de contenido de la secuencia por base (Per Base Sequence Content) nos indica la proporción de cada una de las bases (A, T, C, G) que hay en la secuencia, lo ideal en dicho gráfico es que las líneas sean paralelas, ya que las cantidades relativas a cada base en cada posición de las lecturas no deberían ser muy desequilibradas, pues dichas cantidades deben reflejar, en cierto modo, la proporción de dichas bases en el genoma (Figura 16).

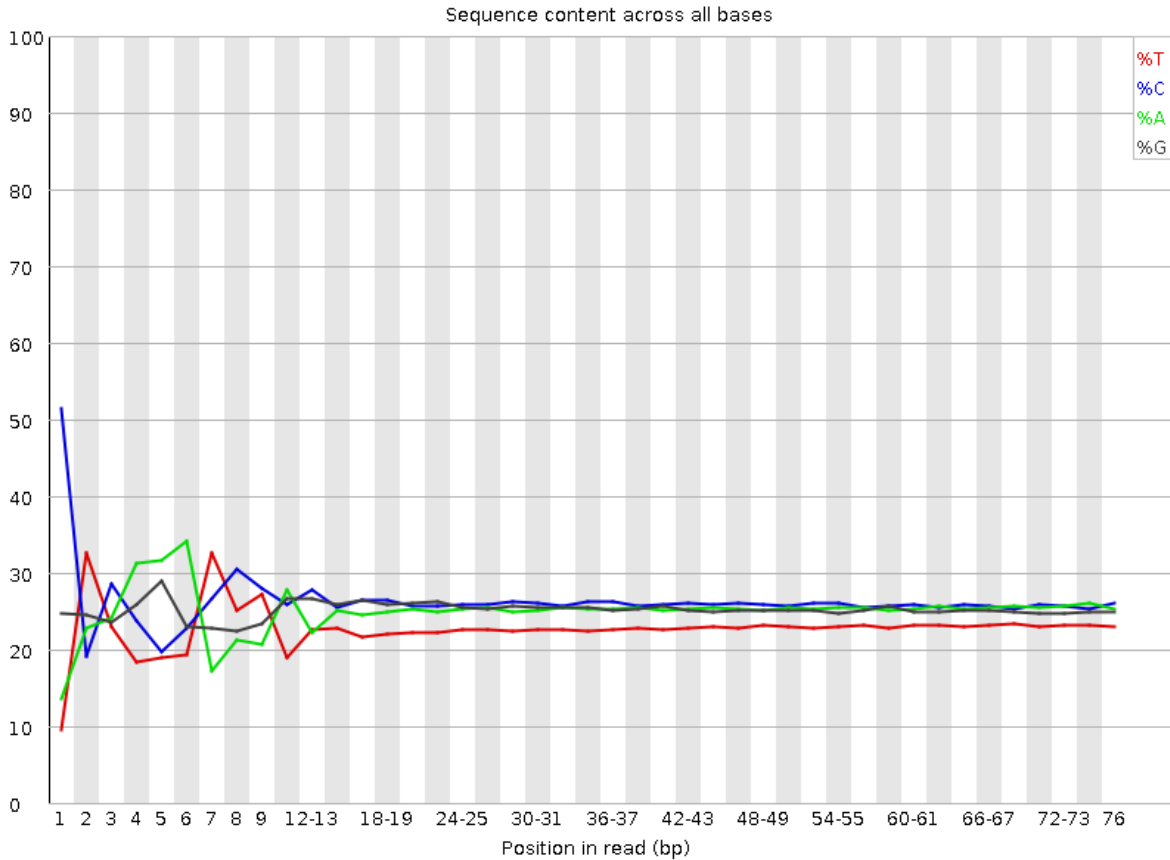


Figura 16. Gráfico de contenido de la secuencia por base (Per Base Sequence Content).

El gráfico de contenido de guanina y citosina (GC) por secuencia (Per Sequence GC Content) presenta la media de contenido de GC en las lecturas (línea roja) y lo compara con una distribución normal teórica del contenido de GC (línea azul). Lo correcto es observar una distribución prácticamente normal de contenido de GC, correspondiendo el pico central al contenido de GC del genoma. En el eje X se muestra el porcentaje medio del contenido de G y C, mientras que en el eje Y se muestra el número de lecturas (Figura 17).

El gráfico de distribución de la longitud de las secuencias (Sequence Length Distribution) muestra la distribución de tamaño de las lecturas, este gráfico es útil porque como se mencionó anteriormente, lo aconsejable es tener lecturas de la misma longitud. En el eje X se muestra la longitud de las

secuencias, mientras que en el eje Y se muestra el número de lecturas (Figura 18).

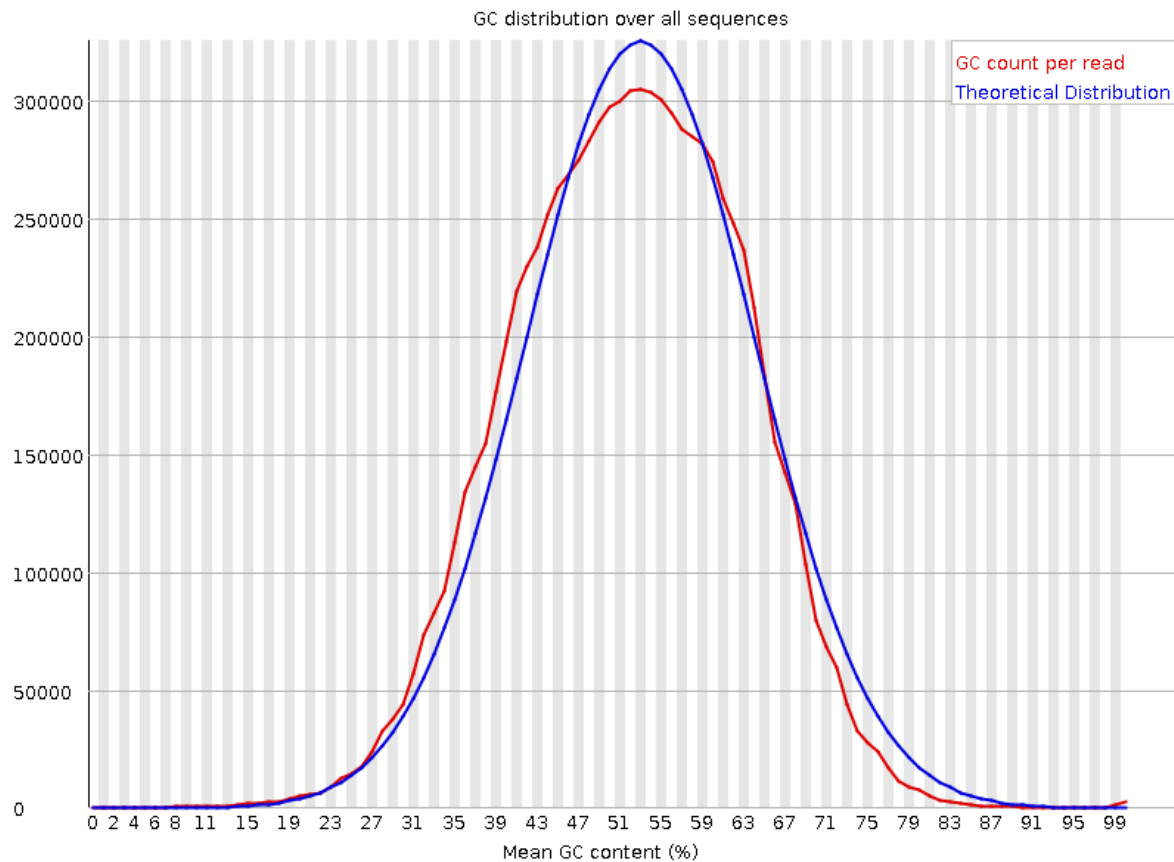


Figura 17. Gráfico de contenido de guanina y citosina (GC) por secuencia (Per Sequence GC Content).

En la figura de secuencias sobrerrepresentadas (Overrepresented Sequences) se muestra una lista de secuencias que aparecen más de lo esperado en el archivo. Una secuencia se considera sobrerrepresentada si representa $\geq 0.1\%$ de las lecturas totales y será un fracaso si dicho porcentaje supera el 1% del total de secuencias. Muchas de estas secuencias pueden ser de los adaptadores que se han usado para la secuenciación. Sin embargo, en muchos de los casos nos encontramos con “no” en la última columna. Esto significa que la secuencia no está reconocida en la base de datos como un adaptador. Por lo tanto, se

tratan de secuencias sobrerrepresentadas debido a duplicaciones o por contaminación (Figura 19).

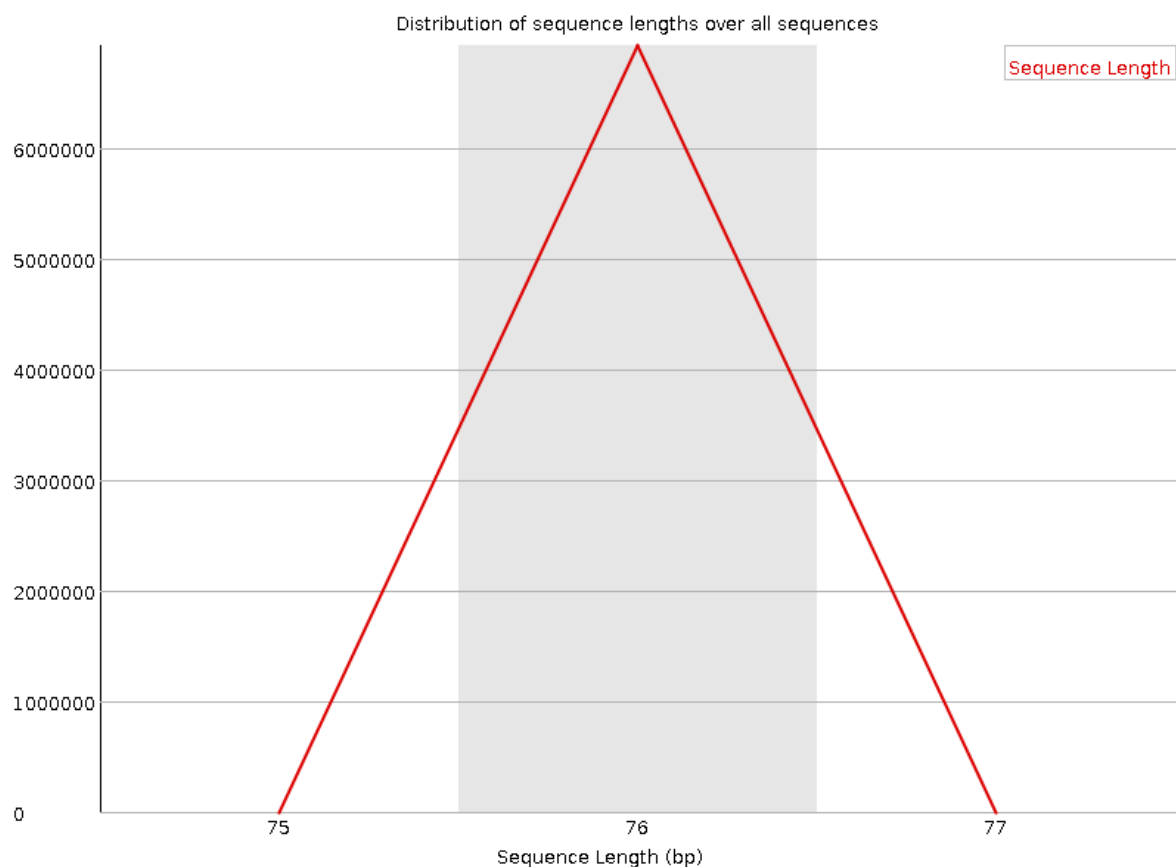


Figura 18. Gráfico de distribución de la longitud de las secuencias (Sequence Length Distribution).

Secuencia	Frecuencia	Porcentaje	Fuente
#Sequence	Count	Percentage	Possible
AA	5843	0.1070297655584699	No

Figura 19. Secuencias sobrerrepresentadas (Overrepresented Sequences).

Posterior al análisis de calidad de las lecturas, se procede al alineamiento y mapeo de las lecturas frente a un genoma de referencia, en este caso *Homo sapiens*; el objetivo de este procedimiento es identificar la posición donde se encuentra la máxima semejanza entre cada una de las lecturas con respecto al genoma de referencia, el cual debe de estar indizado

para poder alinear las secuencias cortas con mayor facilidad; para ello se utiliza bowtie2, el cual es una herramienta que se utiliza para alinear las lecturas de secuenciación con secuencias de referencia largas. Es especialmente adecuado para alinear lecturas de aproximadamente 50 hasta 100 o 1,000 caracteres y para alinear genomas relativamente largos (por ejemplo, mamíferos).

Bowtie2 genera archivos de extensión .sam (del acrónimo en inglés Sequence Alignment Map), los cuales deben de convertirse a extensión .bam (del acrónimo en inglés Binary Alignment Map) que es la versión binaria del archivo .sam. Este tipo de archivos contienen datos de alineamientos separados por tabulación. Cada uno de ellos presenta la siguiente estructura por filas: nombre/identificador de la lectura; posición de dicha lectura en el genoma de referencia, indicando el cromosoma en el que se encuentra, el punto inicial y final del lugar que ocupa dentro del genoma de referencia, permitiendo identificar el gen y el transcrito, o transcritos, correspondientes; la secuencia y la calidad de dicha secuencia.

Ya que se llevó a cabo el alineamiento y el mapeo de las lecturas frente a un genoma de referencia, se necesita realizar un conteo de las lecturas, en dicho proceso se genera una tabla de conteos en donde se cuantifica el número de lecturas en relación a los genes o transcritos que aparecen en el genoma de referencia, de modo que para aquella muestra que un gen o transcrito se expresa más que en otra, el número de lecturas alineadas contra ese gen o transcrito será mayor que para la otra muestra. Los genes se disponen en filas y las muestras en columnas.

Generalmente, en las matrices de conteos hay un cierto número de genes que presentan pocas o nulas lecturas en todas o en la mayoría de los genes; estos genes no resultan de interés cuando se pretende realizar un

análisis de expresión diferencial debido a que el objetivo de dicho análisis es determinar aquellos genes cuyo nivel de expresión es significativamente diferente entre los distintos grupos experimentales a comparar; es por ello que se realiza un filtrado para los genes que no muestren un nivel de expresión significativo en los grupos de estudio.

Una vez que se realiza el filtrado de los genes se procede a la normalización los datos, con ello se busca minimizar el ruido técnico introducido en los datos durante el proceso de secuenciación con el fin de volverlos comparables entre sí, así como eliminar las variaciones biológicas entre las muestras. Además, al normalizar se busca poner en una misma escala todas las muestras para evitar falsos positivos, ya que una muestra o librería con mayor profundidad de secuenciación tiene más probabilidad de tener genes diferencialmente expresados con respecto a otra, sin deberse estas diferencias a la condición bajo estudio. Existen diversos métodos para llevar a cabo la normalización de estos datos, el más común es el método TMM (del acrónimo en inglés Trimmed Mean of M values) [53], este tipo de normalización asume que la mayoría de los genes no están expresados diferencialmente y consiste en utilizar las medias truncadas de las medidas de abundancia relativa de cada gen entre dos muestras [54].

Posterior a la normalización de los datos, se estima la dispersión común para todos los transcritos, con la finalidad de conocer la variabilidad de los datos; con dicha información se calcula el coeficiente de variación biológica (BCV del acrónimo en inglés Biological Coefficient of Variation) el cual representa el coeficiente de variación entre réplicas de la misma condición, para posteriormente realizar una estimación de la dispersión para cada uno de los transcritos.

En último lugar se realiza una selección de los genes expresados diferencialmente, para lo cual se deben de establecer ciertos parámetros,

como la proporción de falsos positivos (FDR del acrónimo en inglés False Discovery Rate) permitidos o el LogFC (\log_2 -fold-change) que muestra el cambio en la proporción de las lecturas para ambas condiciones en función del \log_2 .

Para poder realizar un análisis completo sobre la expresión diferencial de genes obtenidos del RNA-seq para cada una de las condiciones de interés, se realiza un análisis de validación biológica de los datos obtenidos, para lo cual se pueden emplear distintas plataformas bioinformáticas como GO (Gene Ontology, por sus siglas en inglés), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, por sus siglas en inglés) o STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, por sus siglas en inglés).

El enriquecimiento por GO se ha empleado con frecuencia en estudios de análisis masivo de genes, ya que permite realizar un análisis de un grupo de genes mediante un sistema de clasificación de ontología de genes en el cual se asignan a un conjunto de categorías o "términos" predefinidos dependiendo de sus características funcionales. Los términos se agrupan en tres categorías: función molecular (que describe la actividad molecular de un gen), proceso biológico (que describe el papel celular o fisiológico más importante llevado a cabo por el gen, coordinado con otros genes) y proceso celular (que describe la ubicación en la célula donde el producto del gen ejecuta su función). Cada gen puede ser descrito (anotado con) en varios términos.

Dicho proceso tiene por objetivo identificar el perfil funcional del grupo de genes de interés para poder comprender mejor los procesos biológicos, celulares o moleculares en los que participan. El análisis se realiza mediante la comparación del grupo de genes de entrada a cada uno de los términos en el GO y con una prueba estadística aplicada para cada término para ver si éste está enriquecido para los genes de entrada. El

resultado del análisis es típicamente una lista clasificada de los términos de GO, cada uno asociado con un valor de p , que nos indica la importancia de un término biológico con respecto a un conjunto de genes analizado, cuando el valor de p es más próximo a cero, es más significativo el término GO, cuando el valor está más alejado del cero significa que el resultado está más relacionado al azar.

En el caso de la plataforma KEGG tiene diversas funciones que nos ayudan a vincular la información genómica con información funcional con la finalidad de identificar las rutas metabólicas en las que intervienen los genes de interés; los mapas utilizados en dicha plataforma representan interacciones moleculares y redes de información para metabolismo, información de procesos genéticos, procesos celulares o enfermedades humanas. Toda la información contenida en KEGG está organizada en cinco tipos de datos, generando un sistema complejo y completo: (1) Catálogo de componentes químicos en las células; (2) Catálogo de genes; (3) Mapas de genomas; (4) Mapas de vías metabólicas; (5) Tablas de homologías.

En el caso particular de KEGG Pathway (rutas metabólicas), describe redes potenciales de actividades moleculares, ya sean metabólicas o reguladoras; en donde cada nodo de la red puede representar diferentes compuestos biológicos: enzimas, compuestos, complejos de proteínas, lípidos o metabolitos, entre otros. Por otro lado, las relaciones entre dichos nodos pueden representar diferentes procesos metabólicos, es decir, son redes que representan interacciones físicas entre los nodos que las componen.

De igual manera también se puede emplear otra herramienta bioinformática, STRING, que permite obtener, clasificar y visualizar en forma de redes de genes o proteínas las interacciones descritas en la literatura

para un conjunto de genes de interés, en donde los enlaces que existen entre dichas redes muestra que tienen algún tipo de relación funcional.

3. ANTECEDENTES

Con la finalidad de comprender el impacto de las mutaciones de ARCL-II en la biosíntesis de *ATP6V0A2*, Huchtagowder y colaboradores realizaron un análisis de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) en el que demostraron que en fibroblastos de pacientes con al menos una mutación predicha para introducir un PTC, como es el caso de los pacientes reportados por Martínez-Duncker y colaboradores, se redujeron significativamente los niveles de ARNm de *ATP6V0A2* en estado estacionario, probablemente derivado del mecanismo NMD. Por el contrario, la abundancia de ARNm de *ATP6V0A2* con mutaciones puntuales donde hubo cambio de codón no fue significativamente diferente del control (Figura 20) [32].

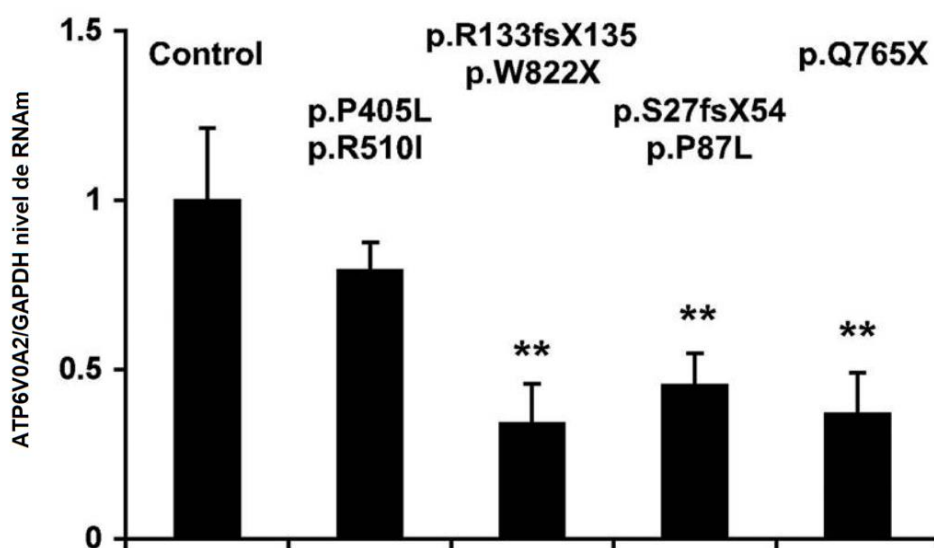


Figura 20. Expresión relativa de *ATP6V0A2* en fibroblastos de la piel de pacientes con ARCL-II y personas normales. *GAPDH* se usó como un gen de referencia interno. Las barras muestran medias de tres experimentos independientes, cada uno con muestras triplicadas, las barras de error son error estándar de la media (SEM). Las mutaciones sin sentido y las que cambiaron el marco de lectura, mostraron una reducción significativa (** $P = 0.01$, prueba t) de la expresión de *ATP6V0A2* en comparación con los individuos control (promedio de cinco individuos). Las mutaciones en cada muestra de fibroblastos se muestran sobre las barras. El paciente 1 que portaba mutaciones puntuales con

cambio de codón homocigóticas mostró una expresión de *ATP6V0A2* comparable a los sujetos de control. Imagen adaptada al español de [32].

Adicionalmente, estudiaron los fibroblastos de pacientes en condiciones post-confluentes cuando las células secretaban activamente la matriz extracelular. Los fibroblastos ARCL-II mostraron alteración y un crecimiento anormal del aparato de Golgi por inmunotinción y microscopía electrónica, además las células contenían abundantes autofagosomas, cuerpos multivesiculares y grandes lisosomas, los cuales no se observaron en las células control (Figura 21), lo que sugiere que el tráfico de vesículas que contienen a la tropoelastina puede ser defectuoso.

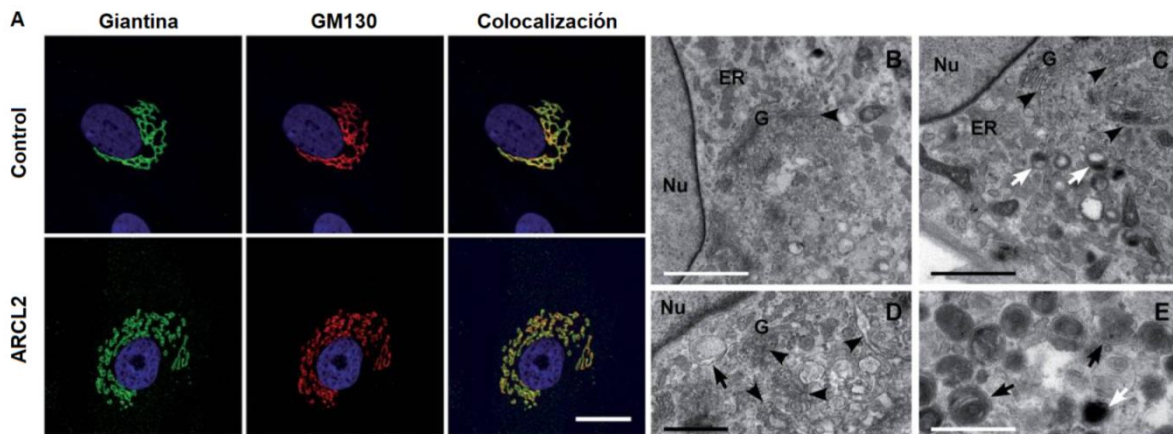


Figura 21. Aparato secretor anormal en fibroblastos ARCL-II. (A) La tinción por inmunofluorescencia de los marcadores de Golgi Giantina (verde) y GM130 (rojo) en fibroblastos secretores de matriz extracelular de paciente muestra la interrupción del Golgi en mini-pilas en comparación con el aparato de Golgi bien organizado en las células de control. Microscopía electrónica de transmisión de control representativo (B) y ARCL-II (C - E,) los fibroblastos muestran una morfología normal del núcleo (Nu) y el retículo endoplásmico (RE). En contraste, el aparato de Golgi (G) en las células ARCL-II muestra inflamación y fragmentación anormales (C y D, puntas de flecha). Además, los fibroblastos ARCL-II contenían muchos lisosomas (C y E, flechas blancas), autofagosomas y cuerpos multivesiculares (D y E, flechas negras). Barras de aumento A: 10 μ m; B y C: 2 μ m; D y E: 1 μ m. Imagen adaptada al español de [32].

La formación de fibra elástica reducida o anormal es un mecanismo causal compartido en todos los síndromes de cutis laxa descritos hasta la fecha. La biosíntesis de fibra elástica requiere un armazón de microfibrillas de fibrilina y una familia de enzimas de reticulación extracelular, lisil oxidasas (LOX). Tanto las fibrilinas como las LOX están N-glicosiladas. Por lo tanto, estudiaron si las anomalías secretoras en ARCL-II interfieren con la función de estas moléculas clave de la fibra elástica. Las microfibrillas en los tres cultivos de fibroblastos ARCL-II resultaron normales y la síntesis y secreción de LOX tampoco se vio afectada (Figura 22) [32].

De igual manera y en el mismo trabajo, Huchtagowder y colaboradores demostraron que a pesar de que la red microfibrilar fue normal y la actividad LOX elevada, la tinción de elastina usando un anticuerpo contra la fracción alfa de elastina insoluble reveló una red de fibra elástica disminuida en las tres líneas de fibroblastos ARCL-II que analizaron [32], lo que deriva en un ensamblaje defectuoso de las mismas.

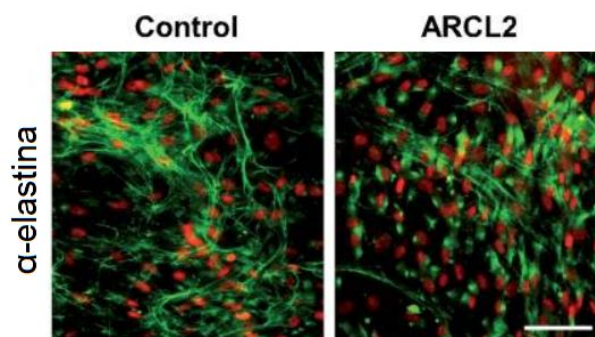


Figura 22. Red de fibra elástica disminuida en las tres líneas de fibroblastos ARCL-II analizadas. Los cultivos de los fibroblastos fueron inmunoteñidos para α -elastina. Los núcleos se contratiñeron con yoduro de propidio (rojo). Imagen modificada y adaptada al español de [32].

Por otro lado, evaluaron la deposición de TE, precursor soluble de la elastina y observaron que tanto en las células de control como en las de pacientes, la tinción por anticuerpos contra la TE recombinante humana

(TE) detectó material fibrilar y agregados pericelulares globulares, conocidos por ser intermedios de la formación de fibra elástica. Las células ARCL-II mostraron muy poca elastina fibrilar, y la mayor parte de la inmunorreactividad se encontró en depósitos globulares de TE (Figura 23-izquierdo). La morfometría cuantitativa mostró que el número de agregados de TE globular por célula aumentó significativamente en las células ARCL-II en comparación con los controles (Figura 23-derecho) [32].

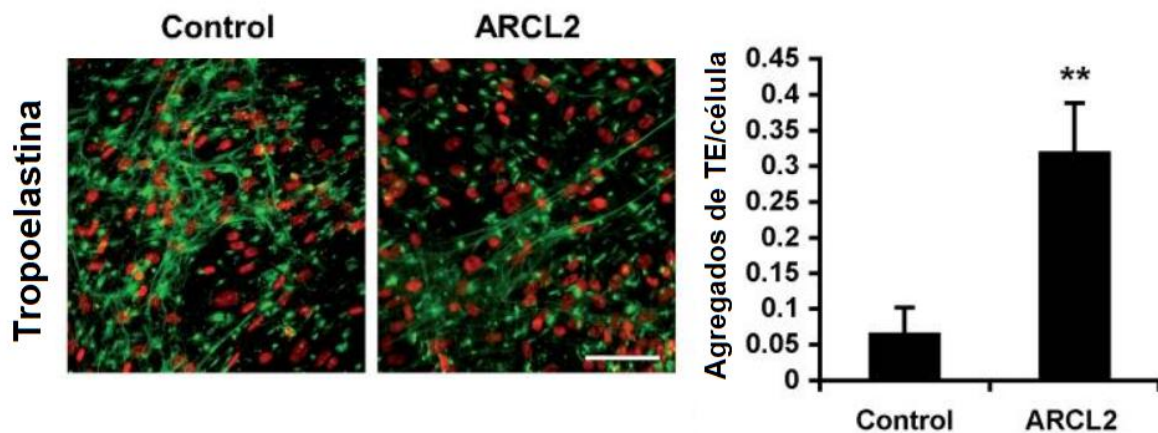


Figura 23. Los cultivos de los fibroblastos fueron inmunoteñidos para TE. Los núcleos se contratiñeron con yoduro de propidio (rojo). La tinción por anticuerpos contra TE, detectó material fibrilar y agregados pericelulares globulares. La morfometría cuantitativa mostró que el número de agregados globulares de TE por célula aumentó significativamente en las células ARCL-II en comparación con los controles. Imagen modificada y adaptada al español de [32].

Si bien los estudios en los pacientes que presentan mutaciones en *ATP6V0A2* se han centrado en el estudio de las fibras elásticas, particularmente en el papel de la TE, es importante mencionar que la pérdida de la homeostasis en el Golgi deriva en una desregulación de diversos procesos celulares que deben estudiarse.

En el año 2014 se identificaron dos pacientes Mexicanos con cutis laxa autosómica recesiva tipo II, ambos asociados a una mutación puntual sin

sentido en *ATP6V0A2* [3] uno con la mutación (c.187 C>T, p.R63X) en el exón 2, la cual fue reportada previamente en dos pacientes de Turquía e identificada por Korank y colaboradores [14] y el otro paciente con una mutación (c.2293 C>T, p.Q765X) en el exón 18, también previamente reportada [24].

El paciente 1 (P1) descrito por Martínez-Duncker I. y colaboradores, es un niño de 3 años, hijo de padres consanguíneos (hermanos) sin embarazos previos conocidos, abortos espontáneos o parientes afectados por cutis laxa. El fenotipo sugirió que este paciente tenía un síndrome de cutis laxa ARCL-IIA, particularmente debido a la presencia de anomalías del sistema nervioso motor, anomalías cardiovasculares y fontanela anterior patente que lo distingue de ARCL-IIB así como la ausencia de movimientos atetoides y opacificación corneal presente en el ARCL-III [3].

Para confirmar si este paciente tenía la hipoglicosilación característica observada en *ATP6V0A2*-CDG, la glicosilación de la transferrina sérica (N-glicoproteína) se analizó mediante isoelectroenfoque (IEF) y reveló un perfil tipo II anormal (Figura 24) [3] que se observan glicanos truncados en la transferrina y apunta a una perturbación del compartimiento de Golgi.

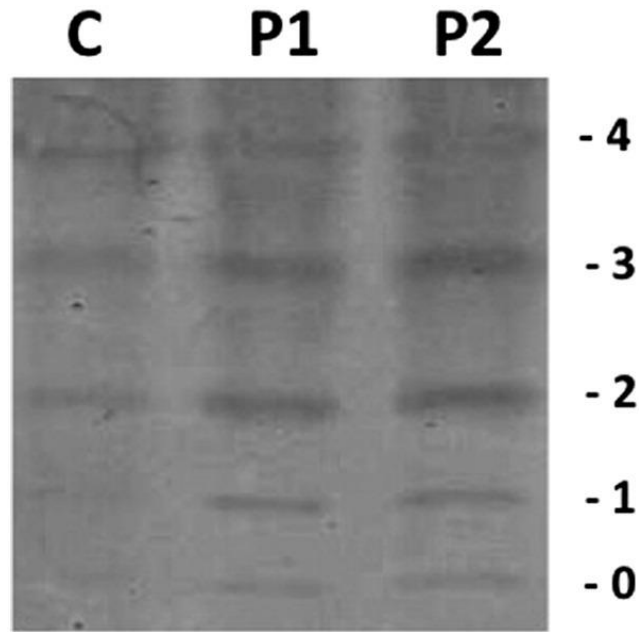


Figura 24. Perfil de sialilación de la proteína transferrina y apolipoproteína en los pacientes 1 y 2 [3].

Posteriormente, la transferrina y la apolipoproteína C-III (ApoC-III, O-glicoproteína) se perfilaron mediante espectrometría de masas, confirmando la hipoglicosilación de la transferrina sérica pero revelando la glicosilación normal de la ApoC-III en suero (Figura 25) [3].

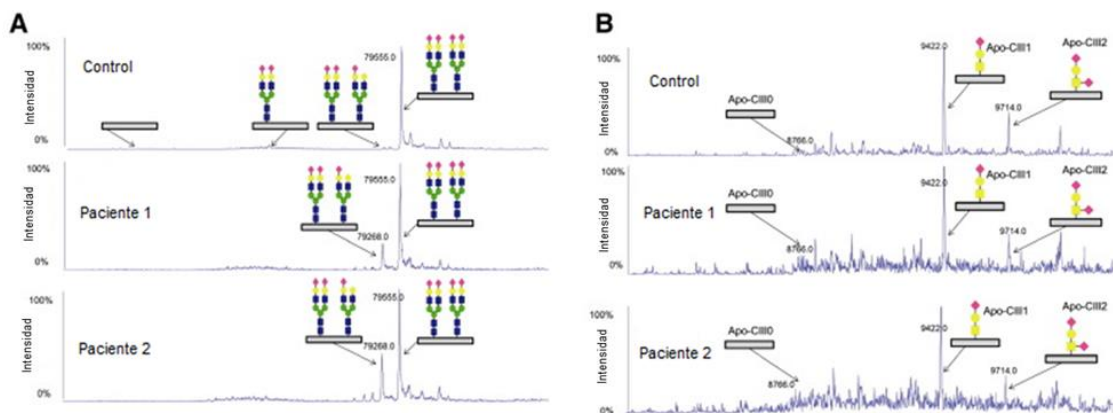


Figura 25. Espectrometría de masas de transferrina sérica y ApoC-III. **A.** Perfiles de transferrina de los pacientes 1 y 2 que muestran un aumento de la transferrina trisialilada en comparación con un control normal. **B.** Perfil apoCIII del paciente 1 que muestra un

perfil de glicosilación normal y el paciente 2 que muestra un perfil anormal en comparación con un control normal. Adaptada al español de [3].

El análisis mutacional de *ATP6V0A2* usando el cADN del paciente reveló un solo transcrito de *ATP6V0A2* con una mutación sin sentido en el exón 2 que codifica un codón de paro prematuro (c.187C> T; p.R63X) (Figura 26) [3].

El paciente 2 (P2) es un varón de 10 meses, hijo de parientes consanguíneos de cuarto grado con un embarazo anterior que terminó en aborto espontáneo sin parientes conocidos afectados por cutis laxa [3].

La exploración física reveló un peso persistentemente bajo, altura y circunferencia cefálica (<5 percentil), una fontanela anterior ancha (> 6 cm), piel caída en las mejillas de la cara, nariz pequeña con narinas antevertidas, filtrum largo, pliegues nasolabiales marcados y orejas grandes evertidas con hipoplasia helicoidal. Este fenotipo también sugirió un síndrome de cutis-laxa ARCL-IIA que conduce al análisis de isoelectroenfoque de transferrina mostrado previamente; la transferrina sérica IEF reveló un perfil anormal tipo II. La transferrina y la apolipoproteína C-III se perfilaron mediante espectrometría de masas y confirmaron un defecto de hipoglicosilación combinado (Figura 25) [3].

La amplificación por PCR y la secuenciación de *ATP6V0A2* usando cADN revelaron la presencia de dos transcritos, una transcripción de longitud completa con una mutación sin sentido previamente informada en el exón 18 que causa un codón de parada prematuro (c.2293C> T; p.Q765X) y una transcripción que carece del exón 18 (r.2176_2293del) (Figura 26) [3]. Con respecto a este segundo paciente se mostró que dicha mutación induce un corte y empalme alternativo sin sentido a través de la interrupción del sitio de empalme normal y que conduce a la omisión del exón 18 que causa un cambio de marco y un codón de parada prematuro [3].

Posterior a este reporte, se identificó en el grupo de Martínez-Duncker I. un tercer paciente mexicano con sospecha de ARCL-IIA, por lo que a partir de suero se analizó el perfil de sialilación en la proteína transferrina mediante un gel de isoelectroenfoque (IEF) el cual mostró un patrón de bandeo correspondiente a un CDG de tipo II, a partir de este resultado se mandó a secuenciar a *ATP6V0A2*, observando una mutación puntual en el exón 18 (c.2293 C>T) al igual que el paciente reportado previamente por el mismo grupo, ambos son hijos de padres consanguíneos y provienen de la misma localidad, Túnel de Potrerillo localizada en el estado de Aguascalientes en la República Mexicana.

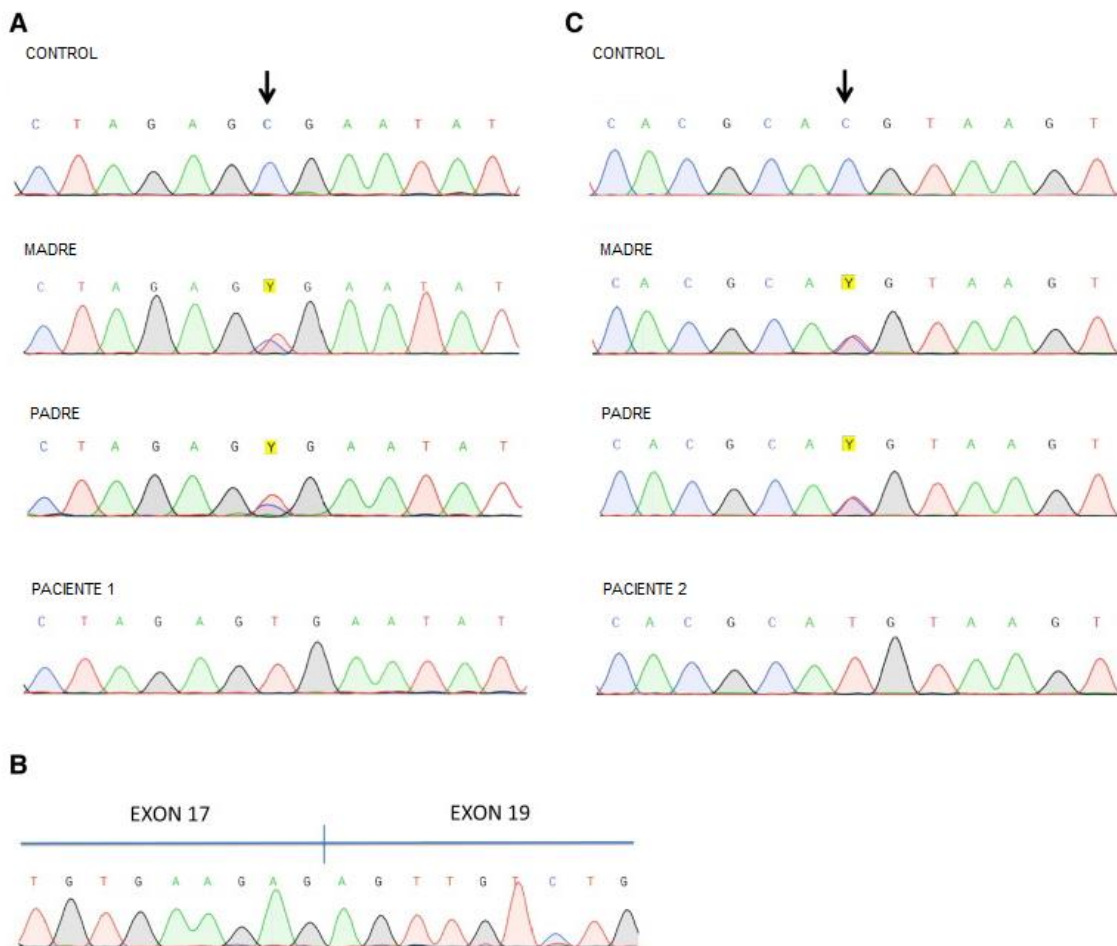


Figura 26. Cromatogramas de secuenciación de Sanger que muestran mutaciones. **A.** El paciente 1 muestra la mutación homocigótica en el ADN genómico (c.187C> T) y sus

padres lo muestran de forma heterocigótica. **B.** Paciente 2 que muestra el exón 18 omitiendo en ADNc. **C.** El paciente 2 muestra una mutación homocigótica en el ADN genómico (c.2293C> T) y sus padres lo muestran de forma heterocigótica. La secuencia de control es de un individuo sano. Adaptada al español de [3].

En el año 2011, Lecca y colaboradores hicieron un análisis de transcriptoma con la técnica de microarreglos, en donde se estudiaron a los fibroblastos ALG6-CDG, DPM1-CDG y ALG12-CDG (todos ellos implicados en defectos de enzimas transferasas), este análisis reveló una fuerte inducción de varios genes que codifican componentes de la matriz extracelular, como colágenos, COMP (gen que codifica para la proteína de la matriz oligomérica del cartílago), IGFBP5 (gen que codifica para la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 5) y biglicano (proteoglicano de la matriz extracelular) [55]; sin embargo hasta el momento no se ha reportado un análisis transcriptómico respecto a fibroblastos ATP6V0A2-CDG y tampoco se ha utilizado RNA-seq para los procesos anteriormente mencionados.

Las mutaciones sin sentido en *ATP6V0A2* posiblemente se traduzcan en una desregulación de los mecanismos celulares incluyendo los asociados a la síntesis y organización de la matriz extracelular, derivado de los procesos alterados por la pérdida de la homeostasis del aparato de Golgi. Las enfermedades genéticas no solo se entienden por la pérdida de función del gen sino que probablemente existen cambios en la expresión de otros genes que compensen la función o bien puedan contribuir a la patología.

Es por ello que comprender las variaciones en el transcriptoma de una célula en respuesta a los cambios en la función y el entorno de la célula es fundamental para entender los mecanismos reguladores, razón por la cual el transcriptoma se utiliza a menudo como una aproximación del estado funcional celular.

En las últimas décadas, el perfil del transcriptoma ha sido uno de los enfoques más utilizados para investigar enfermedades humanas a nivel molecular. A través de estudios de expresión, se han encontrado muchos biomarcadores moleculares y dianas terapéuticas para varias patologías humanas [56].

El análisis de genes expresados diferencialmente como una respuesta transcripcional del genoma a diferentes estímulos ambientales o condiciones fisiológicas / patológicas siempre ha sido uno de los propósitos principales de los estudios de transcriptoma [57].

4. HIPÓTESIS

Los fibroblastos de tejido conectivo dérmico de individuos con mutaciones en *ATP6V0A2* pueden presentar una expresión significativamente aumentada de genes codificantes para proteínas de la matriz extracelular con respecto a individuos que no presentan mutación en *ATP6V0A2*.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar fibroblastos de tejido conectivo dérmico en individuos que no presentan mutación en *ATP6V0A2* (individuos sanos) y en fibroblastos de tejido conectivo dérmico en individuos que presentan mutación en *ATP6V0A2* (individuos enfermos) para contribuir al entendimiento de la enfermedad.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar un análisis de expresión diferencial en fibroblastos de tejido conectivo dérmico en individuos que no presentan mutación en *ATP6V0A2* (individuos sanos) y en fibroblastos de tejido conectivo dérmico en individuos que presentan mutación en *ATP6V0A2* (individuos enfermos) por medio de secuenciación masiva de ARN (RNA-seq).
2. Detectar los genes que codifican proteínas de la matriz extracelular en los fibroblastos de tejido conectivo dérmico en pacientes que presenten una menor expresión con respecto a los individuos sanos.
3. Identificar biomarcadores implicados en el desorden congénito de glicosilación asociado a la mutación en *ATP6V0A2* para avanzar en el diagnóstico de esta enfermedad.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 CONSENTIMIENTO INFORMADO

Previo a la toma de la biopsia de los individuos de estudio (dos individuos con mutación en el gen *ATP6V0A2* y tres individuos sanos), se les proporcionó a los padres de familia o tutores un formato de consentimiento informado, el cual es un documento informativo en donde se invita a las personas a participar en el proyecto de investigación. El aceptar y firmar los lineamientos que establece el consentimiento informado autoriza a una persona a participar en el presente estudio así como también permite que la información recolectada, pueda ser utilizada para la elaboración de análisis y comunicación de los resultados obtenidos. El consentimiento informado contiene la siguiente información:

1. Nombre del investigador.
2. Nombre y descripción del procedimiento que se le realiza a las personas en el estudio.
3. Objetivos del estudio, es decir, qué se pretende obtener con la investigación.
4. Riesgos e inconvenientes de participar en el estudio, así como las molestias que pudieran generar.
5. Derechos, responsabilidades y beneficios como participante del estudio.
6. Compensaciones o retribuciones que podría recibir por participar en la investigación.
7. Aprobación del proyecto de investigación por un Comité de Ética de investigación en humanos.
8. Confidencialidad y manejo de la información, es decir, en el escrito se garantiza que sus datos no podrán ser vistos o utilizados por otras

personas ajenas al estudio ni tampoco para propósitos diferentes a los que establece el documento que firma.

9. Datos personales del menor que participa en el estudio: nombre, fecha de nacimiento, estatura y peso.
10. Fecha, nombre y firma de la persona que autoriza que el menor participe en el estudio.

6.2 TRATAMIENTO DE BIOPSIAS PARA LA EXTRACCIÓN DE FIBROBLASTOS SANOS

1. Desinfectar con alcohol el área de donde se tomará la biopsia.
2. Administrar lidocaína tópica, la cual se deja actuar durante aproximadamente 20 minutos.
3. Retirar la lidocaína con un algodón con alcohol.
4. Tomar la biopsia con un bisturí y colocar la muestra dentro de un tubo eppendorf de 1.5 mL.
5. Lavar 2-3 veces la muestra con 2 mL de DPBS, el tejido debe de quedar cubierto.
6. Retirar el DPBS y añadir 500 μ L de tripsina al 0.625%.
7. Colocar en la incubadora (37°C, 5% CO₂) durante 20 minutos. La muestra se debe de mover cada 5-8 minutos.
8. Inactivar la tripsina con 500 μ L de medio Gibco® AmnioMAX™ C-100, suplementado al 10% con Gibco® AmnioMAX™ C-100 Supplement y con antibiótico, estreptomina y penicilina 1%.
9. Centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm.
10. Desechar el sobrenadante, resuspender la pastilla celular en 1 mL de medio, con las condiciones previamente descritas.
11. Colocar las células resuspendidas en una caja T25 con un volumen final de 5mL de medio de cultivo.
12. Colocar la caja T25 en la incubadora (37°C, 5% CO₂).

6.3 PASAJE CELULAR

1. Retirar medio de cultivo y lavar 2 veces las células con 1 mL de PBS.
2. Agregar a la placa 1mL de tripsina 1.25%-PBS, incubar por 5 minutos y observar al microscopio.
3. Inactivar la tripsina con 1mL de medio de cultivo AmnioMAX™ C-100, en las condiciones previamente descritas.
4. Resuspender y homogenizar las células en caja, verter el volumen en 1 tubo eppendorf de 1.5mL.
5. Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Desechar sobrenadante y resuspender la pastilla celular en 5 mL de medio de cultivo.
7. Contar las células a través del método Neubauer para redistribuir la carga celular en nuevas cajas.
8. Resembrar en caja T75 e incubar a 37 °C, 5% CO₂.
9. Dejar que las células se adhieran y mantenerlas en observación para agregar o cambiar el medio de cultivo según sea necesario.

6.4 CULTIVO CELULAR DE QUERATINOCITOS (CÉLULAS HaCaT)

1. Colocar las células HaCaT en una caja T25 con un volumen final de 5mL de medio de cultivo DMEM -F12 10%SFB, estreptomina y penicilina 1%.
2. Colocar en la incubadora a 37°C, 5% CO₂.
3. Dejar que las células se adhieran y mantenerlas en observación para agregar o cambiar el medio de cultivo según sea necesario.

6.5 CRIOPRESERVACIÓN CELULAR

En caso de que se necesiten criopreservar células de pases tempranos, será necesario realizar hasta el paso 7 de las instrucciones antes

mencionadas en el apartado de pasaje celular, se deberán congelar por criovial de 1, 000,000 a 1, 500,000 de células en un volumen máximo de 1.5 mL con DMSO 10% a -80 °C, máximo 6 meses, en caso de que se necesiten criopreservar por un mayor periodo deberán de conservarse en nitrógeno líquido (~ -150°C).

6.6 EXTRACCIÓN DE ARN

1. Retirar medio de cultivo y lavar 2 veces las células con 1 mL de PBS.
2. Agregar a la placa 1mL de tripsina 1.25%-PBS, incubar por 5 minutos y observar al microscopio.
3. Inactivar la tripsina con 1mL de medio de cultivo AmnioMAX™ C-100, en las condiciones previamente descritas.
4. Resuspender y homogenizar las células en caja, verter el volumen en 1 tubo eppendorf de 1.5mL.
5. Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Desechar sobrenadante y resuspender la pastilla celular en 1 mL de PBS.
7. Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Desechar sobrenadante y resuspender la pastilla celular en 1 mL de PBS.
9. Contar las células a través del método Neubauer para separar en un tubo eppendorf 1×10^6 células.
10. Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
11. Desechar sobrenadante y congelar las células por 12 h a -80°C.
12. Añadir 350 µL de amortiguador de lisis RLT (RNeasy mini kit, Qiagen) al pellet celular.
13. Homogenizar el lisado por 45 segundos en mezclador de vórtice.
14. Añadir 350 µL de etanol al 70% para homogenizar el lisado, mezclar bien por pipeteo. No centrifugar.

15. Transferir el volumen total, incluyendo cualquier precipitado que se pudo haber formado a la columna de centrifugado RNeasy. Cerrar la columna y centrifugar por 30 segundos a 10,000 rpm. Desechar los residuos recolectados en el tubo de 2 mL que contiene la columna.
16. Añadir 700 μ L de amortiguador RW1 (RNeasy mini kit, Qiagen) a la columna de centrifugado para lavar la membrana de la columna. Cerrar la columna y centrifugar por 30 segundos a 10,000 rpm. Desechar los residuos recolectados en el tubo de 2 mL que contiene la columna.
17. Añadir 500 μ L de amortiguador RPE (RNeasy mini kit, Qiagen) a la columna de centrifugado para lavar la membrana de la columna. Cerrar la columna y centrifugar por 30 segundos a 10,000 rpm. Desechar los residuos recolectados en el tubo de 2 mL que contiene la columna.
18. Añadir 500 μ L de amortiguador RPE (RNeasy mini kit, Qiagen) a la columna de centrifugado para lavar la membrana de la columna. Cerrar la columna y centrifugar por 2 minutos a 10,000 rpm. Desechar los residuos recolectados en el tubo de 2 mL que contiene la columna.
19. Cerrar la columna y centrifugar por 1 minuto a 10,000 rpm para asegurarse de eliminar cualquier residuo de amortiguador RPE (RNeasy mini kit, Qiagen).
20. Colocar la columna de centrifugado en un tubo de 2 mL nuevo. Añadir 30 μ L de agua libre de ARNasas. Cerrar la columna y centrifugar por 1 minuto a 13,000 rpm para eluir el ARN.

6.7 ANÁLISIS DE LA CALIDAD DEL ARN

Cuantificación de ARN por espectrofotómetro (DS-11, DeNovix, NanoDrop™).

1. Colocar 1 μL de ARN sobre el espectrofotómetro y medir la muestra.

Nota: La relación 260/280 nm debe de ser mayor o igual a 1.8.

Gel de agarosa al 1.5%.

1. Pesar 0.6 g de agarosa y disolverlos en 40 mL de amortiguador TAE 1X.
2. Calentar la mezcla contenida en un matraz, en un horno de microondas dando pulsos de 20 segundos hasta lograr una mezcla homogénea. NOTA: Evitar ebullición.
3. Añadir 0.5 μL de bromuro de etidio a la mezcla antes preparada.
4. Vaciar la mezcla en una bandeja (evitar hacer burbujas) y colocar un peine en uno de los extremos.
5. Dejar enfriar hasta la polimerización del gel.
6. Colocar el gel en la cámara de corrida, retirar el peine cuidadosamente.
7. Colocar 1 μg de ARN en cada pozo con 3 μL de amortiguador de carga.
8. Correr el gel por 90 minutos a 70 volts constantes.
9. Retirar el gel y observarlo en un transiluminador de luz ultravioleta a 250 nm de longitud de onda.

6.8 VALIDACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Preparación de ADNc.

1. Preparar 1 μg de ARN, 1 μL de dNTPs 10 μM , 1 μL de oligo dT y colocar el volumen restante de agua libre de ARNasas para obtener un volumen final de 15 μL .
2. Colocar las muestras en una termocicladora Axygen®, modelo MaxyGene Gradient, catálogo THERM-1000 por 5 minutos a 65°C.

3. Colocar las muestras en hielo por 5 minutos.
4. Añadir 4 μL de amortiguador RT, 0.5 μL de inhibidor de ARNasas (Ribulock™) y 0.5 μL de enzima retrotranscriptasa (RT).
5. Colocar las muestras en una termocicladora Axygen®, modelo MaxyGene Gradient, catálogo THERM-1000 por 30 minutos a 50 °C y 5 minutos a 85°C.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1. Preparar una mezcla con 2.5 μL de amortiguador $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10X, 2.5 μL de cloruro de magnesio (MgCl_2), 0.5 μL de dNTPs, 0.5 μL de oligo sentido (forward), 0.5 μL de oligo antisentido (reverse), 0.25 μL de enzima *Taq* polimerasa, 17.25 μL de agua libre de ARNasas y ADNasas y 1 μL de ADNc. Volumen final 25 μL .
2. Colocar las muestras en una termocicladora Axygen®, modelo MaxyGene Gradient, catálogo THERM-1000 con las siguientes condiciones: 35 ciclos, 4 minutos a 95°C, 1 minuto a 95°C, 1 minuto a la temperatura a la que alinean los oligonucleótidos (en caso de no saber la temperatura, se debe de establecer un gradiente de al menos tres temperaturas), 1 minuto a 72°C, 10 minutos a 72°C.
3. Colocar las muestras a 4°C.

Gel de agarosa al 1.5%.

1. Pesar 0.6 g de agarosa y disolverlos en 40 mL de amortiguador TAE 1X.
2. Calentar la mezcla contenida en un matraz, en un horno de microondas dando pulsos de 20 segundos hasta lograr una mezcla homogénea. NOTA: Evitar ebullición.
3. Añadir 0.5 μL de bromuro de etidio a la mezcla antes preparada.

4. Vaciar la mezcla en una bandeja (evitar hacer burbujas) y colocar un peine en uno de los extremos.
5. Dejar enfriar hasta la polimerización del gel.
6. Colocar el gel en la cámara de corrida, retirar el peine cuidadosamente.
7. Añadir a cada una de las muestras 5 μ L de amortiguador de carga.
8. Colocar la mezcla bien homogenizada en cada uno de los pozos.
9. Correr el gel por 90 minutos a 70 volts constantes.
10. Retirar el gel y observarlo en un transiluminador de luz ultravioleta a 250 nm de longitud de onda.

6.9 SECUENCIACIÓN CON RNA-SEQ (SERVICIO PROPORCIONADO POR LA UUSMB)

1. A partir del ARN total ≥ 1 μ g y con un valor de integridad del ARN (RIN) mayor o igual a 7, realizar un enriquecimiento de ARN mensajero (ARNm) mediante la captura de ARN poliadenilado ("cola de poli-A").
2. Preparar las librerías de ADNc y fragmentar mediante métodos mecánicos.
3. Realizar una selección de fragmentos por tamaño, usualmente de entre de 200-1,000 nucleótidos y secuenciar. Nota: A las secuencias cortas que se obtienen a partir de estos fragmentos de ADNc se les conoce como lecturas ("reads").

6.10 ANÁLISIS DE DATOS DE RNA-Seq

1. Realizar un análisis de control de calidad de los archivos de las secuencias que se obtuvieron de la secuenciación del ARN de las muestras. En este paso se comprueba la distribución general de las lecturas, su longitud, la calidad de las bases en cada posición de las

lecturas, la calidad de la secuencia, el contenido de bases por secuencia, el contenido de Guanina-Citosina (GC), el contenido de bases no leídas, la presencia de k -meros, los niveles de duplicados, de secuencias sobrerrepresentadas y la existencia de secuencias de adaptadores utilizados en la secuenciación. Para llevar a cabo dicho análisis se utiliza la herramienta FastQC versión 0.11.7 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

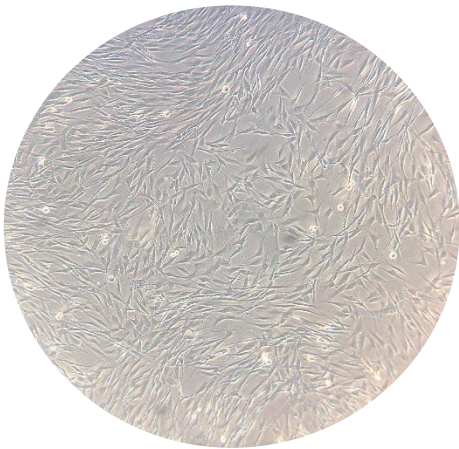
2. Realizar un alineamiento con bowtie2 de las secuencias al genoma de referencia del organismo con el que se trabaja, en este caso *Homo sapiens*.
3. Generar una tabla de conteos de los datos obtenidos del RNA-Seq que se obtienen tras la alineación y el mapeo de las secuencias frente al genoma de referencia.
4. Importar al programa RStudio versión 3.5.1 los datos de conteos, sin normalizar, para visualizar la distribución de los mismos.
5. Realizar un filtrado y eliminar genes con baja expresión, la transformación de los datos se hace de los valores de lecturas a conteos por millón.
6. Normalizar los datos para reducir al mínimo los cambios entre las muestras para la mayoría de los genes.
7. Calcular el coeficiente de variación biológica que hay entre las muestras.
8. Seleccionar los genes que se encuentran diferencialmente expresados, según las condiciones establecidas, en este caso, un $FDR \leq 0.01$ (False Discovery Rate) y $\log FC \geq 1.5$.
9. Obtener los genes que cumplen con las condiciones antes mencionadas y realizar un análisis de validación biológica mediante STRING.

7. RESULTADOS

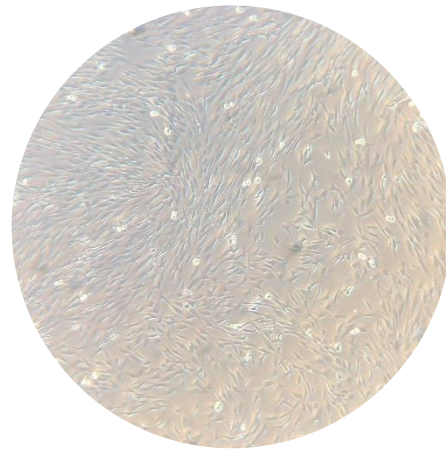
7.1 CULTIVO CELULAR

Como primer análisis se realizaron las biopsias de tres individuos sanos y de dos individuos que presentan mutación en *ATP6V0A2* (pacientes) con la finalidad de obtener fibroblastos de dichas biopsias (Figura 27), los fibroblastos se colocaron en cajas T25 en la incubadora a 37°C, 5% CO₂ con 5 mL de medio Gibco® AmnioMAX™ C-100, suplementado al 10% con Gibco® AmnioMAX™ C-100 Supplement, 1% estreptomina y penicilina. En los cultivos celulares se observó un crecimiento de células grandes, planas, alargadas con numerosas prolongaciones.

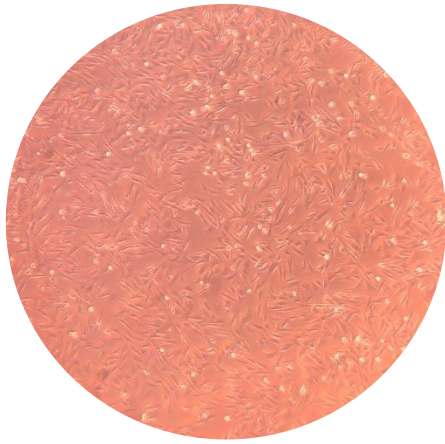
Asimismo se realizó cultivo de células HaCaT (queratinocitos humanos) que se crecieron en medio DMEM-F12 10% SFP, 1% estreptomina y penicilina (Figura 27), en donde se observó un crecimiento de células compactas y granuladas.



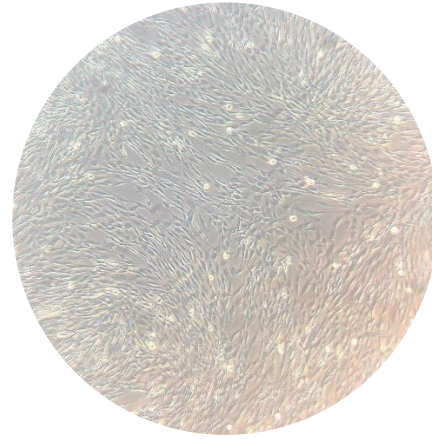
Control 1



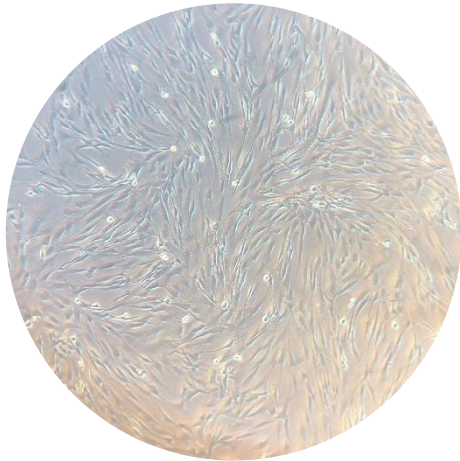
Control 2



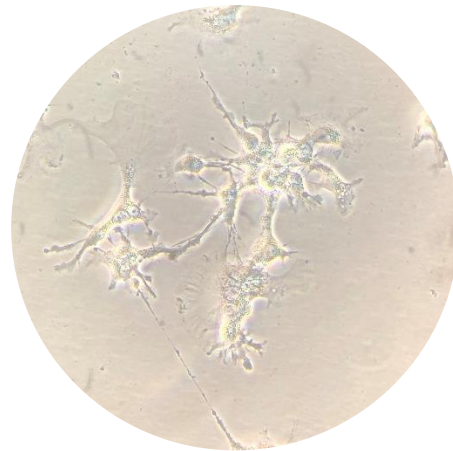
Control 3



Paciente 1



Paciente 2



HaCaT

Figura 27. Microscopía óptica con el objetivo 40X de cultivos celulares de fibroblastos (2 pacientes y 3 individuos sanos) y queratinocitos.

7.2 COMPARATIVO DE MORFOLOGÍA DE FIBROBLASTOS Y QUERATINOCITOS (HaCaT)

Los cultivos celulares de fibroblastos y queratinocitos se estandarizaron al pase 6, con la finalidad de establecer cultivos celulares en donde solamente se tuviera el tipo celular de interés, a partir de dichos cultivos se realizó una comparación morfológica con el propósito de aseverar que en los cultivos de estudio (cultivos de individuos sanos y de pacientes) solamente existía la presencia de fibroblastos (Figura 28). Mediante

microscopía se observó que la forma de los fibroblastos es alargada con prolongaciones, mientras que la forma de los queratinocitos es más compacta y granulosa, por lo que se infiere que los cultivos obtenidos de la biopsia de tres individuos sanos y de dos pacientes son de fibroblastos (Figura 27).

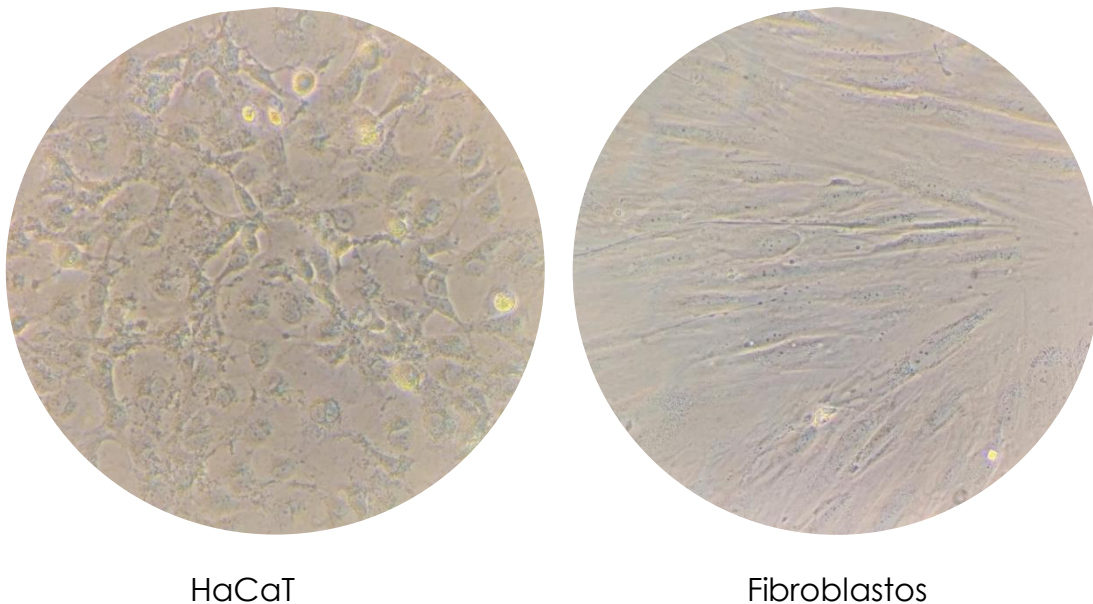


Figura 28. Comparativo morfológico de cultivos de fibroblastos y queratinocitos. Los fibroblastos son células fusiformes con prolongaciones citoplasmáticas que se observan largas y anchas, con un núcleo alojado en la parte central de las células. Los queratinocitos son células de aspecto granular que presentan múltiples prolongaciones citoplasmáticas que se observan cortas y delgadas.

7.3 VALIDACIÓN DE ADNc Y OLIGONUCLEÓTIDOS

Para complementar el estudio comparativo morfológico de los cultivos celulares obtenidos, se realizó una síntesis de ADNc de los individuos de estudio (3 controles y 2 pacientes), así como de las células HaCaT, con dicho ADNc se realizó una PCR de un gen constitutivo (GAPDH) para conocer si la síntesis de ADNc se realizó de manera adecuada, el ADNc posteriormente se utilizó para validar el gen FSP1 (del acrónimo en inglés Fibroblast-specific protein 1), el cual es un marcador para dicho tipo celular, esto con la finalidad de conocer si el cultivo celular obtenido de las

biopsias es únicamente de fibroblastos. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se encuentra en la Tabla 3.

TABLA 3. OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE GENES DE INTERÉS A PARTIR DE PCR.						
Gen	Secuencia de los oligonucleótidos		Longitud (pb)	TM (°C)	%GC	Amplicon
FSP1	F	5'-GTTGATCCTGACTGCTGTCATG -3'	23	62.9	48	134 pb
	R	5'-CAGCAGCTCCTTAGTTCTGAC -3'	22	62.1	50	

Se observó que los cultivos celulares de los individuos sanos y los pacientes muestran la expresión de dicho gen, mientras que las células HaCaT no (Figura 29), lo cual refuerza la aseveración de que los cultivos celulares obtenidos de las biopsias contienen fibroblastos y no queratinocitos.

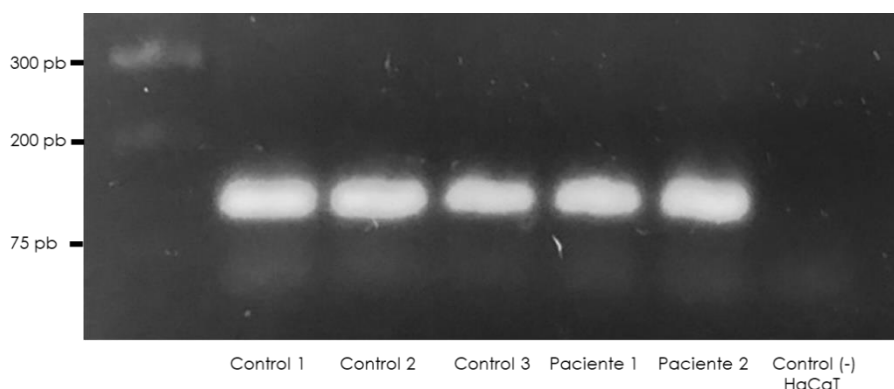


Figura 29. PCR del gen FSP1 en muestras de cultivo celular de 3 individuos sanos, 2 individuos con mutación en *ATP6V0A2* y células HaCaT (queratinocitos).

7.4 EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y MEDICIÓN DE LA CALIDAD DEL ARN

Se realizó la extracción de ARN de las muestras de dos individuos con mutación en *ATP6V0A2* y de tres individuos sanos con el RNeasy mini kit, Qiagen, posteriormente se cuantificó el ARN obtenido por espectrofotómetro (nanodrop) (Tabla 4).

TABLA 4. CUANTIFICACIÓN POR NANODROP DEL ARN OBTENIDO DE LOS CULTIVOS CELULARES DE 3 INDIVIDUOS CONTROLES Y DOS PACIENTES.

Muestra	Concentración	Unidades	Factor	A260	260/280	260/230
Control 1	682.465	ng/uL	40	17.0616	2.02	1.83
Control 2	838.564	ng/uL	40	20.9641	2.04	2.11
Control 3	507.181	ng/uL	40	12.6795	1.99	2.12
Paciente 1	960.775	ng/uL	40	24.0194	2.05	2.15
Paciente 2	1167.45	ng/uL	40	29.1863	1.99	2.14

A continuación para la evaluación de la integridad del ARN (factor crítico previo a la validación de datos de expresión génica) se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (EtBr) para lo cual se tomó 1 µg de ARN de cada una de las muestras. La banda del ARN ribosomal 28S debe de ser aproximadamente dos veces más intensa que la banda del ARN ribosomal 18S, esta relación 2:1 es un indicativo de que el ARN se puede catalogar como íntegro (Figura 30).

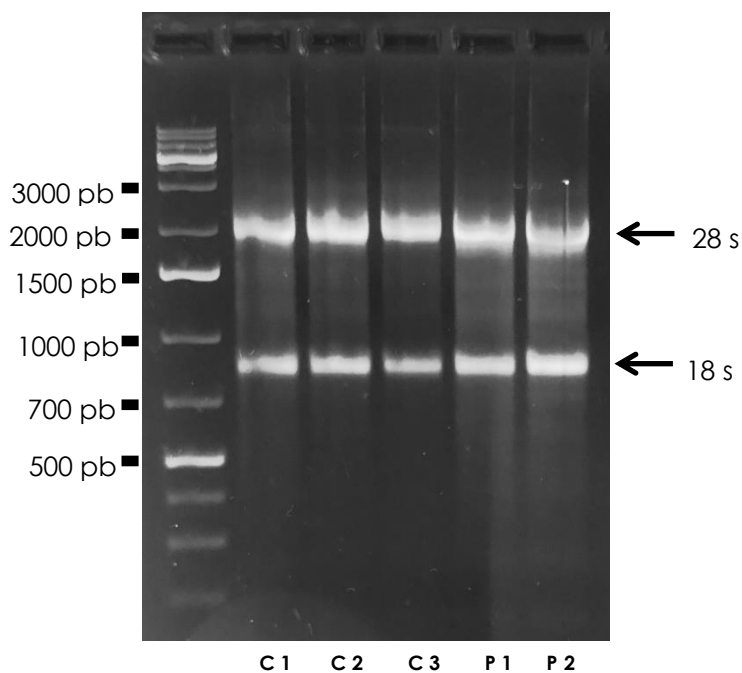


Figura 30. Electroforesis de ARN en gel de agarosa 1.5%. Las dos bandas intensas corresponden a las subunidades mayor y menor del ARN ribosomal y su presencia es signo de un ARN óptimo. Carril 1: control 1, carril 2: control 2, carril 3: control 3, carril 4: paciente 1, carril 5 paciente 2.

Al observar que la integridad del ARN obtenido fue adecuada, se enviaron las muestras para proceder a realizar la secuenciación del ARN, los resultados obtenidos de la cuantificación y calidad del ARN que la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB) reportó se observan en la Figura 31. En los electroferogramas, el primer pico (izquierda) representa al ARN ribosomal 18S, cuyo peso varía según el nivel de degradación del ARN, la longitud de la región entre ambos picos incrementa en el caso de que el ARN estuviera degradado, el segundo pico (derecha) representa al ARN ribosomal 28S, en general, el área bajo la curva del pico del ARN ribosomal 28S debe de ser el doble, o al menos igual al área bajo la curva del ARN ribosomal 18S. El número de integridad del ARN, RIN por sus siglas en inglés "RNA integrity number" permite determinar la integridad del ARN en una escala numérica del 1 al 10, donde 1 es para la muestras completamente degradadas y 10 para un ARN totalmente íntegro. La degradación del ARN se puede observar como un incremento de fragmentos pequeños, así como en una disminución de la intensidad de señal de los ARN ribosomales.

Para las muestras del presente trabajo obtuvimos los RIN que se muestran en la figura 31 por lo que se concluye que el ARN obtenido fue de calidad óptima para continuar con la secuenciación.

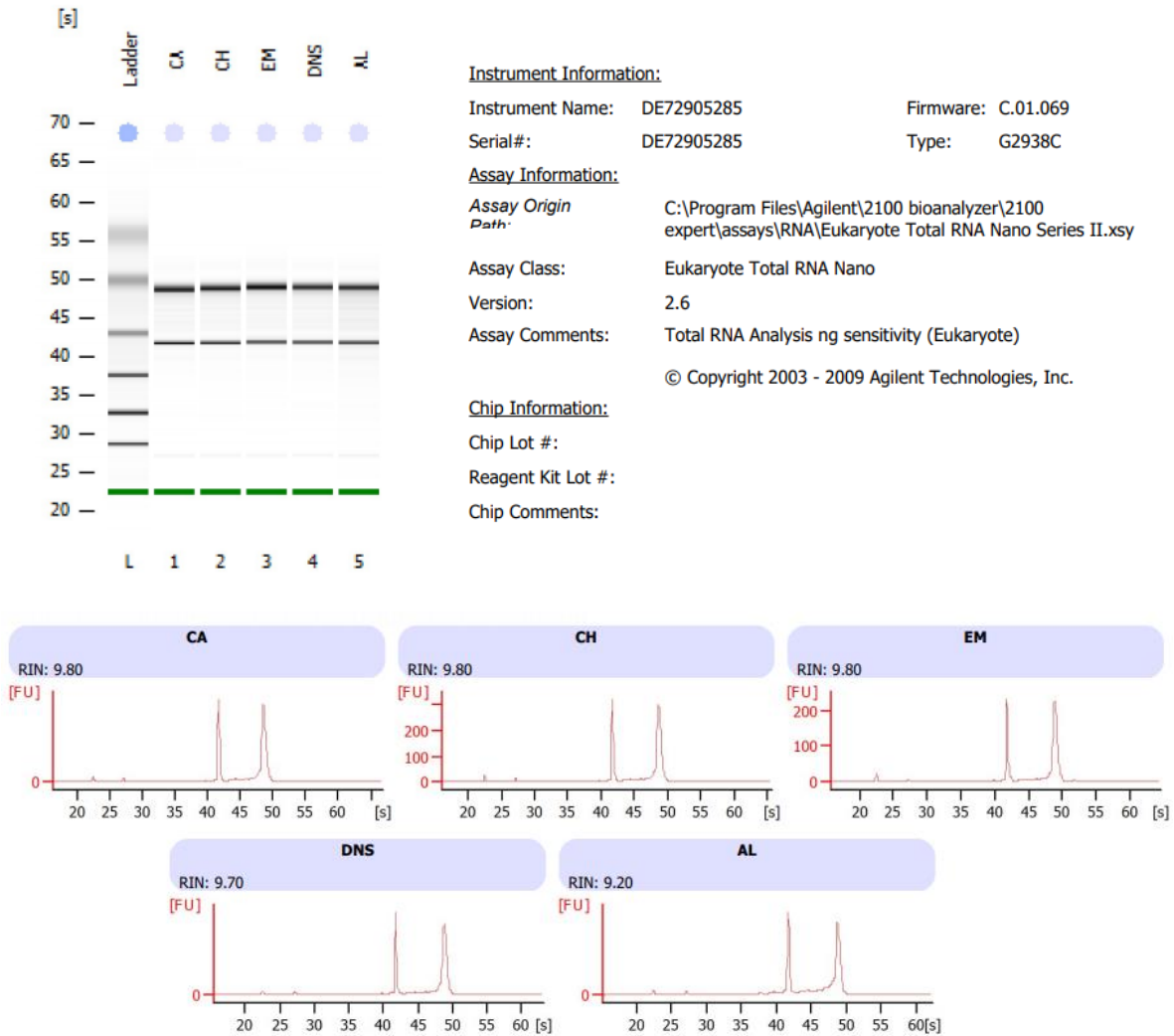


Figura 31. Reporte del análisis de calidad del ARN de 3 individuos sanos y 2 pacientes. Electroferogramas utilizados para determinar el RIN (RNA integrity number) de las muestras de ARN. Un ARN intacto debe de tener RIN 10, cuando un ARN está degradado el RIN es menor a 7.

7.5 ANÁLISIS DE LIBRERÍAS DE RNA-Seq

Para evaluar la expresión diferencial de los transcritos se utilizó el paquete NOISeq de Bioconductor en la plataforma R permite identificar aquellos transcritos expresados diferencialmente mediante una aproximación no paramétrica de los datos de conteo disponibles. NOISeqBIO, computa la expresión diferencial de datos con réplicas, únicamente, biológicas [58].

Este método se basa, en la hipótesis de que cambios en la expresión de un gen entre dos condiciones no necesariamente, deben concluir que dicho gen esté diferencialmente expresado bajo dichas condiciones experimentales. Esto ocurre cuando la magnitud de dicho cambio coincide con los cambios en la expresión de ese gen entre réplicas de una misma condición. Por ello, además de calcular los cambios en la expresión de cada gen entre dos condiciones experimentales, se debe obtener, mediante la comparación de todas las réplicas dentro de la misma condición, la distribución del ruido, es decir, la distribución de los cambios en los valores de expresión de los genes cuando comparamos réplicas de la misma condición. Por esta razón este paquete calcula dos estadísticos de expresión diferencial: M (el logaritmo en base 2 del cociente entre dos condiciones) y D (el valor absoluto de la diferencia entre condiciones) (<https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/NOISeq/inst/doc/NOISeq.pdf>).

El análisis de expresión diferencial se realizó a partir de las tablas de conteos que se obtienen tras la alineación y el mapeo de las secuencias frente al genoma de referencia de *Homo sapiens*.

Las tablas de conteos contienen el número de lecturas que alinean de forma única con los CDS de un gen dado en cada una de las muestras analizadas (3 controles y 2 pacientes), los genes se disponen en filas y las muestras en columnas.

La distribución de los conteos en cada una de las muestras se analizó mediante la generación de diagramas de caja a partir de los correspondientes valores de CPM (Conteos Por Millón) en escala logarítmica base 2 (Figura 32).

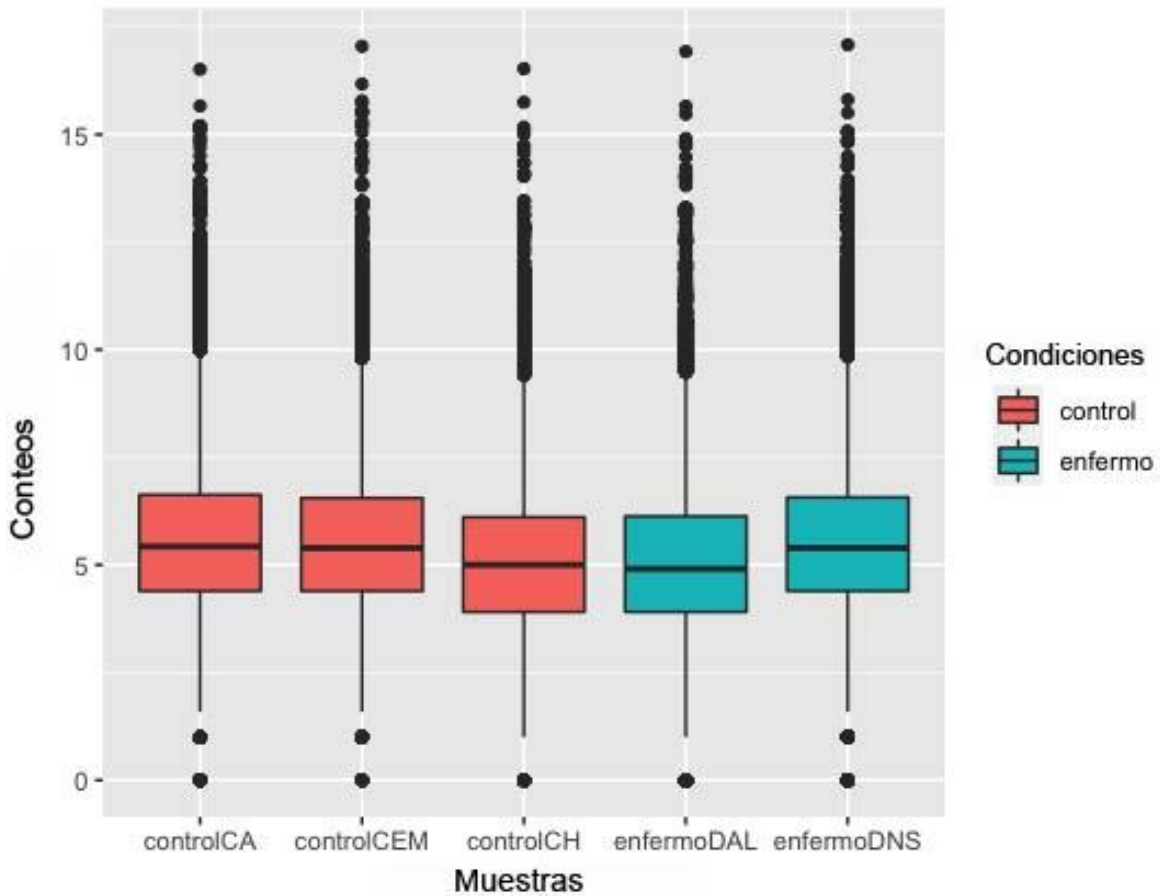


Figura 32. Distribución de los valores de expresión (\log_2 -CPM) de cada una de las muestras para el análisis de expresión diferencial. Diagramas de caja generados a partir de los datos filtrados.

Como se aprecia en la Figura 32, todos los diagramas de caja obtenidos fueron similares, no apreciándose cajas notablemente desplazadas hacia arriba o hacia abajo. Una vez descartada, por el momento, la presencia de muestras problemáticas se continuó con el análisis de los datos.

Posteriormente se realizaron gráficas de densidad, las cuales permitieron visualizar que los individuos sanos y los pacientes presentan igual distribución de lecturas (Figura 33), lo que confirma que se pueden comparar entre sí para realizar el análisis de expresión diferencial (ver tabla anexa: <https://cutt.ly/STC6s5S>).

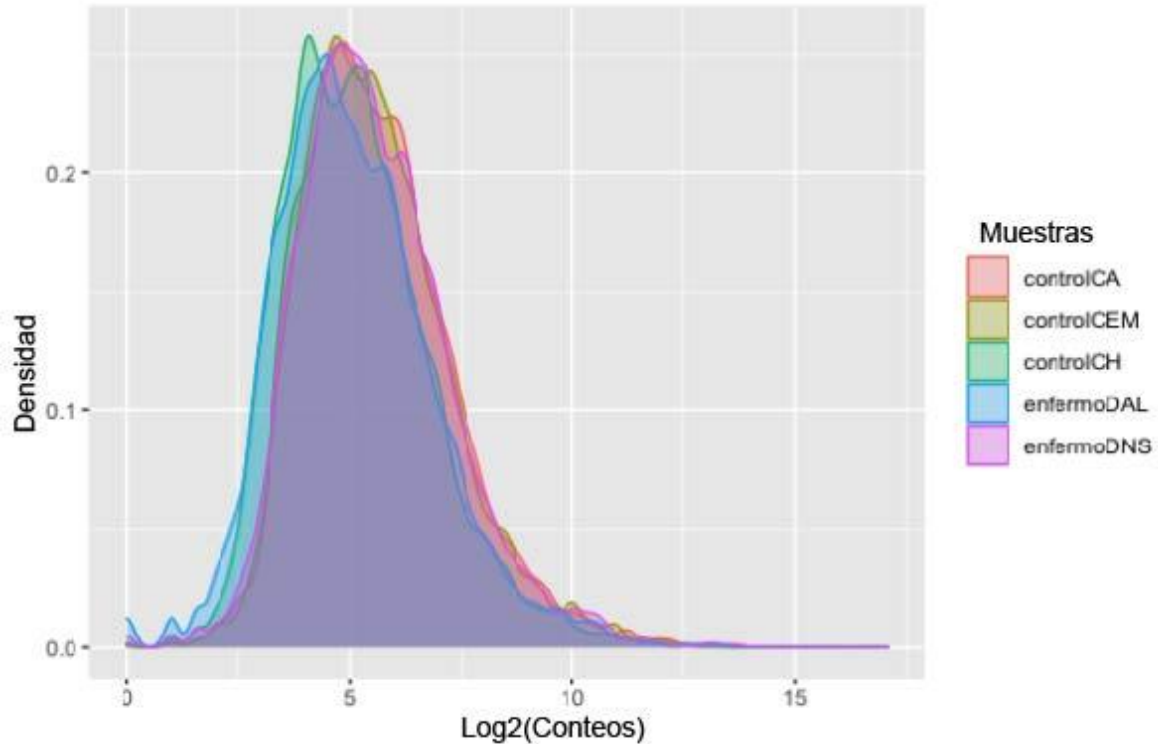


Figura 33. Histograma de la distribución de la expresión génica de muestras de 3 individuos sanos y 2 individuos con mutación en *ATP6V0A2*. Se observa una distribución normal de las lecturas para todas las muestras.

Para la tabla de conteos, se generaron lecturas en un total de 119,511 transcritos, de éstos aproximadamente el 24% no tuvieron lecturas en ninguna de las réplicas biológicas.

Para examinar la relación entre las muestras y detectar expresión diferencial antes de pasar a las pruebas formales, se recurrió a un análisis de escalamiento multidimensional, una técnica que permite analizar visualmente la proximidad entre las muestras.

En el gráfico MDS (del acrónimo en inglés Multidimensional scaling plot of distances), se muestra la distribución de las réplicas biológicas a partir de la normalización de los datos obtenidos (Figura 34), el método utilizado para la normalización fue TMM. Como se evidencia las muestras se separan de acuerdo a la presencia de la mutación, observándose claramente la

separación entre los individuos sanos y los individuos enfermos. El gráfico de igual manera muestra una segunda distribución en el que se observa una separación entre los individuos enfermos debido a que presentan mutaciones en diferentes exones.

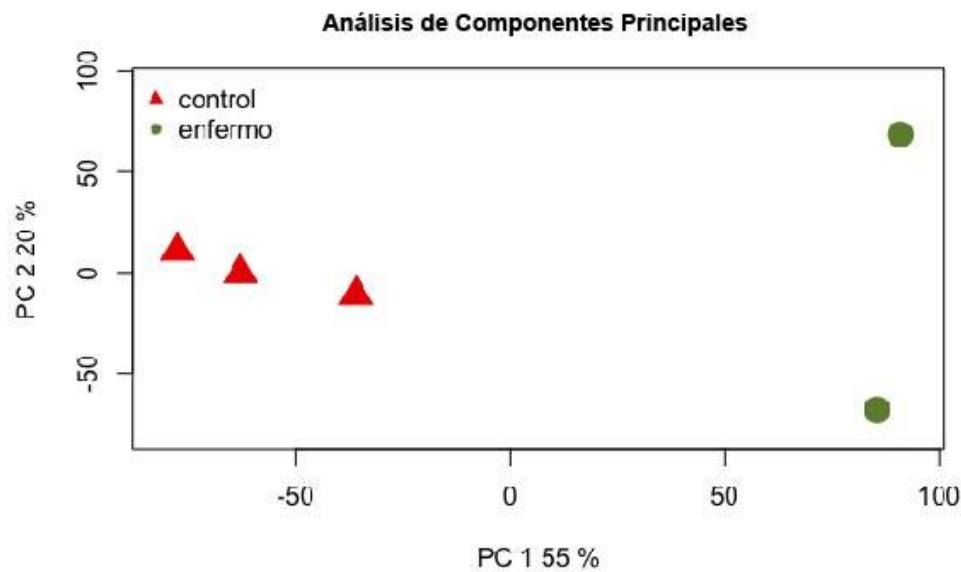


Figura 34. Gráfico PCA de los valores normalizados de las lecturas de 3 individuos sanos (rojo) y 2 individuos con mutación en *ATP6V0A2* (verde). Nótese la separación entre ambos grupos de estudio.

La dispersión común obtenida de las muestras fue de 0.05 y el coeficiente de variación biológica (BCV) entre ellas fue del 22% (Figura 35). La variación biológica entre grupos con respecto a la variación intragrupo nos permite detectar más fácilmente la expresión diferencial de genes. Generalmente se considera óptimo para la detección de genes expresados diferencialmente cuando el valor común del coeficiente de variación biológica se encuentra entre 0.2 y 0.4

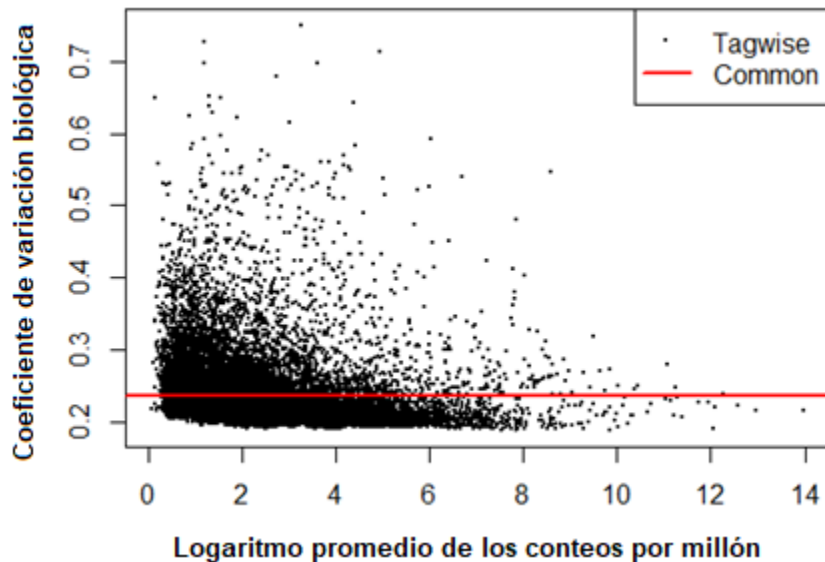


Figura 35. Gráfico BCV para la visualización de las dispersiones estimadas gen a gen a partir de la común (línea roja). Cada punto del gráfico representa un gen.

Posteriormente, se realizó una selección de transcritos, para considerar solamente los que se encontraron diferencialmente expresados, para ello se utilizaron dos parámetros, $FDR \leq 0.01$ y $\log FC \geq 1.5$ si los transcritos se sobre-expresaron en individuos con la mutación en *ATP6V0A2* con respecto al grupo control y $FDR \leq 0.01$ y $\log FC \leq -1.5$ si los transcritos se sub-expresaron en individuos con la mutación en *ATP6V0A2* con respecto al grupo control. Es importante mencionar que debido a la ausencia de muestras en México de pacientes que presenten la mutación en el gen *ATP6V0A2* y al número reducido de réplicas se utilizó NOISEqBIO ya que permite realizar un análisis con pocas réplicas biológicas (<https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/NOISEq/inst/doc/NOISEq.pdf>), y en nuestro caso, estamos trabajando con tres muestras de individuos sanos y dos muestras de individuos enfermos. Lo ideal sería realizar un análisis con al menos tres réplicas biológicas de cada condición para poder tener significancia con peso estadístico y verificar los resultados obtenidos en el presente trabajo; si bien es un análisis exploratorio y de aproximación, consideramos que contribuye al entendimiento de la

patología antes descrita. Con ello se obtuvieron un total de 2,833 transcritos expresados diferencialmente, de los cuales 1,158 transcritos sobre-expresados y 1,675 sub-expresados en pacientes con respecto a los individuos control (Figura 36).

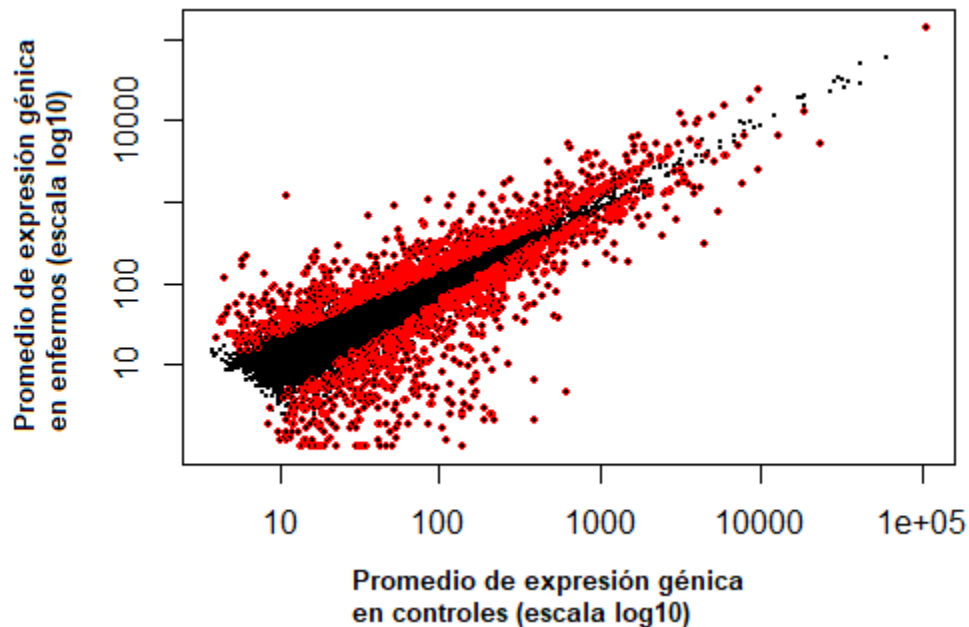


Figura 36. Visualización de los resultados del análisis de expresión génica diferencial realizado en 3 individuos sanos y 2 individuos que presentan mutación en *ATP6V0A2* con el paquete de NOISeqBIO de Bioconductor. Los puntos correspondientes a genes identificados como diferencialmente expresados ($FDR \leq 0.01$) se observan en color rojo.

Las tablas de conteos de los niveles de expresión, contienen 3 datos principales, genes, condiciones y niveles de expresión, para poder visualizar el comportamiento en la expresión en cada una de las muestras, se realizó un mapa de calor (heatmap); el cual es una representación en dos dimensiones de la matriz de conteos, donde las filas representan genes y las columnas condiciones. Cada nivel de expresión se representa como un cuadrado de color en la posición correspondiente a su gen y su condición. El color depende del nivel de expresión, el color azul indica una mayor expresión y el rojo una menor expresión (Figura 37).

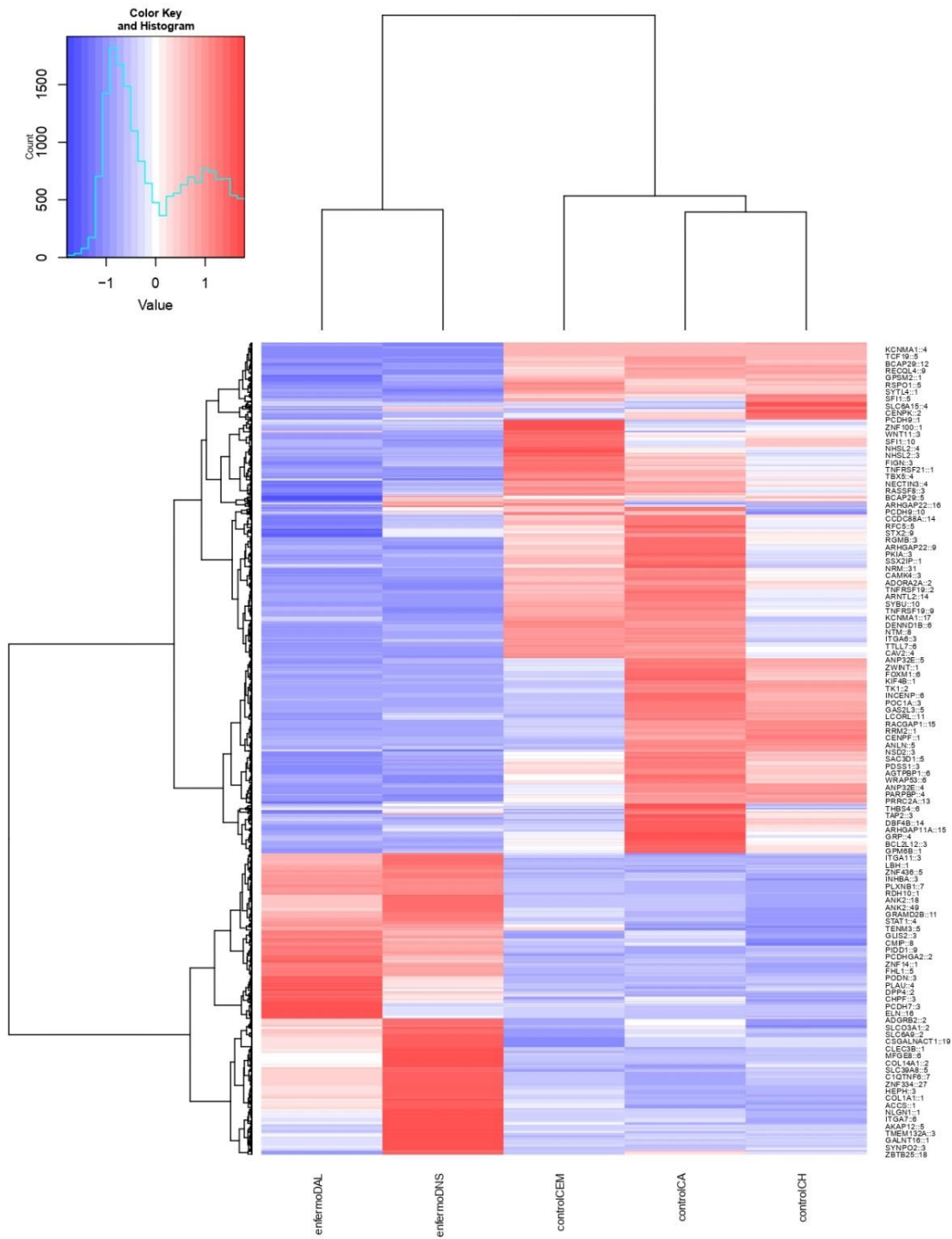


Figura 37. Visualización de la matriz de expresión como un heatmap. El color depende del nivel de expresión, el color azul indica una mayor expresión y el rojo una menor expresión, en las filas se encuentran los genes, en las columnas las condiciones. Columna 1 y 2: pacientes, columnas 3-5: individuos sanos (controles).

Con los transcritos diferencialmente expresados que se obtuvieron del análisis previo, se realizó una tabla de expresión diferencial para cada una de las condiciones (1,158 transcritos sobre-expresados y 1,675 sub-expresados en pacientes con respecto a los individuos control (ver tabla anexa: <https://cutt.ly/1TNz5Qs>).

Con el propósito de detectar los procesos, las funciones o componentes celulares que se encuentran enriquecidos en términos de ontología de genes (GO), se utilizó la base de datos STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) en donde se introdujo la lista completa de genes con su valor asociado de tasa de cambio expresada en logaritmo base 2 (\log_2 fold change) con un $FDR < 0.01$; para la ontología "procesos biológicos" se obtuvieron 183 asociados a organización de la matriz extracelular con un valor de enriquecimiento de 0.669609 y un valor de FDR de 6.68×10^{-10} , de los cuales 110 genes se encuentran sub-expresados y 73 genes se encuentran sobre-expresados, así mismo dentro de la misma ontología se obtuvieron 37 genes asociados a procesos catabólicos de los glicosaminoglicanos con un valor de enriquecimiento de 0.98225 y un valor de FDR de 0.0085, de los cuales 27 genes se encuentran sub-expresados y 10 genes se encuentran sobre-expresados; para la ontología "función molecular" se obtuvieron 58 genes asociados a componentes estructurales de la matriz extracelular con un valor de enriquecimiento de 1.0902 y un valor de FDR de 4.36×10^{-7} , de los cuales 41 genes se encuentran sub-expresados y 17 genes se encuentran sobre-expresados, así mismo, se obtuvieron 99 genes asociados a funciones de unión a glicosaminoglicanos con un valor de enriquecimiento de 0.781813 y un valor de FDR de 6.54×10^{-7} , de los cuales 70 genes se encuentran sub-expresados y 29 genes se encuentran sobre-expresados; para la ontología "Vías metabólicas (KEGG)" se obtuvieron 41 genes asociados a la interacción de la MEC-receptores con un valor de enriquecimiento de 0.68285 y un valor de FDR

de 0.009, de los cuales 21 genes se encuentran sub-expresados y 20 genes se encuentran sobre-expresados; para la ontología "compartimentos de localización subcelular" se obtuvieron 88 genes asociados al complejo de ATPasa con un valor de enriquecimiento de 0.366929 y un valor de FDR de 0.0033, de los cuales 26 genes se encuentran sub-expresados y 62 genes se encuentran sobre-expresados, así mismo se obtuvieron 140 genes asociados a matriz extracelular con un valor de enriquecimiento de 1.00519 y un valor de FDR de 2.63×10^{-10} , de los cuales 96 genes se encuentran sub-expresados y 44 genes se encuentran sobre-expresados y por último se obtuvieron 7 genes asociados a fibras elásticas con un valor de enriquecimiento de 2.34724 y con un valor de FDR de 0.0023, de los cuales en su totalidad están sub-expresados (ver tablas anexas: <https://cutt.ly/STNbB0f>).

De los genes que se encuentran enriquecidos en las distintas ontologías se observan genes que se encuentran sobre-expresados en pacientes con respecto al grupo control, como la elastina (ELN), la cual es esencial en la formación de las fibras elásticas de la MEC, asimismo genes asociados a la formación de microfibrillas (FBLN1, FBN2, MFAP4, MFAP5) que sirven de andamio para la formación de las fibras elásticas, además genes que codifican para colágenos (COL1A1, COL12A1, COL14A1, COL4A2, COL5A1), dicha familia de proteínas son el componente principal de la MEC, están encargados de formar fibras, mallas o establecer puentes de unión entre moléculas de la MEC y el mismo colágeno. De igual forma hay proteínas que están involucradas de manera directa en el ensamblaje de la MEC, como es el caso de las lisil oxidasas (LOX) que son importantes para la reticulación de colágenos y elastina, para formar la estructura de la MEC; algunos otros implicados en la formación, modificación o escisión de GAG y/o proteoglicanos (ADAMTS5, BGN, CCDC80, CSGALNACT1, FMOD, HSPG2, SULF1) todos ellos componentes de la MEC; del mismo modo, se

obtuvieron dentro de esta red de proteínas a las integrinas (ITGA7, ITGA11), que sabemos juegan un papel esencial en la adhesión de la MEC con las células que rodea y que permiten modificar el comportamiento celular en función de las moléculas presentes en la MEC ya que actúan como receptores (Tabla 5).

La desregulación de múltiples vías asociadas a defectos en la formación de fibras de la MEC, seguramente contribuyen a la patología celular con un fenotipo clínico tan diverso como el que presentan los pacientes, en donde la mayoría de las afectaciones clínicas están asociadas en menor o mayor medida a problemas en la MEC. La MEC es un sistema integrado muy complejo, responsable de las propiedades mecánicas del tejido conectivo; los diferentes constituyentes de la matriz interaccionan unos con otros y cualquier variación de uno de ellos puede derivar en una desorganización de la MEC y en el desarrollo de diferentes patologías, como es el caso de la cutis laxa presente en los pacientes con mutación en *ATP6V0A2*.

Gen	Proteína	Descripción	LogFC	OMIM
ADAMTS5	Agrecanasa 2	Enzima de degradación de la MEC que muestra actividad proteolítica de los proteoglicanos de condroitín sulfato que incluyen agrecano, versicano, brevicano y neurocano.	3.27	605007
AGRN	Agrina	Proteoglicano extracelular, desempeña un papel fundamental en la estructura y función de la unión neuromuscular.	1.65	103320
BGN	Biglicano	Proteoglicano rico en leucina, es un componente estructural importante del cartílago articular y participa en el ensamblaje de la MEC de condrocitos a través de la formación de interacciones de proteínas con colágeno tipo VI y grandes agregados de proteoglicanos.	1.64	301870
BMP1	Proteína morfogenética ósea-1	Conjunto de citocinas con efectos pleiotrópicos que pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta. Es capaz de inducir la formación de cartílago.	1.73	112264
CCDC80	Coiled-coil domain-containing protein 80	Promueve la adhesión celular y el ensamblaje de la MEC.	3.03	608298
COL12A1	Colágeno tipo XII, cadena alfa 1	Pertenece a la familia de colágenos asociados a fibrillas con una triple hélice interrumpida (FACIT). Desencadena vías de señalización para regular la migración e invasión celular, inflamación y crecimiento tumoral.	2.19	120320
COL14A1	Colágeno tipo XIV, cadena alfa 1	Pertenece a la familia de colágenos asociados a fibrillas con una triple hélice interrumpida (FACIT). Regula las primeras etapas de la fibrillogénesis en los tejidos conectivos de alta demanda mecánica.	2.33	120324
COL1A1	Colágeno tipo I, cadena alfa 1	Colágeno formador de fibrillas, es abundante en huesos, córneas, dermis y tendones.	1.96	120150
COL4A2	Colágeno tipo IV, cadena alfa 2	El colágeno tipo IV se asocia con laminina, entactina (nidógeno-1) y proteoglicanos de heparán sulfato para formar las membranas basales en forma de láminas que separan el epitelio del tejido conectivo.	1.65	120090
COL5A1	Colágeno tipo V, cadena alfa 1	Desempeña un papel fundamental en el control de la fibrillogénesis, tiene sitios de adhesión celular y de unión a heparina que podrían ser cruciales en procesos fisiológicos como el desarrollo y la curación de heridas.	1.78	120215
CSGALNACT1	Condroitín sulfato N-acetilgalactosaminiltransferasa-1	Transfiere GalNAc al tetrasacárido común y a las cadenas de condroitín sulfato en el proceso de alargamiento de cadena en los proteoglicanos.	1.59	616615

Gen	Proteína	Descripción	Log FC	OMIM
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo	Proteína de la MEC, rica en cisteína. Se ha implicado en procesos biológicos como la angiogénesis, la condrogénesis y la osteogénesis.	2.02	121009
CYP1B1	Citocromo P450, subfamilia 1, polipéptido 1	Juega un papel importante en el metabolismo oxidativo de los xenobióticos, particularmente la bioactivación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Metaboliza sustratos de origen endógeno como es el caso de los ácidos grasos, hormonas esteroides y vitaminas.	2.73	601771
ELN	Tropoelastina	Componente esencial de las fibras elásticas de la matriz extracelular de tejidos específicos que experimentan estiramiento continuo (pulmones, arterias, piel, ligamentos, entre otros).	3.10	130160
FBLN1	Fibulina 1	Glicoproteína que se encuentra en asociación con estructuras de matriz extracelular que incluyen fibras que contienen fibronectina, elastina y entactina (nidógeno-1). Desempeña un papel en la adhesión celular y la migración a lo largo de las fibras de proteínas dentro de la matriz extracelular.	1.58	135820
FBN2	Fibrilina 2	Componente estructural de microfibrillas que se producen en asociación con elastina. Las microfibrillas que contienen fibrilina-2 regulan el proceso temprano del ensamblaje de fibras elásticas.	3.62	612570
FMOD	Fibromodulina	Pertenece al grupo de proteoglicanos intersticiales que incluyen a la decorina, biglicano y lumicano. Participa en el ensamblaje de la MEC por su capacidad de interactuar con las fibrillas de colágeno.	2.28	600245
HSPG2	Perlecan	Se une a diversas proteínas de la membrana basal, como colágeno IV, laminina-1, integrina β -1 y el α -dístroglicano.	1.57	142461
ITGA7	Integrina, subunidad alfa 7	Las integrinas son glicoproteínas heterodiméricas de membrana que regulan un amplio espectro de interacciones célula-célula y célula-matriz. Particularmente es un receptor celular específico para las proteínas laminina-1, -2 y -5.	2.15	600536
ITGA11	Integrina, subunidad alfa 11	Las integrinas son glicoproteínas heterodiméricas de membrana que regulan un amplio espectro de interacciones célula-célula y célula-matriz. Se une al colágeno.	2.78	604789

TABLA 5. GENES ASOCIADOS A LA COMPOSICIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN INDIVIDUOS CON MUTACIÓN EN ATP6V0A2.				
Gen	Proteína	Descripción	LogFC	OMIM
LAMA2	Subunidad alfa-2 de laminina	Regula la unión, migración y organización de las células en los tejidos durante el desarrollo embrionario al interactuar con otros componentes de la matriz extracelular.	1.70	156225
LOX	Lisil oxidasa	Es una enzima dependiente de cobre que inicia la reticulación de colágenos y elastina, lo hace catalizando la desaminación oxidativa del grupo épsilon-amino en ciertos residuos de lisina e hidroxilisina de colágenos y residuos de lisina de elastina.	1.89	153455
MFAP4	Proteína 4, asociada a microfibrillas	Componente estructural de microfibrillas que contienen fibrilina. Desempeña un papel importante en el ensamblaje y mantenimiento de las fibras elásticas.	1.85	600596
MFAP5	Proteína 5, asociada a microfibrillas	Componente estructural de microfibrillas que contienen fibrilina. Desempeña un papel importante en la matriz extracelular por sus interacciones con diferentes componentes microfibrilares como la fibrilina-1, fibrilina-2 y la tropoelastina.	6.77	601103
OLFML2A	Proteína 2A similar a la olfactomedina	Glicoproteína que participa en el desarrollo y la organización funcional del sistema nervioso y la retina.	1.97	615899
POSTN	Periostina	Funciona como un ligando para las integrinas alfa-V / beta-3 y alfa-V / beta-5 para apoyar la adhesión y la migración de las células epiteliales.	1.54	608777
SPARC	Proteína secretada ácida y rica en cisteína	Proteína asociada a la matriz que provoca cambios en la forma celular, inhibe la progresión del ciclo celular e influye en la síntesis de la MEC, es necesaria para que el colágeno en los huesos calcifique.	2.1	182120
SULF1	Sulfatasa 1	Elimina selectivamente los grupos 6-O-sulfato del heparán sulfato, esta actividad modula los efectos del heparán sulfato al alterar los sitios de unión para las moléculas de señalización.	4.27	610012

Tabla 5. Los valores LogFC representan la tasa de cambio expresada en logaritmo base 2 en comparación con los niveles de ARNm medidos en las células de control.

8. DISCUSIÓN

Con el incremento en el uso de las tecnologías de secuenciación masiva se hace necesario utilizarlas para contribuir al algoritmo diagnóstico de los desórdenes congénitos de la glicosilación, así como para entender mejor la relación genotipo-fenotipo de los pacientes que presentan estas enfermedades. Hasta la fecha el estudio de pacientes que presentan mutaciones en genes asociados a la glicosilación en la mayoría de los casos se acota a un diagnóstico clínico y un tratamiento correctivo en el mejor de los casos, sin embargo es de suma importancia continuar realizando estudios sobre el genoma de los pacientes con la finalidad de entender mejor los procesos patológicos por los que atraviesan.

Si bien las NGS se han utilizado para la búsqueda de genes afectados en los CDG [60], por primera vez se utilizó el RNA-Seq para obtener información sobre los genes involucrados en la patología *ATP6V0A2*-CDG y cómo se comportan respecto a individuos sanos, contribuyendo a un mejor entendimiento de la enfermedad.

El diagnóstico y comprensión de los CDG representa un desafío en la actualidad, aun en presencia de herramientas metodológicas como el RNA-Seq utilizado en el presente trabajo, en ese sentido, se busca generar nueva información que propicie una mejora diagnóstica para estas patologías metabólicas hereditarias.

9. CONCLUSIONES

1) Se obtuvieron un total de 2,833 transcritos expresados diferencialmente, 1,158 transcritos que se expresan más en individuos con la mutación en *ATP6V0A2* con respecto a los sanos y 1,675 que se expresan menos en individuos con la mutación en *ATP6V0A2* con respecto a los sanos.

2) De los 1,158 transcritos sobre-expresados en individuos con la mutación, se obtuvieron genes asociados a la composición y organización de la MEC mismos que no se encontraron en sanos (Tabla 5).

3) De los genes sobre-expresados en pacientes con respecto al grupo control que se encuentran asociados a la composición y organización de la MEC, hay genes particularmente esenciales en la formación de las fibras elásticas como los colágenos (*COL1A1*, *COL12A1*, *COL14A1*, *COL4A2*, *COL5A1*), la elastina (*ELN*), la fibulina-1 (*FBLN1*), la fibrilina-2 (*FBN2*) y las proteínas asociadas a microfibrillas (*MFAP4*, *MFAP5*), la alteración de ellos sugiere una contribución al fenotipo clínico que presentan los pacientes, debido a que las fibras elásticas son indispensables para mantener la elasticidad de los tejidos.

4) Dentro de los genes sobre-expresados en pacientes con respecto al grupo control, se encuentran las integrinas 7 y 11 (*ITGA7*, *ITGA11*) y la laminina-2 (*LAMA2*) que funcionan para regular la interacción de las células con la matriz extracelular, la cual es esencial para el desarrollo de los tejidos, así como para su remodelación, la alteración de ellos sugiere una posible interacción defectuosa de las células con la matriz extracelular, dicha interacción es esencial para el ensamblaje de proteínas de la MEC.

5) En conjunto, estos resultados sugieren que la desregulación de los genes implicados en el ensamblaje y la organización de la MEC contribuyen al

fenotipo clínico que presentan los pacientes, ya que la mayoría de las afectaciones que muestran son relacionadas a una defectuosa matriz extracelular en diversos tejidos.

10. PERSPECTIVAS

- 1) Realizar PCR en tiempo real para validar los genes que se encontraron sobre-expresados en pacientes con respecto al grupo control.
- 2) Realizar un análisis proteómico de los pacientes para tener una representación completa de la patología.
- 3) Realizar un estudio de los genes involucrados en la formación o modificación de los GAG y proteoglicanos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Morava E, Rahman S, Peters V, Baumgartner MR, Patterson M, Zschocke J. "Quo vadis: the re-definition of 'inborn metabolic diseases,'" *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 38, no. 6, pp. 1003–1006, 2015.
- [2] OMS. "Unidos para combatir las enfermedades raras". *Boletín de la Organización Mundial de la Salud*. 2012;90(6):471-476. <http://www.who.int/bulletin/volumes/90/6/12-020612/>
- [3] Bahena-Bahena D, López-Valdez J, Raymond K, Salinas-Marín R, Ortega-García A, Ng BG, Freeze HH, Ruíz-García M, Martínez-Duncker I. "ATP6V0A2 mutations present in two Mexican Mestizo children with an autosomal recessive cutis laxa syndrome type IIA". *Mol. Genet. Metab. Reports*. 2014 Apr 25;1:203-212.
- [4] Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. "Essentials of Glycobiology". 3rd edition. *Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 2015-2017.
- [5] Schachter H. and Freeze H. H., "Glycosylation diseases: Quo vadis?," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, 2009 Sep;1792(9):925-30.
- [6] D. C. Pérez-Cerdá, D. M. Girós, D. M. Serrano, and B. Dueñas Perez, "Trastornos de la glicosilación," *AECOM*, pp. 13–27, 2015.
- [7] Zhang X., Wang Y. and Arbor A., "Glycosylation quality control by the Golgi structure," *J. Mol. Biol.*, 2016 Aug 14;428(16):3183-3193.
- [8] Wopereis S, Grünewald S, Huijben KM, Morava E, Mollicone R, van Engelen BG, Lefeber DJ, Wevers RA. "Transferrin and apolipoprotein C-III isofocusing are complementary in the diagnosis of N- and O-glycan biosynthesis defects". *Clin Chem*. 2007 Feb;53(2):180-7.
- [9] Morales MA, Ramírez DSM, Mena CCA, et al. Síndrome de cutis laxa. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*. 2011;9(1):29-34.
- [10] J.H. Kristensen, J. Thorlacius-Ussing, S.R. Rønnow, M.A. Karsdal, "Chapter 30 - Elastin", *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin (Second Edition)*, Academic Press, 2019, pages 265-273.
- [11] Stephen E. McGowan, "Chapter 4 - The Formation of Pulmonary Alveoli", *The Lung (Second Edition)*, Academic Press, 2014, pages 65-84.
- [12] Hibino M, Sakai Y, Kato W, Tanaka K, Tajima K, Yokoyama T, Iwasa M,

Morisaki H, Tsuzuki T, Usui A. "Ascending Aortic Aneurysm in a Child With Fibulin-4 Deficiency". *Ann Thorac Surg*. 2018 Feb;105(2):e59-e61.

- [13] Tomasovic A, Kurrle N, Wempe F, De-Zolt S, Scheibe S, Koli K, Serchinger M, Schnütgen F, Sürün D, Sterner-Kock A, Weissmann N, von Melchner H. "Ltbp4 regulates Pdgfr β expression via TGF β -dependent modulation of Nrf2 transcription factor function". *Matrix Biol*. 2017 May;59:109-120.
- [14] Morava E, Guillard M, Lefeber DJ, Wevers RA. "Autosomal recessive cutis laxa syndrome revisited". *Eur J Hum Genet*. 2009 Sep;17(9):1099-110.
- [15] Morava E, Wopereis S, Coucke P, Gillessen-Kaesbach G, Voit T, Smeitink J, Wevers R, Grünewald S. "Defective protein glycosylation in patients with cutis laxa syndrome". *Eur J Hum Genet*. 2005 Apr;13(4):414-21.
- [16] Reversade B, Escande-Beillard N, Dimopoulou A, Fischer B, Chng SC, Li Y, Shboul M, Tham PY, Kayserili H, Al-Gazali L, Shahwan M, Brancati F, Lee H, O'Connor BD, Schmidt-von Kegler M, Merriman B, Nelson SF, Masri A, Alkazaleh F, Guerra D, Ferrari P, Nanda A, Rajab A, Markie D, Gray M, Nelson J, Grix A, Sommer A, Savarirayan R, Janecke AR, Steichen E, Sillence D, Hausser I, Budde B, Nürnberg G, Nürnberg P, Seemann P, Kunkel D, Zambruno G, Dallapiccola B, Schuelke M, Robertson S, Hamamy H, Wollnik B, Van Maldergem L, Mundlos S, Kornak U. Mutations in PYCR1 cause cutis laxa with progeroid features. *Nat Genet*. 2009 Sep;41(9):1016-21.
- [17] Van Damme T, Gardeitchik T, Mohamed M, Guerrero-Castillo S, Freisinger P, Guillemyn B, Kariminejad A, Dalloyaux D, van Kraaij S, Lefeber DJ, Syx D, Steyaert W, De Rycke R, Hoischen A, Kamsteeg EJ, Wong SY, van Scherpenzeel M, Jamali P, Brandt U, Nijtmans L, Korenke GC, Chung BHY, Mak CCY, Hausser I, Kornak U, Fischer-Zirnsak B, Strom TM, Meitinger T, Alanay Y, Utine GE, Leung PKC, Ghaderi-Sohi S, Coucke P, Symoens S, De Paepe A, Thiel C, Haack TB, Malfait F, Morava E, Callewaert B, Wevers RA. Mutations in ATP6V1E1 or ATP6V1A Cause Autosomal-Recessive Cutis Laxa. *Am J Hum Genet*. 2017 Feb 2;100(2):216-227. Epub 2017 Jan 5. Erratum in: *Am J Hum Genet*. 2020 Aug 6;107(2):374.
- [18] Kivuva EC, Parker MJ, Cohen MC, Wagner BE, Sobey G. "De Barsy syndrome: a review of the phenotype". *Clin Dysmorphol*. 2008 Apr;17(2):99-107.
- [19] Nozaki F, Kusunoki T, Okamoto N, Yamamoto Y, Miya F, Tsunoda T,

- Kosaki K, Kumada T, Shibata M, Fujii T. "ALDH18A1-related cutis laxa syndrome with cyclic vomiting". *Brain Dev.* 2016 Aug;38(7):678-84.
- [20] Migocka M. "Copper-transporting ATPases: The evolutionarily conserved machineries for balancing copper in living systems". *IUBMB Life.* 2015 Oct;67(10):737-45.
- [21] Berk DR, Bentley DD, Bayliss SJ, Lind A, Urban Z. "Cutis laxa: a review". *J Am Acad Dermatol.* 2012 May;66(5):842.e1-17.
- [22] McVie-Wylie AJ, Lamson DR, Chen YT. "Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility". *Genomics.* 2001 Feb 15;72(1):113-7.
- [23] Lee YC, Huang HY, Chang CJ, Cheng CH, Chen YT. "Mitochondrial GLUT10 facilitates dehydroascorbic acid import and protects cells against oxidative stress: mechanistic insight into arterial tortuosity syndrome". *Hum Mol Genet.* 2010 Oct 1;19(19):3721-33.
- [24] Kornak U, Reynders E, Dimopoulou A, van Reeuwijk J, Fischer B, Rajab A, Budde B, Nürnberg P, Foulquier F; ARCL Debré-type Study Group, Lefeber D, Urban Z, Gruenewald S, Annaert W, Brunner HG, van Bokhoven H, Wevers R, Morava E, Matthijs G, Van Maldergem L, Mundlos S. "Impaired glycosylation and cutis laxa caused by mutations in the vesicular H⁺-ATPase subunit ATP6V0A2". *Nat Genet.* 2008 Jan;40(1):32-4.
- [25] Fischer B, Dimopoulou A, Egerer J, Gardeitchik T, Kidd A, Jost D, Kayserili H, Alanay Y, Tantcheva-Poor I, Mangold E, Daumer-Haas C, Phadke S, Peirano RI, Heusel J, Desphande C, Gupta N, Nanda A, Felix E, Berry-Kravis E, Kabra M, Wevers RA, van Maldergem L, Mundlos S, Morava E, Kornak U. "Further characterization of ATP6V0A2-related autosomal recessive cutis laxa". *Hum Genet.* 2012 Nov;131(11):1761-73.
- [26] Guillard M, Dimopoulou A, Fischer B, Morava E, Lefeber DJ, Kornak U, Wevers RA. "Vacuolar H⁺-ATPase meets glycosylation in patients with cutis laxa". *Biochim Biophys Acta.* 2009 Sep;1792(9):903-14.
- [27] Kellokumpu S. "Golgi pH, Ion and Redox Homeostasis: How Much Do They Really Matter?" *Front Cell Dev Biol.* 2019 Jun 11;7:93.
- [28] Casey JR, Grinstein S, Orlowski J. "Sensors and regulators of intracellular pH". *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Jan;11(1):50-61.
- [29] Fisher P, Spencer H, Thomas-Oates J, Wood AJ, Ungar D. "Modeling Glycan Processing Reveals Golgi-Enzyme Homeostasis upon Trafficking

- Defects and Cellular Differentiation". *Cell Rep.* 2019 Apr 23;27(4):1231-1243.e6.
- [30] Axelsson MA, Karlsson NG, Steel DM, Ouwendijk J, Nilsson T, Hansson GC. "Neutralization of pH in the Golgi apparatus causes redistribution of glycosyltransferases and changes in the O-glycosylation of mucins". *Glycobiology.* 2001 Aug;11(8):633-44.
- [31] Rivinoja A, Kokkonen N, Kellokumpu I, Kellokumpu S. "Elevated Golgi pH in breast and colorectal cancer cells correlates with the expression of oncofetal carbohydrate T-antigen". *J Cell Physiol.* 2006 Jul;208(1):167-74.
- [32] Huchtagowder V, Morava E, Kornak U, Lefeber DJ, Fischer B, Dimopoulou A, Aldinger A, Choi J, Davis EC, Abuelo DN, Adamowicz M, Al-Aama J, Basel-Vanagaite L, Fernandez B, Grealley MT, Gillissen-Kaesbach G, Kayserili H, Lemyre E, Tekin M, Türkmen S, Tuysuz B, Yüksel-Konuk B, Mundlos S, Van Maldergem L, Wevers RA, Urban Z. "Loss-of-function mutations in ATP6V0A2 impair vesicular trafficking, tropoelastin secretion and cell survival". *Hum Mol Genet.* 2009 Jun 15;18(12):2149-65.
- [33] Esmail S, Kartner N, Yao Y, Kim JW, Reithmeier RAF, Manolson MF. "Molecular mechanisms of cutis laxa- and distal renal tubular acidosis-causing mutations in V-ATPase a subunits, ATP6V0A2 and ATP6V0A4". *J Biol Chem.* 2018 Feb 23;293(8):2787-2800.
- [34] Jefferies KC, Cipriano DJ, Forgac M. "Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases". *Arch Biochem Biophys.* 2008 Aug 1;476(1):33-42.
- [35] Toei M, Saum R, Forgac M. "Regulation and isoform function of the V-ATPases". *Biochemistry.* 2010 Jun 15;49(23):4715-23.
- [36] Pamarthy S, Kulshrestha A, Katara GK, Beaman KD. "The curious case of vacuolar ATPase: regulation of signaling pathways". *Mol Cancer.* 2018 Feb 15;17(1):41.
- [37] Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2015. "Molecular biology of the cell". New York: Garland Science.
- [38] Lamandé SR, Bateman JF. "Genetic Disorders of the Extracellular Matrix". *Anat Rec.* 2020 Jun;303(6):1527-1542.
- [39] Baldwin AK, Simpson A, Steer R, Cain SA, Kielty CM. "Elastic fibres in health and disease". *Expert Rev Mol Med.* 2013 Aug 20;15:e8.

- [40] Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. "The extracellular matrix at a glance". *J Cell Sci.* 2010 Dec 15;123(Pt 24):4195-200.
- [41] Williams I.R., "Fibroblasts," *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*, Elsevier, 1998, pages 905-909.
- [42] Pawlina W., Ross M. H. and Negrete J. H. "Histología : texto y atlas color con biología celular y molecular", *Medica Panamericana*. Buenos Air. 2012.
- [43] Saavedra Torres, J. S.; Zúñiga Cerón, L. F.; Vásquez López, J. A.; Navia Amézquita, C. A.; Mosquera Sánchez, L. P.; Freyre Bernal, S. I. "La matriz extracelular: un ecosistema influyente en la forma y comportamiento de las células". *Morfología*. vol. 7, no. 1, pp. 12–35, 2015.
- [44] Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R. "Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy". *Pharmacol Rev.* 2009 Jun;61(2):198-223.
- [45] Murray Robert K., Bender David A., Botham Kathleen M., Kennelly Peter J., Rodwell Victor W., Weil P. Anthony. "Harper: Bioquímica ilustrada". *Interamericana, McGraw-Hill*, 2013.
- [46] Sepúlveda Saavedra J., Soto Domínguez A., "Atlas de histología. Biología celular y tisular". *McGraw-Hill*, 2nd ed. 2014.
- [47] Eynard, Aldo R.; Valentich, Mirta A.; Rovasio, Roberto A. "Histología y Embriología del ser humano. Bases celulares y moleculares". Editorial médica *Panamericana*, 2008.
- [48] Bautista-Hernández LA, Gómez-Olivares JL, Buentello-Volante B, Bautista-de Lucio VM. "Fibroblasts: The Unknown Sentinels Eliciting Immune Responses Against Microorganisms". *Eur J Microbiol Immunol* 2017 Aug 19;7(3):151-157.
- [49] Kurosaki T, Maquat LE. "Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance". *J Cell Sci.* 2016 Feb 1;129(3):461-7.
- [50] Carolina J., Sedano S., Camilo Y. and López Carrascal E. "RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno," *Fitosanidad*, vol. 16, no. 2, pp. 101–113, 2012.
- [51] Zhao S, Fung-Leung WP, Bittner A, Ngo K, Liu X. "Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells". *PLoS One.* 2014 Jan 16;9(1):e78644.
- [52] Lister R, Gregory BD, Ecker JR. "Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes, and beyond". *Curr Opin*

Plant Biol. 2009 Apr;12(2):107-18.

- [53] Dillies MA, Rau A, Aubert J, Hennequet-Antier C, Jeanmougin M, Servant N, Keime C, Marot G, Castel D, Estelle J, Guernec G, Jagla B, Jouneau L, Laloë D, Le Gall C, Schaëffer B, Le Crom S, Guedj M, Jaffrézic F; French StatOmique Consortium. "A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis". *Brief Bioinform.* 2013 Nov;14(6):671-83.
- [54] Robinson MD, Oshlack A. "A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data". *Genome Biol.* 2010;11(3):R25.
- [55] Lecca MR, Maag C, Berger EG, Hennet T. "Fibrotic response in fibroblasts from congenital disorders of glycosylation". *J Cell Mol Med.* 2011 Aug;15(8):1788-96.
- [56] Casamassimi A, Federico A, Rienzo M, Esposito S, Ciccodicola A. "Transcriptome Profiling in Human Diseases: New Advances and Perspectives". *Int J Mol Sci.* 2017 Jul 29;18(8):1652.
- [57] Byron SA, Van Keuren-Jensen KR, Engelthaler DM, Carpten JD, Craig DW. "Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges". *Nat Rev Genet.* 2016 May;17(5):257-71.
- [58] Tarazona S, Furió-Tarí P, Turrà D, Pietro AD, Nueda MJ, Ferrer A, Conesa A. "Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package". *Nucleic Acids Res.* 2015 Dec 2;43(21):e140.
- [59] Wopereis S, Grünewald S, Morava E, Penzien JM, Briones P, García-Silva MT, Demacker PN, Huijben KM, Wevers RA. Apolipoprotein C-III isofocusing in the diagnosis of genetic defects in O-glycan biosynthesis. *Clin Chem.* 2003 Nov;49(11):1839-45. doi: 10.1373/clinchem.2003.022541.
- [60] Jones MA, Rhodenizer D, da Silva C, Huff IJ, Keong L, Bean LJ, Coffee B, Collins C, Tanner AK, He M, Hegde MR. Molecular diagnostic testing for congenital disorders of glycosylation (CDG): detection rate for single gene testing and next generation sequencing panel testing. *Mol Genet Metab.* 2013 Sep-Oct;110(1-2):78-85. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.05.012. Epub 2013 May 28. PMID: 23806237.