



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE FIBROBLASTOS  
DE PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE NIEMANN-PICK Y EL POTENCIAL  
EFECTO TRÓFICO DE FACTORES DE CRECIMIENTO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. PRADEL BERNAL TAMARA PATRICIA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DEL CARMEN CÁRDENAS AGUAYO**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DE LOURDES MASSIEUTRIGO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA, UNAM

**DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA**

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE FIBROBLASTOS  
DE PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE NIEMANN-PICK Y EL POTENCIAL  
EFECTO TRÓFICO DE FACTORES DE CRECIMIENTO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. PRADEL BERNAL TAMARA PATRICIA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DEL CARMEN CÁRDENAS AGUAYO**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DE LOURDES MASSIEUTRIGO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA, UNAM

**DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA**

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022**

**COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA**

**OFICIO CPCB/969/2022**

**ASUNTO: Oficio de Jurado**

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
**Directora General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **20 de junio de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **PRADEL BERNAL TAMARA PATRICIA** con número de cuenta **312064613** con la tesis titulada **“ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE NIEMANN-PICK Y EL POTENCIAL EFECTO TRÓFICO DE FACTORES DE CRECIMIENTO”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA DEL CARMEN CÁRDENAS AGUAYO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ROLANDO EFRAÍN HERNÁNDEZ MUÑOZ  
Vocal: DRA. YAZMÍN RAMIRO CORTÉS  
Vocal: DRA. SARA LUZ MORALES LÁZARO  
Vocal: DR. LUIS OSKAR SOTO ROJAS  
Secretario: DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 19 de octubre de 2022

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Primeramente, al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM

A los apoyos económicos recibidos para poder realizar mis estudios e investigación: el apoyo de los proyectos DGAPA/PAPIIT/UNAM número IA208118 e IA210620 y CONACYT número 319578; al CONACYT por la beca de Maestría.

A mi tutora principal la Doctora María del Carmen Cárdenas Aguayo

A los miembros de mi Comité Tutor

- Dra. Lourdes Massieu Trigo
- Dr. José Fernando Peña Ortega

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A todas las personas que me apoyaron y ayudaron para la elaboración de esta tesis:

Vuelvo agradecer a mi tutora la Dra. María del Carmen Cárdenas Aguayo

A la Dra. Laura Gómez Virgilio

Al Biol. Josué Jared Rafael Rivera Osorio

A mis compañeros de laboratorio en orden alfabético: Ari, Dra. Carmelita, próximo

Dr. Gustavo, Musi, Norma, Obed y Rebe

A los amigos que estuvieron más cerca estos últimos dos años

A mi familia porque sin ellos no sería

A los miembros del Jurado para obtener el examen de grado:

- Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz
- Dra. Yazmín Ramiro Cortés
- Dra. Sara Luz Morales Lázaro
- Dr. Luis Oskar Soto Rojas
- Dr. José Fernando Peña Ortega

A la Técnico Académico de nuestro laboratorio: M. en C. Mireya Velázquez Paniagua.

Agradecimientos técnicos a la Biol. Ivonne Grisel Sánchez Cervantes por su asesoría en la técnica de inmunofluorescencia, observación de muestras y captura de micrografías en un microscopio confocal LSM 880 de la marca Zeiss.

*“... para las cosas  
que tenemos que aprender  
antes de que podamos hacerlas,  
aprendemos haciéndolas”*

Aristóteles

## **ÍNDICE DE CONTENIDO**

### INDICE DE ABREVIATURAS

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	3
RESUMEN GRÁFICO .....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Generalidades de la enfermedad de Niemann-Pick .....	6
1.1.1 Enfermedad de Niemann-Pick tipo C: cuadro clínico y diagnóstico .....	8
1.1.2 Daño neuronal y muerte celular en NPC .....	9
1.1.3 Enfermedad de Niemann-Pick tipo C: del almacenamiento del colesterol a la vía de la autofagia .....	11
1.2 Autofagia: generalidades y conceptos básicos .....	12
1.3 Factores tróficos o de crecimiento .....	13
2. ANTECEDENTES .....	16
2.1 Factores tróficos como reguladores de la autofagia .....	16
2.2 El sexo y otras variables que deben de ser consideradas en el estudio de enfermedades .....	17
2.3 Generalidades del análisis de la expresión génica mediante microarreglos de expresión y sus aplicaciones en el área biomédica .....	19
3. HIPÓTESIS .....	21
4. JUSTIFICACIÓN.....	21
5. OBJETIVO GENERAL.....	22
6. METODOLOGÍA .....	23
6.1 Diseño experimental.....	23
6.2 Búsqueda de bases de datos de microarreglos de RNA de células de pacientes con NPC.....	23
6.3 Análisis del enriquecimiento de ontología de genes o <i>gene ontology</i> (GO) .....	24
6.4 Análisis del enriquecimiento de vías de señalización .....	25
6.5 Análisis del enriquecimiento de sitios de unión a factores de transcripción.....	25
6.6 Análisis de las vías de muerte celular en arreglos de expresión de la enfermedad de NPC.....	25
7. RESULTADOS .....	26
7.1 Tratamiento de la base de datos.....	26
7.2 Análisis de la expresión diferencial.....	27
7.3 Los resultados del GO de las mujeres relacionados con la enfermedad de NPC ....	31

7.4	Los resultados del GO de los hombres relacionados con la enfermedad de NPC ...	33
7.5	Vías de señalización enriquecidas para ambas bases de datos .....	36
7.6	Análisis de enriquecimiento de motivos de unión de la base de datos de mujeres ..	37
7.7	Análisis de enriquecimiento de motivos de unión de la base de datos de hombres.	38
7.8	Búsqueda de vías de muerte celular en arreglos de expresión de la enfermedad de NPC en los datos de mujeres .....	40
7.9	Búsqueda de vías de muerte celular en arreglos de expresión de la enfermedad de NPC en los datos de hombres .....	42
7.10	Validación de genes.....	43
8.	DISCUSIÓN.....	46
8.1	Las vías importantes de la enfermedad de NPC aparecen en los análisis de enriquecimiento.....	47
8.2	Factores de crecimiento expresados diferencialmente y su posible importancia en la patología.....	50
8.3	Validación de los GED comunes entre mujeres y hombres y la propuesta como posibles objetos de estudio.....	51
9.	CONCLUSIONES.....	55
10.	PERSPECTIVAS .....	56
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57
12.	ANEXO: Caracterización de las líneas celulares de fibroblastos de pacientes con NPC y sujetos controles en campo claro mediante el microscopio optico y ensayo de inmunofluorescencia en el microscopio confocal .....	64

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>APK</b>	Cinasa dependiente de AMP
<b>ARMCX1</b>	Repetición de armadillo que contiene un ligando a x 1; Armadillo repeat containing x-linked 1
<b>ARNTL</b>	Proteína 1 similar a un translocador nuclear del receptor del hidrocarburo arilo; Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1
<b>ASM</b>	Esfingomielinasa ácida
<b>ATF3</b>	Factor de transcripción activador 3; Activating Transcription Factor 3
<b>ATF4</b>	Factor de transcripción activador 4; Activating Transcription Factor 4
<b>ATG</b>	Genes Relacionados con la autofagia; Autofagy-related Genes
<b>BATF</b>	Factor de transcripción básico tipo atf cremallera de leucina; Basic leucine zipper atf-like transcription factor
<b>BCAP31</b>	Proteína asociada al receptor de células B
<b>Bcl2</b>	Linfoma célula B2
<b>BMP1</b>	Proteína morfogenética del hueso 1
<b>BP</b>	Proceso biológico
<b>CC</b>	Componente celular
<b>CCDC93</b>	Dominio de bombina enrollada con 93; Coiled-coil domain containing 93
<b>CEBPA</b>	CCAAT enhancer unido a proteína alfa; CCAAT/enhancer-binding protein Alpha
<b>CENPV</b>	Proteína de centrómero V
<b>DEGs</b>	Differentially expressed genes; Genes expresados diferencialmente
<b>DMPS</b>	Patrones moleculares asociados al daño; Damage associated molecular patterns
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EP</b>	Enfermedad de Parkinson
<b>ETV6</b>	Factor de transcripción variante de Ets 6; Ets variant transcription factor 6
<b>FC</b>	Valor de Cambio, Fold Change
<b>FEZF2</b>	Familia Fez de dedos zinc 2; Fez family zinc finger 2
<b>FEZ1</b>	Proteína zeta 1 de fasciculación y elongación; Fasciculation and elongation protein zeta 1
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento derivado de fibroblastos
<b>FGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento fibroblástico
<b>FOS</b>	Subunidad del factor de transcripción ap-1; Fos proto-oncogene, ap-1 transcription factor subunit
<b>FT</b>	Factor de Transcripción
<b>GED</b>	Genes expresados diferencialmente
<b>GEO2</b>	Gene expression omnibus 2
<b>GLMP</b>	Proteína de membrana lisosomal glicosilada; Glycosylated lysosomal membrane protein

<b>HEXB</b>	Subunidad beta de hexosaminidasa; Hexosaminidase subunit beta
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos
<b>HINFP</b>	Factor de transcripción de histona H4
<b>IMPA2</b>	Inositol monofosfatasa 2; Inositol monophosphatase 2
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento de insulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>KEGG</b>	Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
<b>LATS2</b>	Cinasa supresora de tumores grandes
<b>LC3</b>	Proteína de cadena ligera asociada a los microtúbulos
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>LSD</b>	Enfermedades de almacenamiento lisosomal; Lysosomal storage diseases
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógeno
<b>Max</b>	Myc asociada al factor x; Myc associated factor x
<b>MEGF6</b>	Dominio 6 multiple de EGF; Multiple EGF like domains 6
<b>MF</b>	Función molecular
<b>MLKL</b>	Dominio de cinasa de linaje mixto como pseudocinasa
<b>mTOR</b>	Cinasa diana de rapamicina
<b>mTORC1</b>	Cinasa diana de rapamicina complejo 1
<b>NCBI</b>	Centro Nacional de Información Biotecnológica
<b>NFκβ</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso
<b>NOV</b>	Nefroblastoma sobreexpresado
<b>NP</b>	Enfermedad de Niemann-Pick
<b>NPA</b>	Niemann-Pick tipo A
<b>NPAS2</b>	Proteína 2 que contiene al dominio PAS neural; Neuronal PAS domain-containing protein 2
<b>NPC</b>	Niemann-Pick tipo C
<b>NPC2</b>	Transportador de colesterol intracelular 2
<b>NPCs</b>	Células progenitoras neurales
<b>NRL</b>	Cremallera de leucina de retina neural; Neural retina leucine zipper
<b>OSBPL3</b>	Proteína de unión a oxisteroles tipo 3; Oxysterol binding protein like 3
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PHYH</b>	Fitanoil-coa 2-hidroxilasa Phytanoyl-coa 2-hydroxylase
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3-cinasa
<b>PI3KIP1</b>	Proteína 1 que interactúa con la fosfoinositida-3- cinasa
<b>PINK1</b>	PTEN cinasa inducida 1
<b>PKD1</b>	Policistina 1
<b>PROS1</b>	Proteína S1
<b>PRRX1</b>	Homeobox 1 emparejado relacionado
<b>PTK7</b>	Proteína tirosina cinasa 7
<b>PWMErich</b>	Matriz de enriquecimiento de peso de posición; Position weight matrix enrichment

<b>RAB3IL1</b>	Proteína que interactúa con Rab3a tipo 1; Rab3a interacting protein like 1
<b>RARA</b>	Receptor alfa de ácido retinoico; Retinoic Acid Receptor Alpha
<b>RIP3</b>	Proteína cinasa 3 que interactúa con el receptor
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>RT-PCR</b>	Reacción Cadena de la Polimerasa- Retrotranscriptasa
<b>SGK3</b>	Proteína serina/treonina cinasa
<b>SNARE</b>	Receptor de proteínas de fijación soluble de NSF
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SQSTM1</b>	Sequestosome 1
<b>TCF3</b>	Factor de transcripción 3; Transcription factor 3
<b>TCF7L1</b>	Factor de transcripción 7 tipo-1
<b>TF</b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>TFAP2A</b>	Factor de transcripción AP-2 alfa; Transcription Factor AP-2 Alpha
<b>TFE3</b>	Factor de transcripción de unión a IGHM enhancer 3; Transcription Factor Binding To IGHM Enhancer 3
<b>TFEB</b>	Factor de transcripción EB; Transcription Factor EB
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformador
<b>TGFB11</b>	Proteína del transcrito 1 inducida por el factor de crecimiento transformante beta 1; Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>ULK1</b>	Unc-51-tipo cinasa 1
<b>USF1</b>	Factor de transcripción río arriba 1; Upstream Transcription Factor 1
<b>VAT1</b>	Transportador vesicular de aminas 1; Vesicle Amine Transport 1
<b>VEGFA</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular A
<b>ZMAT2</b>	Dedos de zing matrin tipo 2; Zinc finger matrin-type 2

## **RESUMEN**

La enfermedad de Niemann-Pick (NPC) es un trastorno neurodegenerativo el cuál es causado por una mutación en el gen *NPC1* o *NPC2*, ambos codifican para proteínas del endosoma y lisosoma que se encargan del transporte del colesterol hacia el citoplasma celular, por lo que su mutación provoca la acumulación del colesterol y otros tipos de lípidos dentro de estos compartimentos celulares, afectando su función y comunicación con otros organelos, y eventualmente lleva a la desregulación de la vía de la autofagia y muerte celular. La enfermedad de NPC afecta al ser humano desde neonatales hasta adultos mayores, donde los signos y síntomas son variables: inflamación del hígado y bazo, problemas motores, temblores, movimientos involuntarios, problemas en el aprendizaje (en casos en infantes), demencia (en los adultos), entre otros.

Debido a su baja prevalencia y heterogeneidad en su sintomatología se ha dificultado tanto su estudio como su diagnóstico. Por estas razones el enfoque de este trabajo reside en determinar *in silico* aquellas diferencias moleculares entre células somáticas provenientes de pacientes y sujetos control para posteriormente proponer alguna o algunas biomoléculas como posibles biomarcadores que permitan lograr un diagnóstico más eficiente y puedan constituir nuevos blancos terapéuticos. Por lo que para el presente proyecto se analizó una base de datos de un microarreglo de expresión proveniente de fibroblastos de 23 pacientes vs 22 controles. La base de datos se obtuvo del repositorio de libre acceso GEO2, con numero de acceso: GSE124283, la cual se extrajo en crudo, se normalizó y se realizó el análisis de expresión diferencial mediante el uso del paquete limma de R, el cual compara las medias de expresión y su significancia de cada uno de los genes entre pacientes y controles. Este primer análisis mostró variabilidad en los genes expresados diferencialmente entre los individuos de las mismas categorías: controles o pacientes, probablemente debido a las diferencias por el sexo. Posteriormente, se separaron la base de datos entre mujeres y hombres y se analizaron de forma independiente con el fin de que los cambios de la expresión génica no fueran afectados por el sexo y que los cambios de expresión detectados fueran representativos de la enfermedad. Una vez obtenidos los genes expresados diferencialmente, se realizaron los análisis de enriquecimiento: GO, KEGG y PWMErich, para buscar la significancia biológica de cada uno de ellos.

El análisis en forma independiente de los datos de mujeres y hombres mostró diferencias en la expresión de los genes entre los dos grupos, pero también importantes similitudes en vías de señalización que representan a la enfermedad como grupos de genes involucrados

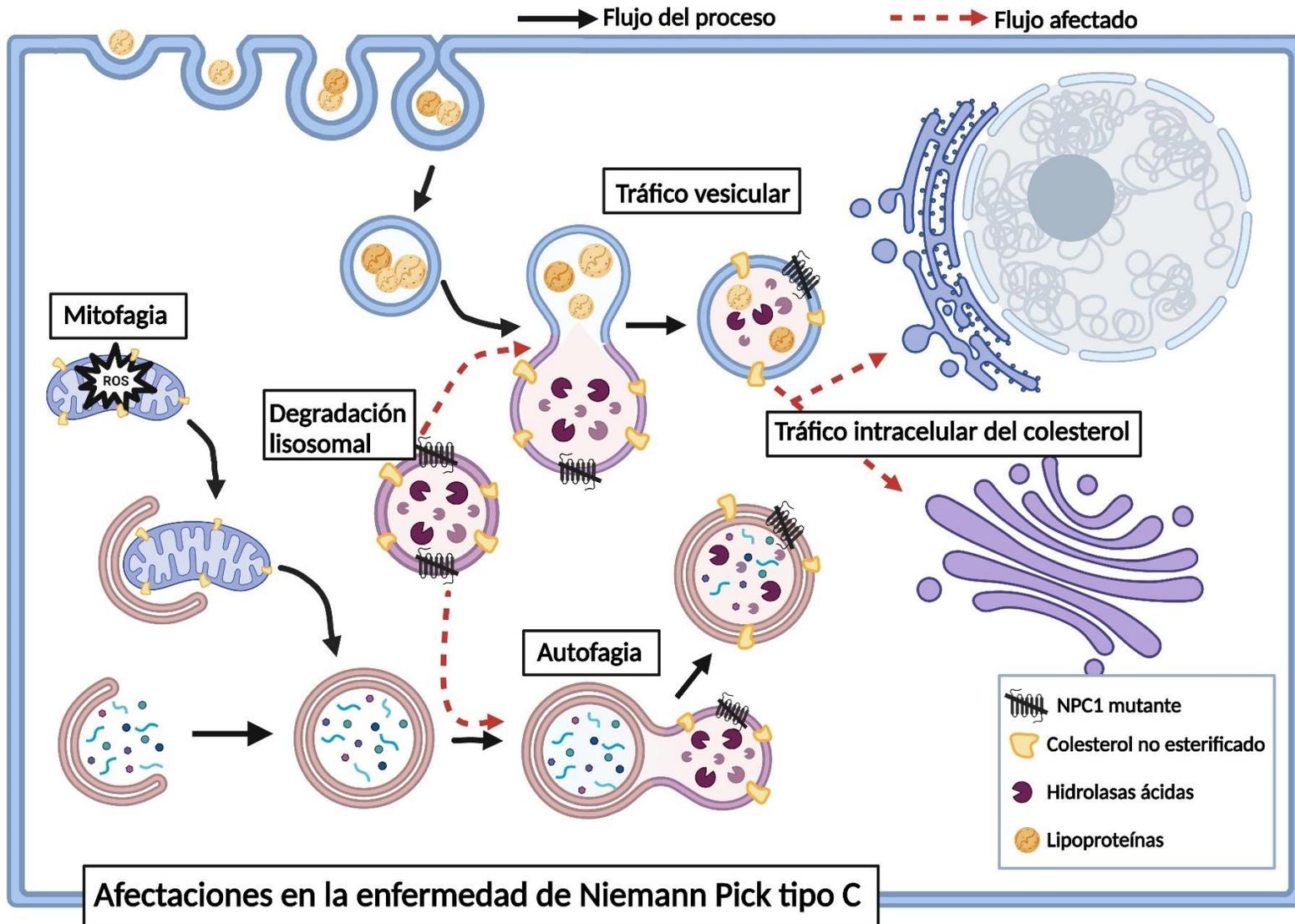
en el lisosoma, endosoma y transporte, metabolismo de lípidos, vía de Wnt e interacciones célula-célula. También encontramos 18 genes en común entre ambas bases de datos, los cuales proponemos como objetivo de estudio o biomarcadores potenciales de esta enfermedad neurodegenerativa.

## **ABSTRACT**

Niemann-Pick disease type C1 is a neuro-visceral lysosomal storage disorder that affects people of variable ages ranging from infancy to adulthood. The presence of mutations in either NPC1 or NPC2 leads to accumulated cholesterol and other lipids inside endosoma/lysosoma that give rise to loss of function, autophagy dysregulation and eventually death cell. The symptoms of the disease are variable and may include: enlarged liver or/and spleen, learning difficulties, seizures, gait problems, dementia, loss of muscle tone, among others.

For this project we used *in silico* methods to identify the principal genes affected in this disease. The approach was an analysis of microarray data from GEO2, accession number GSE124283. We studied the gene expression of skin fibroblast from 45 individuals: 22 healthy controls and 23 with NPC. The raw data set were downloaded, normalized and the differential expression analysis was performed by limma package, this analysis revealed a bias (excessive variability) among subjects within the same category (control or patient) when analyzed the two sexes together, so we decided to independently analyze men's and women's data.

The second approach was looking for the biological significance of the differential expressed genes with enrichments analysis: the Gene Ontology, KEGG pathway and PWMErich; here we got several differences between the two sexes although we found similarities that represent this pathology, some of this common genes between the two groups of the databases, that were differentially expressed between patients and controls, where enriched in the lysosome, endosome transport, lipid metabolism, Wnt signaling pathway and cell-cell interaction. Both data sets share 18 DEGs, that participate on important pathways, therefore, we propose that some of the 18 DEGs that we found related to NPC disease could have value as potential biomarkers or targets of this disease.



**Figura 1. Resumen gráfico de las principales afectaciones** a nivel celular que ocurren en la enfermedad de NPC, la mayoría de ellas reflejadas en nuestros resultados. La entrada de lípidos a la célula se hace mediante el procesos de endocitosis, iniciando con la unión de las lipoproteínas a sus receptores de membrana y la formación del endosoma. El endosoma eventualmente se puede fusionar con otros endosomas, vesículas y/o el lisosoma. La degradación de las lipoproteínas libera a los diferentes tipos de lípidos que se dirigirán hacia otros organelos, para formación de membrana, participación en el metabolismo o sustratos de diversas vías. La mitofagia es la degradación de mitocondrias dañadas que ocasionan un aumento de ROS. La mitofagia y autofagia inician con el englobamiento de las biomoléculas que se desean degradar por una doble membrana que formará al autofagosoma, el proceso continua con su fusión con el lisosoma y la degradación de estos compuestos. La principal función del lisosoma es la degradación mediante sus hidrolasas ácidas, sin embargo, también contiene otras clases de proteínas que participan en otros procesos. Tal es el caso de la proteína NPC1, que es una proteína de membrana que transporta el colesterol fuera del lisosoma, y su mutación provoca su acumulación del mismo, así como una alteración de la funciones del lisosoma y eventualmente de las vías en las que participa. Los recuadros y flechas señalan el nombre y flujo del proceso. Las flechas puntuadas y rojas indican flujo afectado por la patología de NPC.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades de la enfermedad de Niemann-Pick

La enfermedad de Niemann-Pick (NP) fue descrita por primera vez por Albert Niemann y Ludwig Pick en los años 1910's, ambos estudiaron los casos de varios niños con ascendencia judía que presentaban síntomas de lo que parecía ser una enfermedad nueva que eventualmente conducía a una muerte temprana. La enfermedad de NP es un trastorno degenerativo neuro-visceral causado por un desorden en el almacenamiento lisosomal y reciclamiento de biomoléculas que se caracteriza por la acumulación de lípidos dentro de la célula (Villamandos García & Santos-Lozano, 2014).

El término de “enfermedad de Niemann-Pick” engloba un grupo heterogéneo de enfermedades representadas por el acumulo lipídico lisosomal con características clínicas, bioquímicas y moleculares variables. Se clasifica en 3 tipos, Niemann Pick tipo A, B y C. Las tres variedades de la enfermedad de Niemann-Pick son heredables y causadas por una mutación de tipo autosómica recesiva (McGovern et al., 2013). Para el caso de los tipos A y B son debido a una mutación en el gen de la enzima *esfingomielinasa ácida* (ASM, por sus siglas en inglés) la cual tiene un papel importante en la degradación de los esfingolípidos impidiendo su acumulación y regulando su concentración en las membranas plasmáticas. En la NP tipo A (NPA) no hay actividad de la enzima en absoluto, lo que genera una disfunción neurovisceral y eventualmente la muerte a temprana edad (entre los primeros 2-3 años de edad); mientras que en el tipo B si existe actividad de la enzima ASM pero a niveles bajos; en NPB los primeros síntomas aparecen a una edad variable (dependiendo de la mutación) desde la niñez hasta la etapa adulta, con síntomas heterogéneos y los pacientes muestran supervivencia más alta que en la tipo A (Thurberg et al., 2012). Ambos tipos tienen prevalencia baja de 0.4 – 0.6 por cada 100, 000 nacidos y en general, cuanto más temprano es el inicio clínico, más grave es la enfermedad (Hammond et al., 2019).

La enfermedad NP tipo C es causada por una mutación en el gen *NPC* (*NPC1* o *NPC2*) la cual codifica a proteínas endolisomales encargadas de transportar colesterol (Cox & Cachon-Gonzalez, 2012) y cuya mutación causa una acumulación de colesterol no esterificado y otros tipos de lípidos, entre ellos los esfingolípidos, glicosfingolípidos y los gangliósidos GM3 y GM2 (Lloyd-Evans & Platt, 2010), la mutación afecta todas las células del cuerpo pero las que presentan un mayor deterioro son las del cerebro, hígado, bazo y

algunas células del sistema inmune. El tipo C de esta enfermedad afecta desde neonatos hasta adultos mayores, presentando en cada estrato de edad síntomas variables.

Para el caso de la enfermedad de NPC se ha estimado una prevalencia mundial de entre 1 de 89,000 a 1 en 120,000 nacidos vivos (Burton et al., 2021). Sin embargo, en un proyecto de secuenciación del genoma y exoma de distintas poblaciones alrededor del mundo (en particular en una cohorte grande de pacientes de la república Checa) se predijo un incremento en la prevalencia de esta enfermedad, entre 1/19,000 - 36,000 por lo que pareciera que es más común de lo que se había considerado inicialmente y algunos casos de inicio tardío pueden pasar desapercibidos en las estadísticas (Hammond et al., 2019), en parte por las dificultades en su diagnóstico. Se estima que entre el inicio de los signos y síntomas y el diagnóstico de NPC hay en promedio 2.5 años para el tipo infantil, 4.3 infantil tardío y 6 años para el tipo juvenil y adultos (Burton et al., 2021).

Cabe destacar que en México no hay datos de prevalencia, sin embargo, si hay publicaciones de casos (Griese et al., 2010; Jean-Tron et al., 2012; Pina-Aguilar et al., 2014; Zarco-Román et al., 2017). En el presente proyecto nos centramos en NPC, esto debido a la rareza de la enfermedad y por ende su poco estudio, su evolución menos fatal que la tipo A y B y por lo que hasta ahora se conoce respecto a los mecanismos moleculares subyacentes, que se alinea con el interés de nuestro grupo el cuál es la importancia de la autofagia en el SNC.

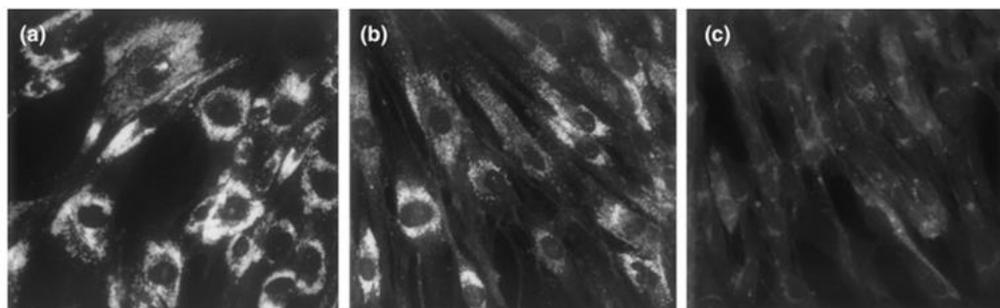
Pero, ¿por qué estudiarla?, además de que NPC es una enfermedad muy interesante, a lo largo de su estudio se han encontrado características que comparte con otras enfermedades de mayor importancia (por tener mayor prevalencia). El entendimiento de enfermedades asociadas a mutaciones, como NPC, pueden llevarnos entender las bases de la desregulación de la autofagia, de la homeostasis de lípidos, de calcio, transporte intracelular, señalización y comunicación entre organelos, así como otras disfunciones que comparte con otras enfermedades más prevalentes. Al igual que la enfermedad de Alzheimer, NPC es una enfermedad neurodegenerativa donde ocurre una desregulación en la homeostasis del colesterol, con depósitos de tau y Amiloide- $\beta$ , además de la desregulación de la autofagia. NPC también es una de las 60 enfermedades de depósitos lisosomales, las cuáles, al igual que los lisosomas, ha incrementado progresivamente su estudio, importancia y conocimiento. Los lisosomas ya no son vistos como organelos involucrados solamente en vías catabólicas, sino como un elemento dinámico en la vía de la autofagia y en otras funciones de señalización celular, incluida la adaptación a cambios

en el ambiente. Esta nueva visión del lisosoma ha redefinido la manera en la que entendemos las enfermedades de depósitos lisosomales (Parenti et al., 2021) y por lo tanto la NPC.

### 1.1.1 Enfermedad de Niemann-Pick tipo C: cuadro clínico y diagnóstico

En NPC una las principales vías afectadas es la autofagia y dado que esta vía es la ruta principal de eliminación y reciclamiento de macromoléculas, el mantenimiento de la homeostasis, viabilidad celular y el bienestar del organismo (Palhegyi et al., 2019), su desregulación causa una enfermedad progresiva multisistémica que abarca un amplio espectro clínico. La forma más frecuente de la enfermedad se asocia con una colestasis neonatal transitoria, esplenomegalia y/o hepatomegalia progresiva y posteriormente síntomas neurológicos. Entre las manifestaciones neurológicas se destacan las siguientes: alteraciones en la motilidad ocular siendo característica la parálisis de la mirada vertical, disfagia, disartria, ataxia, distonía, crisis epilépticas, daño cognitivo progresivo, síntomas psiquiátricos y crisis de cataplejía Gelástica: episodios de debilidad muscular con risa incontenible (Molina & Gómez, 2016); también se han reportado en adultos demencia y casos de psicosis que se asemejan a esquizofrenia (Walterfang et al., 2006). Sin embargo, los síntomas y signos de NPC son muy variables, son poco específicos y se desarrollan en distintos periodos de tiempo, por lo que de esto deriva en un diagnóstico difícil y en muchas ocasiones erróneo (Villamandos García & Santos-Lozano, 2014).

Respecto al diagnóstico, el más aceptado es la secuenciación de los genes *NPC1* y *NPC2* buscando la mutación y en caso de ser necesario, el ensayo de filipina; la filipina es un potente antibiótico empleado como marcador fluorescente del colesterol (Van Leeuwen et al., 2008) el cual permite visualizar la acumulación de colesterol no-esterificado dentro de la célula, como se puede observar en la figura 2 (Vanier & Millat, 2003).



**Figura 2. Microfotografía de cultivos de fibroblastos provenientes de pacientes con Niemann-Pick y sujetos sanos, teñidos con filipina.** (a) Paciente con Niemann-Pick tipo C, (b) paciente con una variante de NPC y (c) sujeto sano; en los incisos a y b se muestra el aumento de la concentración de colesterol y por lo tanto más intensidad de fluorescencia al compararlas con las células de un paciente sano. Imagen obtenida de Vanier, M. y Millat, G., 2003.

### 1.1.2 Daño neuronal y muerte celular en NPC

En las enfermedades por almacenamiento lisosómico (LSD, por sus siglas en inglés: *Lysosomal storage diseases*) se ha documentado la muerte celular o principalmente afectación de neuronas y otras células del organismo, especialmente las del hígado, bazo, cardíacas y del sistema inmune (macrófagos), sin saber exactamente los mecanismos por los que ocurre la muerte celular. Lo que sí se sabe es que en estas enfermedades el mal funcionamiento del lisosoma afecta las vías de degradación de los organelos dañados, como la mitofagia, que conlleva a la acumulación de mitocondrias disfuncionales, de especies reactivas del oxígeno (ROS) y desregulación de vías donde participa la mitocondria como la apoptosis y la respuesta inflamatoria (Torres et al., 2017; Yanez et al., 2020).

Así como la disfunción mitocondrial es común en otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA) y enfermedad de Parkinson (EP), hay otras características fisiopatológicas compartidas con NPC como disfunción en el metabolismo de los lípidos, alteraciones del citoesqueleto y fragmentaciones del aparato de Golgi, que acompañan el daño celular progresivo causando alteraciones morfológicas manifestadas en todo el espectro de la enfermedad como lo son la formación de mega neuritas, dendritogénesis ectópica, marañas neurofibrilares (Walkley & Suzuki, 2004).

Actualmente se encuentra en discusión el mecanismo por el cual las neuronas y otras células mueren en NPC (Yanez et al., 2020). La evidencia indica que la neurodegeneración sucede por la vía de la apoptosis y, en este sentido, diversos trabajos reportan la presencia de células apoptóticas tanto en cerebros de pacientes como en modelos murinos de NPC, sugiriendo que dicha apoptosis ocurre por la vía de TNF (factor de necrosis tumoral). Sin embargo, al respecto al modelo murino, se demostró que, aunque el aumento de expresión de genes involucrados en esta vía correlaciona con el deterioro de la enfermedad, al bloquearla no se observa una reducción de la patología (Wu et al., 2005; Yanez et al., 2020).

Por ello, se ha propuesto que en esta patología los mecanismos de muerte celular implicados pueden ser otros como la necroptosis.

Un estudio realizado en hepatocitos de pacientes con NPC demostró que la inhibición de la apoptosis solo disminuye ligeramente la muerte celular. A través de la inducción de Bcl-2 (protooncogén) se ha intentado bloquear la muerte celular dependiente de caspasas y la piroptosis (apoptosis con activación del inflamosoma) con minociclina, antibiótico con actividad antiinflamatoria y antiapoptótica, concluyendo finalmente que la muerte de las células no se efectúa por estas vías pues no se observan cambios significativos, y sugiriendo de nuevo otros mecanismos, como la necroptosis (Yanez et al., 2020).

La sugerencia de la necroptosis como posible mecanismo de muerte celular en este modelo, surge a partir del hecho de que al usar un inhibidor alostérico de RIP3 (regulador de la necroptosis) se observó una disminución significativa de la muerte celular. En otro reporte se determinó que la inhibición de necroptosis en un modelo murino de neuronas de Purkinje llevó a que dichas células mostraron una mejoría en la progresión de la enfermedad y una disminución en la tasa de mortalidad (Cougnoux et al., 2016; Yanez et al., 2020). Estos trabajos ofrecen un nuevo punto de vista en el que se realza el papel de la necroptosis como el tipo de muerte celular más probable que ocurre en NPC.

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada y organizada que se ejecutada por la familia de proteínas llamadas caspasas. El proceso mediante el cual una célula muere por apoptosis ocurre de la siguiente manera: primero, se activan las endonucleasas que se encargan de romper el DNA; posteriormente se prosigue con la degradación de proteínas del núcleo, proteínas de unión intracelular, la fragmentación del citoesqueleto; y finaliza con la formación de cuerpos apoptóticos así como la aparición de células fagocíticas del sistema inmune (D'Arcy, 2019). En este tipo de muerte celular, a diferencia de la necrosis, se busca que sea un proceso limpio, es decir, que no se dañen a células vecinas y no generar una respuesta inflamatoria.

Mientras que la necroptosis es un tipo de muerte celular parecida a la necrosis, pero regulada, ya que en esta vía se reconocen receptores de membrana tipo RIP que activan a MLKL (ejecutor de la necroptosis). El RIP3 es un componente de la vía de señalización de TNF, que puede inducir la muerte celular por la vía de las caspasas o por otra vía independiente; a diferencia de la apoptosis, en la necroptosis hay una respuesta inflamatoria usualmente inducida por DAMPs (Pan et al., 2016). Es importante tener en cuenta que la apoptosis y necroptosis no son mutuamente excluyentes, pueden suceder en el mismo órgano de forma secuencial o simultánea (Linkermann & Green, 2014).

### **1.1.3 Enfermedad de Niemann-Pick tipo C: del almacenamiento del colesterol a la vía de la autofagia**

El mal funcionamiento de las proteínas NPC1 y/o NPC2 provocan la acumulación del colesterol, de algunos glicolípidos y gangliósidos en el endosoma tardío; esta acumulación a su vez provoca un mal funcionamiento en el tránsito vesicular y posiblemente, afecte las uniones entre membranas para su fusión. Tomando en cuenta que la patología no solo se debe a la acumulación de lípidos en compartimientos celulares, sino también a la ausencia de ellos en otros lugares (Hammond et al., 2019), podemos relacionar algunas afectaciones a la pérdida de homeostasis en el metabolismo de lípidos.

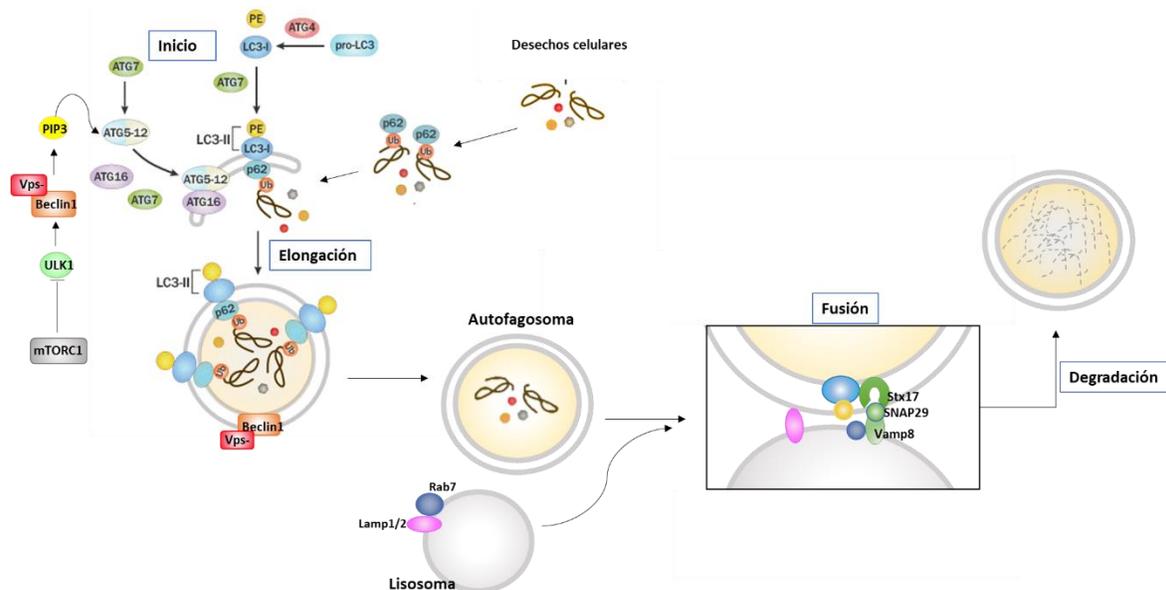
Debido a que el colesterol es uno de los lípidos mayormente afectados en esta patología, también se alteran sus principales funciones, las cuales son: a nivel estructural en las membranas contribuye a la fluidez, curvatura y asociaciones entre organelos. También a partir del metabolismo del colesterol y otros lípidos se obtiene moléculas de importancia biológica como hormonas, vitamina D y ácidos biliares. Particularmente, los lípidos también cumplen un papel importante en las estructuras de los axones y formación de mielina en el sistema nervioso. Es por ello que la patología de NPC se presentan afectaciones en el metabolismo, comunicación entre organelos y el transporte vesicular dentro de las células, así como la sinapsis para el caso de las neuronas.

Se ha reportado que el colesterol que se acumula dentro de las vesículas promueve el reclutamiento desde el citoplasma hacia la membrana del lisosoma/endosoma de mTORC1, sensor de nutrientes, energía y estrés y además regulador de la vía de la autofagia. El reclutamiento de mTORC1 disminuye mecanismos encargados del mantenimiento de la biomasa, proliferación, crecimiento y catabolismo. En la NPC, el mTORC1 está hiperactivo (Lim et al., 2019), lo que lleva a un desbalance en la vía de la autofagia y eventualmente la acumulación de colesterol. Los resultados encontrados en fibroblastos de pacientes con NPC mostraron que el tratamiento con rapamicina (inhibidor de la mTORC1, por lo tanto, promotor de la autofagia) provoca una disminución en la acumulación de colesterol en los lisosomas y una mejora en la viabilidad celular. La evidencia indica que la regulación positiva de la autofagia es un buen blanco terapéutico tanto por la vía de mTOR como por la inducción del factor transcripcional TEFB, regulador maestro de la biogénesis de los lisosomas (Yanez et al., 2020).

## 1.2 Autofagia: generalidades y conceptos básicos

La autofagia es el proceso de degradación y reciclamiento por la vía lisosomal conservada evolutivamente, durante el cual, los componentes celulares como macromoléculas, proteínas y hasta organelos son secuestrados en autofagosomas que se fusionan a lisosomas para su degradación y/o reciclaje. La macrofagia, usualmente referida como autofagia, inicia con la activación de ULK1 (ATG1), que acarrea a Beclin1 junto con Vps y después participan otras proteínas llamadas ATG (autofagy-related genes). Durante la elongación las ATG5 y ATG12 acarrean otras proteínas ATG como LC3-II y I, junto con los fosfolípidos que formarán la doble membrana del autofagosoma. Los desechos celulares, proteínas no-funcionales y/u organelos que se quieren degradar son marcados con receptores específicos de autofagia, como p62 o PINK1, que después interactúan con proteína ATG (fig. 3). Una vez formado el autofagosoma, éste se fusiona con el lisosoma mediante el reconocimiento y unión de membranas mediante las proteínas sintaxina-17, Vamp-8, SNAP29 y otras proteínas de la familia de las SNARE. Después de la fusión las proteasas e hidrolasas en el pH del lisosoma degradan a los desechos celulares (fig. 3).

La autofagia tiene diversos roles fisiológicos como: ayuda en el reciclaje de componentes celulares y en menor medida induce muerte celular ante diferentes tipos de estrés principalmente por restricción calórica, durante la diferenciación celular, embriogénesis y ante el señalamiento de organelos dañados. Alteraciones en la vía de la autofagia se han relacionado con cáncer y otras enfermedades neurodegenerativas como EA (D'Arcy, 2019). La autofagia se encuentra a niveles basales en la mayoría de las células y entre sus reguladores esta mTORC1 (fig. 3) y AMPK, ambas responden a los cambios de nutrientes y regulan a ULK. Aunque en condiciones basales se encuentra activa, la autofagia también puede inducirse por varios inductores como diferentes tipos de estrés, restricción calórica, ausencia de factores de crecimiento, daño a biomoléculas, daño a organelos, envejecimiento y cambios metabólicos.



**Figura 3. Esquema de la vía de la autofagia** con los 4 pasos principales: 1) inicio, 2) elongación, 3) fusión y 4) degradación. Se ilustran algunas de las proteínas que participan en cada paso. Imagen elaborada en BioRender.

### 1.3 Factores tróficos o de crecimiento

Los factores tróficos son polipéptidos, que pueden tener un efecto autócrino o parácrino, pero a cortas distancias (son mediadores locales) del sitio donde fueron secretados, a diferencia de las hormonas, que si pueden tener un efecto a distancias mayores. Tienen receptores específicos en la superficie de las células, que al unirse generan una cascada de señalización la cual, en la mayoría de los casos, concluye con la regulación de la expresión de genes de respuesta primaria (como los protooncogenes), secundaria o tardía. Lo que puede dar como resultado la regulación del ciclo celular o del proceso de diferenciación (Cardenas-Aguayo M del, 2004).

Estas moléculas pueden estimular diferentes tipos celulares o sólo a un tipo particular de célula. Se conocen varias familias de factores tróficos, la cuales se describen en la tabla 1 (Cardenas-Aguayo M del, 2004).

<b>Tabla 1.</b> Principales familias de los factores de crecimiento y algunas de sus características. Modificada de Cardenas-Aguayo, M. del C. 2004			
<b>Factor</b>	<b>Origen</b>	<b>Actividad primaria</b>	<b>Comentario</b>
HGF	Hepatocitos y células de origen mesenquimal	Promueve la proliferación, angiogénesis, morfogénesis y antipoptotica	Se ocupa en la regeneración y protección de varios órganos.

PDGF	Plaquetas, células endoteliales, placenta	Promueve la proliferación de tejido conectivo, glial y de células de músculo liso	Consta de distintos dímeros: AA, AB y BB
VEGF	Células mesenquimales y del estroma	Estimula la supervivencia, proliferación y motilidad	Induce la migración de células precursoras endoteliales
EGF	Glándulas submaxilares masculinas, Glándula de Brunner	Promueve la proliferación de células de mesénquima, glía y células epiteliales	Es utilizado para expandir NPCs <i>in-vitro</i> .
TGF- $\alpha$	Es común en células transformadas	Puede ser importante para la correcta cicatrización de heridas	Está relacionado con EGF
FGF	Se encuentra en gran variedad de células, la proteína se asocia con ECM	Promueve la proliferación de un gran número de células	La familia cuenta con al menos 19 miembros y 4 receptores. Al igual que EGF, FGF-2 es utilizado para expandir cultivos de NPCs
NGF	Glándula submaxilar masculina	Promueve crecimiento neurítico y supervivencia en las células neurales	Primera neurotrofina identificada por R. Levi-Montalcini y cols. en 1968. Sus receptores son del tipo trk (trkA, trkB y trkC)
Neurotrofinas		Promueven la proliferación, diferenciación o supervivencia de las células neurales	Esta familia además del NGF incluye a la NT-3, NT-4/5, la NT-6 y el BDNF
Eritropoyetina	Riñón	Promueve la proliferación y la diferenciación de los eritrocitos	En el SNC actúa como neuroprotector
TGF- $\beta$	Células TH1 activas (T-helper) y linfocitos citolíticos (Natural Killers).	Ant-inflamatorio (suprime la producción de citocinas y la expresión del MHC II), promueve la cicatrización de las heridas, inhibe la proliferación de los macrófagos y de los linfocitos	Al menos 100 miembros de esta familia
IGF-1	Principalmente el Hígado	Promueve la proliferación de muchos tipos celulares	Está relacionado con IGF-II y la proinsulina, también se le llama somatomedina C
IGF-II	Gran variedad de células	Promueve la proliferación de múltiples tipos celulares,	Está relacionado con IGF-I y la proinsulina

		principalmente de origen fetal	
Citocinas	Principalmente secretadas por linfocitos	Causan inflamación, o la inhiben, estimulan la proliferación, regulan la respuesta inmune. Inducen muerte celular	Las interleucinas son al menos 22 (IL1 $\alpha$ y $\beta$ , IL2...IL22) Los interferones son: INF- $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ Factores de Necrosis Tumoral: TNF- $\alpha$ y $\beta$

El término factor de crecimiento (o factor trófico) se utilizó por primera vez en relación con los componentes del suero (el fluido de la sangre que permanece cuando la sangre ha coagulado), que permiten que las células de mamífero proliferen *in vitro* (Cardenas-Aguayo M del, 2004). De los factores que promueven la supervivencia celular se encuentran los factores neurotróficos derivados de glía (GDNF), derivados del cerebro (BDNF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y varios miembros de la familia de los factores de crecimiento derivados de fibroblastos (FGF) (Cardenas-Aguayo M del et al., 2003).

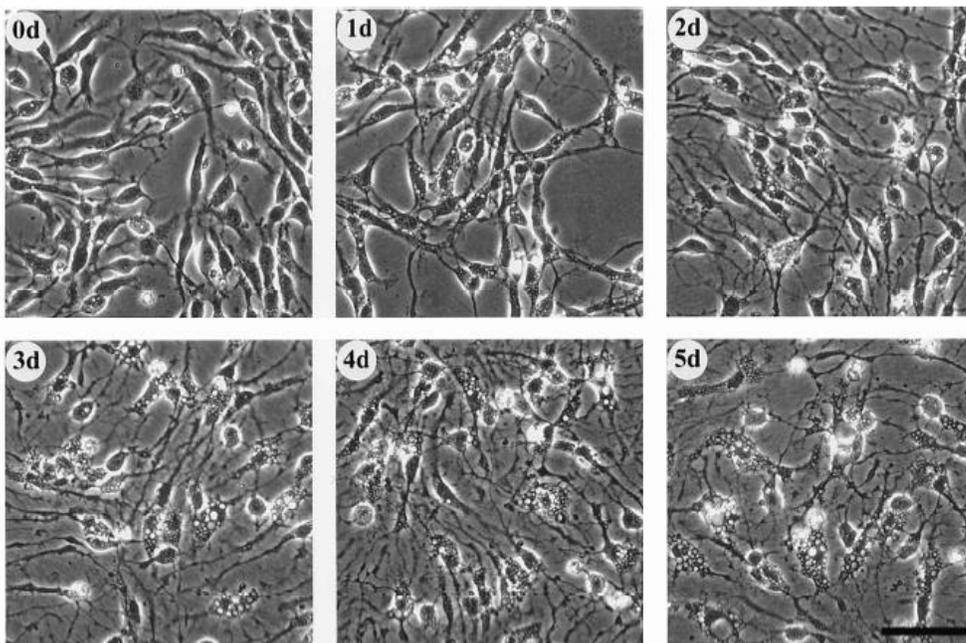
Los factores neurotróficos derivados del cerebro tienen un papel importante en la plasticidad del sistema nervioso central (SNC), envejecimiento, cambios morfológicos y funcionales, como fosforilación de receptores asociados a diferentes funciones, generación de nuevas neuronas, reorganización del citoesqueleto y de las espinas dendríticas. Se ha reportado la deficiencia de neurotrofinas como NGF y BDNF durante las primeras etapas de la EA, lo que puede estar generando degeneración neuronal, muerte celular y pérdida de neurotransmisión colinérgica. De igual modo, se han reportado bajos niveles de expresión BDNF tanto en modelos de la enfermedad de Parkinson, en depresión y ante estrés. En el caso de NPC se vio que la desregulación de NGF está asociada a los defectos de los endosomas que afectan el transporte celular y la señalización de la vía de NGF (Cabeza et al., 2012). Por lo que se ha propuesto que el “nivelar” las concentraciones de las neurotrofinas pueden tener un potencial terapéutico en estas enfermedades (Cardenas-Aguayo M del et al., 2013).

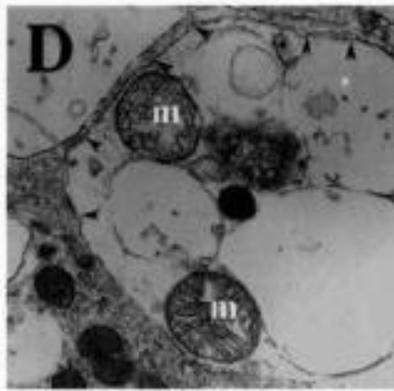
## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Factores tróficos como reguladores de la autofagia

En estudios previos nuestro grupo reportó que FGF2 tiene un papel importante en la supervivencia de precursores neurales (Cardenas-Aguayo M del et al., 2003) y actualmente se sabe que los factores de crecimiento tienen efectos múltiples, ya que además de inducir la proliferación pueden controlar otros procesos como el de supervivencia, diferenciación, migración, etc. (Cardenas-Aguayo M del, 2004). Por otro lado, se ha descrito que ante la ausencia de los factores de crecimiento las células dejan de inducir señales favorables a la supervivencia, por lo tanto, sin estas señales favorables, moléculas como puma, noxa y bax (reguladores de la apoptosis), que normalmente se encuentran inhibidas, se activan e inician la apoptosis (D'Arcy, 2019).

Desde un enfoque diferente Cárdenas-Aguayo en 2003, caracterizó el mecanismo de muerte celular en células precursoras neurales derivadas de la neuroesfera ante la ausencia de factores de crecimiento. Las células mostraron características de autofagia al retirarles el FGF2, como formación de vacuolas de doble membrana alrededor de componentes del citoplasma como las mitocondrias y otras vesículas (fig. 4).





**Figura 4. Desarrollo de vacuolas en ausencia de FGF2** en células derivadas de la neuroesfera, 0-5 días. El cultivo celular creció durante 12-24 horas en presencia de FGF2, se lavaron y se prosiguió a su cultivo en ausencia del factor de crecimiento. Se observa la formación de vacuolas a partir del primer día (1d) de retirarles FGF2. La imagen de la izquierda, (inciso D) es una fotografía en el microscopio electrónico de una de las vacuolas que se formaron, la cabeza de flechas señala la doble membrana y m, de mitocondria. Barra de escala 50  $\mu$ m. Tomada de Cárdenas-Aguayo, M. del C. y col. 2003.

## 2.2 El sexo y otras variables que deben de ser consideradas en el estudio de enfermedades

En los últimos años han surgido estudios sobre la importancia de tomar en cuenta el sexo en el estudio de las enfermedades y particularmente se habla sobre las diferencias que hay en enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo EA (Medeiros & Silva, 2019) y esquizofrenia (Mendrek & Stip, 2011), también en enfermedades cardiovasculares, en la respuesta inflamatoria (Houben et al., 2020) y recientemente en la respuesta a tratamientos y fármacos para otro tipo de enfermedades (Idda et al., 2021).

Se ha sugerido que la principal causa de esta diferencia, pero no la única, es hormonal principalmente refiriéndose a las hormonas esteroideas, y típicamente el estrógeno. Las diferentes hormonas y su proporción entre los sexos afectan de diferente forma los órganos y sistemas, incluso ciertas funciones del cerebro se encuentra bajo la influencia de ellas (Cahill, 2006). Muchas funciones neuronales y conductuales se ven afectadas o reguladas por las hormonas, incluyendo el estado de ánimo, la función cognitiva, la regulación de la presión arterial, la coordinación motora, el dolor y la sensibilidad a los opioides. Anatómicamente existe muy poco dimorfismo sexual en el cerebro de humanos, y la mayoría de estas diferencias se encuentran principalmente en los patrones de conectividad de ciertas regiones cerebrales, y aún más notables, en mecanismos neuroquímicos y moleculares (McEwen & Milner, 2017).

En NPC poco se ha hablado sobre las diferencias que pueden presentarse entre ambos sexos; sin embargo, de lo reportado en el modelo murino, los resultados muestran que estas diferencias se ven tanto en la patología, en la supervivencia (Cognoux et al., 2020), así como en la respuesta al tratamiento (Houben et al., 2020); mientras que en el humano no se ha evidenciado una diferencia en supervivencia.

Dado que la respuesta hormonal es considerada como la posible causa que explica dichas diferencias y considerando además que el colesterol es el sustrato en la síntesis de hormonas esteroideas y puede activar la respuesta inflamatoria (Houben et al., 2020), se podría esperar una diferencia entre los sexos en NPC.

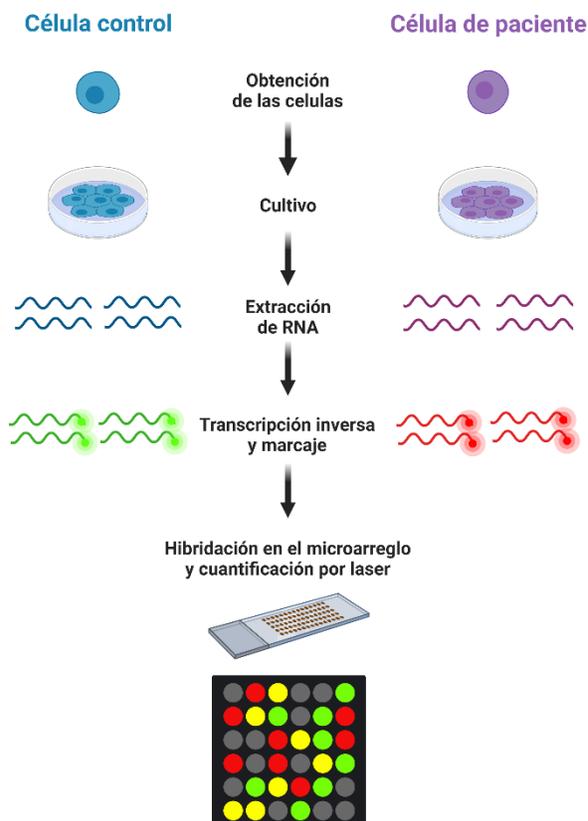
Por ejemplo, en un estudio del perfil lipídico de 34 pacientes de NPC (18 hombres y 16 mujeres) con rangos de edad de 1.5 a 45 años encontraron diferencias significativas con respecto a la población control cuando además de dividir a los pacientes por sexo, los dividían por rangos de edad: menores (niñas, niños) o mayores de 14 años (mujeres, hombres). Entre los resultados encontraron que los niveles del colesterol total fueron significativamente menores en niñas y hombres con NPC, pero no fue así para niños y mujeres; además, los niveles de LDL fueron significativamente menores en niñas, hombres y mujeres con NPC, mientras que en el caso de los niños no hubo diferencias significativas; también los niveles de triacilgliceroles fueron significativamente mayores en los niños, niñas y mujeres con NPC, exceptuando a los hombres. Y de forma general, en todos los pacientes de NPC los valores de HDL fueron significativamente menores. También reportaron una asociación inversa significativa entre los niveles de HDL y la edad de muerte de los pacientes de NPC (n = 5, para este caso) (Garver et al., 2010).

Relacionado con las diferencias neuroquímicas está el caso de dos hermanos, un hombre y una mujer, con la misma mutación en el gen *NPC1*, una mutación que se ha relacionado con el fenotipo juvenil y usualmente presenta síntomas parecidos a la esquizofrenia. A los 16 años el varón presentó psicosis y a los 25 años comenzó con alteraciones cognitivas y motoras, mientras que su hermana mostró alteraciones menos severas y los primeros síntomas después de los 25 años, además de una mejor respuesta a los tratamientos (Walterfang et al., 2009). En un principio ambos casos fueron diagnosticados con esquizofrenia, sin ver mejoras tras el tratamiento se realizó el diagnóstico correcto, señalando de nuevo la importancia del reconocimiento de estas enfermedades raras para el correcto diagnóstico de las mismas y la búsqueda de biomarcadores. Las nuevas tecnologías, como la secuenciación de última generación más los enfoques “-oma” (metabólicos, genómicos y proteómicos), han tenido un gran impacto en la caracterización biológica, desarrollo de herramientas de diagnóstico e identificación y validación de nuevos objetivos terapéuticos.

### 2.3 Generalidades del análisis de la expresión génica mediante microarreglos de expresión y sus aplicaciones en el área biomédica

Una de las primeras respuestas de la célula ante un cambio en el medio, el ciclo celular, diferenciación celular, adaptación, estrés, etc., consiste en la regulación de la transcripción, la cual implica el “encendido” o “apagado” de cierto tipo de genes para su posterior traducción. El estudio de la expresión génica permite conocer en qué condiciones un gen está activado y por lo tanto se transcribe a RNA mensajero para pasar a otro nivel de regulación y finalmente a la traducción de la proteína. En la actualidad hay muchas formas de estudiar la regulación génica a diferentes niveles dependiendo de la pregunta inicial: microarreglos, Northern blot, RNA-seq y PCR.

En los estudios de microarreglo se extrae el RNA de las células control y células problema, después el mRNA se retro-transcribe a cDNA usando ácidos nucleicos etiquetados con una molécula que emite fluorescencia cuando se forma la doble cadena de DNA. El microarreglo consta de miles de pozos en un arreglo cuadrado, en cada pozo hay una gran cantidad de copias de un gen en particular las cuales van a hibridar con el cDNA de las muestras, en esta técnica se mide la cantidad del transcrito con la intensidad y/o color de la fluorescencia (fig. 5).



**Figura 5. Metodología para la obtención de un microarreglo de expresión,** se comparan las muestras control y muestras problema. Imagen elaborada en BioRender.

En la actualidad existen más de 2 millones de datos de microarreglos de expresión de células y tejidos humanos que son de dominio público y se encuentran en el repositorio GEO o *Gene Expresión Omnibus* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), provenientes de varias plataformas (Wu & Witten, 2019). GEO hace accesible esta información para que cualquier persona pueda descargarlo con los datos en crudo o analizarlo mediante GEO2. El análisis de microarreglos es otra herramienta en el estudio de enfermedades ya que permite encontrar patrones de expresión de genes característicos de un tejido o condición patológica.

Los microarreglos se basan en la hibridación de los ácidos nucleicos, evaluando al mismo tiempo la presencia de miles de genes en una condición (Mirnics et al., 2001) y por lo tanto se genera una gran cantidad de información que, usando herramientas bioinformáticas, sirve para encontrar desde patrones en el cambio de regulación de varios genes, hasta el estudio de mecanismos regulatorios, funciones celulares y vías metabólicas características de las muestras analizadas. En el contexto de salud humana y tratamientos, el conocimiento obtenido en estos patrones multigénicos puede ayudar a determinar las causas y consecuencias de enfermedades, así como identificar genes para uso diagnóstico (biomarcadores) y terapéutico (Lockhart & Winzeler, 2000).

### **3. HIPÓTESIS**

Existen diferencias significativas en la expresión de genes involucrados en diversas funciones como tráfico vesicular, metabolismo de lípidos, muerte celular, así como vías de señalización y factores de crecimiento de células somáticas (fibroblastos) provenientes de pacientes con la enfermedad de Niemann Pick con respecto a las células obtenidas de los sujetos control.

### **4. JUSTIFICACIÓN**

La enfermedad de Niemann-Pick tipo C es una entidad patológica que afecta al sistema neuro-visceral, que se presenta baja prevalencia y heterogeneidad en su sintomatología, lo cual ha dificultado su estudio, diagnóstico y tratamiento. Por estas razones, el enfoque de este trabajo residió en determinar a través de ensayos *in silico* aquellas diferencias moleculares entre células somáticas provenientes de pacientes y sujetos control para posteriormente proponer algunas biomoléculas como posibles biomarcadores, que permitan lograr un diagnóstico más eficiente y puedan constituir nuevos blancos terapéuticos. Las herramientas que se utilizaron fueron el análisis de bases de datos de microarreglos a través de técnicas bioinformáticas en donde se esperaba encontrar vías enriquecidas en diferentes procesos celulares tales como muerte, supervivencia y autofagia.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

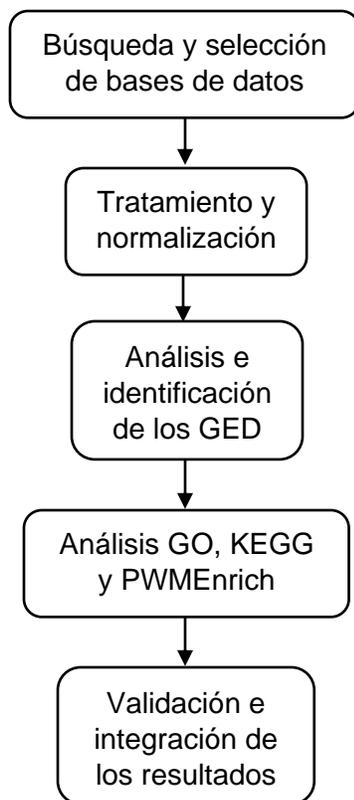
Evaluar el patrón de expresión diferencial en células somáticas (fibroblastos) de pacientes con la enfermedad de Niemann Pick vs sujetos control mediante el análisis bioinformático de bases de datos de microarreglos de RNA y detectar las posibles alteraciones en vías de señalización y factores de crecimiento como potenciales biomarcadores de esta enfermedad neurodegenerativa.,

### **5.1 Objetivos particulares**

- Análisis *in silico* de genes de expresión diferencial de NPC en bases de datos de microarreglos de RNA
- Analizar las vías de muerte celular en arreglos de expresión de la enfermedad de NPC.
- Analizar las vías de señalización relacionadas con factores de crecimiento y su impacto de las vías de viabilidad celular.
- Desarrollar interactomas (análisis de redes) para interpretar los cambios de expresión diferencial relacionados con la enfermedad de Niemann Pick.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Diseño experimental



**Figura 6. Esquema del diseño experimental.** Esquema representativo introductorio de la metodología explicada a continuación.

### 6.2 Búsqueda de bases de datos de microarreglos de RNA de células de pacientes con NPC

Se trabajó con una base de datos alojada en el repositorio Gene Expression Omnibus o GEO2 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) del Centro Nacional de Información Biotecnológica o NCBI (por sus siglas en inglés). La base de datos referida tiene la clave de acceso GSE124283, compartida en la red por Hetmanczyk y colaboradores (Hetmanczyk-Sawicka et al., 2020). Dicha base de datos fue obtenida a partir del microarreglo Genechip Illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip, proveniente de cultivos de fibroblastos de 46 individuos: 22 controles (13 hombres y 9 mujeres) y 24 enfermos con NPC (12 hombres y 12 mujeres) de los cuales 16 de los enfermos padecían de la variante infantil, 6 de la juvenil y 2 de la de adultos.

Se obtuvo el perfil de expresión en crudo, se trató con el paquete lumi y Limma de R Bioconductor (<https://www.bioconductor.org/>) y el software estadístico R (versión 4.0), se realizó la corrección de fondo y normalización. La normalización de un microarreglo se basa en dos situaciones, la primera es que la mayor parte de los genes no se están expresando en ninguna de las condiciones y la segunda es que en los genes que si están expresados la mayoría tendrá una expresión promedio y sin variación ante las diferentes condiciones, mientras que un menor número de genes aumentará o disminuirá su expresión. En la normalización de los datos también se busca eliminar el sesgo experimental entre las muestras y obtener los datos al mismo nivel para entonces poder compararlos mediante diferentes tipos de análisis estadísticos.

### **Análisis de la expresión diferencial**

Después de normalizar la base de datos el siguiente paso es encontrar los genes expresados diferencialmente por el método empírico de Bayes con el paquete limma de Bioconductor/R (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html>); limma usa la prueba t-test la cual arroja la variación promedio de cada gene entre dos grupos y si esa expresión diferencial es significativa (valor-p), en este caso los grupos son las células de pacientes con NPC vs la de los individuos controles. El paquete lima también introduce el análisis de Benjamini-Hochberg para corrección múltiples pruebas para evitar a los falsos positivos que hayan salido significativos (valor-p ajustado). Los resultados de la expresión diferencial se muestran en un mapa de calor, elaborado con el paquete heatmap.2 y en un gráfico de volcán realizado con EnhancedVolcano, ambos paquetes de R.

### **6.3 Análisis del enriquecimiento de ontología de genes o *gene ontology* (GO)**

Los resultados del gene ontology se obtuvieron a partir del paquete topGO de R (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/topGO.html>), para este análisis se tienen que seleccionar dos objetos, un universo de genes y la selección de los genes dentro de este universo que se van a utilizar para encontrar a los GO enriquecidos. En topGO se pueden aplicar diferentes estadísticas de prueba, en este proyecto se usó la prueba de Fisher.

De la base de datos se seleccionaron los genes expresados diferencialmente con valor-p ajustada menor a 0.05 como universo y para la segunda selección se eligieron los genes con un *fold change* (FC) o valor de cambio mayor que 0 para los que se regularon positivamente y menor que 0 los regulados negativamente.

Para cada uno de los grupos de genes el GO da 3 resultados que describen a cada grupo, según sea el caso, entonces para estos resultados se seleccionó la función molecular (MF), componente celular (CC) y proceso biológico (BP) enriquecidos significativamente. En estos resultados se busca una concordancia con el significado biológico de la enfermedad y sus afectaciones y entre los 3 grupos: MF, CC y BP; este paso sirve para comenzar a limitar el análisis hacia vías o funciones de interés.

#### **6.4 Análisis del enriquecimiento de vías de señalización**

Se usó la función `kegga` del paquete de `limma` de R para el análisis de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), KEGG obtiene las vías del KEGG a partir de la página oficial del KEGG. Se identificaron las vías de señalización enriquecidas entre los genes expresados diferencialmente y se usó la prueba de Fisher para el cálculo de significancia, para este caso se usaron los resultados con un valor-p <0.05. Para este análisis solo se seleccionaron a los genes expresados diferencialmente sin separarlos por expresión y se eligió el top 10 con respecto a su valor de significancia o valor-p.

#### **6.5 Análisis del enriquecimiento de sitios de unión a factores de transcripción**

Para la búsqueda de factores de transcripción que regulen a los genes expresados diferencialmente de nuestra base de datos se usó el paquete de Bioconductor, `PWMErich` (<https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/PWMErich.html>). `PWMErich` identifica en la secuencia no codificante de la lista de genes los sitios unión de DNA en donde se unen reguladores o factores transcripcionales y se arrojan a los enriquecidos. Para esto se seleccionaron 1000 pares de bases (pb) río arriba del grupo de genes que aumentaron su transcripción y los que la disminuyeron, esto con el fin de encontrar el o los factores de transcripción principales o importantes que estén posiblemente regulando a los genes que tienen una expresión diferencial en nuestra base de datos.

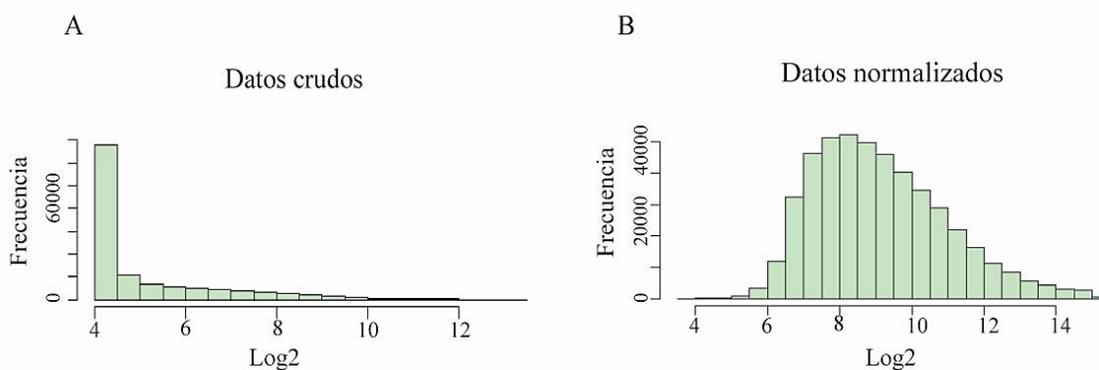
#### **6.6 Análisis de las vías de muerte celular en arreglos de expresión de la enfermedad de NPC**

Se obtuvieron los genes expresados diferencialmente que estaban dentro de los GO enriquecidos relacionados con muerte celular, supervivencia y/o proliferación y se buscó gen por gen la vía con la que estaba relacionado y su interacción con otros genes, para entender mejor las vías de muerte celular que se estaban activando en estas células o bien en la enfermedad. En esta metodología se usó también la página web del KEGG: <https://www.genome.jp/kegg/> para la identificación de estas vías.

## 7. RESULTADOS

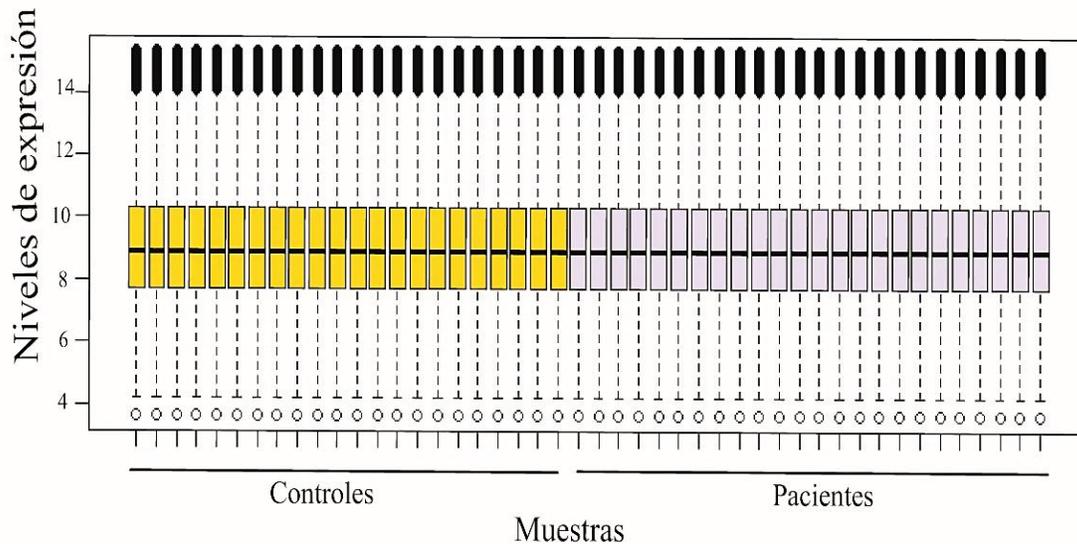
### 7.1 Tratamiento de la base de datos

La base de datos se descargó en crudo y se trató con el paquete de R Bioconductor, primero se hizo una corrección de fondo y después la normalización. Con la normalización se busca obtener una expresión de los genes con distribución normal, hay diferentes formas de visualizar estos resultados, por ejemplo, mediante un histograma y/o la gráfica de cajas y bigotes, en la primera se agrupan a todos los sujetos y en el otro tipo de gráfica se visualizan por sujeto. En la figura 7 se muestra el histograma con la distribución de los datos antes (fig. 7A) y después (fig. 7B) de su tratamiento, en la figura 6B se observa como los datos tienden a una distribución normal.



**Figura 7. Histograma de la distribución de los datos normalizados.** (A) Después de la corrección de fondo, pero antes de la normalización y (B) después de la normalización, en este caso la media de la expresión de los genes de la población es 8.5 y el resto se distribuye a los extremos de la media.

Otra forma de visualizar la normalización de los datos es mediante el gráfico de cajas y bigotes (fig. 8) pero en este tipo de gráfico se ve la distribución de los cuantiles de cada una de las muestras. Por lo tanto, esperamos a partir de todas las muestras una distribución normal, una sola mediana poblacional definida, en donde se encuentren la mayoría de los datos con misma distribución de expresión a ambos lados y menos valores en los extremos.

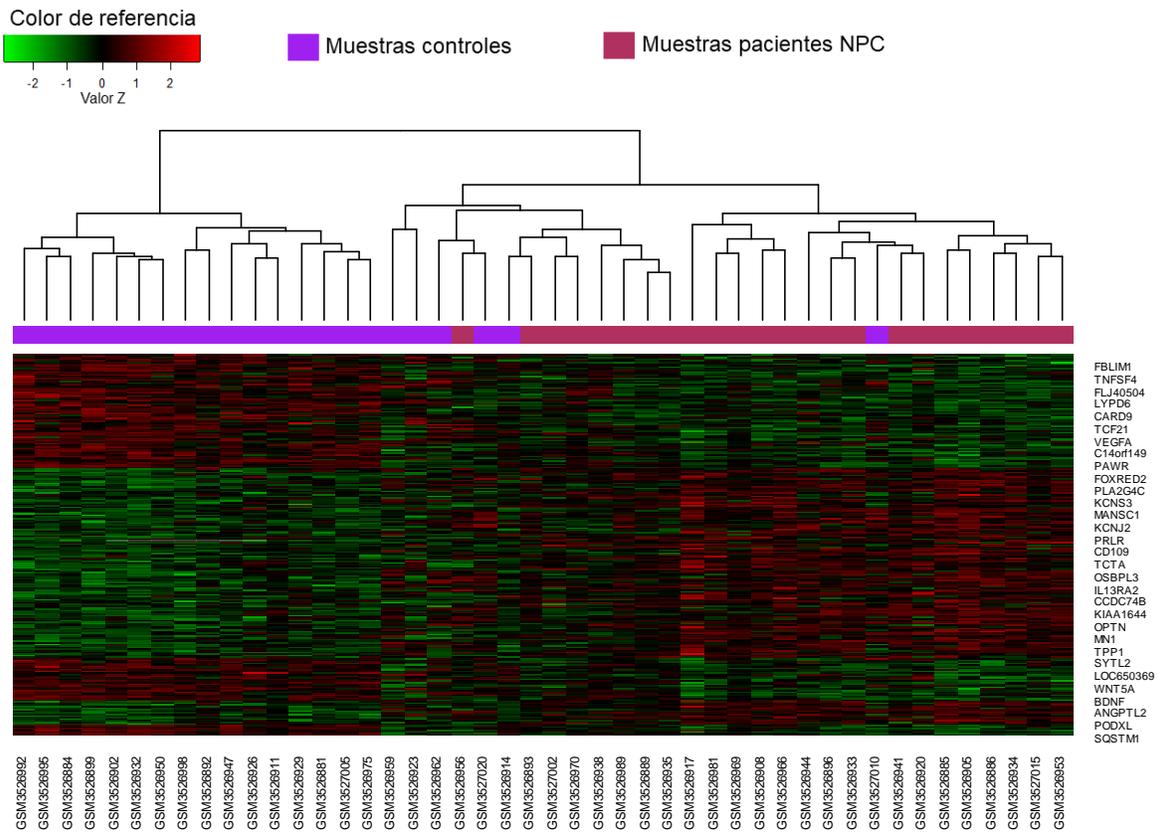


**Figura 8. Gráfico de cajas y bigotes de cada muestra**, sobre el eje de las abscisa está el nivel de expresión y sobre las ordenadas las muestras. De igual forma la media de la población es 8.5, vemos que tanto los controles como pacientes tienen la misma distribución y por lo tanto son comparables entre ellos.

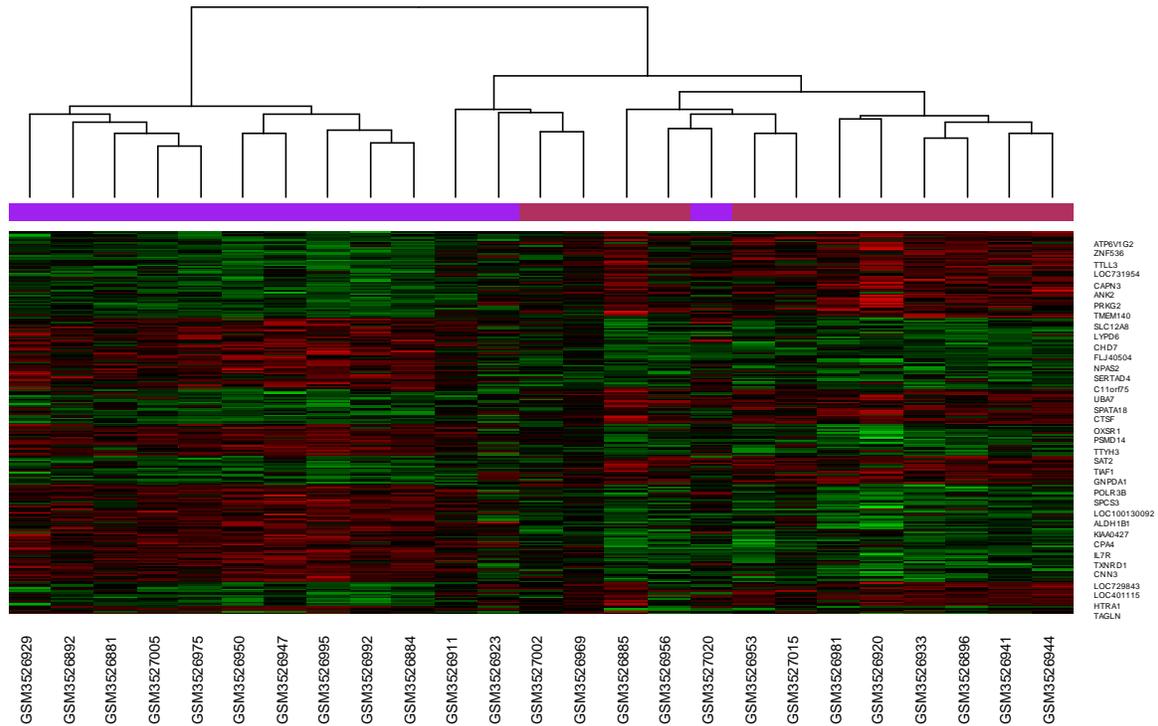
## 7.2 Análisis de la expresión diferencial

Después del tratamiento de la base de datos, se hizo la búsqueda de los genes expresados diferencialmente por el método empírico de Bayes con el paquete limma; una vez obtenidos los genes expresados diferencialmente existen varias formas de visualizarlos, y la primera que se usó en este reporte fue el heatmap. En el heatmap o mapa de calor se grafica la expresión de los genes expresados diferencialmente (GED) de cada una de las 46 muestras en un gradiente de color, y el paquete por sí solo acomoda las muestras jerárquicamente basado en la semejanza de expresión. Al analizar la base de datos completa y después de obtener el mapa de calor vimos que los GED no representaban a la enfermedad pues no se compartía la expresión entre las muestras de pacientes, sino que había expresión similar entre controles y pacientes; por eso, en la figura 9A las muestras se acomodaron desordenadamente (fig. 9A). Posterior a estos resultados, se analizaron la base de datos separando a hombres y mujeres y al encontrar resultados más sólidos se optó por seguir analizándola de esta manera. Por ello, a partir de aquí se muestran ambos resultados, siendo la figura 9B el mapa de calor de solo los hombres y la 9C de solo las mujeres.

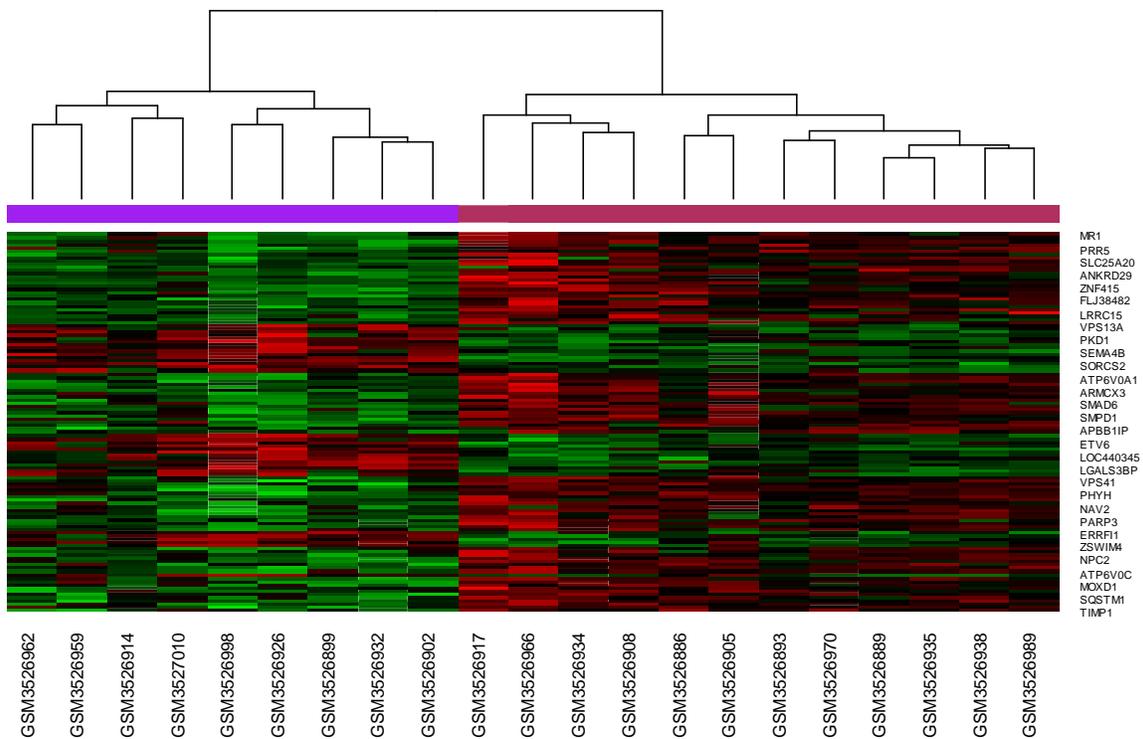
A



B



C



**Figura 9. Mapas de calor con la jerarquización de las muestras de:** (A) la base de datos completa, (B) base de datos de sólo hombres y (C) base de datos de sólo mujeres. Sobre el eje de las abscisas están los genes expresados diferencialmente y sobre las ordenadas las muestras, en la parte superior está el dendograma que muestra la relación de expresión entre las muestras, ordenadas por semejanza.

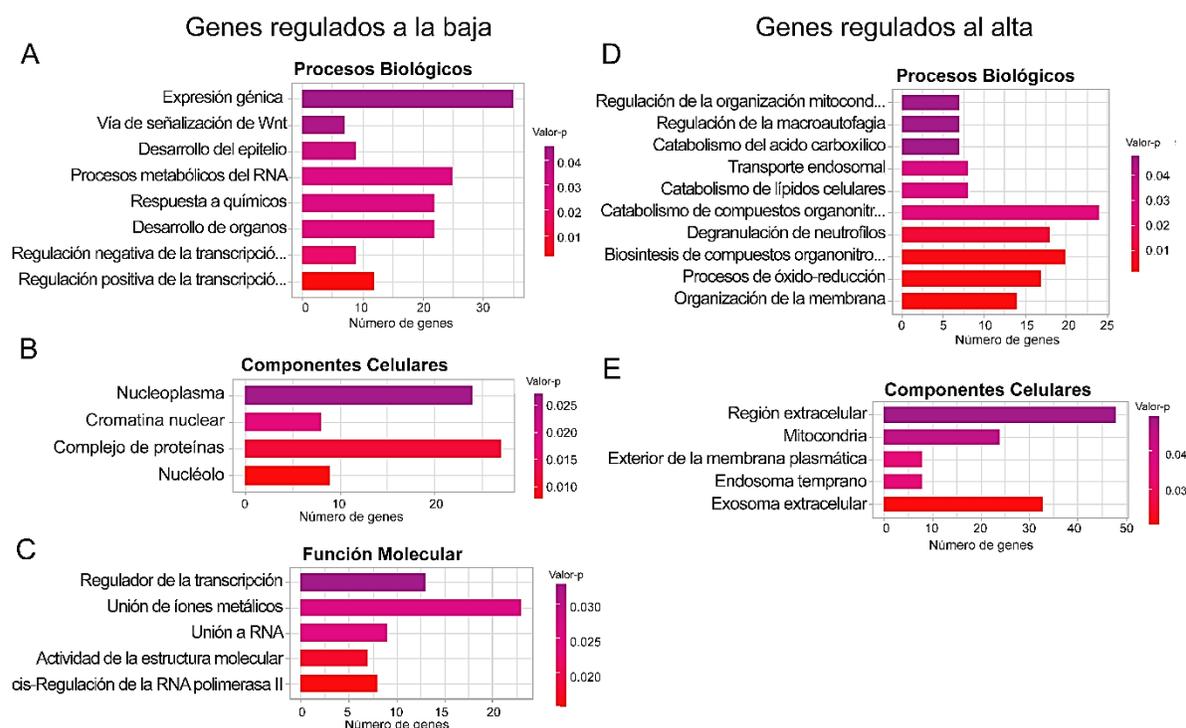
El segundo gráfico que usamos para visualizar los resultados fue el diagrama de volcán (*volcano plot*) (fig. 10), en donde se muestra la expresión diferencial en el valor de cambio o FC de cada uno de los genes entre los pacientes con NPC contra los controles y que tanto esta diferencia es significativa (valor-p ajustado). Nosotros definimos a los genes expresados diferencialmente con un valor-p ajustado  $\leq 0.05$  y FC mayor a 0.5 o menor a -0.5, de esta forma se obtuvieron de los datos de las mujeres 107 genes que aumentaron su transcripción y 52 que la bajaron (fig. 10A); y de los hombres 286 genes que aumentaron su transcripción y 235 que la bajaron (fig. 10B).



### 7.3 Los resultados del GO de las mujeres relacionados con la enfermedad de NPC

Entre los GO enriquecidos de los genes regulados negativamente en **función molecular** se encuentran las vías de regulación transcripcional, unión al RNA, unión a iones metálicos, entre otros (fig. 11A); entre los **componentes celulares** se hallaron el núcleo y la cromatina (fig. 11B), finalmente, entre los **procesos biológicos** se encontraron la regulación de la expresión génica, metabolismo del RNA y la vía de señalización de Wnt, entre otros (fig. 11C).

De los regulados positivamente encontramos en **procesos biológicos**: regulación de la macroautofagia (tabla 2), transporte endosomal, catabolismo de lípidos (tabla 3), procesos de oxido-reducción, degranulación de neutrófilos, por mencionar algunos (fig. 11D); los **componentes celulares** enriquecidos fueron el endosoma, mitocondria, región extracelular y membrana plasmática, entre otros (fig. 11E).



**Figura 11. Resultados del topGO de los GED de las mujeres, GO enriquecidos en los genes a la baja en (A) Procesos Biológicos, (B) Componentes Celulares y (C) Función Molecular; GO enriquecidos de los genes a la baja en (D) Procesos Biológicos y (E) Componentes Celulares. Todos los GO fueron significativamente enriquecidos como lo muestra el gradiente de color que indica los valores del valor-p.**

Se añadieron tablas de los procesos biológicos enriquecidos que ya se han reportado en la enfermedad con los genes que participan en los mismos, su regulación en valor de fold change (F.C) o valor de cambio y su función.

<b>Tabla 2. Genes que incluyen en el GO:0016241. Regulación de la macroautofagia,</b>		
<b>Gen</b>	<b>F.C.</b>	<b>Función</b>
<i>ATP6V0A1</i>	0.80	Subunidad de una enzima que se encarga de la acidificación de organelos intracelulares.
<i>ATP6V0C</i>	0.57	Subunidad de una enzima que se encarga de la acidificación de organelos intracelulares.
<i>ATP6V1A</i>	0.73	Subunidad de una enzima que se encarga de la acidificación de organelos intracelulares.
<i>FEZ1</i>	0.57	Involucrado en el transporte retrogrado de la mitocondrial al del soma al axón o dendritas. Regula morfología celular, crecimiento de dendritas y soma.
<i>GBA</i>	0.68	Este gen codifica a una proteína de membrana lisosomal que juega un papel central en la degradación de lípidos e intercambio de membranas.
<i>PINK1</i>	0.69	Proteína cinasa serina/treonina ubicada en la mitocondria, protege a la célula del estrés inducido por disfunción mitocondrial.
<i>VPS35</i>	0.77	Proteína vacuolar involucrada en el transporte retrogrado de endosomas a Golgi.
<i>SQSTM1</i>	0.45	Receptor p62/SQSTM1: interacciona con la maquinaria de autofagia mTOR y vías de señalización de respuesta antioxidante, inflamación y metabolismo.

\*Algunos de estas funciones se obtuvieron de Genecards: <https://www.genecards.org/> otras de artículos publicados en Pubmed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

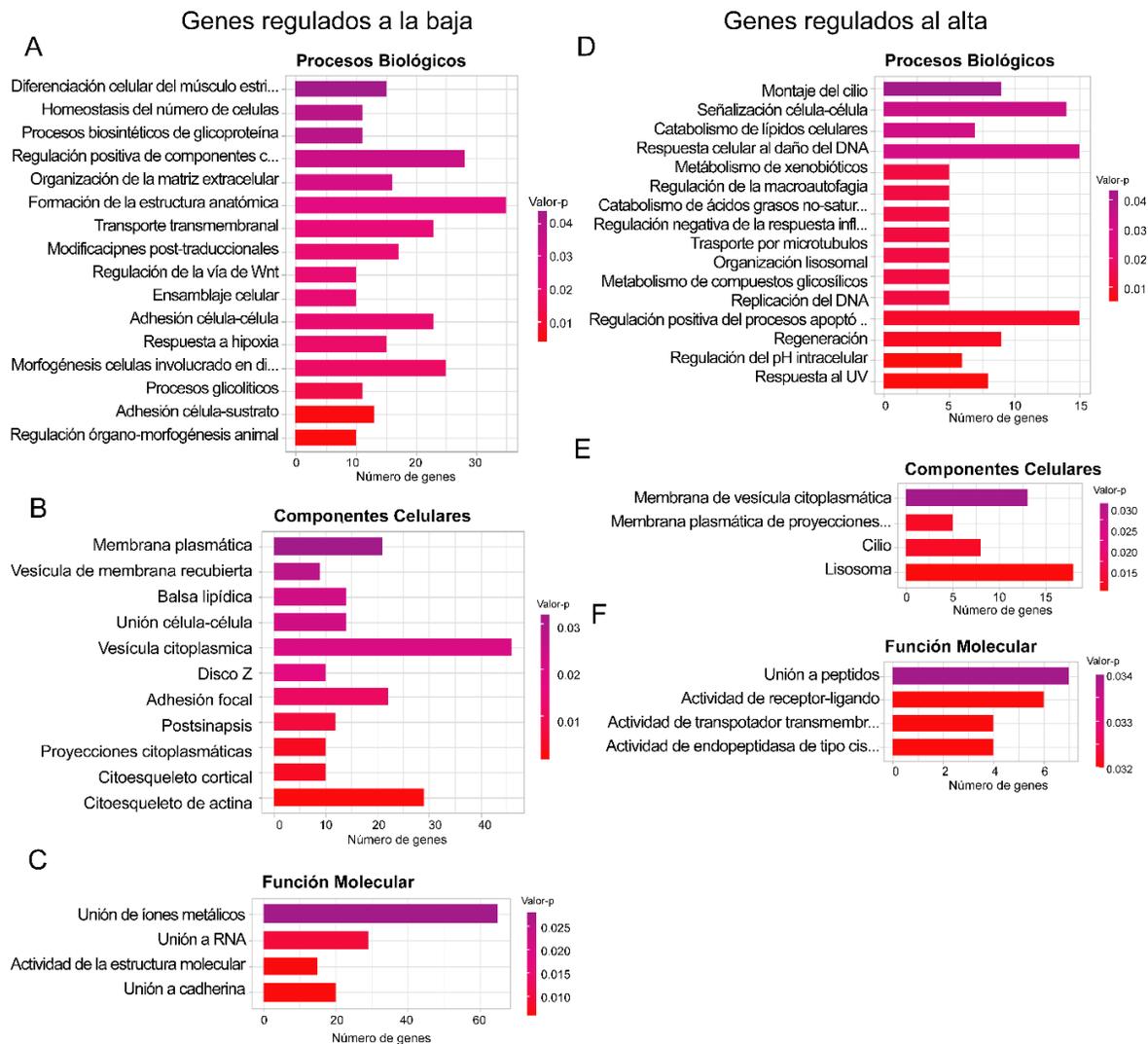
<b>Tabla 3. Genes que incluyen en el GO:0044242. Proceso catabólico de lípidos celulares</b>		
<b>Gen</b>	<b>F.C.</b>	<b>Función</b>
<i>ACAT1</i>	0.66	Cataliza el último paso de la beta-oxidación, esterifica al colesterol libre
<i>CROT</i>	0.55	Participa en la beta-oxidación, convierte el producto final en un éster de carnitina.
<i>DAGLB</i>	0.49	Hidroliza DAGs de forma calcio-dependiente.
<i>GBA</i>	0.68	Enzima del lisosoma que cataliza la hidrólisis de glucosilceramidas en ceramidas libres.
<i>HEXB</i>	0.64	Subunidad beta de la Hexosaminidasa. Cataliza la degradación del gangliósido GM2.
<i>PHYH</i>	0.87	Proteína peroxisomal involucrada en la alfa-oxidación de ácidos grasos.
<i>PLA2G15</i>	0.59	Fosfolipasa dependiente de calcio, homeostasis de glicerolfosfolipidos, grupos acilos y otros lípidos en compartimentos celulares.
<i>SMPD1</i>	0.79	Esfingomielinasa ácida lisosomal que convierte la esfingomielinina en ceramida.

\*Algunos de estas funciones se obtuvieron de Genecards: <https://www.genecards.org/> otras de artículos publicados en Pubmed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

#### 7.4 Los resultados del GO de los hombres relacionados con la enfermedad de NPC

Para identificar el significado biológico de los genes expresados diferencialmente se realizó el análisis GO de los genes expresados al alta y los de a la baja (fig. 12) de la base de datos de solo los hombres. De los 235 genes expresados a la baja se obtuvo en **función molecular** unión al RNA, unión a Cadherina, unión a iones metálicos, entre otros (fig. 12A). Entre los **componentes celulares** enriquecidos se estuvieron membrana vesicular, balsas lipídicas, citoesqueleto y uniones célula-célula (fig. 12B); en **procesos biológicos**: organización de la matriz extracelular, procesos glucolíticos (fig. 13), adhesión y uniones célula-célula y la vía de señalización de Wnt, entre otros (fig. 12C).

De los 286 genes regulados positivamente (a la alta) encontramos en **procesos biológicos**: regulación positiva de la apoptosis (tabla 4), metabolismo de ácidos grasos no saturados (tabla 5), organización del lisosoma, regulación de procesos inflamatorios y regeneración, por mencionar algunos (fig. 12D). De los **componentes celulares** enriquecidos estuvieron el lisosoma, membrana de vesículas, membrana plasmática y cilio o citoesqueleto (fig. 12E); en **función molecular** están: unión a RNA, unión a péptidos y ligandos de receptores, por mencionar algunos (fig. 12F).



**Figura 12. Resultados del topGO de los GED de los hombres, GO enriquecidos en los genes a la baja en (A) Procesos Biológicos, (B) Componentes Celulares y (C) Función Molecular; GO enriquecidos de los genes a la baja en (D) Procesos Biológicos y (E) Componentes Celulares. Todos los GO fueron significativamente enriquecidos como lo muestra el gradiente de color que indica los valores del valor-p.**

Se añadieron tablas de los procesos biológicos enriquecidos que ya se han reportado en la enfermedad con los genes que participan en los mismos, su regulación en valor de fold change (F.C) o valor de cambio y su función

Tabla 4. Genes que incluyen en el GO:0043065 Regulación positivo del procesos apoptótico		
Gen	F.C.	Función
AKR1C3	1.62	Moonlights como un receptor coactivador de androgenos y previene degradación por unión a ubiquitina. Su sobreexpresión promueve supervivencia celular por activación NF-kB y STAT3.

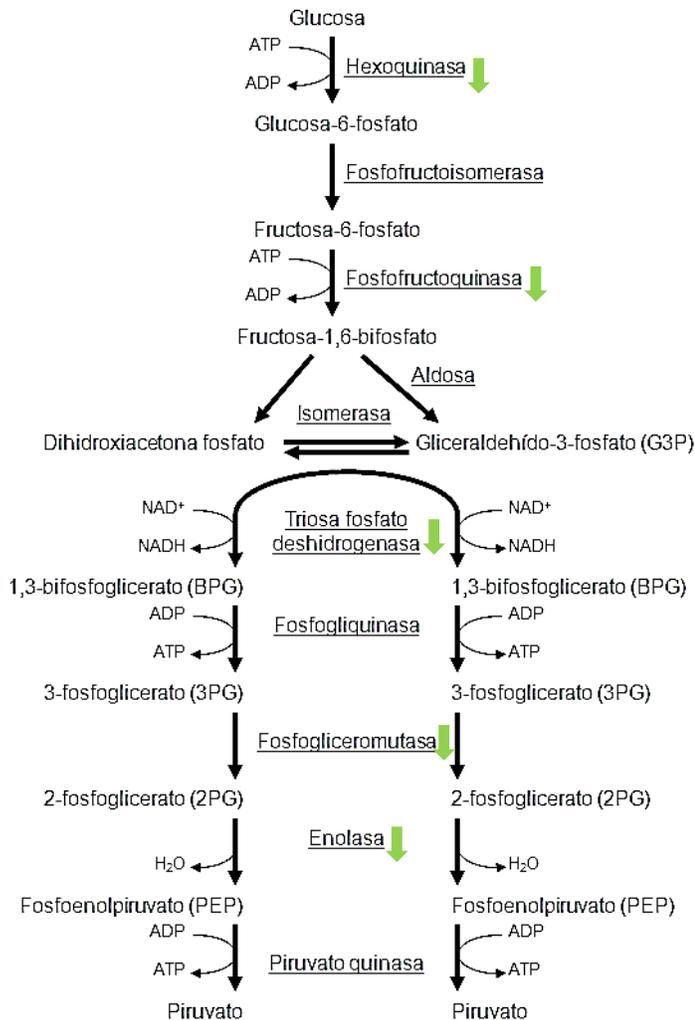
<i>ARHGEF3</i>	1.26	Promueve la regeneración muscular mediante la activación de la autofagia
<i>GRN</i>	0.5	Progranulina es un factor de respuesta al estrés en fibroblastos ante hipoxia y acidosis. Tiene un papel importante en la homeostasis del lisosoma.
<i>IFIT2</i>	0.59	Modula la apoptosis o proliferación. IFIT2 sobrerexpresado lleva a la activación de caspase-3.
<i>PYCARD</i>	0.76	Es un componente importando del inflamosoma. Estructuralmente, es uno de los motivos de muerte, CARD interacciona con caspasa-1.
<i>SLIT2</i>	0.84	Slits son un grupo de glicoproteínas secretoras que juegan un papel en la migración celular. También han sugerido que <i>Slit2</i> puede ser un gen supresor de tumores.
<i>SQSTM1</i>	0.48	p62/SQSTM1: interacciona con la maquinaria de autofagia y otras vías de señalización de respuesta antioxidante, inflamación y metabolismo.
<i>TNFSF12</i>	0.59	Forma parte de la superfamilia de factor de necrosis tumoral (TNF), puede activar caspasa-8 o 9 y llevar a la apoptosis intrínseca o extrínseca.

\*Algunos de estas funciones se obtuvieron de Genecards: <https://www.genecards.org/> otras de artículos publicados en Pubmed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

<b>Tabla 5. Genes que incluyen en el GO:0044242. Proceso catabólico de lípidos celulares</b>		
<b>Gen</b>	<b>F.C.</b>	<b>Función</b>
<i>AKR1C3</i>	1.62	Moonlight como un receptor coactivador de androgenos y previene degradación por unión a ubiquitina. Su sobreexpresión promueve supervivencia celular por activación NF-κB y STAT3.
<i>AUH</i>	0.42	Es el paso crítico en la vía de degradación de la leucina. Se localiza en la mitochondria.
<i>IDH1</i>	0.67	Isocitrato deshidrogenasa, participa en el rompimiento de grasas para la obtención de energía, en la conversión del isocitrato a 2-cetoglutarato.
<i>PHYH</i>	0.64	Es responsable de uno de los primeros pasos del rompimiento del ácido fitánico durante la alfa-oxidación.
<i>PLA2G4C</i>	0.87	Hidroliza glicerofosfolípidos hacia ácidos grasos libres y lisofosfolípidos. Y participa en la formación de balsas lipídicas.
<i>PNPLA7</i>	0.69	Promueve la hidrólisis de lisofosfatidilcolina e interactúa con las balsas lipídicas.

\*Algunos de estas funciones se obtuvieron de Genecards: <https://www.genecards.org/> otras de artículos publicados en Pubmed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

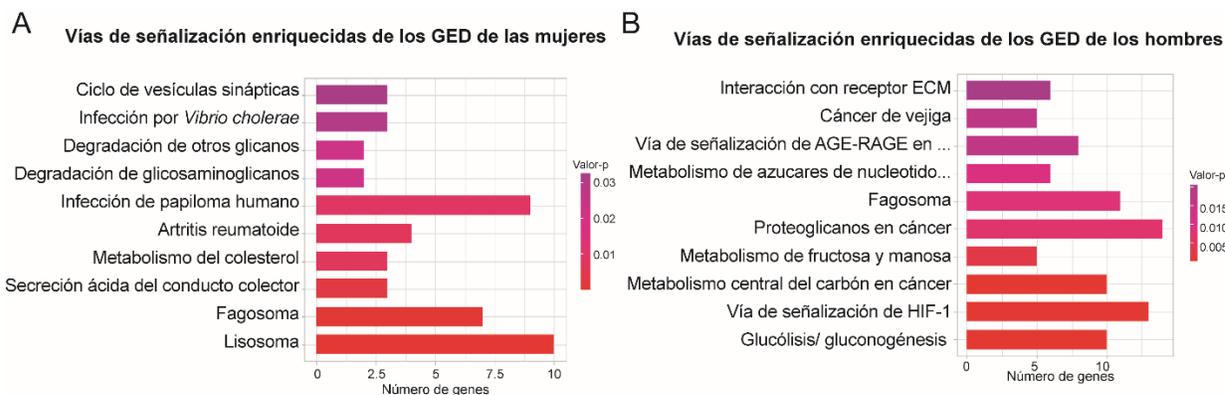
Uno de los GO enriquecidos en los genes a la baja fue el de procesos glucolíticos, con alrededor de 12 genes que participan en diferentes vías, una de ellas fue la glucólisis (fig. 13) en donde se encontraron 5 genes participando en ella.



**Figura 13. Vía metabólica de la glucólisis.** Con flechas verdes se señalan a los genes que disminuyeron su transcripción en la base de datos de hombres, de los cuales 5 se traducen a las enzimas que forman parte de esta vía, dos de ellas: la hexoquinasa y la fosfofructocinasa, son dos de las tres principales que regulan la vía. Figura obtenida de la web: <http://fisiolvegetal.blogspot.com/2012/11/respiracion-i-glucolisis.html>

### 7.5 Vías de señalización enriquecidas para ambas bases de datos

Para el KEGG se incluyeron todos los GED sin dividirlos por la regulación positiva o negativa, con el objeto de visualizar las vías alteradas de manera más general. En el caso de las mujeres, se observaron vías relacionadas con el fagosoma, lisosoma, vesículas y metabolismo del colesterol. En el caso de los hombres se obtuvieron vías del fagosoma, interacción con la matriz extracelular, y metabolismo de glúcidos, entre otros. En este caso la única vía compartida entre ambos sexos fue la del fagosoma.



**Figura 14. Resultados del KEGG** de A) mujeres y B) hombres. Todos los resultados fueron significativamente enriquecidos como lo muestra el gradiente de color que indica los valores del valor-p.

## 7.6 Análisis de enriquecimiento de motivos de unión de la base de datos de mujeres

De los 107 genes que aumentaron su transcripción en la base de datos de las mujeres se seleccionaron a los 7 factores de transcripción enriquecidos significativamente que se unían a ellos. En la tabla 6 se añadieron su función, algunos de los GED que regulan y la frecuencia con la que apareció este motivo en las secuencias no codificantes.

Tabla 6. Resultados de PWMEnrich de la base de datos de las mujeres		
F.T	Función	%
<b>USF1</b>	Se expresa ubicuamente controla genes importantes en el metabolismo de glucosa y lípidos. Genes que regula: <i>VAT1</i> , <i>RAB3IL1</i> , <i>CD68</i> , <i>ATP6V0A1</i> , <i>GBA</i> , <i>SMPD1</i> , <i>PIK3IP1</i> , <i>SGK3</i> , <i>IL13RA2</i> , <i>ITGB5</i> , <i>MEGF6</i> , entre otros.	22
<b>RARA</b>	Receptor nuclear del ácido retinoico, regula genes implicados en el desarrollo, diferenciación, apoptosis, granulopoyesis y genes del reloj circadiano. Genes que regula: <i>VAT1</i> , <i>SMAD6</i> , <i>EGFR</i> , entre otros.	21
<b>TFEB</b>	Es el regulador maestro de la biogénesis y exocitosis lisosomal, autofagia, catabolismo de lípidos, metabolismo energético y respuesta inmune. Genes que regula: <i>VAT1</i> , <i>RAB3IL1</i> , <i>GBA</i> , <i>SGK3</i> , entre otros.	20
<b>TFAP2A</b>	Regula vías del desarrollo adecuado del ojo, la cara, la pared del cuerpo, las extremidades y el desarrollo del tubo neural. Genes que regula: <i>RAB3IL1</i> , <i>CD68</i> , <i>SMPD1</i> , <i>IL13RA2</i> , <i>ITGB5</i> , entre otros.	19
<b>TFE3</b>	Promueve la transcripción de genes rio-abajo del TGF- $\beta$ . Genes que regula: <i>CD68</i> , <i>ATP6V0A1</i> , <i>GBA</i> , <i>PIK3IP1</i> , <i>SGK3</i> , <i>IL13RA2</i> , <i>MEGF6</i> , <i>EGFR</i> , entre otros	19

<b>ATF3</b>	Este factor de transcripción se activa en cáncer y en respuesta al estrés. Genes que regula: <i>RAB3IL1</i> , <i>CD68</i> , <i>ATP6V0A1</i> , <i>IGFBP6</i> , <i>SMAD6</i> , <i>EGFR</i> , entre otros.	18
<b>ARNTL</b>	Es un factor de transcripción que activa genes del reloj circadiano, metabolismo, sueño, temperatura del cuerpo, presión sanguínea, endocrino, renal y cardiovascular. Genes que regula: <i>RAB3IL1</i> , <i>GBA</i> , <i>ACAT</i> , entre otros.	18

% Porcentaje de secuencias en el que se encuentra el motivo enriquecido.

\*Algunos de estas funciones se obtuvieron de Genecards: <https://www.genecards.org/> otras de artículos publicados en Pubmed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

Del mismo modo para los 52 genes que disminuyeron su transcripción se seleccionaron a los 6 factores de transcripción más enriquecidos que se unían a ellos. En la tabla 7 se añadió su función y algunos de los GED que regulan.

<b>Tabla 7. Resultados de PWMEnrich de la base de datos de las mujeres</b>		
<b>F.T</b>	<b>Función</b>	<b>%</b>
<b>NRL</b>	Se puede regular de manera redox-dependiente, se activa en dietas ricas en carbohidratos y bajas en grasa y puede activar a TGF- $\beta$ 1. Genes que regula: <i>PIK3IP1</i> , <i>LATS2</i> , <i>NETO2</i> , <i>IMPA2</i> , entre otros.	35
<b>ATF3</b>	Este factor de transcripción se activa en cáncer y en respuesta al estrés. Genes que regula: <i>PIK3IP1</i> , <i>CENPV</i> , <i>TCF7L1</i> , <i>NETO2</i> , <i>IMPA2</i> , <i>VEGFA</i> , entre otros.	33
<b>ATF4</b>	Regulador de procesos metabólicos, redox, respuesta integrada al estrés (ISR). Genes que regula: <i>PIK3IP1</i> , <i>NETO2</i> , <i>IMPA2</i> , entre otros.	33
<b>CEBPA</b>	Factor de transcripción que coordina proliferación, diferenciación de células madre mieloides, adipocitos, hepatocitos, entre otros. Genes que regula: <i>PIK3IP1</i> , <i>LATS2</i> , <i>TCF7L1</i> , <i>NETO2</i> , <i>IMPA2</i> , <i>ERRFI1</i> , entre otros.	30
<b>ARNTL</b>	Es un factor de transcripción que activa genes del reloj circadiano, metabolismo, sueño, temperatura del cuerpo, presión sanguínea, endocrino, renal y cardiovascular. Genes que regula: <i>PIK3IP1</i> , <i>LATS2</i> , <i>NETO2</i> , <i>IMPA2</i> , entre otros.	30
<b>MAX</b>	Está implicado en vías de proliferación, diferenciación y apoptosis. Genes que regula: <i>PIK3IP1</i> , <i>CENPV</i> , <i>LATS2</i> , <i>TCF7L1</i> , <i>NETO2</i> , <i>IMPA2</i> , <i>VEGF4</i> , entre otros.	26

% Porcentaje de secuencias en el que se encuentra el motivo enriquecido.

\*Algunos de estas funciones se obtuvieron de Genecards: <https://www.genecards.org/> otras de artículos publicados en Pubmed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

## 7.7 Análisis de enriquecimiento de motivos de unión de la base de datos de hombres

De los 286 genes que aumentaron su transcripción en las bases de datos de los hombres se seleccionaron a los 7 posibles factores de transcripción más enriquecidos y que los podrían estar regulando. En la tabla 8 se añadió su función y algunos de los GED que regulan.

<b>Tabla 8. Resultados de PWMEnrich de la base de datos de los hombres</b>		
<b>F.T</b>	<b>Función</b>	<b>%</b>
<b>FEZF2</b>	Represor de la transcripción. Tiene una función específica en las proyecciones neurales. Genes que regula: <i>KLF4</i> , <i>ATP6V0E2</i> , entre otros.	18
<b>HINFP1</b>	Represor de la transcripción. Genes que regula: <i>CAT</i> , <i>KLF4</i> , <i>NT5E</i> , <i>ATP6V0E2</i> , <i>EGFR</i> , entre otros.	17
<b>FOS</b>	Regulador de la proliferación y diferenciación; en algunos casos se ha asociado con la muerte celular por apoptosis. Genes que regula: <i>AKR1C3</i> , <i>GPX1</i> , <i>KLF4</i> , <i>RCAN2</i> , entre otros.	16
<b>ZMAT2</b>	Forma parte del complejo corte-empalme del RNA mensajero. Genes que regula: <i>TNFSF12</i> , <i>EGFR</i> , entre otros.	16
<b>TCF3</b>	Involucrado en la diferenciación neuronal y de la transición de mesénquima a epitelio. Genes que regula: <i>CTSK</i> , <i>ATP6V0E2</i> , entre otros.	16
<b>MYC</b>	Juega un papel en la progresión celular, apoptosis y transformación celular. Genes que regula: <i>ARHGEF3</i> , <i>GPX1</i> , <i>NT5E</i> , <i>EGFR</i> , <i>ATP6V1G2</i> , entre otros.	16
<b>BATF</b>	Controla la diferenciación de linajes de células inmune. Genes que regula: <i>PYCARD</i> , <i>CES2</i> , entre otros.	16

% Porcentaje de secuencias en el que se encuentra el motivo enriquecido.

\*Algunos de estas funciones se obtuvieron de Genecards: <https://www.genecards.org/> otras de artículos publicados en Pubmed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

Se repitió el mismo procedimiento para los 235 genes que disminuyeron su transcripción en la base de datos de los hombres se seleccionaron a los 7 posibles factores de transcripción enriquecidos significativamente que los podrían estar regulando. En la tabla 9 añadimos su función y algunos de los GED que regulan.

<b>Tabla 9. Resultados de PWMEnrich de la base de datos de los hombres</b>		
<b>F.T</b>	<b>Función</b>	<b>%</b>
<b>ATF3</b>	Este factor de transcripción se activa en cáncer y en respuesta al estrés. Genes que regula: <i>PAWR</i> , <i>NPC1</i> , <i>FLNB</i> , <i>TAGLN</i> , <i>WNT5A</i> , <i>NXN</i> , entre otros.	27
<b>CEBPA</b>	Factor de transcripción que coordina proliferación, diferenciación de células madre mieloides, adipocitos, hepatocitos, entre otros. Genes que regula: <i>PAWR</i> , <i>FLNB</i> , <i>TAGLN</i> , <i>SULF1</i> , <i>WNT5A</i> , <i>NXN</i> , entre otros.	26
<b>NRL</b>	Se puede regular de manera redox-dependiente, se activa en dietas ricas en carbohidratos y bajas en grasa y puede activar a TGF- $\beta$ 1. Genes que regula: <i>PAWR</i> , <i>NPC1</i> , <i>SULF1</i> , <i>NXN</i> , entre otros.	24
<b>ATF4</b>	Regulador de procesos metabólicos, redox, respuesta integrada al estrés (ISR). Genes que regula: <i>PAWR</i> , <i>NPC1</i> , <i>NXN</i> , entre otros.	24
<b>MAX</b>	Está implicado en vías de proliferación, diferenciación y apoptosis.	23

	Genes que regula: <i>PAWR, PGK1, TAGLN, SULF1, NXN, HK2</i> , entre otros.	
<b>ARNTL</b>	Es un factor de transcripción que activa genes del reloj circadiano, metabolismo, sueño, temperatura del cuerpo, presión sanguínea, endocrino, renal y cardiovascular. Genes que regula: <i>PAWR, SULF1, WNT5A, HK2</i> , entre otros.	23
<b>RARA</b>	Involucrado en la regulación del desarrollo, diferenciación, apoptosis y genes del reloj circadiano. Genes que regula: <i>PAWR, PGK1, TAGLN, MYH9, SLC2A1</i> , entre otros.	22

% Porcentaje de secuencias en el que se encuentra el motivo enriquecido.

\*Algunos de estas funciones se obtienen de Genecards: <https://www.genecards.org/> otras de artículos publicados en Pubmed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

### 7.8 Búsqueda de vías de muerte celular en arreglos de expresión de la enfermedad de NPC en los datos de mujeres

A diferencia de los datos que se obtuvieron de los hombres, en mujeres no se encontraron procesos biológicos en el topGO (fig. 11) ni vías en el KEGG (fig. 14) relacionadas con muerte celular por lo que se optó por la búsqueda individual de gen por gen dentro de los genes expresados diferencialmente. Se seleccionaron entonces genes que estuvieran involucrados en vías de señalización de muerte celular, proliferación, supervivencia y/o autofagia.

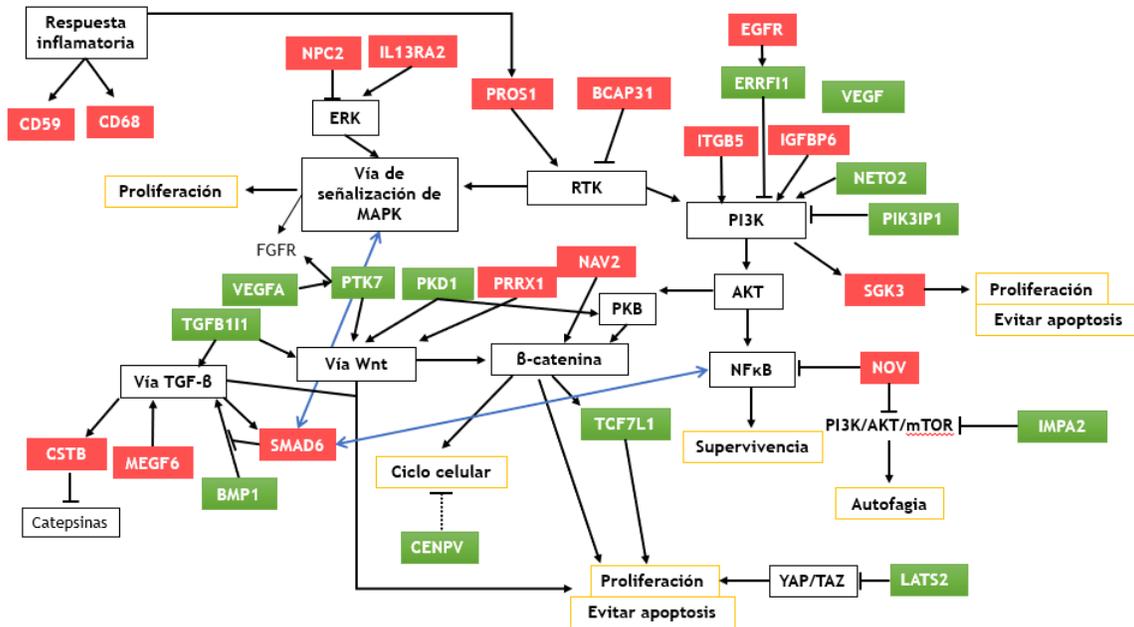
Para encontrar las vías en las que participaban los genes se buscaron en KEGG (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>) cada uno de los genes por separado y después se buscó la correlación entre ellos. Teniendo en cuenta el gran número de vías de regulación que hay en la célula y que hay proteínas que participan en más de una vía, solo se puede hacer una suposición de lo que podría estar ocurriendo en las células de mujeres con NPC, con base en nuestros resultados.

Una vez identificadas las vías o proteínas con las que interaccionan pudimos reconocer al menos 3 vías centrales: la vía de MAPK, PI3K y Wnt/ $\beta$ -catenina (fig. 15). Con la vía de señalización de MAPK interactúan al menos 3 genes: PROS1, NPC2 y BCAP31 (genes regulados a la alta), por estos últimos dos la vía estaría siendo regulada de manera negativa. En la vía de PI3K interaccionan ITGB5 (a la alta) y SGK3 (a la alta) de manera positiva mientras que PI3KIP1 que es su inhibidor, está inhibida su transcripción. PROS1 además de participar en la vía de MAPK, participa en la respuesta antiinflamatoria al igual que CD59 (fuerte inhibidor del complemento) y CD68, glicoproteína que se encuentra preferencialmente en las membranas de endosomas/lisosomas, pero también en la membrana celular y responde a la presencia de LDL oxidadas, todos expresados a la alta.

También se identificaron genes y vías que interaccionan con la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina, que es fundamental en el desarrollo embrionario y en la homeostasis tisular. La inhibición de la expresión de algunos genes que codifican a proteínas de la vía lleva a la estabilización de  $\beta$ -catenina y por lo tanto a su función como activador de la transcripción de genes. La estabilización o no-degradación de  $\beta$ -catenina activa vías de proliferación y supervivencia celular.

PKD1 puede interaccionar con la vía Wnt y  $\beta$ -catenina (Kim et al., 2016; Lee et al., 2020), y se sabe que PTK7 puede interactuar con receptores de la vía de Wnt y con otros receptores como FGFR y VEGFA, y puede tanto activar como inhibir la vía (Peradziryi et al., 2012). También en esta vía identificamos a TCF7L1 que es un factor de transcripción que interactúa con  $\beta$ -catenina para la activación de genes (Chen et al., 2021), y a TGFB111 que participa en la vía de TGF y Wnt. Todos los genes anteriores están regulados a la baja en la base de datos de mujeres. Mientras que PRRX1, que está regulado al alta, activa la vía permitiendo que  $\beta$ -catenina se mantenga en el citoplasma. La expresión de PRRX1 en fibroblastos se ha asociado a la reparación del daño y propagación (Leavitt et al., 2020), y en otras con la proliferación y diferenciación (fig. 14). Además de TGFB111 se identificaron otros genes que interactúan con la vía TGF, MEGF6 y BMP1, los tres pueden activar a TGF- $\beta$ , pero el único que está expresado al alta es MEGF6.

En las células se están expresando genes que participan en otras vías de proliferación y supervivencia, como LATS2 que está regulado a la baja y por lo tanto no puede bloquear la función de YAP/TAZ en la proliferación y evadir la apoptosis. El CENPV que forma parte del centrómero por lo que tiene un papel en la división celular, y finalmente NOV que se encuentra al alta y puede inhibir a NF $\kappa$ B y PI3K/AKT/mTOR y por lo tanto inhibe la respuesta inflamatoria y promueve la autofagia. NOV también promueve la adhesión celular.

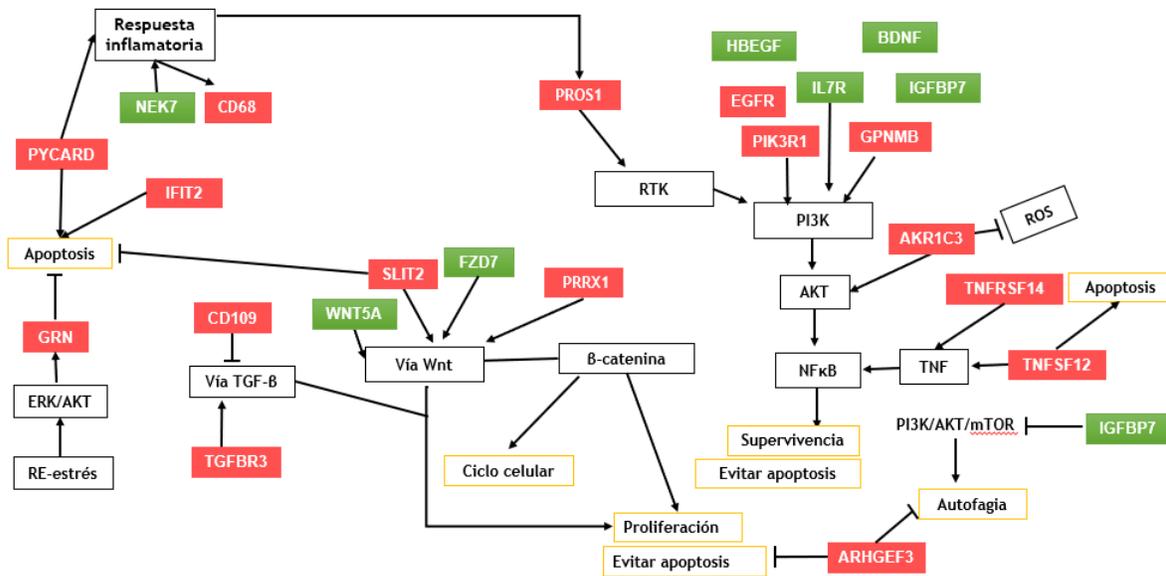


**Figura 15. Vías identificadas con los genes expresados diferencialmente en mujeres.** Los genes que se marcan de rojo son los que aumentaron su transcripción mientras que los verdes son los que la disminuyeron, los que están en blanco son otras proteínas que participan en la vía.

### 7.9 Búsqueda de vías de muerte celular en arreglos de expresión de la enfermedad de NPC en los datos de hombres

En el resultado del Gene Ontology (fig. 12) de los genes expresados a la alta se encontró enriquecida la regulación positiva de los procesos apoptóticos (tabla 4). En este GO se encuentran genes involucrados con autofagia (*ARHGEF3* y *SQSTM1*) y la mayoría de ellos están asociados a la regulación de la proliferación y muerte celular.

A modo de buscar relación entre ambas bases de datos, buscamos en los resultados de los hombres a los GED que también participen en algunas de las tres vías anteriormente mencionadas: MAPK, PI3K y Wnt/ $\beta$ -catenina, o vías de autofagia, supervivencia o evasión a la apoptosis, también incluimos a los genes de la tabla 4 y factores de crecimiento, en el esquema (fig. 16).

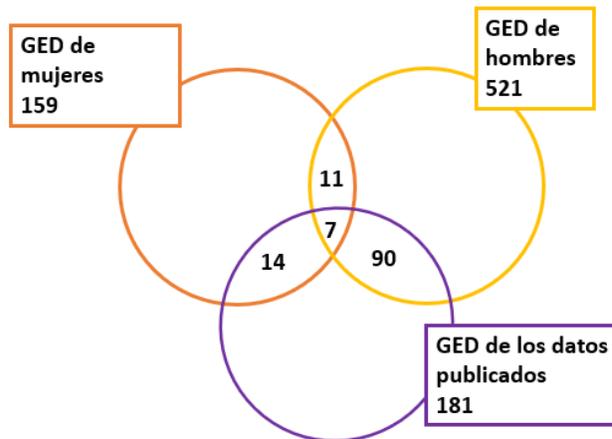


**Figura 16. Vías identificadas con los genes expresados diferencialmente en los hombres.** Los genes que se marcan de rojo son los que aumentaron su transcripción mientras que los verdes son las que la disminuyeron, los que están en blanco son otras proteínas que participan en la vía.

### 7.10 Validación de genes

Se compararon los 159 GED (valor-p ajustado  $\leq 0.05$  y valor de cambio mayor a 0.5 o menor a -0.5) que se obtuvieron de la base de datos de solo las mujeres, con los 288 GED (valor-p ajustado  $\leq 0.05$  y valor de cambio mayor a 0.5 o menor a -0.5) que se obtienen de los datos de solo hombres y 181 GED (valor-p ajustado  $\leq 0.05$ , valor de mayor a 1.4 o menor a -1.4) del artículo en donde se publicaron los resultados de la base de datos completa, se buscó la intersección entre los 3 grupos de genes cuidando que tuvieran la misma regulación (a la alta o a la baja).

Fueron 97 genes compartidos entre la base de datos completa vs solo hombres y 21 genes vs solo mujeres; 18 genes solo se comparten entre hombres y mujeres y 7 se comparten entre las tres bases de datos (fig. 17 y tab. 10).



**Figura 17. Intersección de la base de datos** de fibroblastos completa y con la división por sexos.

En la tabla 10 se mencionan los 7 genes en común entre la base de datos analizada entera y nuestros resultados de hombres y mujeres; se incluye a qué codifican y en que vías participan.

<b>Tabla 10. Genes que están en la intersección de las 3 bases de datos</b>	
<b>Gene</b>	<b>Función</b>
<b><i>CENPV</i></b> (baja)	Participa en el crecimiento celular, división, el paso entre G2 y M del ciclo celular y senescencia
<b><i>IMPA2</i></b> (baja)	Se reportó que está relacionado con la vía de MAPK en la progresión de tumores
<b><i>PRRX1</i></b> (alta)	Cuando está sobreexpresada tiene diferentes efectos en la morfología celular, proliferación, migración e invasión
<b><i>VAT1</i></b> (alta)	Transportador que regula calcio, mecanismos de reparación epidérmico y negativamente regula la fisión mitocondrial
<b><i>RAB3IL1</i></b> (alta)	Es una proteína intercambiadora de guanina de Rab3A. Y Rab3A tiene un rol importante en el transporte vesicular, tráfico y exocitosis. Es también sustrato de la vía de señalización de MAPK y la secreción de IL-6
<b><i>PROS1</i></b> (alta)	ProS1 es un fuerte estimulador de fosforilación de Tyro3, Erk y Akt, también está involucrado en la cascada de coagulación y anti-inflamación.
<b><i>NAV2</i></b> (alta)	Participa en el crecimiento y migración celular

\*Algunos de estas funciones se obtuvieron de Genecards: <https://www.genecards.org/> otras de artículos publicados en Pubmed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

También añadimos la lista (tabla 11) de los 18 genes expresados diferencialmente en común entre hombres y mujeres.

<b>Tabla 11. Intersección de genes entre mujeres y hombres</b>		
<b>Genes que disminuyeron su transcripción</b>	<b>Genes que aumentaron su transcripción</b>	
<i>CENPV</i>	<i>FEZ1</i>	<i>PHYH</i>
<i>IMPA2</i>	<i>SQSTM1</i>	<i>RAB3IL1</i>
<i>NPAS2</i>	<i>PRRX1</i>	<i>CD68</i>
<i>ETV6</i>	<i>CCDC93</i>	<i>C1orf85</i>
	<i>HEXB</i>	<i>OSBPL3</i>
	<i>ARMCX1</i>	<i>NAV2</i>
	<i>VAT1</i>	<i>PROS1</i>

## 8. DISCUSIÓN

La enfermedad como Niemann-Pick es un trastorno que presenta mucha heterogeneidad, por lo tanto, es importante considerar el eliminar aquellas variables que puedan añadir algún sesgo en el muestreo, como lo es el sexo o la edad.

Dado que al analizar la base de datos completa se notaron diferencias en la expresión de algunos genes dentro del mismo grupo de muestras, la base de datos se dividió entre mujeres y hombres para analizarlos por separado, y esto fue por dos razones: 1) al analizarla completa no se encontró homogeneidad en los resultados debido a que se tiene una gran variedad en las mutaciones del gen y en la edad en la que se inicia la enfermedad, y 2) las células que se pidieron al banco de células para el estudio *in vivo*, son fibroblastos de pacientes con NPC y de individuos aparentemente sanos que provienen del sexo femenino, por lo que de esta forma nos aseguramos de que los genes que se elijan para su posterior validación en las células de pacientes no estén sesgados por el fenotipo sexual.

En el caso del análisis de la base de datos elegida para la separación por sexos ayudó a agrupar mejor jerárquicamente a los pacientes en el mapa de calor. También tomando en consideración los resultados publicados por Hetmanczyk y colaboradores (donde está publicada la base de datos), cuando validaron sus resultados *in silico* mediante una RT-PCR tiempo real notaron incongruencias en la expresión de algunos genes entre pacientes infantiles y los pacientes adultos (referirse al material suplementario del artículo de Hetmanczyk y colaboradores (Hetmanczyk-Sawicka et al., 2020); para el caso de la edad hay reportes que indican que la edad de aparición de los primeros síntomas influye en el progreso de la enfermedad y parámetros clínicos (Baxter et al., 2022). Además, las diferencias sexuales asociadas al dimorfismo sexual son más evidentes en la pubertad. Esta clase de sesgos se tienen que tomar en cuenta cuando se buscan opciones de tratamientos o marcadores para el diagnóstico, también estos hallazgos señalan la importancia de validar los resultados obtenidos en el análisis *in silico* en algún modelo celular comparando ambos sexos (*in vitro*).

En este estudio se trabajó con la base de datos de un microarreglo con muestras de 22 controles y 23 pacientes de Niemann-Pick, una de las variables que se podía controlar es el sexo por lo que la base de datos se analizó separando a hombres y mujeres. El análisis de los microarreglos nos permite comparar la diferencia de expresión de los miles de genes que se están transcribiendo o dejando de transcribir en las células de pacientes contra las de individuos sanos o controles. El análisis se va limitando hasta obtener los genes

expresados diferencialmente en la condición de interés, después se analizan con base en su función o participación dentro de la célula mediante los análisis de enriquecimiento (fig. 6).

### **8.1 Las vías importantes de la enfermedad de NPC aparecen en los análisis de enriquecimiento**

De los resultados del topGO de mujeres (fig. 11) se obtuvo que algunos de los genes expresados diferencialmente están involucrados en vías que se han descrito afectadas en esta patología. Por ejemplo, la regulación positiva de endosomas y la macroautofagia (tabla 2) lo que concuerda con lo observado en células provenientes de pacientes con NPC y del modelo murino, donde se ha visto la acumulación de vesículas, endosomas y autofagosomas debido a que el depósito de lípidos interfiere en la vía de la autofagia (Davis et al., 2021). En respuesta a la acumulación de lípidos también se encontraron GO asociados a la activación del catabolismo de lípidos al alta (tabla 3), una de las situaciones interesantes de este grupo de genes son que pertenecen a diferentes vías y organelos celulares como lisosomas, mitocondria y peroxisoma.

Otros resultados obtenidos del GO son aquellos enriquecidos en genes involucrados en eliminar especies reactivas del oxígeno y en la organización mitocondrial; asociado a estos resultados se ha reportado la disfunción mitocondrial en células con NPC (Karten et al., 2009), tanto la desregulación de la mitofagia como la acumulación de colesterol dentro de ella afecta su función promoviendo la generación de ROS, por lo que, la célula aumenta la transcripción de estos genes probablemente intentado aminorar el daño.

En los resultados del topGO de solo los hombres se observa que los genes expresados diferencialmente están involucrados en vías que también se encuentran afectadas en la patología. Al igual que en los resultados de solo las mujeres se obtuvieron genes asociados a la activación del metabolismo de lípidos (tabla 5). Una diferencia entre ambas bases de datos fue que en la de hombres se obtuvieron genes que aumentaron su transcripción en la regulación negativa del proceso inflamatorio y regulación positiva de procesos de apoptosis (tabla 4). La respuesta inflamatoria ya se había reportado en células NPC, tanto de humano como del modelo murino y a la apoptosis como el proceso por el cual las células mueren (Wu et al., 2005; Yanez et al., 2020); sin embargo, ninguno de los genes asociados a estos procesos fue enriquecido en los resultados de las mujeres. Esta regulación diferencial en el procesos de apoptosis entre hombres y mujeres podría explicarse por la regulación negativa de los estrógenos hacia la misma, lo que podría dar resultado a una menor afectación de

la enfermedad en mujeres, lo cual solo se ha reportado en el caso de los dos hermanos (que se mencionó en los antecedentes, (Walterfang et al., 2009)); o bien otra explicación a este resultado sería que en mujeres la regulación de la muerte celular sucede por otra vía alterna, como la necroptosis.

Un resultado interesante, y que no se ha reportado en esta patología, fue el metabolismo de azúcares (fig. 13), donde al menos 6 de las enzimas que participan en la glucólisis disminuyeron su transcripción, al igual que un transportador de glucosa (*GLUT1*). Aunque no se ha reportado en células con NPC, estos resultados concuerdan con la desregulación que ocurre en otros desordenes metabólicos. De hecho, en dietas altas en grasa se ha reportado una disminución en la expresión de *GLUT1*. Del mismo modo se ha reportado la desregulación del metabolismo de la glucosa en enfermedades neurodegenerativas (Zhang et al., 2021), como en EA (Vogelsang et al., 2018). Relacionado con el metabolismo también se han visto diferencias entre ambos sexos, en la distribución y acumulación de la grasa, homeostasis de la glucosa, señalización de la insulina, y metabolismo de lípidos, incluso hay dependencia del tejido del que se trate. De hecho, frente a enfermedades metabólicas pareciera que las mujeres siempre tienen una mejor adaptación, y se ha postulado que tanto las hormonas como el cromosoma X están implicados. Por ejemplo, la homeostasis de la glucosa de inicio está regulada por el músculo esquelético, de forma basal y a través de la insulina; en las mujeres al tener menor masa muscular hay mayor secreción de insulina y por lo tanto mayor absorción de glucosa. En el caso de los hombres, una mayor masa muscular los hace más vulnerables a generar resistencia a la insulina (Chella Krishnan et al., 2018), lo que podría explicar el metabolismo de glucosa a la baja en la base de datos de hombres analizada en el presente trabajo, debido al desbalance metabólico.

A pesar de las diferencias encontradas entre ambos sexos en nuestro análisis, se encontraron resultados compartidos del topGO entre hombres y mujeres. Dentro de los genes expresados al alta se encontraron GO relacionados con el metabolismo de lípidos mientras que de los genes expresados a la baja se encontraron GO relacionados con la vía de Wnt, unión a RNA y a iones metálicos (en MF). Cabe señalar que para el caso del metabolismo de lípidos y la vía de Wnt se comparten ambas vías, pero los genes involucrados no son los mismos entre hombres y mujeres (tabla 5 y 3). Mientras que en los resultados del KEGG, el fagosoma fue la única vía en común entre ambas bases de datos (de hombres y mujeres).

## **Mujeres y hombres comparten los mismos factores de transcripción enriquecidos para los genes regulados a la baja**

El siguiente análisis de enriquecimiento que se hizo fue el de los factores de transcripción (FT) los cuales podrían estar regulando a los genes expresados diferencialmente. Entre los factores de transcripción enriquecidos en la base de datos de mujeres se encontraron algunas semejanzas en la participación de los genes que regulan de manera conjunta (genes a la baja y hacia la alta). Se hallaron factores de transcripción asociados a la regulación de genes de respuesta al estrés (ATF3, ATF4, ARNT); del metabolismo (USF1, ARNTL, NRL, ATF4); y de desarrollo, diferenciación, y apoptosis (RARA, TFE3, NRL, CEBPA, MAX), entre otros.

Entre los factores transcripcionales enriquecidos se encuentra TFE3, el cual es el regulador maestro de lisosomas y endosomas, por lo que tiene sentido que este regulando vías que se encuentran activadas en NPC. TFE3 también se ha relacionado con otras enfermedades neurodegenerativas como EA (Iyaswamy et al., 2021; Zheng et al., 2021), enfermedad de Parkinson (Decressac & Bjorklund, 2013; Ebrahimi-Fakhari & Wahlster, 2013) y enfermedad de Huntington (Tsunemi et al., 2012). Por ello, se ha propuesto su activación para promover la autofagia y eliminación de agregados de proteínas que normalmente ocurren en estas enfermedades.

La mayoría de los factores de transcripción que se obtuvieron en los genes que aumentaron su transcripción están involucrados en diferenciación, proliferación y apoptosis: MYC, BATF, TCF3 y FOS. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos del topGO, donde se obtuvieron GO relacionados con apoptosis y regeneración (fig. 12D). Y de manera conjunta, en genes que aumentaron y disminuyeron su transcripción encontramos FT represores de la transcripción (FEZF2, HINFP1); que regulan genes que participan en proliferación y diferenciación (FOS1, TCF3, BATF, CEBPA, MAX, RARA); apoptosis (MYC, RARA); respuesta al estrés (ATF3, ATF4, NRL); y en el metabolismo (NRL, ATF4).

Así como en los resultados de enriquecimiento anteriores en el análisis de PWMErich se encontraron similitudes entre los sexos; de los genes que disminuyeron su regulación de hombres y mujeres resultaron enriquecidos casi los mismos posibles factores de transcripción que podrían estar regulándolos, es decir, un total de 6 FT (tab. 7 y 9).

## 8.2 Factores de crecimiento expresados diferencialmente y su posible importancia en la patología

En ambas bases de datos encontramos genes que codifican a factores de crecimiento expresados diferencialmente. En la base de datos de mujeres los factores de crecimiento expresados a la baja fueron: *TGFB111*, *PDGFC*, *IGFBP6* y *VEGFA*; y a la alta: *NGF*, *MEGF* y *EGFR* (fig. 15). Como parte de las hipótesis de este trabajo es que los factores de crecimiento podrían restablecer la vía de la autofagia nos centraremos en aquellos factores de crecimiento que están expresados a la baja para proponerlos como posibles blancos de estudio en la patología. *TGFB111* participa en la vía de TGF- $\beta$  inhibiéndola y en la vía de Wnt, su sobreexpresión se ha asociado a la inhibición de la proliferación en tumores (Ruan et al., 2020). *PDGFC* puede inducir la vía de TGF- $\beta$  y estimular la proliferación (Li et al., 2021). *IGFBP6* modula supervivencia y diferenciación celular (Zong et al., 2021). *VEGFA* (Factor de crecimiento endotelial vascular A) es responsable de la angiogénesis y al igual que los demás participa en vías de supervivencia y diferenciación celular, *VEGF* se ha reportado disminuido en células de NCP de humano y del modelo murino de NPC y además reportaron una disminución de la acumulación vesicular cuando se añadió el factor de crecimiento (Lee et al., 2014).

Mientras que en los hombres encontramos a la baja *HBEGF*, *IGFBP7* y *BDNF*; y a la alta receptores de factores tróficos: *TGFBR3* y *EGFR* (fig. 16). *HBEGF* se ha visto implicado en proliferación y migración, se incrementa ante el daño a la piel (White et al., 2021) *HBEGF* (factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina) se ha visto implicado en proliferación y migración, se incrementa ante el daño a la piel (White et al., 2021). *IGFBP7* juega un papel en proliferación, migración, crecimiento y metabolismo. El *BDNF* es una neurotrofina que se encuentra usualmente en cerebro y en tejidos periféricos. Se ha asociado el *BDNF* a la patología de NPC y el neurodeterioro, en el modelo murino de NPC se reportó que hay una deficiencia en la activación del receptor TRKB mediante *BDNF* debido a la acumulación de colesterol en las neuronas estriatales, la no-activación del receptor provoca que el crecimiento de las neuritas no se induzca (Henderson et al., 2000). En este artículo faltó medir la secreción de *BDNF*, resultado que sería interesante dado que en nuestro estudio está regulado a la baja porque probablemente ésta sea otra de las razones del neurodeterioro.

### 8.3 Validación de los GED comunes entre mujeres y hombres y la propuesta como posibles objetos de estudio

Se sugieren como genes cruciales en la enfermedad aquellos que se encuentran en la intersección entre las bases de datos (fig. 17). Sin embargo, los resultados del análisis de la base de datos analizada entera y ya publicados (Hetmanczyk-Sawicka et al., 2020) están sesgados por el tipo de análisis bioinformático que utilizaron para tratar y normalizar los datos, además del sesgo por no contemplar las diferencias de expresión que hay entre los sexos y edad de los pacientes. De hecho, cuando se analizó la base de datos completa, se obtienen solo 103 genes expresados diferencialmente (con F.C. mayor a 1 y menor a -1), esto denota las diferencias que hay entre diversos análisis bioinformáticos dado que en la academia no hay una normalización general de este tipo de análisis.

Se considera entonces prestar más atención a los resultados de este trabajo para este análisis y a los 14 genes sobre-expresados en común de hombres y mujeres (tabla 11). En esta lista se encuentran: SQSTM1 el cual es un receptor y sustrato de autofagia, vía que apareció enriquecida tanto en el análisis de topGO como en KEGG. Al igual que en nuestros resultados, SQSTM1 aparece sobre-expresado en células de NPC1 (Illynska et al., 2021), así como en un estudio de proteómica (Davis et al., 2021), su expresión positiva podría ser consecuencia de la falla en la vía de la autofagia que se presenta en NPC.

Así como en el GO análisis, encontramos en esta lista a genes involucrados en metabolismo de lípidos o relacionados con ellos: *PHYH*, *PRRX1*, *HEXB*, *CCDC93*, *OSBPL3* y *GLMP*. *PHYH* codifica para la enzima que degrada y evita la acumulación de ácido fitoico, ácido graso que su acumulación se ha asociado al daño mitocondrial y de membrana (Picher-Martel & Dupre, 2018). Defectos en este gen (*PHYH*) están asociados a la enfermedad Refsum, una ataxia cerebral autosómica recesiva (ARCA por sus siglas en inglés), cabe destacar que la enfermedad de Niemann-Pick también pertenece a ARCA. *HEXB* codifica la subunidad beta de la Hexosaminidasa, la cual se encarga de catalizar la degradación del gangliósido GM2, evitando que se acumule. Los gangliósidos son lípidos secundarios que también se acumulan en NPC, principalmente en el cerebro (Anheuser et al., 2019), al igual que en nuestros resultados *HEXB* aparece sobre-expresado en un estudio de proteómica (Davis et al., 2021). *CCDC93* codifica a una proteína que participa en el complejo CCC el cual se encarga de medir los niveles de colesterol dentro de la célula. El *CCDC93* también participa en el proceso de reciclaje de proteínas y receptores endosomales, principalmente el receptor de LDL (Rimbert et al., 2020). El *PRRX1* es un factor de transcripción presente en diversos tejidos, regula genes involucrados en desarrollo, que participan en la fibrosis

durante la reparación de heridas (Leavitt et al., 2020), también se ha visto que inhibe la adipogénesis mediante la activación de la vía TGF $\beta$  (Du et al., 2013) y participa en otras vías del metabolismo de lípidos (Claussnitzer et al., 2014). Otro gen relacionado es *OSBPL3* que codifica al receptor intracelular de unión a oxisteroles, los cuales son colesterol oxidados que se incrementan en la enfermedad de Niemann-Pick debido al estrés oxidante y además fueron de los primeros biomarcadores reportados para esta enfermedad (Maekawa et al., 2020). El *OSBPL3* también se ha visto implicado en la relación entre el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y la membrana plasmática (Santos et al., 2018). *OSBPL3* sobre-expresado ya se había publicado en datos de otro microarreglo de fibroblastos de pacientes con NPC (Reddy et al., 2006).

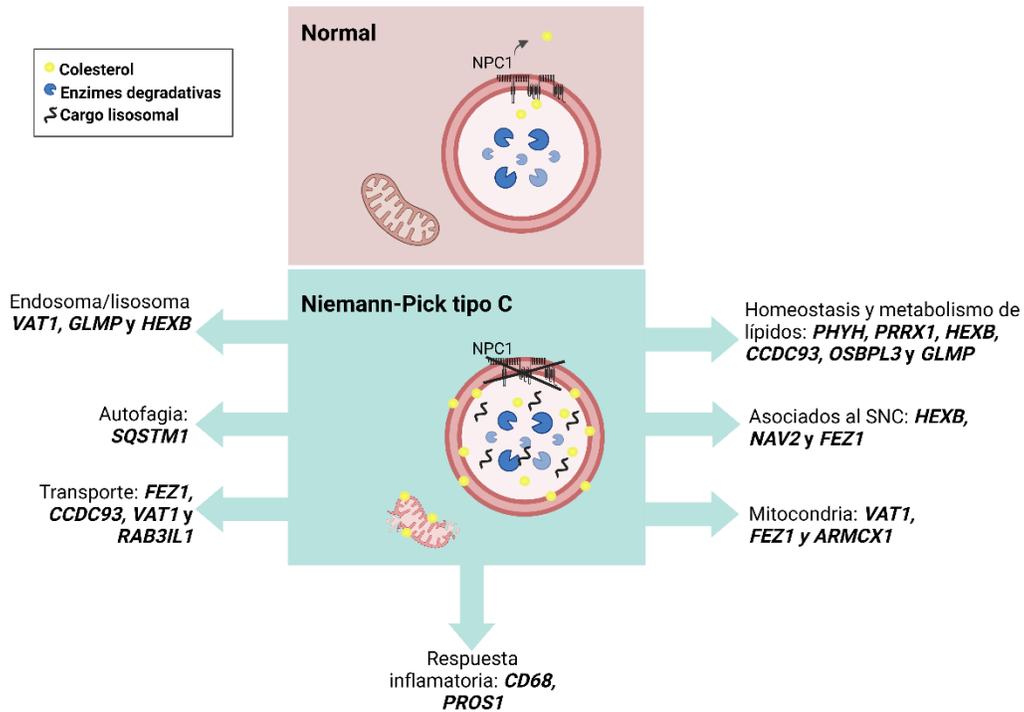
También se obtuvieron genes que codifican a proteínas de endosomas/lisosomas, *HEXB*, *VAT1* y *C1orf85* o *GLMP*; *VAT1* es un transportador principalmente relacionado con la sinapsis, transporte vesicular, exosomas, transferencia de fosfolípidos entre membranas de organelos, fusión y fisión mitocondrial (Yang et al., 2021). Además, cuando *VAT1* está sobre-expresado en células HeLa, se induce fragmentación mitocondrial (Watanabe et al., 2020), y de acuerdo con otros estudios, en células de pacientes con NPC es común la fragmentación mitocondrial (Davis et al., 2021; Wos et al., 2016) pero su relación con *VAT1* no se ha reportado en la patología. *C1orf85* o *GLMP* conforma uno de los dominios de *MFSD1* un transportador de membrana lisosomal, *GLMP* se ha relacionado con depósitos de lípidos y su respectiva regulación (Liu et al., 2021). Tanto *VAT1* como *GLMP* se reportaron aumentadas en un estudio de proteómica del modelo de ratón de NPC (Balboa et al., 2021).

Otro de los genes en común que se reportó en este estudio aumentado fue *CD68*, este gen está relacionado a la respuesta inflamatoria y también se ha reportado a la alta en tejido de hígado (Alam et al., 2014) y en el sistema nervioso central del modelo de ratón (Smith et al., 2009). *PROS1* es otro gen de interés que participa en la respuesta inflamatoria, codifica a una proteína ligando de TAM y estos receptores tienen un papel importante en la respuesta inflamatoria en cáncer, esclerosis múltiple y enfermedades neurodegenerativas como EA y EP (Herrera-Rivero et al., 2019). Así mismo, *PROS1* participa en el mantenimiento de células precursoras neurales, en la diferenciación, protección contra neurotoxicidad y apoptosis. También se ha propuesto como biomarcador de la progresión de la EA porque se encuentra elevado en estadios tempranos, pero no avanzados de la enfermedad (Herrera-Rivero et al., 2019; Tondo et al., 2019).

Otros genes de la intersección que se han asociado con el sistema nervioso son *HEXB*, *NAV2* y *FEZ1*. Mutaciones en el gen *HEXB* (anteriormente mencionado) causan la enfermedad de Sandhoff, una enfermedad de depósito lisosomal como NPC, que causa pérdida de neuronas motoras y deterioro mental (Alonso-Perez et al., 2021). *NAV2* codifica a proteína de la familia de los *neuron navigator* altamente expresado en el cerebro, pero presente también en otros tejidos y juega un papel importante en la regulación del crecimiento, migración y regeneración de neuronas en el sistema nervioso. Esta proteína también se ha asociado a la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (Wang et al., 2021), la vía de Wnt fue enriquecida en el topGO de los genes expresados a la baja en ambas bases de datos. *FEZ1* codifica a una proteína necesaria para el desarrollo axonal, transporte anterógrado de mitocondrias y con efecto neuroprotector (Demir et al., 2019). Al igual que *FEZ1* se encontró en la intersección, y en los resultados del GO, genes involucrados en transporte como *CCDC93*, *VAT1* y *RAB3IL1*. *RAB3IL1* codifica a una proteína asociada con Rab3A, involucrada en exocitosis. Además, en los resultados de un RNAseq de fibroblastos de pacientes con NPC tratados con 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP $\beta$ CD), un tratamiento propuesto para la enfermedad de NPC, vs sin tratamiento, *RAB3IL1* y *SQSTM1* disminuyeron su transcripción (Rodríguez-Gil et al., 2021).

Otras vías relacionadas con la patología de NPC y que se representaron en la intersección de nuestros resultados y GO, fueron la disfunción mitocondrial y estrés oxidante, ambas condiciones reportadas en células de pacientes (Jurs et al., 2020; Zampieri et al., 2009) y en el modelo murino (Cologna et al., 2012). De los genes en común fueron *VAT1*, *FEZ1* y *ARMCX1*, los primeros dos previamente mencionados, con respecto a *ARMCX1* se ha visto que regula el tráfico mitocondrial y su sobre-expresión está asociada a la regeneración de axones (Kaeffer et al., 2021).

A manera de resumen en la figura 18 se incluyen las principales vías en las que participan estos 14 genes (expresados a la alta, comunes entre las bases de datos de mujeres y hombres), hay que considerar que muchas de las vías que aparecen en la imagen también fueron resultado de los análisis de enriquecimiento y también se incluyen en la resumen gráfico (fig. 1) de las principales afectaciones de NPC a nivel celular.



**Figura 18. Principales vías en las que participan los 14 genes expresados a la alta comunes entre las bases de datos de mujeres y hombres.** El gráfico representa al lisosoma con la proteína NPC1 funcional y con un transporte de colesterol “normal” y al lisosoma con NPC1 mutada, con acumulación de colesterol y cargo lisosomal, además de daño a otros organelos, como la mitocondria. Imagen elaborada en Biorender.

## 9. CONCLUSIONES

- Se analizó el perfil de expresión de la base de datos de microarreglos de fibroblastos de pacientes con NPC y controles, con una n = 45. Debido a la heterogeneidad de la enfermedad se optó por analizarla separando por sexos: hombres y mujeres.
- Se hizo un análisis de enriquecimiento de ontología de la función molecular, procesos biológicos y componentes celulares enriquecidos. Se encontró concordancia con la disfunción en el transporte vesicular, regulación de la macroautofagia y catabolismo de lípidos en genes expresados al alta; y a la baja se encontraron procesos biológicos de la vía de Wnt y regulación transcripcional, principalmente.
- Se encontraron genes río arriba y abajo de vías de proliferación y supervivencia como la vía de MAPK, de Wnt, TGF- $\beta$ , PI3K y NF $\kappa$  $\beta$ , en la base de datos de mujeres. En la de hombres se encontraron enriquecidos términos de GO de regulación positiva de la apoptosis y regulación negativa de la inflamación.
- Dentro de la base de datos de mujeres se encontraron los siguientes factores de crecimiento expresados diferencialmente: a la baja están *VEGFA*, *ERRFI1* y *TGFB111*, y a la alta el receptor *EGFR*. En la base de datos de hombres se encontraron a la alta receptores de factores tróficos: *TGFBR3* y *EGFR*; y a la baja *BDNF* (factor neurotrófico derivado del cerebro), *HBEGF* y *IGFBP7*.
- En el análisis de enriquecimiento de factores de transcripción de los genes que se expresaron diferencialmente en la base de datos de hombres y mujeres se encontraron algunos que participan en la regulación de las mismas vías anteriormente mencionadas: lisosoma, autofagia, proliferación, metabolismo y de respuesta al estrés, entre los que se encuentran *TFEB*, *RARA*, *ATF3*, *ATF4* y *ARNTL*.
- Finalmente, entre la intersección de la base de datos de hombres y mujeres se encontraron 18 genes que podrían ser de relevancia para la patología de NPC. Entre los que se encuentran: *SQSTM1*, *PRRX1*, *OSBPL3*, *CD68*, *PROS1* y *VAT1*, por mencionar algunos.

## 10. PERSPECTIVAS

- Dado que los resultados obtenidos en este trabajo fueron *in silico* y a nivel génico, proponemos que el siguiente paso sea el de la validación en un modelo *in vitro* y en otro nivel de regulación como lo es el proteico, para así determinar cuáles de las moléculas y vías alteradas y que fueron identificadas en nuestro análisis bioinformático se reproducen en un modelo de la enfermedad.
- El primer paso que se propone es determinar si existe alguna diferencia en la proliferación, viabilidad o en la susceptibilidad a la viabilidad posterior a algún insulto químico e incluso muerte entre las células provenientes de pacientes y sujetos control. Estas evaluaciones de la viabilidad y detección de la muerte celular se realizarán por medio de técnicas colorimétricas, por ejemplo: WST-1, Cyto-ID-Autophagy, Apoptosis/ Necrosis Assay Kit, Caspase-3 colorimetric assay kit, en los cultivos celulares antes y después de añadir el o los factores tróficos, o el Peróxido de Hidrógeno, como agente inductor de estrés.
- Una vez establecidas las condiciones del modelo se plantea añadir en los cultivos celulares factores tróficos (se proponen a VEGF y/o BDNF) para evaluar su efecto en la proliferación o viabilidad celular además de evaluar el cambio en la regulación de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina, MAPK y/o IP3K, por medio de la técnica de Western-blot.
- Finalmente, se plantean evaluar algunos genes/proteínas que ya han sido publicados por otros trabajos con el fin de validar nuestro modelo celular de la enfermedad de Niemann-Pick: CD68, OSBPL3 y/o SQSTM1; así como de otros que no han sido publicados pero que participan en vías relevantes para esta enfermedad neurodegenerativa como: VAT1, GLMP y/o NAV2, así como el factor de transcripción TFEB.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alam, M. S., Getz, M., Yi, S., Kurkewich, J., Safeukui, I., & Haldar, K. (2014). Plasma signature of neurological disease in the monogenetic disorder Niemann-Pick Type C. *J Biol Chem*, 289(12), 8051-8066. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.526392>
- Alonso-Perez, J., Casaus, A., Gimenez-Munoz, A., Duff, J., Rojas-Garcia, R., Illa, I., Straub, V., Topf, A., & Diaz-Manera, J. (2021). Late onset Sandhoff disease presenting with lower motor neuron disease and stuttering. *Neuromuscul Disord*, 31(8), 769-772. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2021.04.011>
- Anheuser, S., Breiden, B., & Sandhoff, K. (2019). Membrane lipids and their degradation compounds control GM2 catabolism at intralysosomal luminal vesicles. *J Lipid Res*, 60(6), 1099-1111. <https://doi.org/10.1194/jlr.M092551>
- Balboa, E., Marin, T., Oyarzun, J. E., Contreras, P. S., Hardt, R., van den Bosch, T., Alvarez, A. R., Rebolledo-Jaramillo, B., Klein, A. D., Winter, D., & Zanlungo, S. (2021). Proteomic Analysis of Niemann-Pick Type C Hepatocytes Reveals Potential Therapeutic Targets for Liver Damage. *Cells*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/cells10082159>
- Baxter, L. L., Watkins-Chow, D. E., Johnson, N. L., Farhat, N. Y., Platt, F. M., Dale, R. K., Porter, F. D., Pavan, W. J., & Rodriguez-Gil, J. L. (2022). Correlation of age of onset and clinical severity in Niemann-Pick disease type C1 with lysosomal abnormalities and gene expression. *Sci Rep*, 12(1), 2162. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06112-y>
- Burton, B. K., Ellis, A. G., Orr, B., Chatlani, S., Yoon, K., Shoaff, J. R., & Gallo, D. (2021). Estimating the prevalence of Niemann-Pick disease type C (NPC) in the United States. *Mol Genet Metab*. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.06.011>
- Cabeza, C., Figueroa, A., Lazo, O. M., Galleguillos, C., Pissani, C., Klein, A., Gonzalez-Billault, C., Inestrosa, N. C., Alvarez, A. R., Zanlungo, S., & Bronfman, F. C. (2012). Cholinergic abnormalities, endosomal alterations and up-regulation of nerve growth factor signaling in Niemann-Pick type C disease. *Mol Neurodegener*, 7, 11. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-11>
- Cahill, L. (2006). Why sex matters for neuroscience. *Nat Rev Neurosci*, 7(6), 477-484. <https://doi.org/10.1038/nrn1909>
- Cardenas-Aguayo M del, C. (2004). *Efecto de las señales proliferativa (myc) y de sobrevivencia (bcl-2) en la diferenciación de precursores neurales de mesencéfalo de ratón* Instituto Politécnico Nacional]. México.
- Cardenas-Aguayo M del, C., Kazim, S. F., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2013). Neurogenic and neurotrophic effects of BDNF peptides in mouse hippocampal primary neuronal cell cultures. *PLoS One*, 8(1), e53596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053596>
- Cardenas-Aguayo M del, C., Santa-Olalla, J., Baizabal, J. M., Salgado, L. M., & Covarrubias, L. (2003). Growth factor deprivation induces an alternative non-apoptotic death mechanism that is inhibited by Bcl2 in cells derived from neural precursor cells. *J Hematother Stem Cell Res*, 12(6), 735-748. <https://doi.org/10.1089/15258160360732759>
- Chella Krishnan, K., Mehrabian, M., & Lusic, A. J. (2018). Sex differences in metabolism and cardiometabolic disorders. *Curr Opin Lipidol*, 29(5), 404-410. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000536>
- Chen, J., Xu, Y., Hu, H., & Jin, T. (2021). TCF7L1 Genetic Variants Are Associated with the Susceptibility to Cervical Cancer in a Chinese Population. *Biomed Res Int*, 2021, 6670456. <https://doi.org/10.1155/2021/6670456>
- Claussnitzer, M., Dankel, S. N., Klocke, B., Grallert, H., Glunk, V., Berulava, T., Lee, H., Oskolkov, N., Fadista, J., Ehlers, K., Wahl, S., Hoffmann, C., Qian, K., Ronn, T., Riess, H., Muller-Nurasyid, M., Bretschneider, N., Schroeder, T., Skurk, T., . . . Laumen, H. (2014). Leveraging cross-

- species transcription factor binding site patterns: from diabetes risk loci to disease mechanisms. *Cell*, 156(1-2), 343-358. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.058>
- Cologna, S. M., Jiang, X. S., Backlund, P. S., Cluzeau, C. V., Dail, M. K., Yanjanin, N. M., Siebel, S., Toth, C. L., Jun, H. S., Wassif, C. A., Yergey, A. L., & Porter, F. D. (2012). Quantitative proteomic analysis of Niemann-Pick disease, type C1 cerebellum identifies protein biomarkers and provides pathological insight. *PLoS One*, 7(10), e47845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047845>
- Cougnoux, A., Cluzeau, C., Mitra, S., Li, R., Williams, I., Burkert, K., Xu, X., Wassif, C. A., Zheng, W., & Porter, F. D. (2016). Necroptosis in Niemann-Pick disease, type C1: a potential therapeutic target. *Cell Death Dis*, 7, e2147. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.16>
- Cougnoux, A., Fellmeth, M., Gu, T., Davidson, C. D., Gibson, A. L., Pavan, W. J., & Porter, F. D. (2020). Maternal immune activation modifies the course of Niemann-pick disease, type C1 in a gender specific manner. *Mol Genet Metab*, 129(2), 165-170. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.10.004>
- Cox, T. M., & Cachon-Gonzalez, M. B. (2012). The cellular pathology of lysosomal diseases. *J Pathol*, 226(2), 241-254. <https://doi.org/10.1002/path.3021>
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*, 43(6), 582-592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Davis, O. B., Shin, H. R., Lim, C. Y., Wu, E. Y., Kukurugya, M., Maher, C. F., Perera, R. M., Ordonez, M. P., & Zoncu, R. (2021). NPC1-mTORC1 Signaling Couples Cholesterol Sensing to Organelle Homeostasis and Is a Targetable Pathway in Niemann-Pick Type C. *Dev Cell*, 56(3), 260-276 e267. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.11.016>
- Decressac, M., & Bjorklund, A. (2013). TFEB: Pathogenic role and therapeutic target in Parkinson disease. *Autophagy*, 9(8), 1244-1246. <https://doi.org/10.4161/auto.25044>
- Demir, M., Yilmaz, U., Colak, C., Cigremis, Y., Ozyalin, F., Tekedereli, I., & Sandal, S. (2019). Is there a new pathway relationship between melatonin and FEZ1 in experimental rat model of Alzheimer's disease? *Bratislavske lekarske listy*, 120(1), 70-77.
- Du, B., Cawthorn, W. P., Su, A., Doucette, C. R., Yao, Y., Hemati, N., Kampert, S., McCoin, C., Broome, D. T., Rosen, C. J., Yang, G., & MacDougald, O. A. (2013). The transcription factor paired-related homeobox 1 (Prrx1) inhibits adipogenesis by activating transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling. *J Biol Chem*, 288(5), 3036-3047. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.440370>
- Ebrahimi-Fakhari, D., & Wahlster, L. (2013). Restoring impaired protein metabolism in Parkinson's disease--TFEB-mediated autophagy as a novel therapeutic target. *Mov Disord*, 28(10), 1346. <https://doi.org/10.1002/mds.25601>
- Garver, W. S., Jelinek, D., Meaney, F. J., Flynn, J., Pettit, K. M., Shepherd, G., Heidenreich, R. A., Vockley, C. M., Castro, G., & Francis, G. A. (2010). The National Niemann-Pick Type C1 Disease Database: correlation of lipid profiles, mutations, and biochemical phenotypes. *J Lipid Res*, 51(2), 406-415. <https://doi.org/10.1194/jlr.P000331>
- Griese, M., Brasch, F., Aldana, V. R., Cabrera, M. M., Goelnitz, U., Ikonen, E., Karam, B. J., Liebisch, G., Linder, M. D., Lohse, P., Meyer, W., Schmitz, G., Pamir, A., Ripper, J., Rolfs, A., Schams, A., & Lezana, F. J. (2010). Respiratory disease in Niemann-Pick type C2 is caused by pulmonary alveolar proteinosis. *Clin Genet*, 77(2), 119-130. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01325.x>
- Hammond, N., Munkacsi, A. B., & Sturley, S. L. (2019). The complexity of a monogenic neurodegenerative disease: More than two decades of therapeutic driven research into Niemann-Pick type C disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1864(8), 1109-1123. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.04.002>

- Henderson, L. P., Lin, L., Prasad, A., Paul, C. A., Chang, T. Y., & Maue, R. A. (2000). Embryonic striatal neurons from niemann-pick type C mice exhibit defects in cholesterol metabolism and neurotrophin responsiveness. *J Biol Chem*, 275(26), 20179-20187. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001793200>
- Herrera-Rivero, M., Santarelli, F., Brosseron, F., Kummer, M. P., & Heneka, M. T. (2019). Dysregulation of TLR5 and TAM Ligands in the Alzheimer's Brain as Contributors to Disease Progression. *Mol Neurobiol*, 56(9), 6539-6550. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1540-3>
- Hetmanczyk-Sawicka, K., Iwanicka-Nowicka, R., Fogtman, A., Ciesla, J., Wlodarski, P., Zyzynska-Granica, B., Filocamo, M., Dardis, A., Peruzzo, P., Bednarska-Makaruk, M., Koblowska, M., & Lugowska, A. (2020). Changes in global gene expression indicate disordered autophagy, apoptosis and inflammatory processes and downregulation of cytoskeletal signalling and neuronal development in patients with Niemann-Pick C disease. *Neurogenetics*, 21(2), 105-119. <https://doi.org/10.1007/s10048-019-00600-6>
- Houben, T., Bitorina, A. V., Oligschlaeger, Y., Jeurissen, M. L., Rensen, S., Kohler, S. E., Westerterp, M., Lutjohann, D., Theys, J., Romano, A., Plat, J., & Shiri-Sverdlov, R. (2020). Sex-opposed inflammatory effects of 27-hydroxycholesterol are mediated via differences in estrogen signaling. *J Pathol*, 251(4), 429-439. <https://doi.org/10.1002/path.5477>
- Idda, M. L., Campesi, I., Fiorito, G., Vecchietti, A., Urru, S. A. M., Solinas, M. G., Franconi, F., & Floris, M. (2021). Sex-Biased Expression of Pharmacogenes across Human Tissues. *Biomolecules*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/biom11081206>
- Ilnytska, O., Lai, K., Gorshkov, K., Schultz, M. L., Tran, B. N., Jeziorek, M., Kunkel, T. J., Azaria, R. D., McLoughlin, H. S., Waghalter, M., Xu, Y., Schlame, M., Altan-Bonnet, N., Zheng, W., Lieberman, A. P., Dobrowolski, R., & Storch, J. (2021). Enrichment of NPC1-deficient cells with the lipid LBPA stimulates autophagy, improves lysosomal function, and reduces cholesterol storage. *J Biol Chem*, 297(1), 100813. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100813>
- Iyaswamy, A., Krishnamoorthi, S. K., Zhang, H., Sreenivasmurthy, S. G., Zhu, Z., Liu, J., Su, C. F., Guan, X. J., Wang, Z. Y., Cheung, K. H., Song, J. X., Durairajan, S. S. K., & Li, M. (2021). Qingyangshen mitigates amyloid-beta and Tau aggregate defects involving PPARalpha-TFEB activation in transgenic mice of Alzheimer's disease. *Phytomedicine*, 91, 153648. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153648>
- Jean-Tron, G., Ortega-Ponce, F., & Islas-García, D. (2012). Enfermedad de Niemann-Pick tipo C. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 13(5), 281-285.
- Jurs, A. V., Volkner, C., Liedtke, M., Huth, K., Lukas, J., Hermann, A., & Frech, M. J. (2020). Oxidative Stress and Alterations in the Antioxidative Defense System in Neuronal Cells Derived from NPC1 Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci*, 21(20). <https://doi.org/10.3390/ijms21207667>
- Kaeffer, J., Zeder-Lutz, G., Simonin, F., & Lecat, S. (2021). GPRASP/ARMCX Protein Family: Potential Involvement in Health and Diseases Revealed by their Novel Interacting Partners. *Curr Top Med Chem*, 21(3), 227-254. <https://doi.org/10.2174/1568026620666201202102448>
- Karten, B., Peake, K. B., & Vance, J. E. (2009). Mechanisms and consequences of impaired lipid trafficking in Niemann-Pick type C1-deficient mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 1791(7), 659-670. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.01.025>
- Kim, S., Nie, H., Nesin, V., Tran, U., Outeda, P., Bai, C. X., Keeling, J., Maskey, D., Watnick, T., Wessely, O., & Tsiokas, L. (2016). The polycystin complex mediates Wnt/Ca(2+) signalling. *Nat Cell Biol*, 18(7), 752-764. <https://doi.org/10.1038/ncb3363>
- Leavitt, T., Hu, M. S., Borrelli, M. R., Januszyk, M., Garcia, J. T., Ransom, R. C., Mascharak, S., desJardins-Park, H. E., Litzenburger, U. M., Walmsley, G. G., Marshall, C. D., Moore, A. L., Duoto, B., Adem, S., Foster, D. S., Salhotra, A., Shen, A. H., Griffin, M., Shen, E. Z., . . .

- Longaker, M. T. (2020). Prrx1 Fibroblasts Represent a Pro-fibrotic Lineage in the Mouse Ventral Dermis. *Cell Rep*, 33(6), 108356. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108356>
- Lee, E. J., Seo, E., Kim, J. W., Nam, S. A., Lee, J. Y., Jun, J., Oh, S., Park, M., Jho, E. H., Yoo, K. H., Park, J. H., & Kim, Y. K. (2020). TAZ/Wnt-beta-catenin/c-MYC axis regulates cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(46), 29001-29012. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009334117>
- Lee, H., Lee, J. K., Park, M. H., Hong, Y. R., Marti, H. H., Kim, H., Okada, Y., Otsu, M., Seo, E. J., Park, J. H., Bae, J. H., Okino, N., He, X., Schuchman, E. H., Bae, J. S., & Jin, H. K. (2014). Pathological roles of the VEGF/SphK pathway in Niemann-Pick type C neurons. *Nat Commun*, 5, 5514. <https://doi.org/10.1038/ncomms6514>
- Li, Q., Ming, Y., Jia, H., & Wang, G. (2021). Poricoic acid A suppresses TGF-beta1-induced renal fibrosis and proliferation via the PDGF-C, Smad3 and MAPK pathways. *Exp Ther Med*, 21(4), 289. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9720>
- Lim, C. Y., Davis, O. B., Shin, H. R., Zhang, J., Berdan, C. A., Jiang, X., Counihan, J. L., Ory, D. S., Nomura, D. K., & Zoncu, R. (2019). ER-lysosome contacts enable cholesterol sensing by mTORC1 and drive aberrant growth signalling in Niemann-Pick type C. *Nat Cell Biol*, 21(10), 1206-1218. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0391-5>
- Linkermann, A., & Green, D. R. (2014). Necroptosis. *N Engl J Med*, 370(5), 455-465. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1310050>
- Liu, G., Sun, B. Y., Sun, J., Zhou, P. Y., Guan, R. Y., Zhou, C., Yang, Z. F., Wang, Z. T., Zhou, J., Fan, J., Yi, Y., & Qiu, S. J. (2021). BRG1 regulates lipid metabolism in hepatocellular carcinoma through the PIK3AP1/PI3K/AKT pathway by mediating GLMP expression. *Dig Liver Dis*. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2021.05.002>
- Lloyd-Evans, E., & Platt, F. M. (2010). Lipids on trial: the search for the offending metabolite in Niemann-Pick type C disease. *Traffic*, 11(4), 419-428. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01032.x>
- Lockhart, D. J., & Winzeler, E. A. (2000). Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, 405(6788), 827-836. <https://doi.org/10.1038/35015701>
- Maekawa, M., Iwahori, A., & Mano, N. (2020). Biomarker analysis of Niemann-Pick disease type C using chromatography and mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 191, 113622. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113622>
- McEwen, B. S., & Milner, T. A. (2017). Understanding the broad influence of sex hormones and sex differences in the brain. *J Neurosci Res*, 95(1-2), 24-39. <https://doi.org/10.1002/jnr.23809>
- McGovern, M. M., Lippa, N., Bagiella, E., Schuchman, E. H., Desnick, R. J., & Wasserstein, M. P. (2013). Morbidity and mortality in type B Niemann-Pick disease. *Genet Med*, 15(8), 618-623. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.4>
- Medeiros, A. M., & Silva, R. H. (2019). Sex Differences in Alzheimer's Disease: Where Do We Stand? *J Alzheimers Dis*, 67(1), 35-60. <https://doi.org/10.3233/JAD-180213>
- Mendrek, A., & Stip, E. (2011). Sexual dimorphism in schizophrenia: is there a need for gender-based protocols? *Expert Rev Neurother*, 11(7), 951-959. <https://doi.org/10.1586/ern.11.78>
- Mirnic, K., Middleton, F. A., Lewis, D. A., & Levitt, P. (2001). Analysis of complex brain disorders with gene expression microarrays: schizophrenia as a disease of the synapse. *Trends Neurosci*, 24(8), 479-486. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)01862-2](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01862-2)
- Molina, D. A., & Gómez, M. (2016). Perfil neuropsicológico de la enfermedad de Niemann Pick tipo C: estudio de caso. *Katharsis*(21), 98-110.
- Palhegyi, A. M., Seranova, E., Dimova, S., Hoque, S., & Sarkar, S. (2019). Biomedical Implications of Autophagy in Macromolecule Storage Disorders. *Front Cell Dev Biol*, 7, 179. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00179>

- Pan, Y.-H., Liu, X.-Y., Liu, J.-Q., Liu, Q., Yang, Y., Yang, J.-L., Zhang, X.-F., Wu, Y., & Wang, Y.-Z. (2016). Necroptosis: a new link between cell death and inflammation. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, 3, 156-160.
- Parenti, G., Medina, D. L., & Ballabio, A. (2021). The rapidly evolving view of lysosomal storage diseases. *EMBO Mol Med*, 13(2), e12836. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012836>
- Peradziryi, H., Tolwinski, N. S., & Borchers, A. (2012). The many roles of PTK7: a versatile regulator of cell-cell communication. *Arch Biochem Biophys*, 524(1), 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.12.019>
- Picher-Martel, V., & Dupre, N. (2018). Current and Promising Therapies in Autosomal Recessive Ataxias. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 17(3), 161-171. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180419115029>
- Pina-Aguilar, R. E., Vera-Loaiza, A., Chacon-Camacho, O. F., Zenteno, J. C., Nunez-Orozco, L., & Santillan-Hernandez, Y. (2014). Clinical and genetic characteristics of mexican patients with juvenile presentation of niemann-pick type C disease. *Case Rep Neurol Med*, 2014, 785890. <https://doi.org/10.1155/2014/785890>
- Reddy, J. V., Ganley, I. G., & Pfeffer, S. R. (2006). Clues to neuro-degeneration in Niemann-Pick type C disease from global gene expression profiling. *PLoS One*, 1, e19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000019>
- Rimbert, A., Dalila, N., Wolters, J. C., Huijkman, N., Smit, M., Kloosterhuis, N., Riemsma, M., van der Veen, Y., Singla, A., van Dijk, F., Biobank-Based Integrative Omics Studies, C., Frikke-Schmidt, R., Burstein, E., Tybjaerg-Hansen, A., van de Sluis, B., & Kuivenhoven, J. A. (2020). A common variant in CCDC93 protects against myocardial infarction and cardiovascular mortality by regulating endosomal trafficking of low-density lipoprotein receptor. *Eur Heart J*, 41(9), 1040-1053. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz727>
- Rodriguez-Gil, J. L., Baxter, L. L., Watkins-Chow, D. E., Johnson, N. L., Davidson, C. D., Carlson, S. R., Incao, A. A., Program, N. C. S., Wallom, K. L., Farhat, N. Y., Platt, F. M., Dale, R. K., Porter, F. D., & Pavan, W. J. (2021). Transcriptome of HPbetaCD-treated Niemann-pick disease type C1 cells highlights GPNMB as a biomarker for therapeutics. *Hum Mol Genet*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab194>
- Ruan, X. J., Ye, B. L., Zheng, Z. H., Li, S. T., Zheng, X. F., & Zhang, S. Z. (2020). TGFbeta11 suppressed cell migration and invasion in colorectal cancer by inhibiting the TGF-beta pathway and EMT progress. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 24(13), 7294-7302. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_202007\\_21884](https://doi.org/10.26355/eurrev_202007_21884)
- Santos, M. F., Rappa, G., Karbanova, J., Kurth, T., Corbeil, D., & Lorico, A. (2018). VAMP-associated protein-A and oxysterol-binding protein-related protein 3 promote the entry of late endosomes into the nucleoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 293(36), 13834-13848. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003725>
- Smith, D., Wallom, K. L., Williams, I. M., Jeyakumar, M., & Platt, F. M. (2009). Beneficial effects of anti-inflammatory therapy in a mouse model of Niemann-Pick disease type C1. *Neurobiol Dis*, 36(2), 242-251. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.010>
- Thurberg, B. L., Wasserstein, M. P., Schiano, T., O'Brien, F., Richards, S., Cox, G. F., & McGovern, M. M. (2012). Liver and skin histopathology in adults with acid sphingomyelinase deficiency (Niemann-Pick disease type B). *Am J Surg Pathol*, 36(8), 1234-1246. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31825793ff>
- Tondo, G., Perani, D., & Comi, C. (2019). TAM Receptor Pathways at the Crossroads of Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Dis Markers*, 2019, 2387614. <https://doi.org/10.1155/2019/2387614>

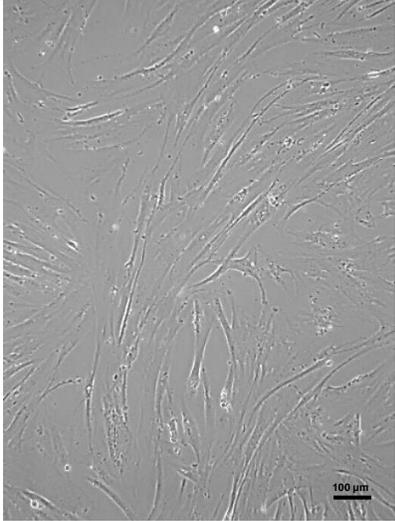
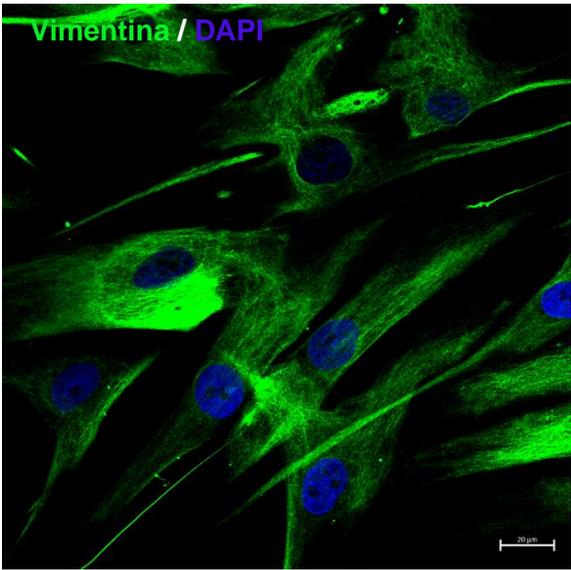
- Torres, S., Balboa, E., Zanlungo, S., Enrich, C., Garcia-Ruiz, C., & Fernandez-Checa, J. C. (2017). Lysosomal and Mitochondrial Liaisons in Niemann-Pick Disease. *Front Physiol*, 8, 982. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00982>
- Tsunemi, T., Ashe, T. D., Morrison, B. E., Soriano, K. R., Au, J., Roque, R. A., Lazarowski, E. R., Damian, V. A., Masliah, E., & La Spada, A. R. (2012). PGC-1alpha rescues Huntington's disease proteotoxicity by preventing oxidative stress and promoting TFEB function. *Sci Transl Med*, 4(142), 142ra197. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003799>
- Van Leeuwen, M. R., Smant, W., de Boer, W., & Dijksterhuis, J. (2008). Filipin is a reliable in situ marker of ergosterol in the plasma membrane of germinating conidia (spores) of *Penicillium discolor* and stains intensively at the site of germ tube formation. *J Microbiol Methods*, 74(2-3), 64-73. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.04.001>
- Vanier, M. T., & Millat, G. (2003). Niemann-Pick disease type C. *Clin Genet*, 64(4), 269-281. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2003.00147.x>
- Villamandos García, D., & Santos-Lozano, A. (2014). Enfermedad de Niemann-Pick: un enfoque global. *Ene*, 8(2), 0-0.
- Vogelsang, P., Giil, L. M., Lund, A., Vedeler, C. A., Parkar, A. P., Nordrehaug, J. E., & Kristoffersen, E. K. (2018). Reduced glucose transporter-1 in brain derived circulating endothelial cells in mild Alzheimer's disease patients. *Brain Res*, 1678, 304-309. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.10.035>
- Walkley, S. U., & Suzuki, K. (2004). Consequences of NPC1 and NPC2 loss of function in mammalian neurons. *Biochim Biophys Acta*, 1685(1-3), 48-62. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2004.08.011>
- Walterfang, M., Fietz, M., Abel, L., Bowman, E., Mocellin, R., & Velakoulis, D. (2009). Gender dimorphism in siblings with schizophrenia-like psychosis due to Niemann-Pick disease type C. *J Inherit Metab Dis*, 32 Suppl 1, S221-226. <https://doi.org/10.1007/s10545-009-1173-1>
- Walterfang, M., Fietz, M., Fahey, M., Sullivan, D., Leane, P., Lubman, D. I., & Velakoulis, D. (2006). The neuropsychiatry of Niemann-Pick type C disease in adulthood. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 18(2), 158-170. <https://doi.org/10.1176/jnp.2006.18.2.158>
- Wang, R., Li, M., Wu, W., Qiu, Y., Hu, W., Li, Z., Wang, Z., Yu, Y., Liao, J., Sun, W., Mao, J., & Zhu, Y. Z. (2021). NAV2 positively modulates inflammatory response of fibroblast-like synoviocytes through activating Wnt/beta-catenin signaling pathway in rheumatoid arthritis. *Clin Transl Med*, 11(4), e376. <https://doi.org/10.1002/ctm2.376>
- Watanabe, Y., Tamura, Y., Kakuta, C., Watanabe, S., & Endo, T. (2020). Structural basis for interorganelle phospholipid transport mediated by VAT-1. *J Biol Chem*, 295(10), 3257-3268. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011019>
- White, M. J. V., Briquez, P. S., White, D. A. V., & Hubbell, J. A. (2021). VEGF-A, PDGF-BB and HB-EGF engineered for promiscuous super affinity to the extracellular matrix improve wound healing in a model of type 1 diabetes. *NPJ Regen Med*, 6(1), 76. <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00189-1>
- Wos, M., Szczepanowska, J., Pikula, S., Tylki-Szymanska, A., Zablocki, K., & Bandorowicz-Pikula, J. (2016). Mitochondrial dysfunction in fibroblasts derived from patients with Niemann-Pick type C disease. *Arch Biochem Biophys*, 593, 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.02.012>
- Wu, J., & Witten, D. (2019). Flexible and Interpretable Models for Survival Data. *J Comput Graph Stat*, 28(4), 954-966. <https://doi.org/10.1080/10618600.2019.1592758>
- Wu, Y. P., Mizukami, H., Matsuda, J., Saito, Y., Proia, R. L., & Suzuki, K. (2005). Apoptosis accompanied by up-regulation of TNF-alpha death pathway genes in the brain of Niemann-Pick type C disease. *Mol Genet Metab*, 84(1), 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2004.08.017>

- Yanez, M. J., Marin, T., Balboa, E., Klein, A. D., Alvarez, A. R., & Zanlungo, S. (2020). Finding pathogenic commonalities between Niemann-Pick type C and other lysosomal storage disorders: Opportunities for shared therapeutic interventions. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1866(10), 165875. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165875>
- Yang, P., Wang, K., Zhang, C., Wang, Z., Liu, Q., Wang, J., Jiang, T., & Shan, X. (2021). Novel roles of VAT1 expression in the immunosuppressive action of diffuse gliomas. *Cancer Immunol Immunother*, 70(9), 2589-2600. <https://doi.org/10.1007/s00262-021-02865-z>
- Zampieri, S., Mellon, S. H., Butters, T. D., Nevyjel, M., Covey, D. F., Bembi, B., & Dardis, A. (2009). Oxidative stress in NPC1 deficient cells: protective effect of allopregnanolone. *J Cell Mol Med*, 13(9B), 3786-3796. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00493.x>
- Zarco-Román, J., Romero-Gómez, H. E., & Carbajal-Rodríguez, L. (2017). Niemann Pick disease type-A: presentation of 12 cases. *Acta pediátrica de México*, 38(3), 152-164.
- Zhang, S., Lachance, B. B., Mattson, M. P., & Jia, X. (2021). Glucose metabolic crosstalk and regulation in brain function and diseases. *Prog Neurobiol*, 204, 102089. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2021.102089>
- Zheng, X., Lin, W., Jiang, Y., Lu, K., Wei, W., Huo, Q., Cui, S., Yang, X., Li, M., Xu, N., Tang, C., & Song, J. X. (2021). Electroacupuncture ameliorates beta-amyloid pathology and cognitive impairment in Alzheimer disease via a novel mechanism involving activation of TFEB (transcription factor EB). *Autophagy*, 1-15. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1886720>
- Zong, Z., Xin, L., Tang, X., & Guo, H. (2021). The clinical characteristics and prognostic value of IGFBP6 in glioma. *Neurol Res*, 1-8. <https://doi.org/10.1080/01616412.2021.1963620>

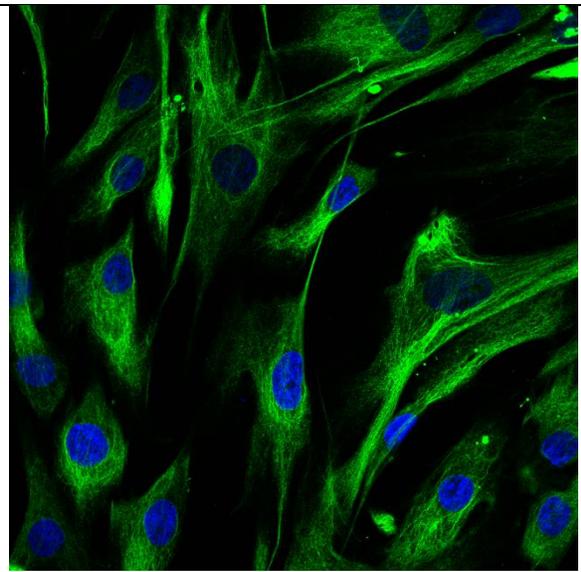
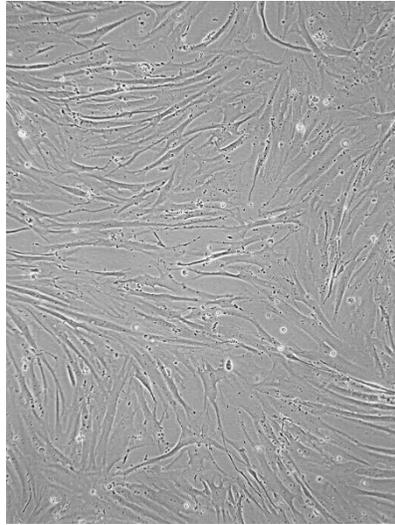
## 12. ANEXO

Con el objetivo de hacer la validación de las vías de señalización obtenidas en los resultados del análisis *in silico* se obtuvieron 7 líneas de fibroblastos del Instituto Coriell (<https://www.coriell.org/>), 4 pacientes con NPC y 3 aparentemente sanos o controles. Las líneas celulares se caracterizaron mediante inmunofluorescencia con el microscopio confocal mediante la expresión de vimentina, una proteína del citoesqueleto celular y marcador de células mesenquimales y fibroblastos; y también con el color azul se marcó el núcleo como marcaje celular mediante la tinción con DAPI.

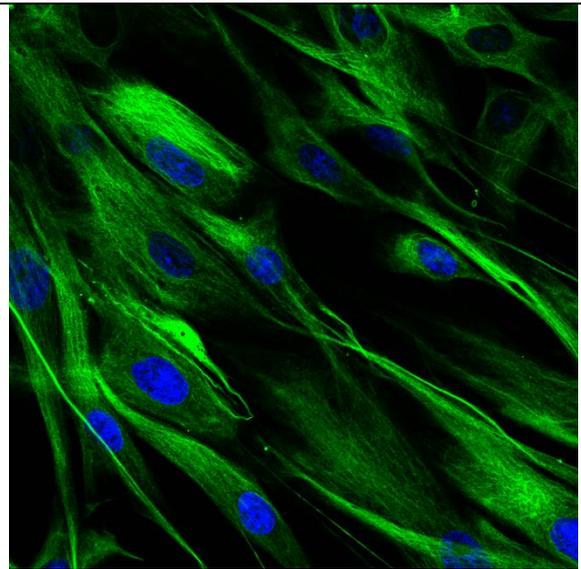
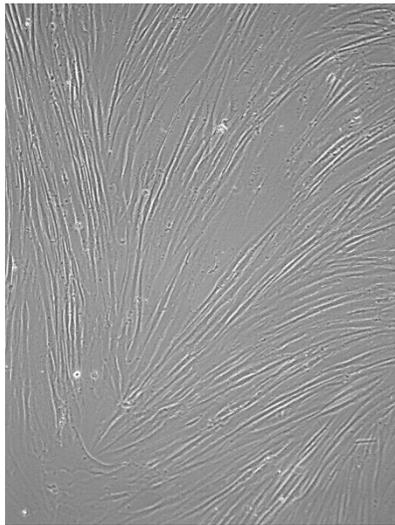
La siguiente tabla muestra el nombre de cada línea celular, junto con las características que tienen, como la edad y el sexo de los individuos, en todos los casos y para el caso de los pacientes la mutación(es) que tienen en el gen *NPC1* y los rasgos clínicos que mostraron. La caracterización de los fibroblastos en campo claro vistos en el microscopio óptico a 10x de contraste de fases, proviene del cultivo celular en una T25 y el pase va de los p4 a los p16, lo que se puede observar es su forma fusiforme, alargada o estrellada y con prolongaciones; en estos resultados también podemos notar la capacidad proliferativa de cada línea.

CONTROLES		
Línea celular de Fibroblastos	Campo claro 10x, microscopio óptico de contraste de fases. Barra de escala = 100 $\mu\text{m}$ .	Imágenes de microscopía confocal de las inmunofluorescencias para Vimentina (núcleos teñidos con DAPI). Barra de escala = 20 $\mu\text{m}$ .
<b>GM00969</b> Sexo: F Edad: 2 años		

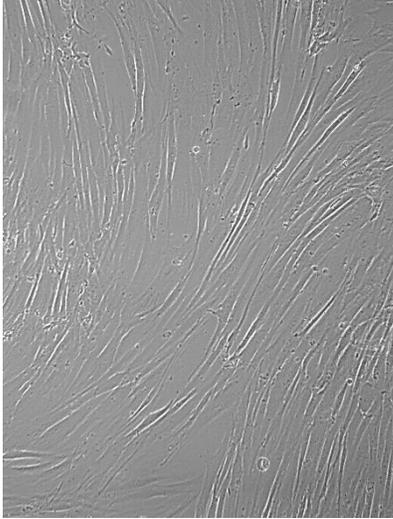
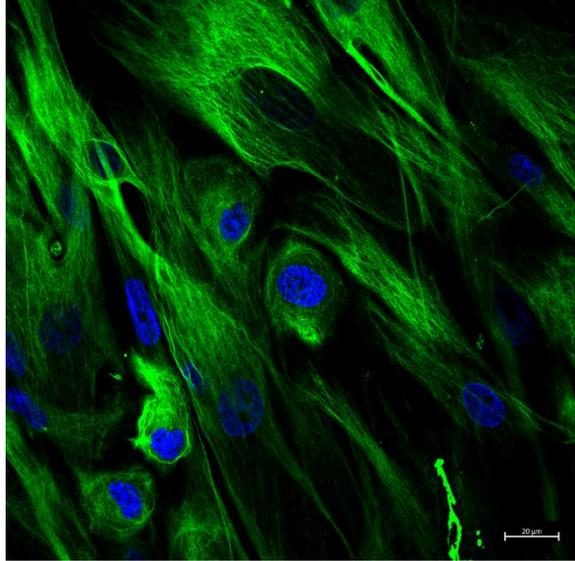
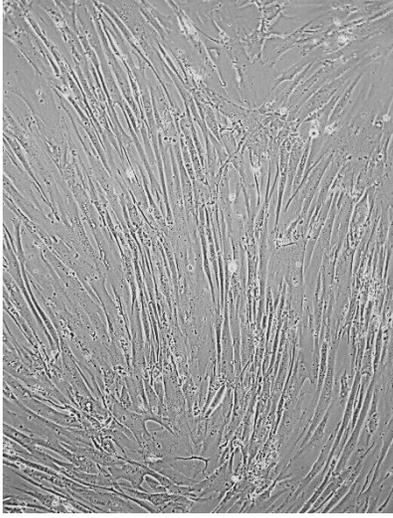
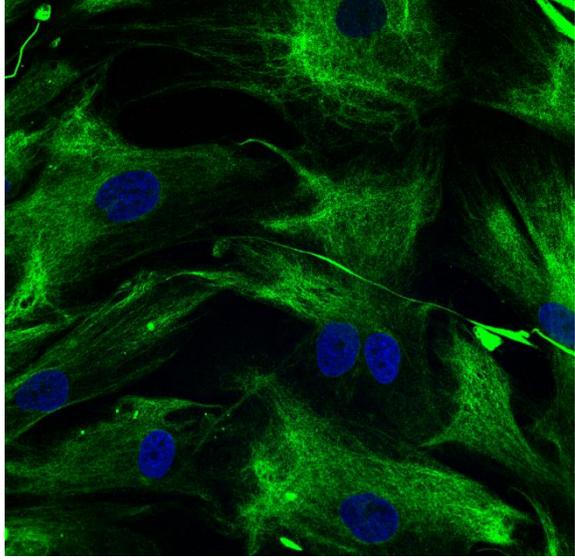
**GM01652**  
Sexo: F  
Edad; 11  
años

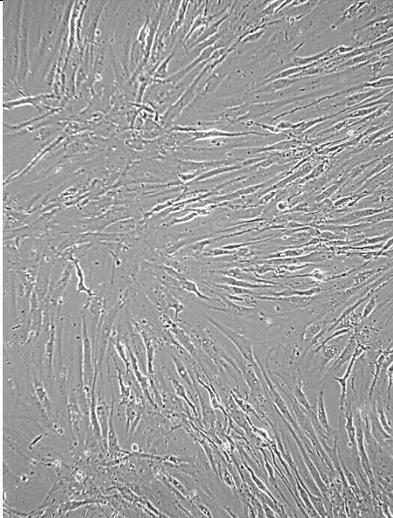
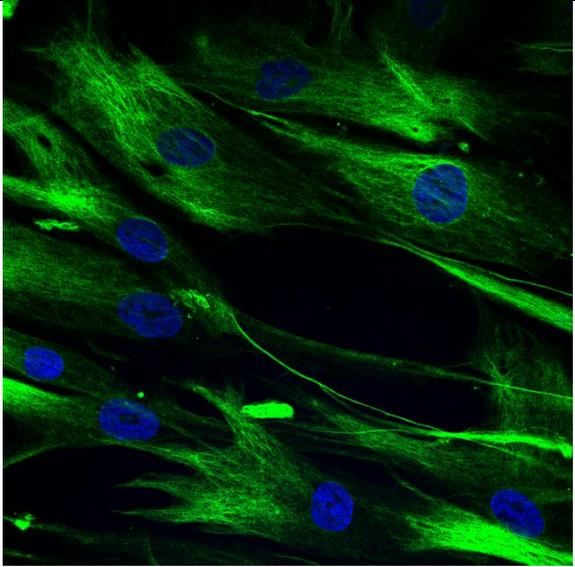
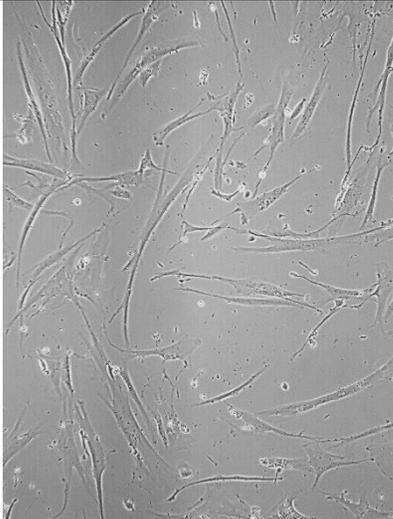
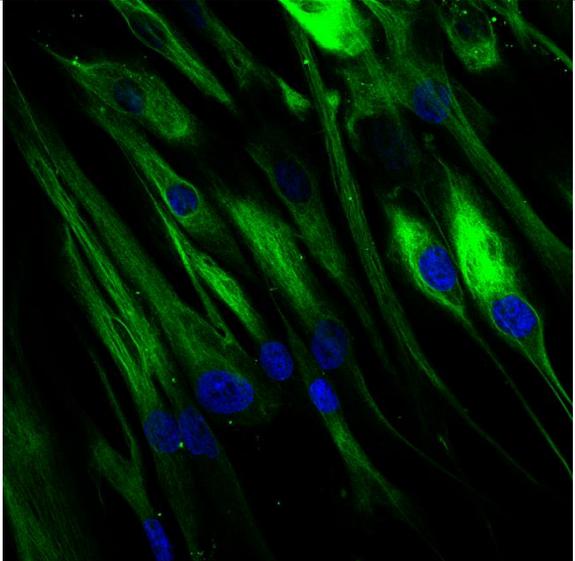


**GM02036**  
Sexo: F  
Edad: 11  
años



**PACIENTES**

Línea celular de Fibroblastos	Campo claro 10x, microscopio óptico de contraste de fases. Barra de escala = 100 μm.	Imágenes de microscopía confocal de las inmunofluorescencias para Vimentina (núcleos teñidos con DAPI). Barra de escala = 20 μm.
<p><b>GM03123</b>                      Sexo: F                      Edad: 9 años                      Genotipo: NPC1                      Mutación:                      c.1947+5G&gt;C                      ILE1061THR                      PRO237SER                      *Rasgos clínicos:                      Actividad de la esfingomielinasa al 38%, actividad "normal" de la β-galactosidasa y acumulación de colesterol no-esterificado en fibroblastos.</p>		
<p><b>GM22870</b>                      Sexo: F                      Edad: 4 años                      Genotipo: NPC1                      Mutación:                      1920delG IVS9-1009G&gt;A                      *Rasgos clínicos:                      Clínicamente afectado. Nacimiento prematuro a 35 semanas con cordón umbilical de 2 vasos; esplenomegalia a los 2 años; desarrollo de retraso y ataxia leve; hepatomegalia a los 3 años y 9 meses. Gemela de la línea GM22871.</p>		

<p><b>GM22871</b>  Sexo: F  Edad: 4 años  Genotipo: NPC1  Mutación:  1920delG IVS9-  1009G&gt;A  *Rasgos  clínicos:  Clínicamente  afectado.  Nacimiento  prematureo a 35  semanas con  cordón umbilical  de 2 vasos;  esplenomegalia  a los 2 años;  desarrollo de  retraso y ataxia  leve;  hepatomegalia a  los 3 años y 9  meses.  Gemela de la  línea GM22870.</p>		
<p><b>GM17914</b>  Sexo: F  Edad: 7 años  Genotipo: NPC1  Mutación:  424_25SinsGA  ILE1061THR  *Rasgos  clínicos:  Clínicamente  afectado. Ataxia,  regresión del  desarrollo,  parálisis de la  mirada superior;  los fibroblastos  no mostraron  colesterol no-  esterificado  detectable por  ensayo químico.</p>		

\*Rasgos clínicos obtenidos de la página del Instituto Coriell (<https://www.coriell.org/>).