

Laura López De Frutos

Avances en el diagnóstico y en el
conocimiento genético de la
enfermedad de Niemann Pick tipo
C

Departamento
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es
Giraldo Castellano, Pilar
Ramos Fuentes, Feliciano Jesús

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO Y EN EL
CONOCIMIENTO GENÉTICO DE LA ENFERMEDAD
DE NIEMANN PICK TIPO C

Autor

Laura López De Frutos

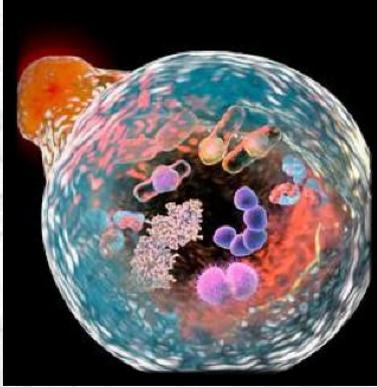
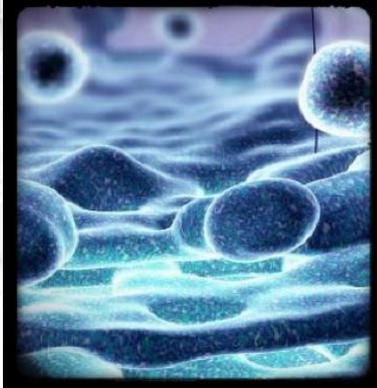
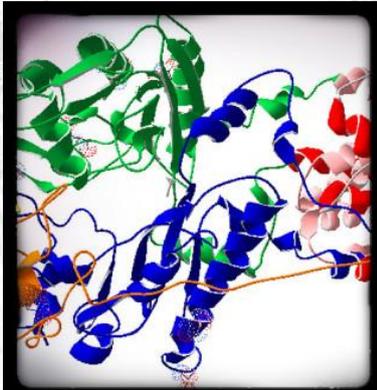
Director/es

Giraldo Castellano, Pilar
Ramos Fuentes, Feliciano Jesús

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2018

TESIS DOCTORAL



**AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO Y
EN EL CONOCIMIENTO GENÉTICO
DE LA ENFERMEDAD DE NIEMANN
PICK TIPO C**

LAURA LÓPEZ DE FRUTOS
MSc. Biología Humana (UB)
Lic. Biología (UPF)



Universidad
Zaragoza

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO Y EN EL
CONOCIMIENTO GENÉTICO DE LA ENFERMEDAD DE
NIEMANN PICK TIPO C**

Memoria presentada por **Laura López de Frutos**

Licenciada en Biología

Máster en Biología Humana

Para optar al Grado de Doctor

Tesis Doctoral dirigida por la Dra. Pilar Giraldo Castellano y el Prof. Feliciano J. Ramos
Fuentes

Zaragoza, Mayo 2018

La Dra. Pilar Giraldo Castellano, Investigadora de la Fundación Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón) y el Prof. Feliciano Jesús Ramos Fuentes, Catedrático de Pediatría de la Universidad de Zaragoza.

HACEN CONSTAR:

Que la Tesis Doctoral titulada “Avances en el diagnóstico y en el conocimiento genético de la enfermedad de Niemann Pick tipo C”, ha sido realizada en la Unidad de Investigación Traslacional del Hospital Universitario Miguel Servet, bajo su dirección y tutela, y que esta se ajusta al plan de investigación propuesto y reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor.

Zaragoza, Mayo de 2018

Fdo.: Pilar Giraldo Castellano

Fdo.: Feliciano J. Ramos Fuentes

Parte de este trabajo ha sido publicado en:

- **New variant associated with Niemann-Pick disease type C: Neurological manifestations and biochemical, molecular, and cellular characterization.** López de Frutos L, Romero-Imbroda J, Rodríguez-Sureda V, Giraldo P. *Neurología*. 2017 Aug 30; pii: S0213-4853(17)30253-0. doi: 10.1016/j.nrl.2017.07.010
- **The erythrocyte osmotic resistance test as screening tool for cholesterol-related lysosomal storage diseases.** López de Frutos L, Cebolla JJ, Irún P, Köhler R, Giraldo P. *Clin Chim Acta*. 2018 May; 482:161-165. doi:10.1016/j.cca.2018.02.010
- **Web-based bioinformatics predictors: Recommendations to assess lysosomal cholesterol trafficking diseases related genes.** López de Frutos L, Cebolla JJ, Irún P, Köhler R, Giraldo P. *Eur J Med Genet*. 2018. En revisión

AGRADECIMIENTOS

... Ara toca escriure la part més difícil...

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de tesis, especialmente a la Dra. Pilar Giraldo, porque sin ella no habría llegado este momento. Porque confió en mí cuando ni siquiera yo lo hacía, me convenció para que no enviara mi *curriculum* al extranjero y le diera una oportunidad a esta ciudad, y me permitió dar un nuevo enfoque a mi carrera profesional. Parece que, finalmente, se ha salido con la suya y ha conseguido quitar el “cito” a mi especialidad (con mucho dolor por mi parte). Y cómo no, también al Prof. Feliciano Ramos por aceptar dirigir la tesis de una persona a la que no conocía y en una enfermedad que no es su especialidad. Gracias a los dos por vuestra inestimable ayuda.

Cómo no, agradecer toda su ayuda a aquellas personas que han hecho posible esta tesis, que me han animado, y ayudado en el laboratorio, enseñándome todo lo que se. Especialmente a mis “laboratorio al poder” Jorge y Pili, sólo ellos saben lo que han aguantado y todo lo que me han tenido que ayudar, entre mis agobios y todo lo que no sabía creo que se han ganado el cielo!!!... a Bea y Carlos por su ayuda en el laboratorio y a todos los compañeros del grupo por su apoyo. También a todos los compañeros de la UIT y del LIM, especialmente a Izaskun por aguantar mis crisis sobre el peso de este trabajo y a Itzi por ayudarnos (desde el desconocimiento mutuo) con la interpretación de los exomas, quizás no lo hemos hecho lo mejor posible, pero sí lo mejor que hemos sabido. Un recuerdo especial a los Dr. Arbonés, Dr. García-Otín y Dr. Köhler por todas aquellas veces que he aparecido en su despacho con el “perdona, una pregunta...” porque siempre han tenido tiempo para contestarla, por absurda que fuera o por liados que estuvieran.

A mis chicas en Zaragoza, gracias a ellas esta ciudad ha sido más acogedora, a la Dra. Adolescente (Elena...) y a Gracia (¿te llamas Gracia porque eres muy graciosa?), sin ellas estos cuatro años habrían sido mucho más largos. Gracias por ayudarme a desconectar, acompañarme de excursión... y gracias sobre todo a Gracia por aguantar mis neuras cada fin de semana, ahora no sé de qué vamos a hablar, bueno sí, tenemos un *planning* por hacer!!! A Susana, Paula y Lis por obligarme a ir al gimnasio de vez en cuando porque después de un descanso (de sudar y de una cervecita) retomas el trabajo con energía renovadas.

I ara si...

Toca agrair a aquella gent que realment ha fet possible aquesta feina, perquè sense el seu suport jo no seria ningú. A la meva mare Sole pel seu suport incondicional i pel seus patiments

cada vegada que agafo el cotxe per anar de visita, per aguantar que li parli de la feina encara que no entén ni una paraula del que li explico. A les meves Ángeles de Charlie (Sandra i Marta) perquè sé que tant se val des de quina alçada caigui, elles son la meva xarxa de seguretat. A l'Ignasi, el meu cunyat, per aguantar a les pesades de les seves cunyades sense queixar-se i sobretot als meus nebots, el Roger i la Núria, perquè sense ells la vida seria en blanc i negre. Tinc la millor família que ningú pot desitjar. I com no, als cosins-nebots adoptius, el seny i la rauxa, el Gerard i el Sergi, perquè sempre va bé tenir gent de totes les edats al teu voltant per veure la vida des de diferents perspectives.

Als meus amics de sempre per ser-hi malgrat la distancia i saber que sempre puc comptar amb vosaltres.

I com no, gràcies a aquella persona que ja no hi és però que sempre m'acompanya. Papa, se que avui estaries orgullós de mi, ni t'imagines com et trobem a faltar.

Gràcies a tots, de debò, sense el vostre suport aquesta feina no hagués estat possible. Us estimo fins a la lluna anar i tornar.

El que s'adquireix amb molt de treball s'estima més

(Aristòtil)

ACRÓNIMOS

7-CC	7-cetocolesterol
AA	Aminoácidos
AMPK	Una vía de señalización celular
ATP	Adenina tri-fosfato
AUC	Del inglés, área bajo la curva
AVV9	Adenovirus asociado serotipo 9
BHT	Butil hidroxitolueno
CCL18/PARC	Quimiocina ligando 18/quimiocina reguladora de activación pulmonar
cDNA	DNA complementario
CEICA	Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón
CIBERER	Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras
d7-7CC	7-cetocolesterol con 7 deuterios
ddNTPs	Disdesoxinucleótidos trifosfato terminadores
DLAL	Déficit de lipasa ácida lisosomal
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Dinucleótidos
ECR	Del inglés, dominios altamente conservados
EDL	Enfermedad de depósito lisosomal
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EG	Enfermedad de Gaucher
ERAD	Del inglés, sistema de degradación proteica asociado al retículo endoplásmico
ERK	Una vía de señalización celular
GM2/GM3	Gangliósidos
GRCh38	Del inglés, versión 38 del Consorcio para el Genoma Humano de Referencia
GSH	Glutación
HDACi	Del inglés, inhibidor de histona deacetilasas
HGMD	Del inglés, base de datos de mutaciones en el genoma humano
HP β CDs	2-Hidroxipropil- β -ciclodextrinas
HPLC	Del inglés, cromatografía líquida de alta resolución
HSF	<i>Human Splicing Finder</i>
HSP	Del inglés, proteínas de choque térmico

IC	Intervalo de confianza
IIS	Instituto de Investigación Sanitaria
LDL	Del inglés, lipoproteína de baja densidad
MC	Del inglés, contactos entre membranas
MCC	Coeficiente de correlación de Matthews
MLPA	Del inglés, amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples
mRNA	RNA mensajero
NCBI	Del inglés, base de datos Gene del Centro Nacional de Información Bioinformática
NGS	Del inglés, secuenciación de nueva generación
NP	Niemann Pick
NP-A/B	Niemann Pick tipos A o B
NP-C	Niemann Pick tipo C
NPCBA1	Ácido 3b-hidroxi,7-b-N-acetilglucosaminilo-5-colenoico
NPCBA2	3b,5a,6b-trihidroxicolanil-glicina
NPC-SI	Del inglés, índice de sospecha de enfermedad de Niemann Pick tipo C
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Del inglés, reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Del inglés, base de datos de proteínas
qRT-PCR	PCR cuantitativa mediante retrotranscripción
QT	Quitotriosidasa
RE	Retículo endoplásmico
ROC	Del inglés, curva operador-receptor
ROE	Resistencia osmótica eritrocitaria
ROS	Del inglés, especies oxígeno reactivas
SANDO	Del inglés, neuropatía atáxica sensitiva, disartria y oftalmoplejia
SSD	Del inglés, dominio de unión a esteroides
TAE	Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) + Tris aminometano + Ácido acético
UTR	Del inglés, región no transcrita
VSGP	Del inglés, parálisis supranuclear de la mirada vertical
VUS	Del inglés, variante de significado incierto

ENLACES

1000 genomas	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/
ClinicalTrials	https://clinicaltrials.gov/
ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
Clustal Omega	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
DUET	http://biosig.unimelb.edu.au/duet/stability
Ensembl	https://www.ensembl.org/index.html
ExAC	http://exac.broadinstitute.org/
FATHMM-Inherited Disease	http://fathmm.biocompute.org.uk/inherited.html
FATHMM-MKL	http://fathmm.biocompute.org.uk/fathmmMKL.htm
FSPLICE	http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fssplice&group=programs&subgroup=gfind
GENESCAN web server by MIT	http://genes.mit.edu/GENSCAN.html
GRCh38	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/human
Hansa	http://www.cdfd.org.in/HANSA/
HGMD	http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php
Human Splicing Finder	http://www.umd.be/HSF3/
i-Mutant Suit	http://gpcr2.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/I-Mutant3.0/I-Mutant3.0.cgi
Mutation Assessor	http://mutationassessor.org/r3/
MutPred1	http://mutpred1.mutdb.org/
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NetGene2 server	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/
NPC-db2	https://medgen.medizin.uni-tuebingen.de/NPC-db2/index.php
NPC-SI	http://www.npc-si.com/
PDB	http://www.rcsb.org/
PMuT	http://mmb.irbbarcelona.org/PMut/
Polyphen2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
Predict SNP1	https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp1/
Predict SNP2	https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp2/
PROVEAN Genome variants	http://provean.jcvi.org/genome_submit_2.php?species=human
PROVEAN Protein	http://provean.jcvi.org/protein_batch_submit.php?species=human
SIFT	http://sift.jcvi.org/
SNAP2	https://www.rostlab.org/services/SNAP/

SNPs&GO	http://snps.biofold.org/snps-and-go/snps-and-go.html
SNPs&GO 3D	http://snps.path.uab.edu/snps-and-go/snps-and-go-3d.html
Spanish Variant Server	http://csvs.babelomics.org/
SPL	http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=spl&group=programs&subgroup=gfind
Spliceport	http://spliceport.cbcb.umd.edu/
SpliceSite Prediction by Neural Network	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
SROOGLE	https://sroogle.tau.ac.il/
Swiss PDB View	https://spdbv.vital-it.ch/

ÍNDICE

1	RESUMEN	27
2	INTRODUCCIÓN	
2.1	ANTECEDENTES HISTÓRICOS	37
2.2	EPIDEMIOLOGÍA	38
2.3	MANIFESTACIONES CLÍNICAS	39
2.3.1	Afectación sistémica	39
2.3.2	Afectación del sistema nervioso	41
2.3.3	Afectación psiquiátrica	43
2.4	CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES DE ENFERMEDAD DE NP-C	44
2.4.1	Presentación perinatal	45
2.4.2	Presentación infantil precoz	46
2.4.3	Presentación infantil tardía	46
2.4.4	Presentación juvenil	47
2.4.5	Presentación adolescente/adulta	47
2.5	GENÉTICA MOLECULAR EN LA ENFERMEDAD DE NP-C	48
2.5.1	Características de <i>NPC1</i>	48
2.5.2	Características de <i>NPC2</i>	49
2.6	ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS NPC1 Y NPC2	51
2.6.1	Proteína NPC1	51
2.6.2	Proteína NPC2	53
2.6.3	Función de las proteínas NPC1 y NPC2	54
2.7	FISIOPATOLOGÍA	56
2.7.1	Transporte de colesterol	56
2.7.2	Proteostasis y estrés celular	58
2.7.3	Biogénesis y homeostasis del lisosoma	59
2.7.4	Exocitosis	61
2.7.5	Regulación mitocondrial	62
2.8	DIAGNÓSTICO	65
2.8.1	Evaluación clínica	66
2.8.2	Estudios de transporte de colesterol	69
2.8.3	Biomarcadores	70
2.8.4	Estudio genético	74

2.9	TRATAMIENTO	76
2.9.1	Miglustat	76
2.9.2	Ciclodextrinas (ensayo clínico)	78
2.9.3	Arimoclomol® (ensayo clínico)	79
2.9.4	Vorinostat® (ensayo clínico)	79
2.9.5	Carbonato de litio (ensayo clínico)	80
2.9.6	Acetil-DL-leucina	80
2.9.7	Terapia génica	80

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1	HIPÓTESIS	83
3.2	OBJETIVOS	83
3.2.1	BLOQUE 01: Estudios para detectar la enfermedad	83
3.2.2	BLOQUE 02: Estudio genético de la enfermedad de NP-C	84

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1	MATERIAL	87
4.1.1	Pacientes	87
4.1.2	Material biológico	87
4.1.3	Aparatos e instrumentos	88
4.1.4	Reactivos	90
4.2	MÉTODOS	97
4.2.1	Separación de extractos	97
4.2.2	Determinación de biomarcadores plasmáticos	104
4.2.3	Test de resistencia osmótica eritrocitaria	107
4.2.4	Cuantificación de la concentración del colesterol contenido en la membrana eritrocitaria	108
4.2.5	Análisis molecular del gen <i>CHIT1</i>	109
4.2.6	Análisis molecular de los genes <i>NPC1</i> y <i>NPC2</i>	111
4.2.7	Síntesis de cDNA	120
4.2.8	Análisis molecular de la transcripción de los genes <i>NPC1</i> y <i>NPC2</i> en leucocitos	122
4.2.9	Cuantificación de la expresión del gen <i>NPC1</i> en leucocitos mediante técnica de PCR cuantitativa (RT-qPCR)	125
4.2.10	Análisis exómico	128
4.2.11	Análisis molecular del premiR33a	130
4.2.12	Análisis estadístico de los datos	132
4.2.13	Procedimiento de trabajo	132

5 RESULTADOS

5.1	BLOQUE 01: ESTUDIOS PARA LA DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD	137
5.1.1	Desarrollo de nuevos sistemas de cribado para NP-C	137
5.1.2	Valoración de la determinación combinada de biomarcadores	145
5.2	BLOQUE 02: ESTUDIOS GENÉTICOS	151
5.2.1	Caracterización de los genes <i>NPC1</i> y <i>NPC2</i> en población española	151
5.2.2	Evaluación del efecto de variantes de significado incierto	169
5.2.3	Otros factores que pueden regular la expresión de <i>NPC1</i>	180

6 DISCUSIÓN

6.1	DETECCIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD	185
6.2	ESTUDIO GENÉTICO DE LA ENFERMEDAD	190

7 CONCLUSIONES

7.1	BLOQUE 01: ESTUDIOS PARA DETECTAR LA ENFERMEDAD	201
7.2	BLOQUE 02: ESTUDIO GENÉTICO DE LA ENFERMEDAD DE NIEMANN PICK TIPO C	201

8 REFERENCIAS **203**

9 MANUSCRITOS

9.1	MANUSCRITO 1: The erythrocyte osmotic resistance test as screening tool for cholesterol-related lysosomal storage diseases.	237
9.2	MANUSCRITO 2: Web-based bioinformatics predictors: Recommendations to assess lysosomal cholesterol trafficking diseases related genes.	243
9.3	MANUSCRITO 3: Nueva variante asociada a enfermedad de Niemann-Pick tipo C: manifestaciones neurológicas y caracterización bioquímica, molecular y celular.	251

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

TABLAS

TABLA 2.9.1. EFECTOS ADVERSOS NOTIFICADOS EN ENSAYO CLÍNICO O DE FORMA ESPONTÁNEA DURANTE EL TRATAMIENTO CON MIGLUSTAT.	78
TABLA 4.1.1. APARATAJE UTILIZADO PARA EL DESARROLLO DEL PROYECTO.	90
TABLA 4.1.2. INICIADORES UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE DNA.	94
TABLA 4.1.3. INICIADORES UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE CDNA.	95
TABLA 4.1.4. INICIADORES UTILIZADOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN NPC1.	95
TABLA 4.1.5. KITS UTILIZADOS PARA EL DESARROLLO DEL PROYECTO.	96
TABLA 4.2.1. PUBLICACIONES ASOCIADAS A LOS MÉTODOS DESCRITOS	97
TABLA 4.2.2. CANTIDADES Y CONCENTRACIONES FINALES PARA LAS AMPLIFICACIONES POR PCR DEL GEN <i>CHIT1</i> .	111
TABLA 4.2.3.- CANTIDADES Y CONCENTRACIONES FINALES PARA LAS AMPLIFICACIONES POR PCR DE LOS GENES <i>NPC1</i> Y <i>NPC2</i>	113
TABLA 4.2.4. CONDICIONES DE LA AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS FRAGMENTOS DE LOS GENES <i>NPC1</i> Y <i>NPC2</i> .	114
TABLA 4.2.5. VOLÚMENES NECESARIOS PARA UNA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN.	116
TABLA 4.2.6. CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN.	116
TABLA 4.2.7. PREDICTORES DE EFECTO " <i>IN SILICO</i> " UTILIZADOS.	118
TABLA 4.2.8. LISTADO DE VARIANTES UTILIZADAS PARA LA VALIDACIÓN DE PREDICTORES.	119
TABLA 4.2.9. CANTIDADES Y CONCENTRACIONES FINALES PARA LA REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN.	120
TABLA 4.2.10. CANTIDADES Y CONCENTRACIONES FINALES PARA LAS AMPLIFICACIONES POR PCR.	122
TABLA 4.2.11. CANTIDADES Y CONCENTRACIONES FINALES PARA LAS AMPLIFICACIONES POR PCR DE LOS GENES <i>NPC1</i> Y <i>NPC2</i> .	123
TABLA 4.2.12. CONDICIONES DE LA AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS FRAGMENTOS DE CDNA LOS GENES <i>NPC1</i> Y <i>NPC2</i> .	124
TABLA 4.2.13. CONDICIONES DE LA AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS FRAGMENTOS DE DNA PARA VALIDAR LAS VARIANTES ASOCIADAS A PATOGENICIDAD DETECTADAS MEDIANTE EL ESTUDIO DE EXOMAS	129
TABLA 4.2.14. CANTIDADES Y CONCENTRACIONES FINALES PARA LAS AMPLIFICACIONES POR PCR DEL PRIMIR-33A.	131
TABLA 5.1.1. CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL EMBEBIDO EN LA MEMBRANA ERITROCITARIA EN LOS CONTROLES Y PACIENTES ANALIZADOS.	144
TABLA 5.1.2. EQUIVALENCIAS ENTRE LAS PUNTUACIONES OBTENIDAS Y EL RIESGO ASIGNADO POR EDAD.	145

TABLA 5.1.3. ESTADO Y VALORES OBSERVADOS EN LOS SUJETOS QUE MOSTRABAN ELEVACIÓN DE LOS TRES BIOMARCADORES.	151
TABLA 5.2.1. DESCRIPCIÓN CLÍNICA DE LOS 180 SUJETOS ANALIZADOS	153
TABLA 5.2.2. INFORMACIÓN CLÍNICA DE LOS SUJETOS CON MÍNIMO 1 VARIANTE PATOGENICA EN EL GEN <i>NPC1</i> .	154
TABLA 5.2.3. DATOS CRUDOS PROPORCIONADOS POR CADA PREDICTOR	157
TABLA 5.2.4. DATOS CRUDOS PROPORCIONADOS POR CADA PREDICTOR.	160
TABLA 5.2.5. DESCRIPCIÓN DEMOGRÁFICA, NIVELES DE BIOMARCADORES Y SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA DE LOS SUJETOS CON VARIANTES EN <i>NPC2</i> .	162
TABLA 5.2.6. VARIANTES CON EFECTO NEUTRAL SEGÚN LOS DATOS PUBLICADOS EN CLINVAR.	165
TABLA 5.2.7. VARIANTES CON EFECTO PATOGENICO SEGÚN LOS DATOS PUBLICADOS EN CLINVAR O EN HGMD.	166
TABLA 5.2.8. VARIANTES CON EFECTO DE SIGNIFICADO INCIERTO O SIN EFECTO DESCRITO SEGÚN LOS DATOS PUBLICADOS EN CLINVAR.	168
TABLA 5.2.9. RESULTADO DEL ESTUDIO DE PREDICTORES " <i>IN SILICO</i> " PARA LAS VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO.	169
TABLA 5.2.10. PREDICCIONES DE EFECTO PARA LAS DOS VARIANTES QUE PRESENTA LA PACIENTE.	170
TABLA 5.2.11. ENERGÍA CALCULADA POR SWISSPROTVIEWER PARA CADA AMINOÁCIDO POSIBLE EN LA SECUENCIA DE NUESTRO PACIENTE.	172
TABLA 5.2.12. FRECUENCIA DE LAS VARIANTES ANALIZADAS	179
TABLA 5.2.13. EFECTO TEÓRICO DE LA VARIANTE ANALIZADA SEGÚN DIFERENTES PREDICTORES.	179
TABLA 5.2.14. DESCRIPCIÓN DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUO DE REGULADORES DE LA EXPRESIÓN DE <i>NPC1</i> .	180
TABLA 5.2.15. PREDICCIONES DE EFECTO PARA LAS DOS VARIANTES DETECTADAS PRÓXIMAS A LA REGIÓN DEL MIR33A.	182

FIGURAS

FIGURA 2.3.1. ESQUEMA DE LA SINTOMATOLOGÍA MÁS RELEVANTE EN LA ENFERMEDAD DE NP-C	39
FIGURA 2.3.2. IMÁGENES DE UN PACIENTE CON NP-C2	41
FIGURA 2.4.1. ESQUEMA DE LA CLASIFICACIÓN DE LOS AFECTADOS DE NP-C EN FUNCIÓN DE LA EDAD DE APARICIÓN DE LA SINTOMATOLOGÍA NEUROLÓGICA	45

FIGURA 2.5.1. IDIOGRAMA DE BANDAS G DEL CROMOSOMA 18	48
FIGURA 2.5.2. IDIOGRAMA DE BANDAS G DEL CROMOSOMA 14	50
FIGURA 2.5.3 VARIANTES ASOCIADAS A PATOGENICIDAD DESCRITAS EN EL GEN <i>NPC2</i> SEGÚN LA BASE DE DATOS HGMD	51
FIGURA 2.6.1 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA NPC1	52
FIGURA 2.6.2. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA NPC2 BOVINA	54
FIGURA 2.6.3. TRASFERENCIA DEL COLESTEROL ENTRE LAS PROTEÍNAS NPC2 Y NPC1	55
FIGURA 2.7.1. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA AFECTACIÓN EN EL TRANSPORTE DEL COLESTEROL	57
FIGURA 2.7.2. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA ELIMINACIÓN DE PROTEÍNAS MAL PLEGADAS	59
FIGURA 2.7.3. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA BIOSÍNTESIS DE LISOSOMAS Y MITOCONDRIAS	60
FIGURA 2.7.4. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA EXOCITOSIS	62
FIGURA 2.7.5. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA INTERACCIÓN ENTRE MITOCONDRIA Y LISOSOMA	63
FIGURA 2.8.1. ALGORITMO DIAGNÓSTICO PARA LA ENFERMEDAD DE NP-C	66
FIGURA 2.8.2. CUESTIONARIO PARA CALCULAR EL NPC-SI	68
FIGURA 2.8.3. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA LA TINCIÓN FILIPINA	70
FIGURA 2.8.4. PROCESO DE FORMACIÓN DEL 7-CETOCOLESTEROL.	72
FIGURA 2.8.5. PROCESO DE FORMACIÓN DEL COLESTANO 3B-5A-6B-TRIOL	73
FIGURA 4.2.1 SISTEMA DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA MEDIANTE SONDAS TAQMAN	125
FIGURA 4.2.2 ESQUEMA DE TRABAJO TRAS RECIBIR UNA MUESTRA CON SOSPECHA DE ENFERMEDAD DE NIEMANN PICK TIPO C	133
FIGURA 5.1.1 ESQUEMA DE TRABAJO TRAS RECIBIR UNA MUESTRA CON SOSPECHA DE ENFERMEDAD DE NIEMANN PICK TIPO C	138
FIGURA 5.1.2 CURVA ROC PARA LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SOLUCIÓN SALINA TESTADAS	139
FIGURA 5.1.3 BOXPLOT AFECTOS DE NP-C O DLAL VS CONTROLES	140
FIGURA 5.1.4 BOXPLOT AFECTOS DE EDL VS CONTROLES	141
FIGURA 5.1.5 PROTOCOLO DE ESTUDIO DE MUESTRAS EN FUNCIÓN DEL RESULTADO DEL TEST DE HEMÓLISIS	142
FIGURA 5.1.6 GRÁFICO DE EVOLUCIÓN DE LOS PACIENTES DE DLAL MONITORIZADO	143
FIGURA 5.1.7 BOXPLOT CON LOS RESULTADOS DE ACTIVIDAD QUITOTRIOSIDASA PARA CADA GRUPO	147
FIGURA 5.1.8 CURVA ROC PARA LA UTILIDAD DE LA ACTIVIDAD QUITOTRIOSIDASA COMO BIOMARCADOR DE ENFERMEDAD DE NP-C	147
FIGURA 5.1.9 BOXPLOT CON LOS RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN CCL18/PARC PARA CADA GRUPO	148
FIGURA 5.1.10 CURVA ROC PARA LA UTILIDAD DE LA CONCENTRACIÓN DE LA QUIMIOCINA CCL18/PARC COMO BIOMARCADOR DE ENFERMEDAD DE NP-C	149

FIGURA 5.1.11 BOXPLOT CON LOS RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN DE 7-CC PARA CADA GRUPO	150
FIGURA 5.1.12 CURVA ROC PARA LA UTILIDAD DE LA CONCENTRACIÓN DEL OXISTEROL 7-CC COMO BIOMARCADOR DE ENFERMEDAD DE NP-C	150
FIGURA 5.2.1 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS VALORES DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, CCM, EXACTITUD Y PRECISIÓN DE CADA PREDICTOR ANALIZADO	158
FIGURA 5.2.2 CURVAS ROC PARA LOS PREDICTORES DE EFECTO DE VARIANTES EN REGIONES EXÓNICAS	159
FIGURA 5.2.3 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS VALORES DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, CCM, EXACTITUD Y PRECISIÓN DE CADA PREDICTOR ANALIZADO.	161
FIGURA 5.2.4 CURVAS ROC PARA LOS PREDICTORES DE EFECTO DE VARIANTES EN REGIONES INTRÓNICAS	161
FIGURA 5.2.5 ESQUEMA CON LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LAS 180 SECUENCIAS DE <i>NPC1</i>	163
FIGURA 5.2.6 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA <i>NPC1</i>	164
FIGURA 5.2.7 ALINEAMIENTO DE PARTE DE LA SECUENCIA DE <i>NPC1</i> ENTRE DIFERENTES ESPECIES	171
FIGURA 5.2.8 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA <i>NPC1</i>	172
FIGURA 5.2.9 ALINEAMIENTO DE PARTE DE LA SECUENCIA DE <i>NPC1</i>	174
FIGURA 5.2.10 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA <i>NPC1</i>	175
FIGURA 5.2.11 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA <i>NPC1</i>	176
FIGURA 5.2.12 ALINEAMIENTO DE PARTE DE LA SECUENCIA DE <i>NPC1</i>	177
FIGURA 5.2.13 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA <i>NPC1</i>	178
FIGURA 5.2.14 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>NPC1</i>	182

1 RESUMEN



Introducción

La enfermedad de Niemann Pick tipo C (NP-C, MIM#257220 y MIM#607625) es una enfermedad rara, con una prevalencia estimada de 1/89.229 nacimientos. Se trata de una enfermedad de depósito lisosomal, en la que, a causa de un déficit del transporte desde el lisosoma al exterior, este se acumula, provocando la disfunción de este orgánulo y de las vías metabólicas en las que está implicado.

En el aspecto clínico la enfermedad de NP-C provoca alteraciones a tres niveles, sistémico, neurológico y psiquiátrico, siendo las manifestaciones más comunes las visceromegalias, ataxia y la parálisis de la mirada vertical. Su clasificación se basa en el momento de aparición de la sintomatología neurológica definiendo 5 grupos: 1.- Perinatal, 2.- Infantil precoz, 3.- infantil tardía, 4.- Juvenil, 5.- Adolescente/Adulta.

Los genes responsables de la enfermedad son *NPC1* y *NPC2*, que codifican las proteínas lisosomales que se ocupan del transporte intracelular del colesterol. El gen *NPC1* (MIM#607623), alterado en el 95% de los casos diagnosticados, es un gen de gran tamaño con una gran variabilidad polimórfica. Se han descrito más de 700 variantes en el gen, siendo 453 causales de la enfermedad de Niemann Pick tipo C. El gen *NPC2* (MIM#601015), tiene un tamaño mucho menor, y sólo se ha asociado a enfermedad en un 4% de los casos. La mayoría de variantes patogénicas detectadas afectan únicamente a un familia, habiéndose descrito sólo 27 asociadas a la enfermedad.

La fisiopatología de la enfermedad es consecuencia del defecto en las proteínas NPC1 y NPC2, la primera se localiza en la membrana del lisosoma y la segunda es una pequeña proteína soluble que se localiza en el lumen de este orgánulo. La principal función de ambas es transportar el colesterol fuera del lisosoma, cuando este es recibido por la proteína NPC2 esta se lo transfiere a NPC1, que se encuentra inmovilizada en la membrana y actúa transfiriéndolo a su destino.

El algoritmo diagnóstico de la enfermedad se inicia con la sospecha clínica de la misma, a continuación se analizan biomarcadores plasmáticos sugestivos de enfermedad de depósito lisosomal y en función del resultado de estos se procede a la secuenciación de los genes responsables. En función de los hallazgos que se obtengan se confirma o desmiente la sospecha o será necesario realizar pruebas complementarias (ampliar el estudio molecular o realizar tinciones para detectar el colesterol acumulado) para intentar llegar a un diagnóstico definitivo.

La enfermedad de NP-C no tiene un tratamiento curativo, actualmente el único que está aprobado por la Agencia del Medicamento es el Miglustat, un inhibidor de la síntesis de glicosfingolípidos que evita su acúmulo y por lo tanto mejora la sintomatología. Además gracias a su pequeño tamaño puede atravesar la barrera hematoencefálica teniendo efecto también a nivel de sintomatología neurológica.

Hipótesis

La dificultad que plantea el diagnóstico de la enfermedad de Niemann-Pick C induce a la búsqueda de indicadores diagnósticos a tres niveles: técnicas simplificadas de cribado, análisis de los mejores biomarcadores y profundizar en el estudio genético. Estas mejoras permitirían la identificación precoz de pacientes con riesgo de desarrollar daño neurológico irreversible.

Objetivos

Los objetivos del presente trabajo se han dividido en dos grandes bloques:

El “Bloque 01: Estudios para detectar la enfermedad” consta de dos objetivos: 1.- Desarrollar un nuevo sistema de cribado para mejorar la detección de pacientes; y 2.- Evaluar la eficacia de la determinación combinada de marcadores subrogados de enfermedad de depósito lisosomal.

El “Bloque 02: Estudio genético de la enfermedad” tiene tres objetivos: 1.- Caracterizar los genes responsables de la enfermedad de Niemann Pick tipo C en la población española; 2.- Asignar un efecto a algunas variantes patogénicas no descritas previamente o cuyo significado se desconoce; y 3.- Evaluar otros factores que pueden estar influyendo en la regulación del gen *NPC1* y por lo tanto en el desarrollo de la enfermedad.

Material y métodos

Para cumplir con los objetivos propuestos se analizaron tres grupos poblacionales, a los que se les realizó el estudio diagnóstico de la enfermedad de NP-C a partir de sangre total recibida en el laboratorio en un plazo máximo de 24h tras la extracción.

El primer grupo, utilizado para cumplir el objetivo 1, estaba compuesto por 121 individuos, 18 afectados de EDLs (NP-C o DLAL) y 103 controles a los que se les realizó un test de resistencia

osmótica eritrocitaria, a 73 de ellos (10 afectados y 63 controles) se les realizó la determinación de concentración de colesterol en la membrana eritrocitaria.

El segundo grupo constaba de 180 individuos remitidos como sospecha de NP-C no relacionados entre ellos a los que se les realizó el estudio diagnóstico completo (cálculo del NPC-SI, determinación de biomarcadores y caracterización de los genes *NPC1* y *NPC2* mediante secuenciación Sanger) siempre que fue posible. Además, según la disponibilidad de muestra y la necesidad de ampliar el estudio, se realizó la secuenciación del cDNA del gen *NPC1* y se cuantificó su expresión mediante RT-qPCR. Este grupo se utilizó para estudiar los objetivos 2, 3 y 4.

Finalmente, a un pequeño grupo de 11 individuos portadores de una variante patogénica o de significado incierto en heterocigosidad, clínica sugestiva de NP-C y al menos un biomarcador alterado, se le realizó la secuenciación del exoma completo con la finalidad de identificar nuevos genes que pudieran asociarse a la enfermedad de NP-C o variantes que justificaran la presencia de sintomatología en sujetos heterocigotos. Así mismo, a un subgrupo de este se le analizó la secuencia del miR33a, asociado a la regulación del gen *NPC1* para valorar la integridad de la misma. Con estos estudios se daba por desarrollado el objetivo 5 propuesto en este trabajo.

Resultados y Discusión

Respecto al primer objetivo, el grupo analizado estaba formado por 103 controles, 12 afectados de DLAL y 6 afectados de NP-C. El test de resistencia osmótica eritrocitaria (ROE) mostró un incremento estadísticamente significativo en la resistencia a la rotura en el grupo de afectos (incluyendo las dos patologías) respecto al grupo control. Esta diferencia se maximizaba a una concentración de solución salina del 0,49% obteniendo un p-valor mediante el test U de Mann-Whitney de 0,00 y un área bajo la curva de 0,84.

A pesar de que el test nos permitía diferenciar afectos de las EDL estudiadas, de la población general, no permitía identificar cuál de las dos patologías incluidas era la que presentaba el sujeto.

La cuantificación de la concentración de colesterol en membrana eritrocitaria se realizó a un grupo control y a un grupo de afectos que incluía NP-C y DLAL en la misma proporción, pero no se observaron diferencias significativas entre los grupos, por lo que no podemos considerar que

el incremento en la resistencia de la membrana se deba a una alteración en la concentración de colesterol de la misma.

Respecto a la evaluación de la utilidad de biomarcadores plasmáticos para valorar la enfermedad de NP-C, se partió de un total de 180 individuos con sospecha de NP-C. De 148 de ellos se disponía de información clínica lo que nos permitió validar la herramienta de sospecha clínica (NPC-SI), obteniendo una muy baja especificidad para la misma (48%).

A 165 individuos se les pudo realizar la evaluación de los tres biomarcadores plasmáticos incluidos en el trabajo (quitotriosidasa, quimiocina CCL18/PARC y 7-cetocolesterol). En primer lugar se estableció un punto de corte para separar afectos y controles para cada uno de los biomarcadores, estableciendo unos niveles de sensibilidad y especificidad mínimos del 100% y del 80% respectivamente. Posteriormente, se evaluó la capacidad de discriminación utilizando los tres marcadores simultáneamente, llegando a identificar a los afectados de enfermedad de NP-C con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98%.

Ninguno de los marcadores analizados son específicos de la enfermedad de NP-C, por lo que, a pesar de mostrar una clara indicación de enfermedad no aseguran el diagnóstico, pudiendo encontrarse los tres marcadores elevados en otras patologías de depósito como DLAL y NP-A/B.

Respecto a la evaluación clínica de los individuos incluidos en el estudio, las manifestaciones más frecuentes fueron la ataxia (55,8%) y la demencia (33,7%). Pero si nos centramos en lo observado en los pacientes afectados, estas manifestaciones afectarían al 40%, siendo más frecuente la esplenomegalia.

Se ha realizado un estudio para detectar los predictores bioinformáticos con mayor eficiencia para el estudio de los genes *NPC1* y *NPC2*, analizando un conjunto de variantes cuyo efecto se conocía previamente mediante 15 algoritmos diferentes si su localización era exónica o 10 si se situaba en región intrónica, obteniendo los mejores resultados con MutPred1 en las sustituciones en región exónica que afectan a la secuencia aminoacídica y *Human Splicing Finder* si la variante se localiza en el intrón alterando la secuencia canónica de ajuste.

Se analizaron mediante secuenciación Sanger los genes asociados a la enfermedad en 180 individuos con sintomatología de NP-C. De estos, 15 se clasificaron como afectados de la enfermedad al finalizar el presente trabajo: 10 eran portadores de dos variantes patogénicas, 2 presentaban deleciones no descritas previamente y que tras este trabajo se han considerado

patogénicas y, 3 eran portadores de una variante patogénica y otra no descrita hasta el momento que también ha podido asociarse a patogenicidad. Todas estas variantes se encuentran en el gen *NPC1*, ya que en el gen *NPC2* solamente se observó en una región intrónica una variante no patogénica según los predictores bioinformáticos.

En el gen *NPC1* se han observado tres variantes de efecto neutral o benigno que no se habían descrito previamente en población ibérica, aumentando este valor hasta seis si solamente consideramos las variantes incluidas en la base de datos de población española realizada por el Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER). Respecto a las variantes asociadas a patogenicidad, de las 453 variantes registradas en la base de datos HGMD (*The human gene mutation database*), solamente 23 se han observado en nuestra población, además una de ellas presentaba una frecuencia superior al 1%, siendo mucho mayor a la frecuencia observada en la variante causal más frecuente en población europea según la literatura o en el registro de variantes asociadas a NP-C de la Universidad de Tübingen (Alemania).

En este trabajo se han detectado cinco variantes de significado incierto y 19 no descritas previamente. Del total de variantes observadas tres de ellas se han podido reclasificar como variantes causales de enfermedad, teniendo en consideración los datos clínicos de los pacientes y el resultado de los predictores bioinformáticos, así como el estudio conservacional de la secuencia de la proteína y las alteraciones estructurales que la variante causa en la misma.

Finalmente, y buscando una posible explicación al porcentaje de casos de enfermedad de NP-C en el que no se encuentran las variantes genéticas causales, se realizó el estudio del exoma completo de 11 individuos con sintomatología clínica, una variante causal o de efecto desconocido en heterocigosidad y al menos, un marcador plasmático elevado. Tres de estos individuos formaban parte de las 180 sospechas analizadas y presentaban una marcada elevación de los tres biomarcadores en combinación con una variante asociada a patogenicidad en heterocigosidad. En primer lugar se buscaron variantes causales de otras patologías cuya sintomatología pudiera corresponderse con la presentada por cada uno de los individuos, de este modo cuatro casos pudieron ser diagnosticados de otras patologías (NP-A/B, esferocitosis hereditaria, SANDO y paraplejía espástica. En los siete casos restantes no se observaron variantes genéticas que pudiesen asociarse a otras patologías, pero tampoco se observaron variantes genéticas comunes entre los pacientes, que pudiesen asociarse a enfermedad de NP-C ni analizándolos todos en un único bloque ni agrupándolos en base a las manifestaciones

clínicas que presentaban. Los resultados de este estudio nos muestran la elevada complejidad del diagnóstico de esta enfermedad y la importancia de una correcta orientación clínica.

Para comprobar si existía una afectación en la regulación del gen *NPC1* causada por una alteración en la secuencia del miR33a se analizó la misma mediante secuenciación Sanger, observando dos variantes en un único paciente que no mostró una alteración en la expresión del gen *NPC1* por lo que no podemos considerar que las variantes detectadas tengan efecto sobre la capacidad regulatoria de miR33a.

Con lo expuesto en este resumen consideramos que se ha dado respuesta los 5 objetivos propuestos, presentando un nuevo sistema de cribado y la eficacia de la combinación del estudio de marcadores plasmáticos, así como exponiendo las peculiaridades que presentan los genes *NPC1* y *NPC2* en nuestra población respecto lo previamente publicado, evaluando el efecto de variantes no descritas hasta el momento y estudiando otros mecanismos por los que la expresión del gen *NPC1* pudiese estar alterada para justificar la presencia de sintomatología clínica en ausencia de variantes genéticas asociadas a la enfermedad.

2 INTRODUCCIÓN



2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El término enfermedad de Niemann Pick (NP) empezó a utilizarse a raíz de los trabajos publicados por el pediatra Albert Niemann y el anatomopatólogo Ludwig Pick en 1914 y 1927 respectivamente. Estos trabajos junto al de Klenk de 1934 en el que describía la esfingomielinina como el principal depósito lisosomal, definieron la enfermedad de NP como un grupo heterogéneo de afectaciones debidas a una sobrecarga lisosomal [1].

La publicación de Crocker y Farber en 1958 que incluía una revisión de 18 pacientes, demostró la gran variabilidad fenotípica que presentaban estos pacientes [1] y permitió que en 1961 se publicara una clasificación de la enfermedad en 4 tipos [2]:

- Tipo A: Forma clásica de presentación en la infancia temprana, mayoritariamente detectada en población judía. Los sujetos mueren prematuramente (1-2 años).
- Tipo B: Alta afectación visceral, pero sin afectación neurológica que se presenta entre los 4-13 años.
- Tipo C: Forma moderada. Presente mayoritariamente en población no judía. Presenta menor acúmulo lipídico en tejido y menor afectación visceral. La edad de defunción se sitúa en torno a los 4-5 años.
- Tipo D: Forma “Nueva Escocia”. Presente en población católica de esa región se observa en la infancia tardía, presenta una afectación visceral ligeramente mayor que el tipo C y un acúmulo lipídico similar. La edad de fallecimiento se sitúa entre los 12-20 años.

Fue el equipo del Dr. Roscoe Brady quien en 1965 describió que la esfingomielinasa es la enzima responsable de la enfermedad de NP estudiando pacientes con la forma clásica de la enfermedad [3], pero en 1980 un estudio que comparaba la recuperación de la actividad enzimática en los cuatro grupos de NP detectó que esta se producía en los tipos A y B (NP-A/B), pero no en los tipos C y D [4]. En 1985 un estudio en fibroblastos de 20 pacientes de NP tipo C (NP-C) detectó un acúmulo de colesterol no esterificado, no observado en los pacientes con déficit de esfingomielinasa [5] por lo que pasó a considerarse, junto con la tipo D una entidad diferente a la enfermedad de NP-A/B.

Pasaron siete años hasta que se pudo identificar la región cromosómica asociada a la enfermedad de NP-C, localizándose en el cromosoma 18 [6], aunque posteriormente, en 1994,

Steinberg y cols. identificaron un segundo grupo de complementación, menos frecuente que el previamente descrito y con una grave afectación pulmonar que no se localizaba en esa región [7]. Aún fueron necesarios unos años para que, en 1997 el grupo de Eugene Carstea identificara al gen *NPC1* como el responsable del mayor grupo de complementación para la enfermedad de NP-C y, ese mismo año se descubrió que el gen responsable de NP tipo D se localizaba en la misma región que *NPC1* y posteriormente que correspondía a una variante concreta del mismo gen, por lo que, los tipos C y D pasaron a considerarse una única enfermedad (NP-C) [8,9].

En el año 2000 el gen *HE1*, actualmente conocido como *NPC2*, fue identificado como el responsable del segundo grupo de complementación de la enfermedad de NP-C [10,11], quedando establecida la causa genética de la enfermedad.

2.2 EPIDEMIOLOGÍA

La frecuencia de la NP-C no está bien establecida, dada las dificultades que entraña el diagnóstico de la misma. Se trata de una enfermedad pan-étnica, a diferencia de lo que se postulaba cuando se acuñó el término en 1961, pero la frecuencia entre poblaciones es diversa. Las prevalencias publicadas oscilan entre 1/45.454 nacimientos en población portuguesa y 1/211.000 en población australiana [12,13].

Estas frecuencias se cree que pueden estar infraestimadas, ya que existe un fenotipo tardío de la enfermedad de NP-C que puede presentar una sintomatología exclusivamente visceral o con una afectación neurológica muy leve, y cuya incidencia potencial se supone entre 1/19.077 ó 1/36.420 individuos [14].

En el momento en que se descubrió el segundo grupo de complementación de la enfermedad de NP-C ya se observó que la frecuencia de este era mucho menor. Estudios mediante técnicas de secuenciación masiva estiman una frecuencia de 1/92.104 y 1/2.858.998 individuos para los grupos de complementación 1 y 2 respectivamente [14].

2.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los pacientes afectados de enfermedad de NP-C, pueden presentar tres tipos de manifestaciones: viscerales, neurológicas y psiquiátricas. Además, los pacientes del segundo grupo de complementación (NP-C2) presentan una afectación grave del sistema respiratorio. La sintomatología visceral afecta principalmente a hígado, bazo y pulmones, mientras que la neurológica muestra más afectación músculo-esquelética, visual y a nivel de área faringo-esofágica. La afectación psiquiátrica tiene su origen a nivel cerebral (Figura 2.3.1).

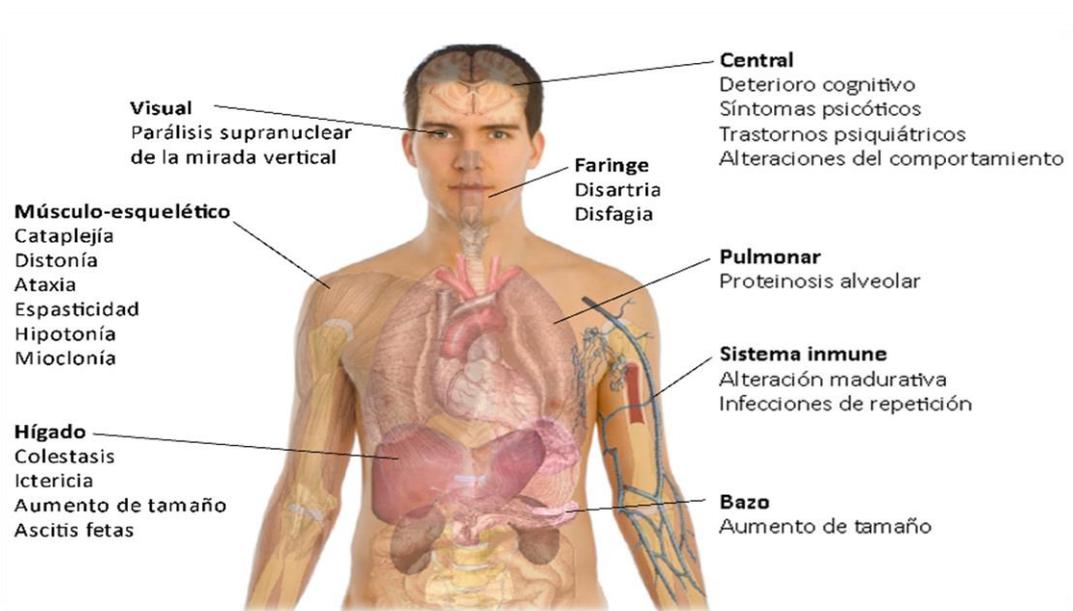


Figura 2.3.1. Esquema de la sintomatología más relevante en la enfermedad de NP

2.3.1 Afectación sistémica

La sintomatología visceral suele ser la primera en presentarse, pudiendo ser en forma de colestasis neonatal temporal, esplenomegalia o hepato-esplenomegalia principalmente [15].

Las formas más tempranas de la enfermedad suelen manifestarse con ascitis o *hydrops fetalis* junto con las organomegalias. Además, a causa de estas, es frecuente la trombocitopenia leve. En cambio, en las formas adultas de la enfermedad de NP-C, estos hallazgos no producen síntomas y se detectan principalmente en estudios rutinarios [16].

La afectación visceral se manifiesta como esplenomegalia que puede ocurrir de forma aislada o con hepatomegalia, con un amplio rango de tamaño, existiendo formas donde el aumento del bazo es prácticamente indetectable por palpación y debe precisarse por técnicas de imagen y otras donde se puede detectar fácilmente por palpación [17]. La hepatomegalia es menos frecuente e igualmente inespecífica apareciendo en múltiples ocasiones de forma simultánea a la esplenomegalia [18]. La presencia de estos síntomas no guarda relación con la afectación neurológica que pueda presentar el paciente.

Según varios estudios, la enfermedad de NP-C es la segunda causa más frecuente de colestasis neonatal, que en la mayoría de los casos se produce por un defecto funcional del hígado en el periodo fetal. [19,20]. Este signo, igual que la ictericia que provoca en estos pacientes, suele remitir de forma espontánea, por lo que puede no aparecer en las historias clínicas y por lo tanto, tener registrada una incidencia infravalorada, pero se considera que podría estar presente en el 40-50% de los afectos [21].

2.3.1.1 Afectación pulmonar

El primer caso de afectación respiratoria en la enfermedad de NP-C se publicó en 1990 [22] y en 1998 se publicó su asociación con el segundo grupo de complementación de la enfermedad de NP-C [23]. Su manifestación es temprana, principalmente en forma de dificultad respiratoria, tos no productiva e infecciones respiratorias de repetición [24] con un rápido deterioro del estado del paciente y de media, un *exitus* a los ocho meses de la aparición de la sintomatología [25].

El estudio radiológico muestra un infiltrado en el intersticio pulmonar que genera una opacidad en la imagen. Tras el estudio histológico se observa que el infiltrado está formado principalmente por linfocitos, histiocitos y células espumosas (macrófagos) (Figura 2.3.2). [23,24].

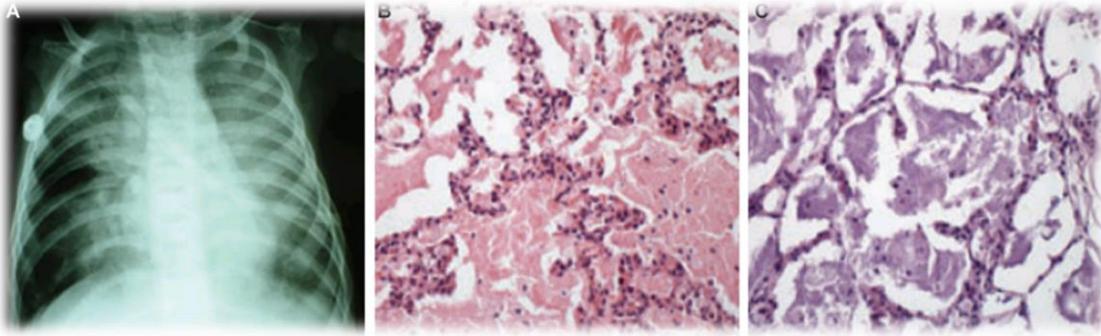


Figura 2.3.2. Imágenes de un paciente con NP-C2. Imagen A: Radiografía de tórax en la que se aprecia la opacidad pulmonar. Imagen B: Imagen histológica de una biopsia de pulmón de afecto de NP-C2 teñida con hematoxilina-eosina. Imagen C: Biopsia de pulmón del mismo sujeto, teñida mediante PAS (ácido periódico y Schiff). Imagen publicada por Griese et al. 2010.

El lavado broncoalveolar muestra una proteinosis por acumulación de surfactante no funcional debido a un exceso de colesterol y, a diferencia de otras proteinosis, una baja cuantificación de proteína [24,26].

2.3.1.2 Afectación del sistema inmune

En los pacientes con enfermedad de NP-C existe un desequilibrio entre la presencia tisular y circulatoria de células asesinas naturales, siendo su proporción en los tejidos mayor de lo esperado. Además, se ha observado que estas células presentan alteraciones de su estado madurativo, presentando un menor número de vesículas citotóxicas [27], lo que puede influir en la mayor incidencia de infecciones en estos pacientes [28].

2.3.2 Afectación del sistema nervioso

Las manifestaciones neurológicas son las más características de la enfermedad de NP-C y las más debilitantes. Se utilizan para clasificar a los pacientes, como veremos más adelante, a pesar de que se han descrito algunos casos sin clínica neurológica [14,29]. Son manifestaciones complejas de detectar, ya que la temprana aparición de sintomatología psiquiátrica puede enmascararlas [30].

La sintomatología más común en estos pacientes afecta a la marcha (ataxia), a la manipulación de objetos (disonía y dismetría), al habla (disartria) y a los movimientos de deglución (disfagia). Así mismo otra alteración motriz, como es la parálisis de la mirada vertical es un signo bastante específico de la enfermedad [15,31].

2.3.2.1 Ataxia

La ataxia cerebelar suele presentarse en un 85-90% de los casos de NP-C, pero no es una manifestación específica, por lo que es fácil que no se asocie como indicador al diagnóstico de la enfermedad [15].

En los sujetos con NP-C suele presentarse un enlentecimiento del movimiento con el fin de asegurar el mismo, por ejemplo, los niños con la enfermedad no suelen correr sino caminar [15,17].

2.3.2.2 Deterioro cognitivo

La neurodegeneración progresiva que presentan los pacientes suele terminar generando una demencia temprana en la mayoría de casos. El deterioro cognitivo es uno de los rasgos mayoritarios, encontrándose en un 86% de los afectos y apareciendo en las primeras etapas de la enfermedad [32].

Suele iniciarse con alteraciones en el lenguaje (disartria), pérdidas de memoria y problemas motores, progresando a alteraciones del comportamiento y un exceso de confianza con la gente a causa de alteraciones en el lóbulo frontal [30].

2.3.2.3 Parálisis de la mirada

La parálisis supranuclear de la mirada vertical (VSGP, acrónimo en inglés) es la alteración neurológica más frecuente y más específica de la enfermedad de NP-C, observándose en un 65% de los afectos [33]. Suele manifestarse en primer lugar en forma de parálisis de la mirada vertical, presentándose inicialmente en forma de movimientos sacádicos voluntarios en dirección vertical, aunque puede progresar y afectar también a los movimientos horizontales [30,34]. Esta alteración se debe a una afectación de los pares craneales III y IV [33].

La dificultad de ajustar la mirada vertical puede traducirse en caídas frecuentes al subir o bajar escaleras o en inclinaciones de la cabeza para realizar tareas cotidianas como escribir por lo que se debe estar atento a estas manifestaciones. Esta alteración puede confundirse con la apraxia oculomotora, aunque esta suele iniciarse con alteraciones de la mirada horizontal y no vertical, además en el caso de la VSGP se observa una reducción de la frecuencia y amplitud de las sacadas que no se detecta en la apraxia oculomotora [17].

2.3.3 Afectación psiquiátrica

La sintomatología psiquiátrica aparece principalmente en la adolescencia o edad adulta de los afectos de NP-C, precediendo a la sintomatología neurológica en la mayoría de los casos. El rango de síntomas es amplio en la adolescencia suelen presentarse problemas de comportamiento y en la escolarización, cuando se manifiestan en la edad adulta disfunciones afectivas, psicosis y demencias son los síntomas más frecuentes [30, 35, 36].

El último estudio publicado por el registro internacional agrupa los síntomas psiquiátricos en 6 grupos, excluyendo de esta clasificación los trastornos cognitivos (demencia, discapacidad intelectual, deterioro cognitivo, etc.) que pasan a considerarse alteraciones neurológicas [31]:

- Trastornos psicóticos: esquizofrenia, trastornos esquizo-afectivos, ilusiones, alucinaciones, desorientación y psicosis.
- Trastornos relacionados con el estado de ánimo: depresión, cambios bruscos del estado de ánimo, hipomanías, irritabilidad y labilidad emocional.
- Trastornos en el control de los impulsos: alteraciones en el comportamiento, agresividad, agitación e inquietud.
- Trastornos del espectro autista (TEA).
- Ansiedad, incluyendo ataques de pánico.
- Otras manifestaciones psiquiátricas.

Uno de los principales problemas que supone la aparición precoz de sintomatología psiquiátrica es la confusión que genera en el clínico, que focaliza las sospechas diagnósticas a entidades de este grupo, existiendo diagnósticos iniciales de esquizofrenia, Alzheimer, demencia frontotemporal, enfermedad de Parkinson o esclerosis múltiple en pacientes que posteriormente fueron diagnosticados de NP-C pudiendo retrasar el correcto diagnóstico del paciente varios años [30].

2.4 CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES DE ENFERMEDAD DE NP-C

La primera clasificación de pacientes afectados de NP-C la realizaron Higgins y cols. en 1992, asignando dos grupos en función de la edad del paciente (menor o mayor de 4 años) y de cuatro estadios cada uno [37].

- **Estadio 0:** Pacientes asintomáticos.
- **Estadio 1:** Alteraciones motoras y cognitivas, además de afectación de las sacadas oculares y de los reflejos auditivos.
- **Estadio 2:** La afectación es más grave, la alteración de las sacadas se agrava a VSGP y los pacientes presentan disartria además de las alteraciones motoras y cognitivas del estadio 1.
- **Estadio 3:** Los pacientes presentan alteraciones del sistema piramidal y respuestas alteradas a los potenciales auditivos.
- **Estadio 4:** Se trata del último estadio con una afectación tan grave que se define por la imposibilidad de deambulación y un estado cuasi-vegetativo del paciente.

Esta clasificación cayó en desuso, pasando a clasificar a los pacientes solamente en función de la edad de aparición de la sintomatología neurológica. Según esta nueva clasificación existen cuatro formas con afectación neurológica y otra, muy precoz, en la que sólo se presenta una grave afectación sistémica (Figura 2.4.1) [38].

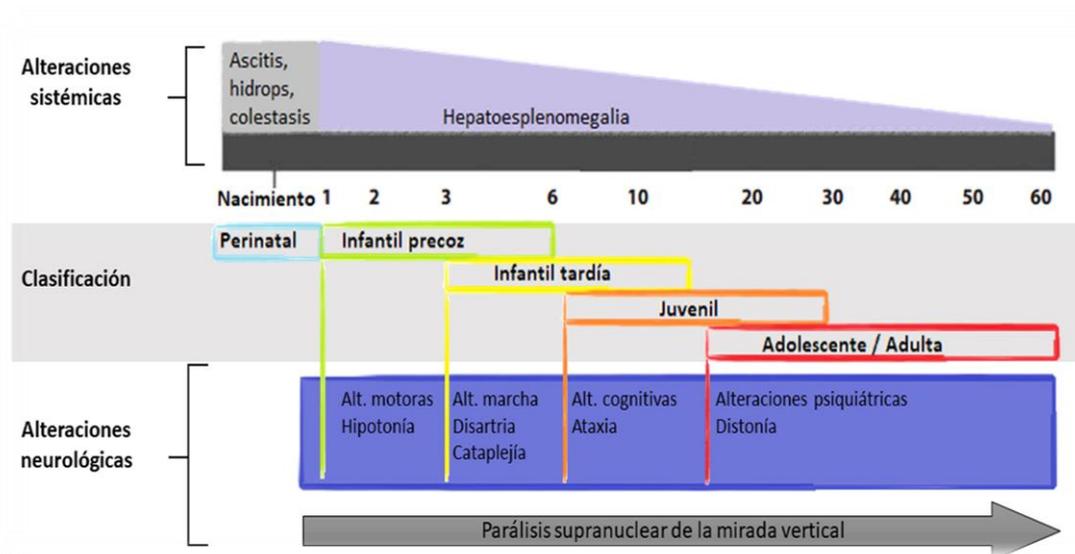


Figura 2.4.1. Esquema de la clasificación de los afectados de NP-C en función de la edad de aparición de la sintomatología neurológica. Las alteraciones neurológicas son aditivas, de forma que un paciente diagnosticado en la adolescencia suele presentar también alteraciones correspondientes a las etapas infantiles. Adaptación del esquema publicado por Vanier et al. en 2010.

Actualmente se sabe que la presentación de los síntomas es gradual y que el espectro fenotípico es continuo.

2.4.1 Presentación perinatal

A causa de la afectación hepática grave, en esta forma temprana de la enfermedad se puede observar hidrops o ascitis fetal, junto con una colestasis prolongada que aparece en los primeros días de vida simultáneamente a una hepato-esplenomegalia [39].

Los síntomas, excepto la hepato-esplenomegalia suelen remitir a los 2-4 meses de edad, y el neonato resulta *exitus* a los 6 meses de vida en un 10% de los casos [38,40].

Esta forma de presentación no muestra sintomatología neurológica, posiblemente porque la gravedad de la afectación visceral y el rápido desarrollo de la enfermedad no da tiempo a que esta sintomatología aparezca [38].

2.4.2 Presentación infantil precoz

La enfermedad presenta sus primeros síntomas antes de los 2 años, siendo la hepatoesplenomegalia el primero en aparecer junto con la colestasis o la ictericia, aproximadamente al primer mes de vida [41]. La hipotonía y el retraso psicomotor suelen aparecer un poco más tarde, aproximadamente al primer año. A causa de la corta edad de los afectos la VSGP no suele observarse [38,42].

El pronóstico de estos pacientes es malo ya que tienen una vida media de 5 años a causa de la rápida progresión neurológica de la enfermedad [43].

2.4.3 Presentación infantil tardía

Engloba aquellos sujetos que presentan manifestaciones neurológicas entre los 2 y 6 años de edad [38].

Del mismo modo que la presentación infantil precoz, el primer síntoma suele ser la hepatoesplenomegalia seguido de dificultades en el lenguaje y alteraciones en la marcha con caídas frecuentes, síntomas que suelen aparecer entre los 5 y 6 años de edad [38].

Los problemas de audición y cataplejías también son síntomas que se observan con frecuencia. En cambio, la VSGP suele ser difícil de detectar en los estadios iniciales, siendo más evidente cuando el niño va creciendo y la sintomatología se agrava. Con la progresión de la enfermedad los problemas de la marcha empeoran, causando ataxias que también se agravarán e incluirán disfagia y disartria que progresan de forma casi simultánea imposibilitando el lenguaje. Del mismo modo, las alteraciones cognitivas también se agravan haciendo más evidente la afectación del desarrollo mental ya que los pacientes desarrollan alteraciones piramidales y dificultades deglutorias. Las epilepsias también son frecuentes en esta forma de la enfermedad, pudiendo afectar a un 20% de los niños [38].

La mayoría de los pacientes fallecen entre los 7 y los 12 años, aunque esto está cambiando gracias a los tratamientos que se explicarán más adelante.

2.4.4 Presentación juvenil

La forma más clásica de la enfermedad suele aparecer entre los 6 y los 15 años siendo la esplenomegalia, normalmente aislada pero que también puede acompañarse de hepatomegalia, la forma más común de identificarla, igual que en las presentaciones anteriores. Pudiendo detectarse en edades tempranas, pero sin que aparezca la sintomatología neurológica hasta esta etapa [38].

Si hasta el momento los pacientes han presentado dificultades en la escolarización con fallos en la atención y dificultades para la escritura tampoco han sido muy relevantes. En esta forma de presentación la VSGP se observa en casi el 100% de los casos, siendo el primer síntoma que pone en alerta, la torpeza en los niños es común y la cataplejía que puede desembocar en narcolepsia inducida por la risa, son signos frecuentes. La evolución de la ataxia es rápida, apareciendo además de la disartria y disfagia, distonía. La regresión intelectual es variable pudiendo ser leve o muy severa, del mismo modo que las crisis epilépticas [38,42].

En los casos más avanzados la disartria suele degenerar en una incapacidad para la expresión verbal y los problemas de deglución acostumbran a agudizarse tanto que requieren de una gastroscopia para poder alimentar al paciente. La vida media es variable pudiendo llegar a sobrepasar la tercera década [38].

2.4.5 Presentación adolescente/adulta

Engloban en esta forma de presentación aquellos casos en los que la sintomatología neurológica se desarrolla a partir de los 15 años de edad.

La mayoría de estos pacientes presentan una esplenomegalia aislada, normalmente no detectable por palpación y casi la mitad de ellos presentan también una ligera hepatomegalia. La sintomatología neurológica se presenta en edades avanzadas, permitiendo que la mayoría de estos pacientes tengan una escolarización normal [44].

La sintomatología psiquiátrica es frecuente, sobre todo las psicosis, alucinaciones e ilusiones, siendo normalmente la responsable del retraso en el diagnóstico de la NP-C [16, 38].

Las alteraciones cognitivas también son frecuentes, así como la VSGP aunque nuevamente, esta se encuentra infradiagnosticada. Otra sintomatología frecuente en este grupo de pacientes es

la ataxia, disartria y disfagia, además se ha detectado una asociación con la frecuencia de Alzheimer y Parkinson. Las epilepsias son poco frecuentes en esta forma de presentación. La evolución de los síntomas es lenta y progresiva, tardando una media de 9 años en desarrollar una dependencia a causa de la enfermedad [38, 44].

La descripción de afectos de la enfermedad con edades avanzadas y sin sintomatología neurológica, hace pensar en la presencia de una forma no neuronopática de la enfermedad de NP-C que podría ser más frecuente de lo esperado [16].

2.5 GENÉTICA MOLECULAR EN LA ENFERMEDAD DE NP-C

La enfermedad de NP-C es de herencia autosómica recesiva, eso implica que es necesario la presencia de dos alelos mutados para ser afecto. Existen dos genes asociados a la enfermedad de NP-C, *NPC1* y *NPC2*.

2.5.1 Características de *NPC1*

El gen *NPC1* (MIM#607623; NG_012795.1) consta de 80,7 Kb. Es el responsable del 95% de los casos de enfermedad de NP-C [45].

Se localiza en el brazo largo del cromosoma 18 (18q11.2; Figura 2.5.1)[8] de las bases 23.506.184 a 23.56.617 (hebra reversa) según la versión 38 del Consorcio para el Genoma Humano de Referencia (GRCh38; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/human>). Consta de 25 exones de pequeño tamaño (78-788 pb) con grandes intrones entre ellos.



18q11.2

Figura 2.5.1. Idiograma de bandas G del cromosoma 18 (resolución de 850 bandas).

En el genoma humano existen 6 genes parálogos, siendo la homología máxima del 37% en el gen *NPC1L1* (homología en cDNA). Existen también 97 especies que presentan genes ortólogos a *NPC1* encontrándose la mayor homología, del 99%, con otros primates [46].

A fecha 30 de abril de 2018 se han descrito en la base de datos de mutaciones en el genoma humano (HGMD, acrónimo en inglés) 455 variantes asociadas a patogenicidad en este gen, todas ellas relacionadas con la enfermedad de NP-C. Las variantes patogénicas más comunes son cambios puntuales que provocan cambios aminoacídicos, de las que se han descrito 305 variantes, además, se han reportado 37 variantes que provocan alteraciones en el ajuste, 62 pequeñas deleciones y 39 pequeñas inserciones, 2 pequeñas inserciones y deleciones y, 11 alteraciones de mayor tamaño [47]. En la base de datos ClinVar existen 86 variantes consideradas benignas o posiblemente benignas, 16 con conflictos de interpretación, 104 causales de enfermedad y 104 variantes de significado incierto [48].

La variante patogénica más frecuente en la población europea es NG_12795.1: g.54882T>C, que codifica para el cambio aminoacídico NP_000262:p.Ile1061Thr [49], su frecuencia en población europea es aproximadamente del 25%. La correlación entre el genotipo y el fenotipo en esta enfermedad no es clara para variantes puntuales pero si existe una clara correlación entre la mayor severidad de la enfermedad y la presencia de mutaciones que generan terminaciones tempranas de la proteína codificada [38].

La expresión del gen *NPC1* está regulada como mínimo mediante dos mecanismos, uno de ellos es la expresión del microRNA33a. Un microRNA es una secuencia corta de RNA (aproximadamente 23pb) que no codifica para proteína pero que interacciona con otros genes regulando su expresión [50]. En este caso, miR33a se localiza en la región intrónica de *SREBF2* e interacciona con dos regiones reguladoras, localizadas en la zona 3'UTR del gen *NPC1*, inhibiendo su expresión cuando existe una alta concentración de colesterol [51,52]. Otro mecanismo de regulación del gen *NPC1* es la metilación de las islas CpG, que se ha detectado incrementada en casos de dislipemias con exceso de colesterol [53].

2.5.2 Características de *NPC2*

El gen *NPC2* (MIM#601015; NG_007117.1), previamente conocido como *HE1*, es el responsable del segundo grupo de complementación de la enfermedad y se asocia aproximadamente a un 5% de los casos descritos [45].

Se localiza en el cromosoma 14, en la región 14q24.3 (Figura 2.5.2) de la posición 74.476.192 a la 74.494.177 de la hebra reversa según la versión 38 del Consorcio para el Genoma Humano de Referencia (GRCh38; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/human>). Está formado por 5 exones de entre 15 y 173 pb y su tamaño total es de casi 18 Kb. Existen 7 transcritos del gen, pero solamente uno de ellos codifica para la proteína completa[46].

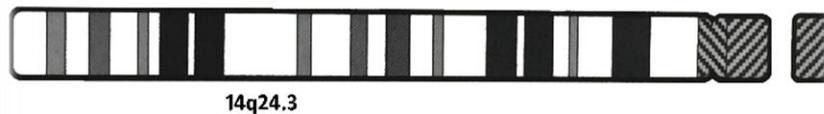


Figura 2.5.2. Idiograma de bandas G del cromosoma 14 (resolución de 850 bandas). Imagen obtenida de ISCN 2013

No se han descrito parálogos pero si 98 ortólogos según la base de datos Ensembl, existiendo una homología del 100% con *Chlorocebus sabaesus*.

La base de datos HGMD profesional, a fecha 30 de abril de 2018, incluye 27 variantes en el gen asociadas a patogenicidad. 19 de ellas son variantes puntuales asociadas a cambios aminoacídicos, 4 generan alteraciones en el ajuste, y otras 4 son deleciones puntuales o de mayor tamaño (Figura 2.5.3) [47]. Ninguna de ellas se puede considerar una variante frecuente, y normalmente su impacto se limita a un ámbito familiar. Además existen en la base de datos ClinVar 5 variantes benignas, 4 con conflictos de interpretación, 14 VUS y 30 variantes posiblemente patogénicas o causales de enfermedad [48].

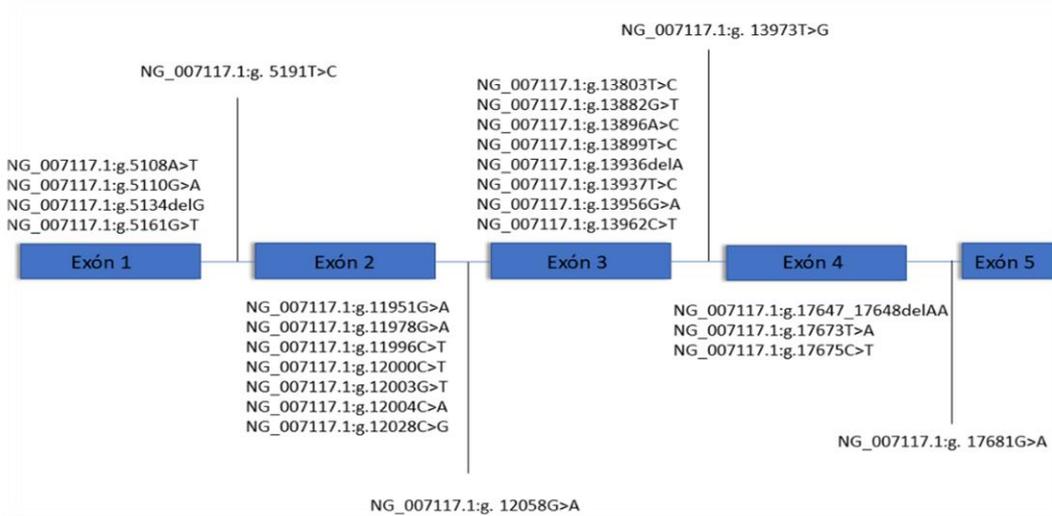


Figura 2.5.3 Variantes asociadas a patogenicidad descritas en el gen *NPC2* según la base de datos HGMD. En la representación falta una delección de gran tamaño, que incluye los exones 2 y 3 pero que no ha sido delimitada.

2.6 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS NPC1 Y NPC2

2.6.1 Proteína NPC1

La proteína NPC1 (NP_000262) está formada por 1.278 aminoácidos, con un peso de 142.167 Da. Existen varias versiones de su estructura publicadas en la base de datos de proteínas (PDB; acrónimo en inglés). Las versiones más completas de la proteína en solitario son las estructuras 5U74 y 3JD8, pero ninguna de ellas incluye las regiones citoplasmáticas (Figura 2.6.1) [54,55].

Se trata de una glicoproteína lisosomal que se localiza a nivel transmembrana, con tres dominios luminales y 13 hélices transmembrana (Figura 2.6.1) [56]. Presenta una región N-terminal que se elimina e indica su localización transmembrana y, en el extremo C-terminal una secuencia di-leucina que envía la proteína al lisosoma [57].

Las regiones luminales están altamente glicosiladas, posiblemente como medida de protección contra la degradación por proteasas lisosomales [56]. El primer dominio luminal contiene una región de unión al colesterol, en el segundo dominio intralisosomal y en la región entre los

dominios transmembrana 3 y 7 existe una región con una alta homología con dominios sensibles a los esteroides (dominio SSD) (Figura 2.6.1) [58–60].

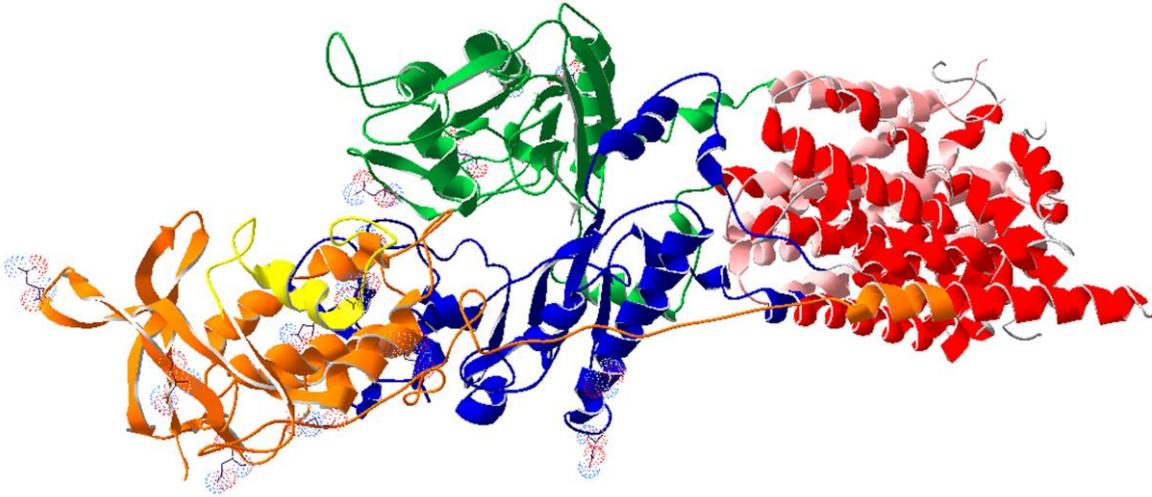


Figura 2.6.1 Estructura de la proteína NPC1. Fusión de las estructuras del protein data bank 3JD8 y 5U74 realizada mediante Swiss PDB Viewer. En color rojo se remarcan las hélices que forman parte de las regiones transmembrana, en un color más pálido la región SSD. El primer bucle luminal se marca en color naranja (en amarillo la zona de unión al colesterol), el segundo de color verde y el tercer bucle en color azul. En la imagen se muestran los puntos energéticos (con el esqueleto en negro) de aquellos aminoácidos que sufren glicosilación

Entre los aminoácidos 861 y 1.083, en el tercer bucle lisosomal, encontramos una región formada por 3 láminas beta y 5 helices alfa. Esta región conocida como “bucle rico en cisteínas” ocho cisteínas que forman puentes disulfuro entre ellas estabilizando la región. El puente que se forma entre las cisteínas localizadas en las posiciones 909 y 914 crea un bucle (bucle Ω) altamente hidrofóbico cuya función es esencial para el transporte del colesterol [55].

La mayor parte de las variantes patogénicas descritas se localizan entre el tercer bucle luminal y el extremo C-terminal de la proteína. Un tercio de las variantes descritas están localizadas en la región rica en cisteínas [61]. Además, existe controversia entre el efecto de la pérdida de puntos de glicosilación, ya que la variante NP_000262:p.Asn222Ser, registrada en la base de datos HGMD presenta serios conflictos de interpretación. Solamente aparece asociada a patogenicidad en casos con sintomatología exclusivamente visceral y nivel molecular se considera que la pérdida de un único punto de glicosilación es poco relevante en la localización y funcionalidad de la proteína [57,62]. Además su frecuencia en la población supera en más de 10 veces la variante NP_000262:p.Ile1061Thr, considerada la más frecuente [14].

Las variantes más frecuentes en población europea tampoco afectan a la funcionalidad de la proteína, sino a la señalización de degradación de la misma por la vía del proteosoma motivada por un fallo en el plegamiento de la proteína, provocado por el cambio aminoacídico [63].

2.6.2 Proteína NPC2

La proteína NPC2 (NP_006423) es mucho menor que NPC1, formada por 151 aminoácidos (131 tras perder la secuencia señal), tiene un peso teórico de 14.5 KDa pero por *Western-blot* se han detectado proteínas de entre 23 y 19 KDa a causa de las diferentes glicosilaciones que puede sufrir. Es una proteína soluble que se localiza en el lumen del lisosoma y que se encuentra ligeramente glicosilada que se une al colesterol a pH ligeramente ácido [64].

Presenta seis cisteínas que interaccionan entre ellas mediante puentes disulfuro y una región rica en prolinas, así como múltiples puntos de N-glicosilación, siendo la asparragina de la posición 58 la más importante para conservar la funcionalidad de la proteína [65].

Su estudio en vertebrados ha permitido definir la presencia de 4 dominios altamente conservados (ECR A, B, C y D), siendo ECR D el que parece ser el lugar de unión al colesterol no esterificado y ECR A responsable de la liberación del mismo [66].

Su traslación al lumen lisosomal se realiza mediante receptores manosa-6-fosfato [67]. La estructura por rayos X de la proteína bovina (1-NEP) permitió conocer la estructura de la proteína, formada por 7 láminas beta e identificar la interacción entre los aminoácidos 66 y 100 que actúan como una puerta, que permite una separación de las láminas para que el colesterol pueda acomodarse en la cavidad interna (Figura 2.6.2) [64].

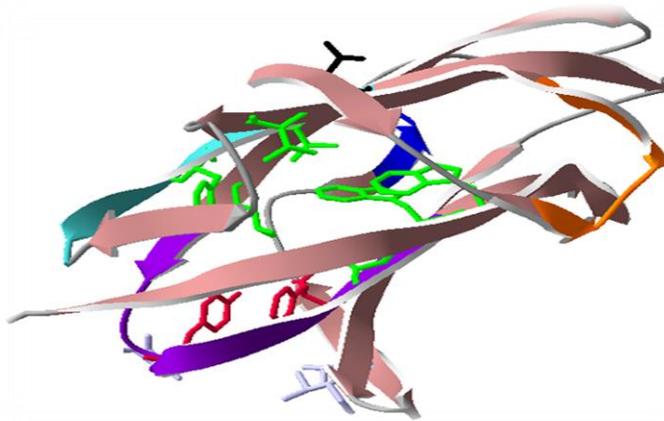


Figura 2.6.2. Estructura de la proteína NPC2 bovina (1-NEP). Con la estructura en color naranja, verde, azul y morado se muestran las regiones ECR A-D respectivamente. Los esqueletos blancos y rojos forman un bolsillo en la superficie de la estructura que permite acoplar el colesterol no esterificado y entre los esqueletos marcados en rojo se forma una "puerta" que permite el acceso del colesterol al bolsillo interior señalado en color verde. En la imagen se muestra el esqueleto (en color negro) de la Asn58 cuya glicosilación es necesaria para el correcto funcionamiento de la proteína. Visualización mediante Swiss PDBViewer.

Función de las proteínas NPC1 y NPC2

Las proteínas NPC1 y NPC2 funcionan de forma secuencial para transportar el colesterol no esterificado del interior del lisosoma al exterior del mismo, ya sea al retículo endoplásmico, a las mitocondrias o liberándolo al citoplasma.

El colesterol no esterificado no puede transportarse de forma pasiva por un medio acuoso como es el lumen lisosomal, por ese motivo es necesario su transporte mediado por proteínas. Tal como se ha explicado en el apartado anterior, el colesterol no esterificado se une a NPC2 y queda alojado en la cavidad interior, permitiendo su transporte hacia la membrana. NPC2 se une al segundo bucle luminal de NPC1, y el colesterol se une a la región de unión (Figura 1.7 en color amarillo), situada en el primer bucle. Esta región debe acercarse al dominio SSD para permitir la liberación del colesterol fuera del lisosoma pero el proceso por el que esto ocurre no está claro existiendo dos posibles mecanismos: a) La unión del colesterol provoca un cambio conformacional que permite que la proteína se cierre, acercando esta región al dominio SSD (Figura 1.7 en color rojo pálido), b) se produce una translación de la molécula de colesterol de su región de unión en una proteína NPC1 al dominio SSD de otra, por lo que no se requiere un cambio conformacional (Figura 2.6.3) [55].

La proteína NPC1 también se ve implicada en la eliminación de otras sustancias acumuladas en el lisosoma (aminas, fármacos, etc.) no mediante la traslación a través de la membrana, sino por un sistema de formación de vesículas [68,69]. De este modo, se ha asociado a la resistencia a tratamientos anticancerígenos como el Imatinib, un inhibidor de tirosincinasas utilizado para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica o la leucemia linfoblástica aguda o la daunorrubicina, una antraciclina utilizada para el tratamiento de leucemias mieloide o linfoblástica agudas [68,70].

Finalmente, NPC1 también se ha asociado con el mecanismo de infección utilizado por los

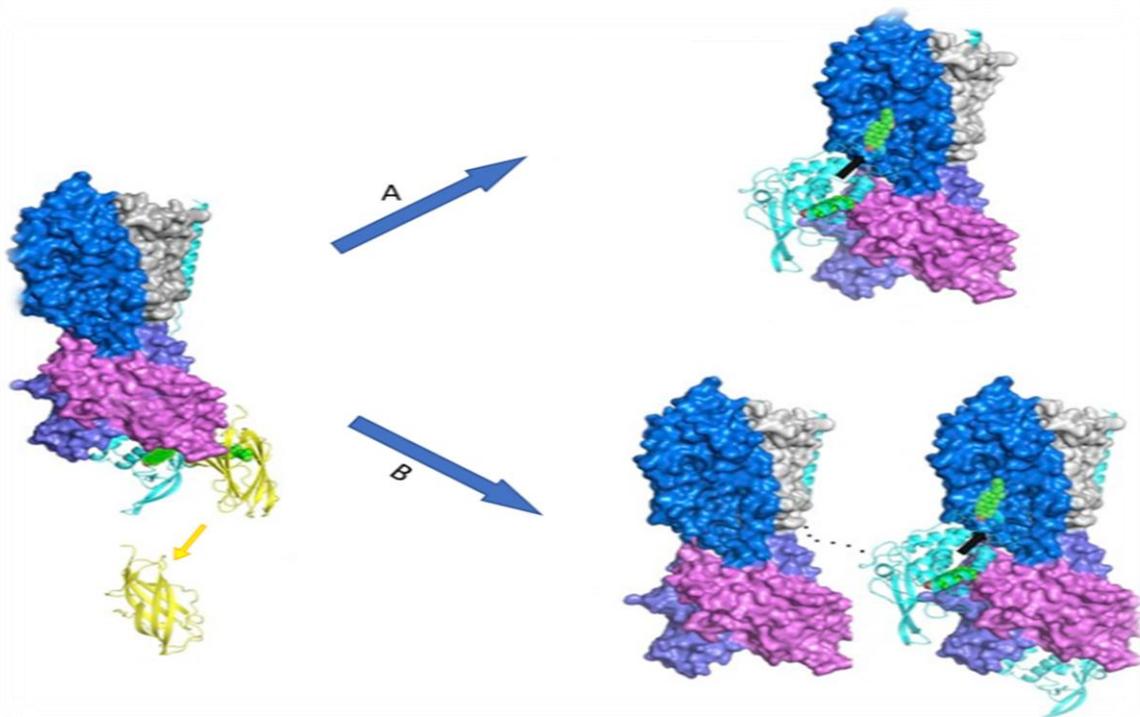


Figura 2.6.3. Tránsito del colesterol entre las proteínas NPC2 y NPC1. A la izquierda de la imagen la proteína NPC2 (amarillo) portando el colesterol (verde) se encuentra unida al segundo bucle de NPC1 (lila) y transfiere el colesterol a la zona de unión situada en el primer bucle (azul pálido) para posteriormente liberarse (flecha amarilla). Flecha A: NPC1 sufre un cambio conformacional que acerca el colesterol al dominio SSD (azul oscuro). Flecha B: NPC1 transfiere el colesterol al dominio SSD de otra proteína NPC1, sin llegar a formar un dímero. Imagen adaptada de Li X et al, 2017.

filovirus, como el virus del Ébola [71]. Una glicoproteína de su membrana penetra en la célula y tras la acción de catepsinas puede unirse al segundo bucle luminal de NPC1 y actuar facilitando la fusión completa de la membrana plasmática y a membrana viral para que se produzca la infección [72]. En este proceso no está claro si NPC2 también está implicada [73].

La proteína NPC2 también tiene funciones independientes al transporte de colesterol. Se ha observado que actúa como un regulador negativo de la proliferación mediante la activación de la vía ERK1/2 en cáncer de pulmón e hígado [74,75]. También promueve la autofagia en líneas celulares de cáncer de mama mediante la activación de AMPK, una proteína cinasa reguladora de señales de transducción [76], y junto con su receptor en la membrana lisosomal (receptor de manosa-6-fosfato) induce la formación de progenitores hematopoyéticos a nivel medular en presencia de trombopoyetina [77].

2.7 FISIOPATOLOGÍA

Como consecuencia de la incapacidad de NPC1 para expulsar el colesterol del lisosoma, este no llega al retículo endoplásmico (RE) y al detectarse unos bajos niveles de colesterol en este orgánulo, se activa la vía de SREBP incrementando la síntesis y la absorción de colesterol, de modo que se entra en un círculo vicioso [78].

Además del colesterol, también se acumulan otros lípidos, principalmente esfingomiélin, lactosilceramida, glucosilceramida, GM2 y GM3, posiblemente a causa del mal funcionamiento del lisosoma y del transporte vesicular de especies lipídicas. Este acúmulo provoca que se alteren un gran número de funciones celulares pero el mecanismo por el que se producen estas alteraciones no está bien caracterizado [79].

2.7.1 Transporte de colesterol

La interacción entre la membrana del RE y el lisosoma es crucial para la transferencia lipídica y el transporte endosomal y se realiza mediante lugares de unión entre ambas (MCs; membrane contacts, acrónimo en inglés) [80].

Algunas de las interacciones implicadas en la transferencia de colesterol del lisosoma al RE son las que se establecen entre las proteínas ORPL1 (receptor de oxisteroles) y MLN64 localizadas en la membrana del lisosoma y VAP-A, una proteína presente en las membranas y responsable de la formación de microtúbulos entre la membrana lisosomal y la del RE. Otra interacción es la

que se da de forma directa entre dos proteínas transmembrana como NPC1 en la membrana lisosomal y ORP5 (otro receptor de oxisteroles) en la membrana del RE (Figura 2.7.1 A) [80,81].

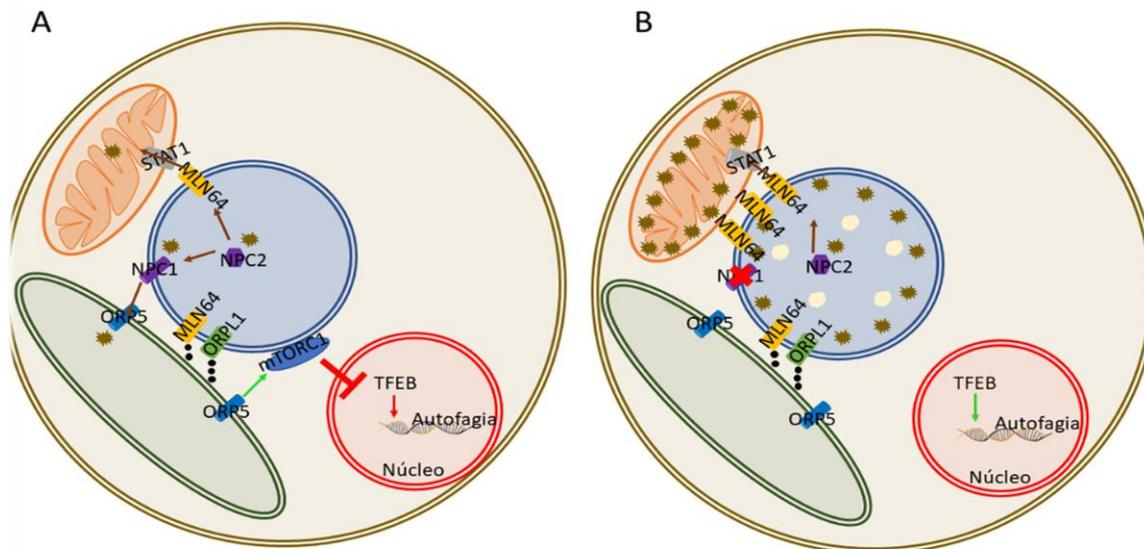


Figura 2.7.1. Representación gráfica de la afectación en el transporte del colesterol. Imagen A: Situación normal Imagen B: Afecto de NP-C. Colesterol: marrón; Esfingosina: blanco; Lisosoma: círculo azul; RE: verde; Mitocondria: Naranja; VAP-A: bolitas negras.

En la enfermedad de NP-C la interacción entre NPC1 y ORP5 es deficiente y además, el exceso de colesterol libre (no unido a NPC1) acumulado en el interior del lisosoma provoca una alteración en la estructura de ORP5 que evita su interacción con VAP-A. La interacción de NPC1 y ORP5 para mantener la estabilidad del MCs también se ha probado por el hecho de que mutaciones en ORP5 impiden la transferencia del colesterol mediada por NPC1 (Figura 2.7.1 B) [82].

MLN64 también puede inducir interacciones entre el lisosoma o el endosoma tardío y el RE, pero no permite la transferencia de colesterol a este orgánulo [80]. ORP5, además de mediar en la transferencia del colesterol del lisosoma al RE también actúa como regulador de mTOR, una de las proteínas que se encuentra directamente implicada en la homeostasis del lisosoma, ya que promueve su traslación al lisosoma, donde se produce su activación [83].

La disfunción de NPC1 provoca un incremento de la expresión de MLN64, un transportador de colesterol del lisosoma a la mitocondria, de forma que NPC2 le transfiera el colesterol a MLN64 y esta se lo transfiera a STAT1, una proteína de la membrana mitocondrial responsable de

trasladar el colesterol de la membrana a externa a la interna. Este intercambio del colesterol se realiza posiblemente por contacto directo entre las membranas del lisosoma y la mitocondria (Figura 2.7.1 A). En los pacientes de NP-C la concentración de colesterol en la membrana interna de la mitocondria se incrementa, provocando una disminución en su fluidez, una reducción de la síntesis de hormonas esteroideas y una reducción en la absorción de glutatión por la mitocondria, además de alterarse la producción de ATP y el estrés oxidativo posiblemente a causa del incremento de colesterol en la membrana interna. [79,84].

2.7.2 Proteostasis y estrés celular

La proteostasis es la regulación de la concentración, plegamiento, interacciones y localización de las proteínas. Siendo fundamental para su correcta regulación la eliminación de aquellas que presentan un plegamiento anómalo [85].

El plegamiento de las proteínas, normalmente se realiza en el RE, cuando no se produce correctamente, estas proteínas anómalas se marcan para su degradación mediante el sistema ERAD (degradación asociada al RE), uno de cuyos reguladores es la concentración de iones Ca^{2+} [86]. Normalmente las proteínas con una vida media corta se degradan mediante el proteosoma, mientras que aquellas con una larga vida media lo hacen en los lisosomas.

El proteosoma actúa cuando la proteína se ha poliubiquitinizado en el RE, cuando la proteína se ha desplegado, la actividad proteolítica del lisosoma permite fragmentarla y así degradarla, pero aquellas proteínas capaces de formar agregados no pueden degradarse mediante este sistema ya que no consiguen perder su conformación para penetrar en el proteosoma [85].

En la membrana plasmática, las proteínas mal plegadas son detectadas por CHIP, una proteína de choque térmico que recluta a la ubiquitina E3 para que marque a la proteína defectuosa y esta pueda ser reconocida por Hsc70, una chaperona cuyo receptor (LAMP-2) se encuentra en la membrana lisosomal. Este proceso se conoce como autofagia ligada a chaperonas (Figura 2.7.2 A) [85].

Las proteínas defectuosas que se localizan en el citoplasma pueden degradarse por esta misma vía o mediante macroautofagia. Esta última, se encuentra regulada negativamente por mTOR y puede activarse por mecanismos de estrés celular. ULK1 es la proteína que inicia el proceso, interaccionando con el complejo III PI3K (una proteína quinasa) y provocando la formación del

fagóforo. Este se alarga encapsulando los productos a degradar (junto con todo lo que encuentra a su paso) y termina cerrándose para formar el autofagosoma que, en condiciones normales se fusionará con el lisosoma para que las enzimas de este degraden las proteínas mal plegadas y todo el material que se ha incluido en el autofagosoma. (Figura 2.7.2 A) [85].

Una proteína lisosomal implicada en la degradación de proteínas mal plegadas es la catepsina D (CatD), en condiciones basales su concentración a nivel cerebral es muy elevada ya que se trata de una de las principales enzimas implicadas en la degradación de las α -sinucleinas. Esta proteína está regulada por calcineurina, y esta a su vez, por la homeostasis del Ca^{2+} en el lisosoma. El bloqueo de los canales de calcio provocado por el acúmulo de esfingosina, puede ser en parte, responsable del mayor riesgo de padecer Parkinson o Alzheimer observado en los pacientes de enfermedades de depósito lisosoma (EDLs) y ser uno de los factores implicados en la neuropatía de la NP-C (Figura 2.7.2 B) [87, 88].

2.7.3 Biogénesis y homeostasis del lisosoma

La síntesis y degradación de lisosomas está regulada por el factor de transcripción TFEB que se localiza principalmente en el citoplasma y se traslada al núcleo tras su activación por estrés

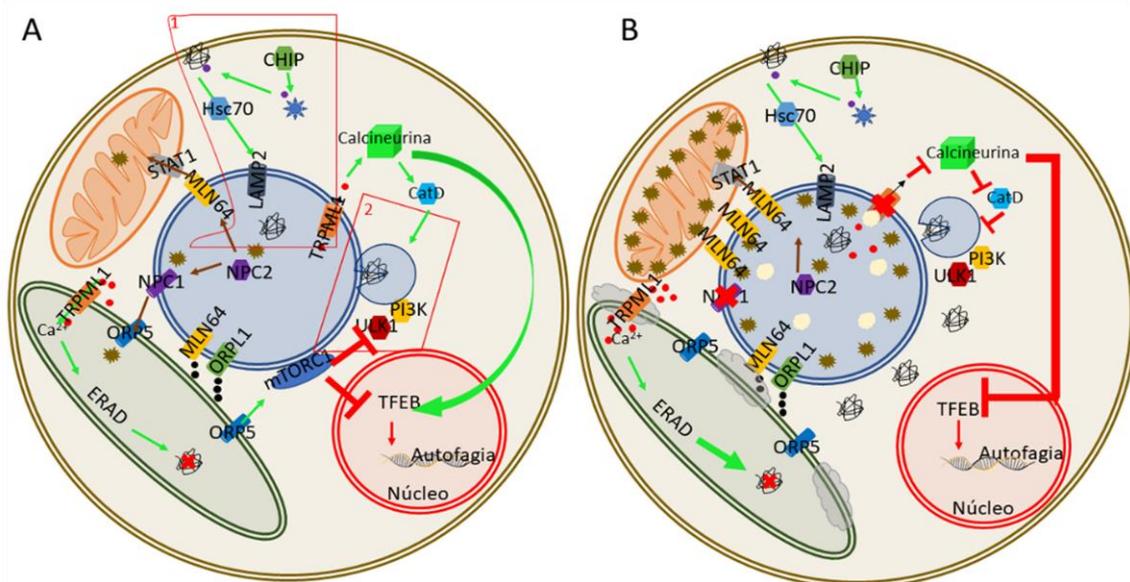


Figura 2.7.2. Representación gráfica de la eliminación de proteínas mal plegadas. Imagen A: Situación normal. Cuadro 1: Autofagia mediada por chaperonas. Cuadro 2: Macroautofagia Imagen B: Afecto de NP-C, donde además de producirse una inhibición de la autofagia por la disminución en la salida de Ca^{2+} , calcineurina actúa inhibiendo la transcripción de genes proautofagia.

lisosomal. La activación de TFEB regula la eliminación de lisosomas disfuncionales y promueve la exocitosis y autofagia de estos [86].

El acúmulo de sustratos no degradados o no expulsados del lisosoma que se produce en las EDLs provoca que estos incrementen su tamaño, pero no puedan activar correctamente las vías de degradación de manera que no se eliminan, comprometiendo su funcionalidad [89].

Esta funcionalidad está altamente regulada por el flujo iónico en el lumen lisosomal, ya que la mayoría de enzimas que contiene dependen de la acidez del medio para poder funcionar. Es gracias a la función del canal V-ATPasa que el medio luminal se mantiene ácido, ya que permite la entrada de iones H^+ mediante el consumo de ATP [90]. Además, intervienen otros canales que ayudan a regular el potencial de membrana, como los TPC's que promueven la liberación de Na^+ al citoplasma o $ClC7$ que incrementa el pH del medio expulsando H^+ para hacer entrar Cl^- (Figura

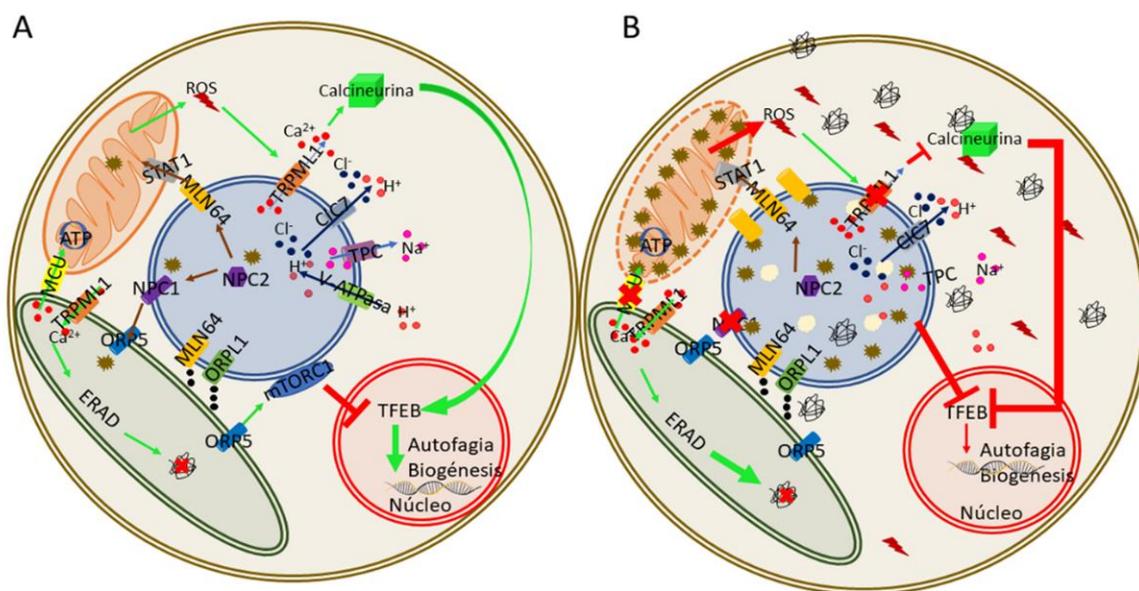


Figura 2.7.3. Representación gráfica de la biosíntesis de lisosomas y mitocondrias. Imagen A: Situación normal, Imagen B: Afecto de NP-C.

2.7.3 A).

Otro factor importante en la manutención de una estructura y funcionalidad correcta en el lisosoma es la actividad mitocondrial. Ambos orgánulos tienen un papel fundamental en la homeostasis del Ca^{2+} . Este entra en la mitocondria mediante un transportador de baja afinidad (MCU) desde el RE gracias a la formación de MCs entre estos dos orgánulos, esta entrada activa

el ciclo de producción de ATP. El Ca^{2+} liberado por los lisosomas también puede tener un papel en la actividad de la mitocondria, ya que esta activa calcineurina, la cual a su vez, promueve la activación de TFEB, un factor de transcripción crucial para la regulación de la biogénesis lisosomal y mitocondrial [90]. Como ya se ha comentado anteriormente, el bloqueo del canal de calcio, mediado por el acúmulo lipídico en el lisosoma, puede actuar bloqueando esta vía de señalización.

Además, la formación de contactos entre las membranas de mitocondrias y lisosomas también permite la liberación de Ca^{2+} entre los dos orgánulos. Este transporte se realiza mediante dos tipos de canales los TPC y los TRPML estos últimos regulados positivamente mediante la producción de especies oxígeno-reactivas en la mitocondria (ROS; acrónimo en inglés). Como ya se ha comentado en el párrafo anterior, el incremento de Ca^{2+} citoplasmático provoca una activación de la vía de TFEB y de la renovación mitocondrial, pero en los pacientes de EDLs esta renovación es disfuncional (ver más adelante en el apartado 2.7.5) [91].

2.7.4 Exocitosis

Las funciones de la exocitosis son básicamente dos, una que consiste en el remodelado de la membrana y otra secretora, ya que es mediante este proceso que se liberan proteínas y moléculas de señalización a la matriz extracelular, como por ejemplo reguladores del desarrollo axonal [89].

Es la activación de este mismo factor de transcripción (TFEB), la que promueve la exocitosis de los lisosomas, necesaria tanto como un proceso de eliminación de compuestos tóxicos como para el transporte de proteínas al medio extracelular [86].

Para la exocitosis, también es necesario que se active el complejo SNARE que promueve el acercamiento entre la membrana lisosomal y la plasmática, estando este proceso regulado por el flujo de iones Ca^{2+} y por la proteína Rab7 que regula la movilidad del lisosoma. Durante la exocitosis, la proteína VAMP7, localizada en la membrana lisosomal, interacciona con SNAP23 y con la sintaxina-4 que se localizan en la membrana plasmática, formando el complejo SNARE y permitiendo el acercamiento de ambas membranas mediante un sistema de microtúbulos. En la región donde se produce esta interacción, el lisosoma libera una gran cantidad de Ca^{2+} a través

de los canales TRMPL1, incrementando su concentración y promoviendo la fusión de las membranas mediante la activación de Syt-VII (Figura 2.7.4 A) [92].

En los afectos de NP-C la funcionalidad de los canales TRMPL1 se encuentra inhibida,

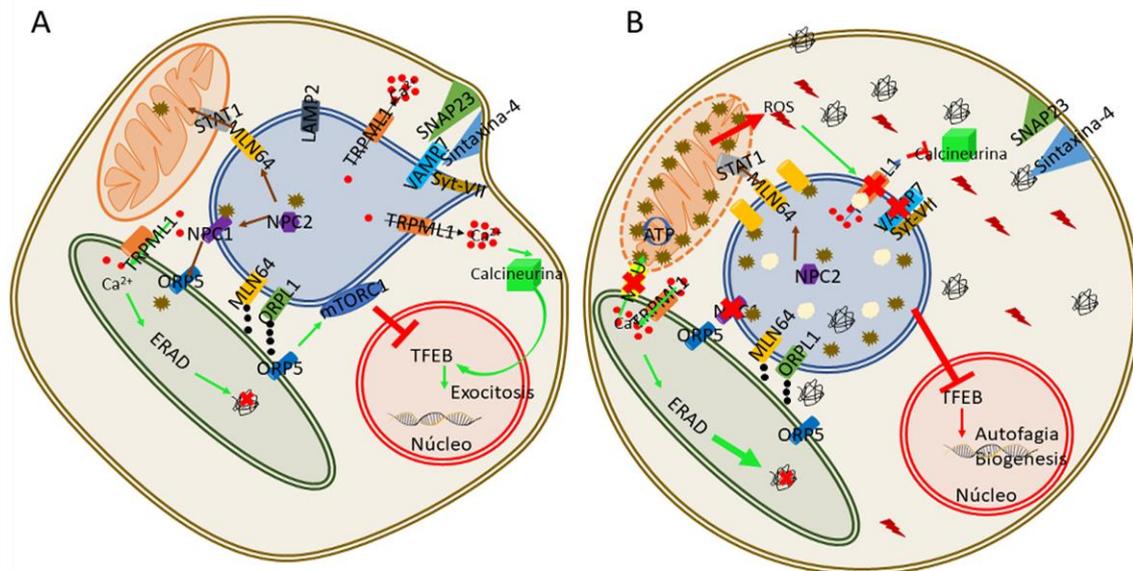


Figura 2.7.4. Representación gráfica de la exocitosis. Imagen A: Situación normal Imagen B: Afecto de NP-C, el bloqueo del transportador de calcio y la deslocalización de VAMP7 impiden la formación del complejo SNARE.

posiblemente por causa del acúmulo de esfingomiélin, además a causa de la alteración en el transporte del colesterol se produce una deslocalización de la proteína VAMP7 por lo que la formación del complejo SNARE, y en consecuencia la exocitosis, se ve comprometida [89,92]. También se ve alterada la formación del complejo SNARE a nivel presináptico a causa del acúmulo de α -sinucleína [93], entrando en un bucle donde la disfunción en la degradación de proteínas mal plegadas provoca una disfunción en la exocitosis y esta propicia la disfunción en la proteólisis (Figura 2.7.4.B).

2.7.5 Regulación mitocondrial

El principal responsable de la producción de energía en la célula es la mitocondria, cuya funcionalidad se encuentra íntimamente ligada a la del lisosoma. La existencia entre interacciones entre ambos orgánulos se apoya en el hecho de que su biogénesis está regulada por el mismo factor de transcripción (TFEB). La falta de expresión de este factor de transcripción provoca una reducción de la síntesis de ATP y un incremento en la formación de ROS que afecta

a la permeabilidad de la membrana mitocondrial y a la funcionalidad de sus canales iónicos (Figura 2.7.5 B) [94]. A su vez, el bloqueo de la salida de Ca^{2+} provoca una activación de la producción de ROS de forma que el sistema puede llegar a desregularse [95].

Además la correcta funcionalidad de la mitocondria también está regulando al lisosoma, ya que una disminución en esta provoca una inhibición de la catepsina B y de la esfingomielinasa ácida, provocando un acúmulo de esfingomielina [79].

Otra vinculación entre el lisosoma y la mitocondria, radica en el hecho de que los aminoácidos necesarios para el correcto funcionamiento de la cadena respiratoria (principalmente glutamina y glutamato) los proporciona el lisosoma a partir de los restos de los procesos de degradación que ocurren en su interior. Cuando existe una disminución de nutrientes en la célula, la activación de mTOR también afecta a la mitocondria, que se alarga y cambia la disposición de su membrana interna, reduciendo la producción de ATP y activando la fragmentación del orgánulo (Figura 2.7.5 B) [94].

Para que se produzca la fragmentación es necesaria una elongación de la membrana, regulada

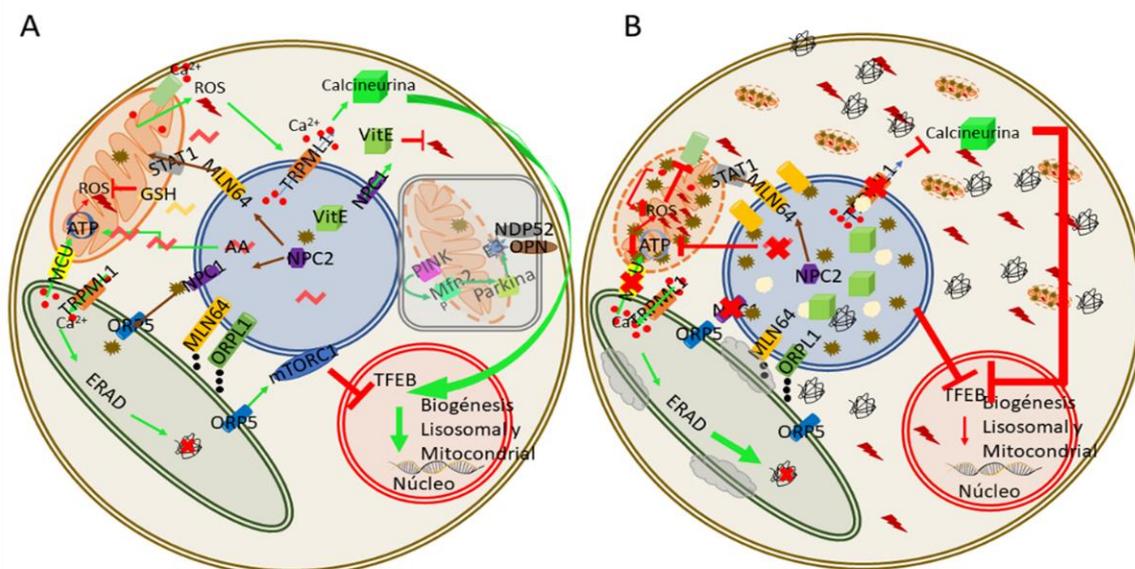


Figura 2.7.5. Representación gráfica de la interacción entre mitocondria y lisosoma. **Imagen A:** Situación normal en la que la degradación de proteínas realizada en el lisosoma permite el acceso de amino ácidos (AA) a la mitocondria, y la mitofagia se realiza de forma normal. **Imagen B:** Afecto de NP-C, la degradación mitocondrial y la regulación de la producción de ATP y de especies oxígeno reactivas se ve alterada.

por la inhibición de DRP1 y un adelgazamiento de la membrana interna, regulado por OPA1 cuya

regulación depende de los sensores de niveles de glutamato y aspartato (representados como AA en la figura (Figura 2.7.5)) [94].

El proceso de degradación de mitocondrias disfuncionales mediante autofagia se conoce como mitofagia, el proceso una mezcla entre la macroautofagia y la autofagia mediada por chaperonas pero las cascadas de señales activadas son diferentes. Existen dos vías de activación de este proceso, la primera cuando existe una disminución del potencial de membrana se activa la quinasa PINK1, localizada en la membrana externa de la mitocondria que fosforila Mfn2 para que actúe reclutando a Parkina. Esta fosforila múltiples sustratos en la membrana externa de la mitocondria entre ellos a la ubiquitinina E3 para que pueda activarse la autofagia. Esta E3 es reconocida por múltiples proteínas en la membrana del fagóforo, como NDP52 o optineurina (OPN) que inducen la formación del autofagosoma en torno a la mitocondria que ha activado el proceso (Figura 2.7.5 A) [96,97].

En la enfermedad de NP-C se ha observado una desregulación de la función y organización de la mitocondria, posiblemente a causa de un aumento de colesterol en la membrana interna. Las mitocondrias de las células afectas son más pequeñas y redondeadas y presentan alteraciones en la distribución de la membrana interna [98]. Además, como ya se ha comentado en apartados anteriores de esta introducción, se ha observado que el proceso de macroautofagia no se realiza correctamente, por lo que lisosomas y mitocondrias disfuncionales se acumulan en el interior de la célula [99]. Otras alteraciones que se observan a causa de mutaciones en el gen *NPC1* es un incremento en la producción de ROS a causa de un déficit de la concentración de glutatión (GSH) en la mitocondria, ya que el incremento de colesterol en la membrana interna de esta bloquea el canal por el que se internaliza. Este incremento de ROS provoca un bloqueo de la salida de calcio de la mitocondria y este cambio en la concentración iónica potencia la actividad de las enzimas productoras de ROS entrando en un círculo vicioso que provoca la disfuncionalidad de la mitocondria (Figura 2.7.5 B) [100].

Una posible solución a este incremento de ROS a nivel celular es el efecto antioxidante de la vitamina E, pero se ha observado que esta se transporta a través del lisosoma y su liberación está regulada por las proteínas NPC, de modo que la capacidad antioxidante de la célula también se encuentra reducida en estos pacientes (Figura 2.7.5 B) [100].

2.8 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la enfermedad de NP-C es complejo, principalmente por la inespecificidad de las manifestaciones clínicas, pero también a causa de la ausencia de un test diagnóstico rápido y preciso como existe en otras enfermedades de depósito lisosomal (EDLs) en las que el problema reside en un déficit enzimático. Pero la importancia de la realización de este diagnóstico en el menor tiempo posible y con la mayor seguridad es crucial, sobre todo desde que existen tratamientos que pueden reducir el avance de la sintomatología neurológica.

Por este motivo se ha planteado un posible algoritmo diagnóstico para seguir en aquellos casos con sospecha de NP-C y que consiste en la evaluación clínica, el estudio de biomarcadores de EDL y el estudio de los genes *NPC1* y *NPC2*. En función de los resultados obtenidos, el estudio se completará con el test de tinción por filipina, con intención de esclarecer los resultados y poder realizar un diagnóstico fiable (Figura 2.8.1) [101,102].

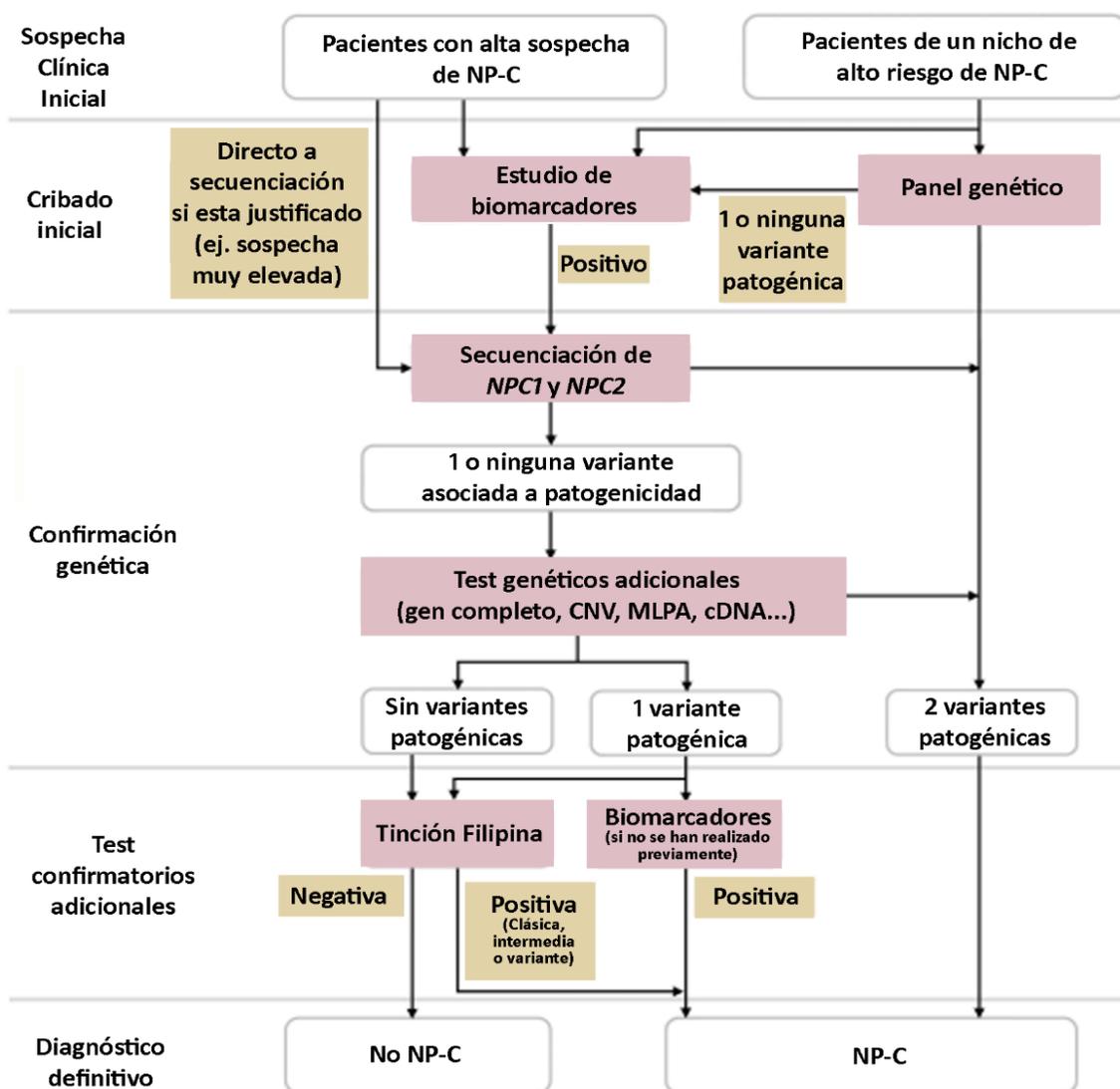


Figura 2.8.1. Algoritmo diagnóstico para la enfermedad de NP-C. Adaptado de Patterson et al. 2017

2.8.1 Evaluación clínica

Ya se ha comentado recurrentemente en esta introducción, la diversidad e inespecificidad de las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes con la enfermedad de NP-C, lo que hace que el diagnóstico pueda realizarse en un amplio grupo de servicios hospitalarios. A pesar de esta diversidad clínica, una correcta anamnesis y una evaluación de la historia familiar del paciente son imprescindibles para poder sospechar de la presencia de la enfermedad y diferenciarla de otras metabolopatías [45].

Para facilitar la identificación de posibles afectos de NP-C, en 2012 se desarrolló un índice sospecha para NP-C (NPC-SI, ver enlaces). Un sistema de puntuación para las manifestaciones clínicas que, considerando la combinación de sintomatología y la historia familiar, otorga un riesgo de sufrir la enfermedad a cada sujeto y la recomendación o no, de aplicar técnicas diagnósticas [103]. Este sistema presentaba una limitación importante ya que la dificultad de identificar la sintomatología neurológica y psiquiátrica en menores de 4 años no permitía la correcta utilización del mismo [103, 104]. Por este motivo, se realizó una ampliación del estudio, incluyendo más pacientes de este grupo, dando más valor a la sintomatología visceral en esta franja de edad [105]. Una reevaluación de la puntuación obtenida por la presencia de sintomatología de diversos grupos (visceral, neurológica o psiquiátrica) y un cambio en la escala de puntuación, junto con la incorporación del sistema de puntuación para menores de 4 años han permitido modificar esta herramienta hasta su forma actual (Figura 2.8.2) [106].

	Sistema nervioso	Bazo	Hígado	Pulmón	Neonatal	Historia familiar
Muy sugestivos						Padres o hermanos afectos de NP-C <input type="checkbox"/>
Síntomas Fuertes		Esplenomegalia <input type="checkbox"/>		Infiltrados pulmonares <input type="checkbox"/>		
Moderados	Cataplejía <input type="checkbox"/>		Ictericia prolongada y sin explicación <input type="checkbox"/>			
Débiles	Parálisis supranuclear de la mirada vertical <input type="checkbox"/>		Bilirrubinemia directa <input type="checkbox"/>		Edema o ascitis fetal <input type="checkbox"/>	
Muy débiles			Hepatomegalia <input type="checkbox"/>			
Combinaciones	Regresión mental <input type="checkbox"/> Ataxia <input type="checkbox"/>					

	Visceral	Neurológico	Psiquiátrico	★ Historia familiar
Muy sugestivos		★ Cataplejía <input type="checkbox"/> ★ Parálisis supranuclear de la mirada vertical <input type="checkbox"/>		Padres o hermanos afectados de NP-C <input type="checkbox"/>
Síntomas Fuertes	★ Esplenomegalia con o sin hepatomegalia <input type="checkbox"/> ★ Ictericia neonatal prolongada o colestasis <input type="checkbox"/>		★ Deterioro cognitivo presenil o demencia <input type="checkbox"/>	Primos afectados de NP-C <input type="checkbox"/>
Moderados		Distonia <input type="checkbox"/> Disartría o disfagia <input type="checkbox"/> Ataxia, caídas frecuentes <input type="checkbox"/>	★ Síntomas psicóticos (alucinaciones, ilusiones...) <input type="checkbox"/>	
Débiles		Espasticidad, adquirida y progresiva <input type="checkbox"/>	Otros trastornos psiquiátricos <input type="checkbox"/> Resistencia al tratamiento psiquiátrico <input type="checkbox"/>	
Muy débiles	Hermanos con ascitis fetal <input type="checkbox"/> Hidrops fetal <input type="checkbox"/>	Hipotonía <input type="checkbox"/> Mioclonía <input type="checkbox"/> Convulsiones <input type="checkbox"/> Retraso en el desarrollo <input type="checkbox"/>	Comportamiento agresivo durante a la infancia o la adolescencia <input type="checkbox"/>	

Figura 2.8.2. Cuestionario para calcular el NPC-SI. En la página anterior: NPC-SI para menores de 4 años. Sobre estas líneas: NPC-SI para mayores de 4 años. Imagen adaptada de <http://www.npc.si.com>

Esta herramienta permite englobar a los pacientes en tres grupos de riesgo en función de la puntuación otorgada. Para el grupo formado por menores de 4 años, se considera alto riesgo tener 6 ó más puntos, mientras que el riesgo se considera bajo con menos de 3 puntos. A la puntuación intermedia se le otorga un riesgo moderado. Para los adultos se consideran de alto riesgo puntuaciones a partir de 40 y de bajo las inferiores a 20.

Al realizar la exploración clínica del paciente, es importante tener en cuenta que, existen 12 grupos de riesgo entre pacientes de otras enfermedades donde la probabilidad de ser afecto de enfermedad de NP-C es mayor que en la población general. Algunos de estos grupos son los pacientes con ataxia tempranas de origen incierto o con distonías, sujetos con deterioro

cognitivo temprano o demencia fronto-temporal, parkinsonismo precoz o inflamación crónica del sistema nervioso central [15].

2.8.2 Estudios de transporte de colesterol

Estas técnicas se basan en la tinción del colesterol en células “*in vivo*”, esto requiere la realización de técnicas invasivas, ya que es necesaria una biopsia de piel y un cultivo de la misma para poder realizarlas. Eso supone, además, que los resultados se demoran ya que el cultivo debe instaurarse y crecer lo suficiente para poder analizarlo. Además, al tratarse de técnicas de tinción, es de crucial importancia disponer de personal formado, ya que se la interpretación es compleja y puede ser altamente sugestiva.

2.8.2.1 Test de tinción filipina

El test de tinción mediante filipina se basa en la capacidad de un compuesto fluorescente, aislado de la *Streptomyces filipinensis* de unirse al colesterol no esterificado, permitiendo su visualización al microscopio.

El protocolo para realizarlo se estableció en 1988 en Lyon. Requiere la realización de una biopsia de piel, y el cultivo en duplicado del mismo. Brevemente consiste en mantener los dos cultivos, uno con medio normal y otro enriquecido en LDL, para posteriormente levantarlos, fijarlos y teñirlos con la sustancia fluorescente que se visualiza al microscopio con un filtro de excitación a 365nm.

Existen cuatro patrones que cuantifican la expresión, las células de un sujeto sano no muestran positividad a la tinción, mientras que podemos encontrar pacientes con tres fenotipos diferentes. Un fenotipo variante en el que observamos positividad en menos del 50% de las células del cultivo normal y entre un 50-75% en el cultivo suplementado. Un fenotipo intermedio con positividad de entre el 60-90% en el cultivo estándar y 80-90% en el rico en LDL y, finalmente, un fenotipo clásico con una positividad del 90-100% en ambos cultivos (Figura 2.8.3) [107].

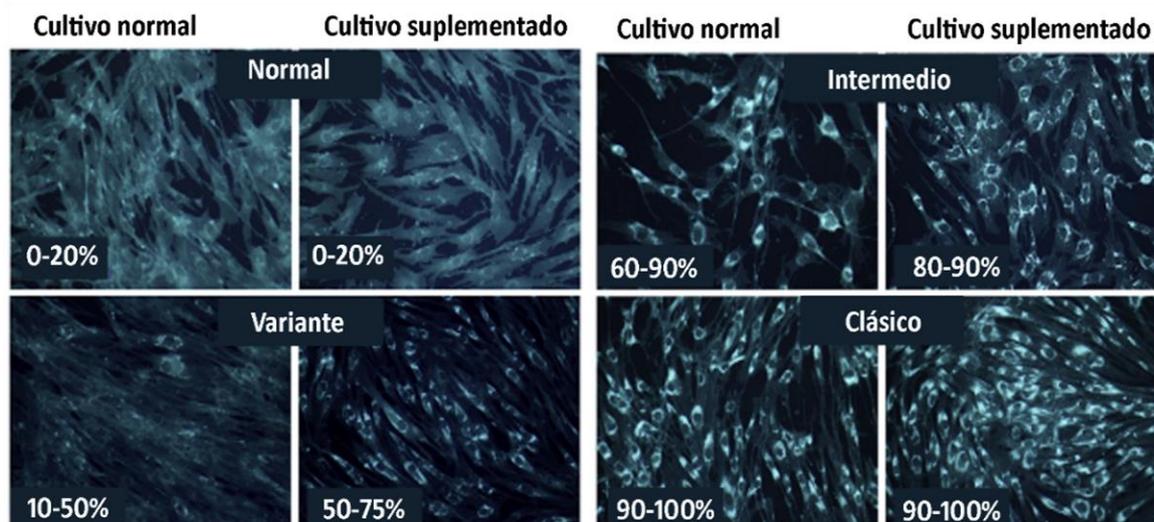


Figura 2.8.3. Microscopia de fluorescencia para la tinción filipina. La imagen muestra un sujeto normal y los tres fenotipos posibles en pacientes NP-C. Imagen adaptada de Vanier et al., 2015.

2.8.2.2 Medida de la esterificación del colesterol

Este test está prácticamente obsoleto a causa de las complicaciones técnicas y la baja sensibilidad frente al test de tinción filipina.

Se basa en la incapacidad de las células de afectados de NP-C para transportar el colesterol no esterificado al retículo endoplásmico donde debe esterificarse [101].

Dos cultivos de fibroblastos del sujeto a estudio se mantienen en medio rico en LDL, al que se le añade ácido oleico [^3H] 4 horas antes de sacrificarlos. Se extraen y separan los lípidos y se mide el colesteril oleato radioactivo, haciendo la media de los dos cultivos. Los pacientes con un fenotipo filipina clásica prácticamente no muestran formación de colesterol esterificado, mientras que los sujetos con un fenotipo intermedio muestran un déficit moderado. Esta técnica no permite identificar aquellos individuos con un fenotipo variante [61].

2.8.3 Biomarcadores

La determinación de biomarcadores de EDL, no proporciona una información específica para el diagnóstico de la enfermedad de NP-C pero si puede ser altamente orientativa. Hoy, no hay un biomarcador específico, pero cada vez hay más marcadores a tener en consideración.

2.8.3.1 Actividad de la enzima quitotriosidasa

La enzima quitotriosidasa (QT) es una citinasa elevada en múltiples EDLs y ampliamente utilizada para el diagnóstico y monitorización de la enfermedad de Gaucher [108–110]. La actividad normal de enzima quitotriosidasa se encuentra en un rango entre 8 y 132 nmol/mL/h mientras que en sujetos afectados de enfermedad de NP-C tiene valores de entre 553 ± 479 y 856 ± 721 nmol/mL/h [108, 111, 112].

Su determinación no es útil en el 100% de los casos, ya que en la población europea existe un polimorfismo (NM_003465:c.1049_1072dup24) que anula la actividad de la enzima [113].

2.8.3.2 Cuantificación de la concentración CCL18/PARC

La quimiocina ligando 18 (CCL18)/quimiocina reguladora de activación pulmonar (PARC) se sintetiza en baja cantidad en los monocitos/macrófagos (10-72 ng/mL), pero que se eleva cuando estos están activados [114]. Esta elevación se observa en EDLs como la enfermedad de Gaucher (237-2285 ng/mL), la enfermedad de NP-A/B o en la enfermedad de NP-C [115].

En los sujetos con NP-C se ha observado una elevación de la quimiocina pero los valores oscilan bastante entre las publicaciones, entre 112-874 ng/mL y 481-370 ng/mL [108,116].

2.8.3.3 Cuantificación de la concentración de oxisteroles

El estrés celular provocado por la acumulación del colesterol no esterificado en el interior del lisosoma provoca un incremento en la producción de especies oxígeno-reactivas (ROS). Estas provocan la oxidación de colesterol, formando oxisteroles como el colestano $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol o el 7-cetocolesterol (7-CC) [101]. Estos se han visto elevados en pacientes afectados de NP-C, presentando una elevada capacidad discriminatoria, aunque no son específicos ya que también se encuentran elevadas en otras patologías como NP-A/B o en el déficit de lipasa ácida lisosomal (DLAL) y en situaciones fisiológicas como la elevación observada en neonatos [117, 118]. Otro de los problemas que presentan como biomarcadores de la enfermedad la elevada complejidad técnica de su determinación, ya que se realiza mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas en tándem, que hace que su disponibilidad se reduzca a laboratorios especializados [101].

2.8.3.3.1 7-Cetocolesterol

El colesterol al ser atacado por las ROS genera mediante una reacción no enzimática 7-hidroperóxido colesterol, este se degrada en dos metabolitos, el 7-cetocolesterol y el 7-a/b-hidroxicolesterol (Figura 2.8.4) [119].

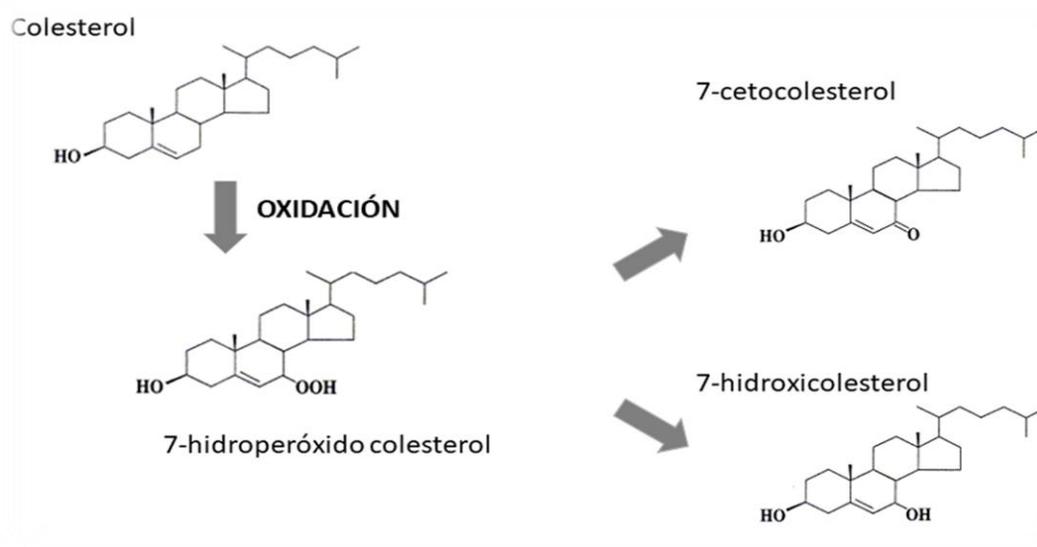


Figura 2.8.4. Proceso de formación del 7-cetocolesterol.

Se ha detectado una elevación de este metabolito en los afectados de NP-C, con concentraciones superiores a 200 ng/mL en los afectados versus un valor medio en los controles de 16 ng/mL [108,119,120].

Existe controversia sobre su utilidad, ya que en algunos estudios lo consideran un metabolito inestable con una alta variabilidad, en cambio en otros trabajos se considera que su estabilidad a largo plazo es mayor que la del colestano $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol [121].

2.8.3.3.2 Colestano $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol

Se trata de otro metabolito de la oxidación no enzimática del colesterol. Cuando se oxida el colesterol puede derivar en un $5\alpha,6\alpha$ epóxido que se degrada a colestano $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol (Figura 2.8.5).

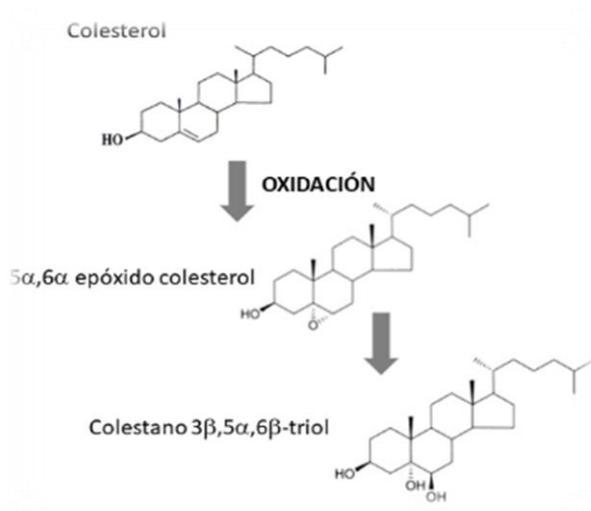


Figura 2.8.5. Proceso de formación del colestano 3b-5a-6b-triol.

Este metabolito se ha detectado elevado en pacientes de NP-C, y aunque tampoco es específico parece ser más sensible que el 7-CC pero menos estable [121,122]. Sus valores en población normal la media de concentración es de 16 ng/mL mientras que en afectados de NP-C se elevan hasta 130 ng/mL. Estos rangos son ampliamente variables según la publicación analizada, ya que en otras la media se sitúa en 4 ng/mL y los pacientes tienen valores que oscilan de 16,3 a 608 ng/mL [119, 123].

2.8.3.4 Lisoesfingolípidos

Los lisoesfingolípidos son metabolitos tóxicos que se generan en múltiples esfingolipidosis por la pérdida de un grupo N-acilo en los esfingolípidos. Se ha observado que la lisoesfingomielinea se encuentra elevada en afectados de NP-C, en menor medida de lo que se observa en pacientes de NP-A/B. La lisoesfingomielinea-509 es un análogo carboxilado de la primera y su elevación es mayor en los pacientes de NP-C que en los de NP-A/B, por lo que puede ser más específica para la enfermedad que nos atañe [61]. Es la ratio entre los dos metabolitos, lo que mejor discrimina entre estas enfermedades [124].

La determinación de estos analitos debe realizarse a partir de sangre total anticoagulada con EDTA, ya que recientemente se ha probado que su capacidad discriminatoria disminuye drásticamente cuando se trabaja con gota de sangre seca. Según varios estudios recientemente publicados, la lisoesfingomielinea no muestra elevación en las muestras recogidas con esta

matriz, mientras que la liso esfingomielina-509 sí, pero con un amplio solapamiento con los controles [125].

Del mismo modo que los oxisteroles, estos metabolitos se analizan mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, por lo que su aplicación se limita a laboratorios con esta equipación. Además, la determinación de la liso esfingomielina-509 presenta otra limitación, ya que no existe un estándar interno para la misma [124].

2.8.3.5 Metabolitos de los ácidos biliares

Se han identificado múltiples metabolitos de ácidos biliares elevados en pacientes de enfermedad de NP-C [61,101].

Entre estos metabolitos se encuentran el ácido 3 β -hidroxi,7 β -N-acetilglucosaminilo-5 α -colenoico (NPCBA1) y la 3 β ,5 α ,6 β -trihidroxicolanil-glicina (NPCBA2) se encuentran elevados respecto a los controles entre 40 y 10 veces en afectos que NP-C, aunque a causa de un polimorfismo genético el primero puede no detectarse en la población, del mismo modo que sucede con la actividad quitotriosidasa [126].

2.8.4 Estudio genético

2.8.4.1 Secuenciación de *NPC1* y *NPC2*

A causa de la implementación y el descenso del coste de las técnicas de secuenciación, el análisis de los genes responsables de la enfermedad de NP-C se ha extendido. Actualmente se recomienda realizarlo a todos los pacientes y no sólo como test confirmatorio en casos dudosos [61].

El estudio más habitual para los genes *NPC1* y *NPC2* es la técnica Sanger realizándose para los 30 exones y para la región de unión con los intrones [101,127].

A pesar de la gran capacidad definitoria de la técnica cuando se detectan variantes asociadas a patogenicidad en los dos alelos, existen casos con biomarcadores o tinción filipina positivos en los que solamente se detecta una o no se detecta ninguna variante asociada a patogenicidad [61,101].

Cuando las variantes observadas son nuevas o su efecto se desconoce es necesario realizar un estudio bioinformático para valorar su riesgo de patogenicidad. Para ello existen un gran número de predictores “*in silico*” con un amplio espectro de análisis, desde la secuencia genómica hasta la estructura terciaria de la proteína, pasando por el análisis de la estructura primaria. Pero estas aplicaciones bioinformáticas solamente proporcionan predicciones y no confieren una seguridad absoluta del efecto del cambio [128].

2.8.4.2 Estudio del cDNA

Como se muestra en la figura 1.10 cuando los resultados de los estudios diagnósticos son confusos, se debe profundizar más en el estudio de los genes responsables de la enfermedad [101]. Una de las opciones es el estudio de la secuencia del cDNA que nos proporcionará información sobre las alteraciones presentes en el RNA mensajero, pudiendo identificar con certeza variantes que afecten al ajuste y permitiendo la identificación de variantes situadas en los intrones a causa de la inserción de nuevos pseudoexones o delección de exones [129].

2.8.4.3 MLPA

También se han observado delecciones de gran tamaño en los genes responsables de NP-C, estas delecciones son difíciles de identificar por técnicas de secuenciación convencional, ya que cuando se encuentran en heterocigosidad aparecen como grandes regiones en las que los polimorfismos que se puedan detectar parecen variantes homocigotas, pudiendo generar problemas para identificar el patrón de segregación familiar, y cuando se encuentran en homocigosidad impiden la amplificación de la región y por lo tanto su análisis [130].

Para identificar estas grandes delecciones se desarrolló la técnica de amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA). Esta permite evaluar la dosis existente de cada una de las regiones que analiza por lo que se pueden detectar delecciones o duplicaciones de fragmentos del gen [131].

2.8.4.4 Secuenciación mediante NGS

La reducción del coste y la implementación de las técnicas de secuenciación masiva están facilitando el acceso a estas. El diseño de paneles para la identificación de enfermedades de depósito lisosomal en los que se incluyen los genes responsables de NP-C, así como paneles para

otros grupos de riesgo en los que también se incluyen *NPC1* y *NPC2* (como paneles para ataxias, colestasis o esplenomegalia) están facilitando la implementación de cribados en los que identificar nuevos pacientes de forma precoz [132–134]. Del mismo modo el incremento de estudios de exomas completos también facilitan esta identificación [14,135].

2.9 TRATAMIENTO

No existe un tratamiento curativo para la enfermedad de NP-C, por lo que el abordaje farmacológico consiste en reducir y retrasar la aparición de los síntomas.

2.9.1 Miglustat

La N-butildeoxinojiromicina (Miglustat; Zavesca®, Actelion Pharmaceuticals, Allschwil, Suiza) es el único tratamiento aprobado en Europa, desde 2006, para la sintomatología neurológica en niños y adultos con enfermedad de NP-C [136,137].

Es un iminoazúcar de pequeño tamaño y soluble en agua capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, cuyo mecanismo de acción es la inhibición parcial de la síntesis de glicoesfingolípidos [138]. Esta inhibición reduce el acúmulo de estos en el lisosoma y por lo tanto la sintomatología neurológica que provoca. Su efecto se extiende restableciendo las balsas lipídicas y la función de los complejos III y IV de la membrana mitocondrial además, proporciona protección contra el estrés oxidativo y reduce la degeneración axonal [139]. Recientemente se ha comprobado que el tratamiento con Miglustat enlentece la progresión de alteraciones en la sustancia blanca [140].

Se administra por vía oral y se absorbe rápidamente, presentando la máxima concentración plasmática a las 2 horas de su administración y una vida media en el organismo de 6-7 horas eliminándose principalmente por vía renal. La ingesta de alimentos junto con el fármaco reduce la absorción del mismo pero no a niveles clínicamente relevantes [136].

Los efectos adversos más frecuentes (80% de los pacientes tratados) se centran en el sistema gastrointestinal, provocando diarreas, flatulencias y dolor abdominal que generalmente se maneja fácilmente sin asistencia médica. El mecanismo causal más probable es la inhibición de disacaridasas gastrointestinales. Además, los pacientes pueden presentar alteraciones sanguíneas, neurológicas, neuromusculares, etc. (Tabla 2.9.1) Estudios en animales han

demostrado también una reducción de la espermatogénesis durante el tratamiento y toxicidad reproductiva, por lo que se desaconseja su administración durante el embarazo. Así mismo, el desconocimiento existente sobre el efecto en la leche materna recomienda evitar su administración durante la lactancia [136,139].

SISTEMA AFECTADO	FRECUENCIA	TRASTORNO
Sangre y Sistema Linfático	Frecuente	Trombocitopenia
Metabolismo y Nutrición	Muy frecuente	Pérdida de peso Disminución del apetito
Psiquiátricos	Frecuente	Depresión Insomnio Disminución de la libido
Sistema Nervioso	Muy frecuente Frecuente	Temblores Neuropatía periférica Ataxia Amnesia Parestesia Hipoestesia Cefalea Mareo
Gastrointestinales	Muy frecuente Frecuente	Diarrea Flatulencia Dolor abdominal Náuseas Vómitos Distensión/molestia abdominal Estreñimiento Dispepsia
Musculo-esquelético y Tejido Conjuntivo	Frecuente	Espasmos musculares Debilidad muscular

		Fatiga
Generales	Frecuente	Astenia
		Escalofríos
		Sensación de malestar

Tabla 2.9.1. Efectos adversos notificados en ensayo clínico o de forma espontánea durante el tratamiento con Miglustat. Clasificación de la frecuencia: Muy frecuente $\geq 1/10$; Frecuente $\geq 1/100$; Poco frecuente $\geq 1/1.000$; Rara $\geq 1/10.000$; Muy rara $\geq 1/100.000$. Las reacciones están listadas por gravedad dentro de cada grupo de frecuencias. Adaptado de la ficha técnica

2.9.2 Ciclodextrinas (ensayo clínico)

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos con un exterior hidrofílico y una cavidad interior hidrofóbica, por lo que son moléculas con una elevada solubilidad. Esta característica ha hecho que se utilicen como excipientes en múltiples complejos farmacológicos [141].

Actualmente existen dos compuestos de 2-Hidoxipropil- β -ciclodextrinas (HP β CDs) que se encuentran en ensayo clínico para su uso farmacológico en la enfermedad de NP-C.

El ensayo con VTS-270 (Vtesse Inc., Gaithersburg, MD) como compuesto activo se encuentra reclutando pacientes para las fases 2/3 de ensayo clínico que tenían previsto finalizarse en marzo 2018, pero aún no hay resultados (Identificador del estudio en ClinicalTrials.gov: NCT02534844; ver enlaces).

El estudio en fase 1 (NCT01747135) ha demostrado que la administración intratecal del compuesto es segura y bien tolerada a dosis de hasta 1.200 mg. Como efectos adversos se han observado casos de ataxia y fatiga tras la administración que han resultado ser dosis-limitantes, pero la ototoxicidad observada ha sido menos limitante de lo previsto según los resultados en estudios animales. A nivel de eficacia, el estudio en fase 1 ha mostrado una mejora en los niveles de los biomarcadores analizados en líquido cefalo-raquídeo, indicando una movilización de los depósitos de colesterol a nivel neuronal [142].

El ensayo con Trappsol® Cyclo™ (CTD Holdings Inc., Alachua, FL) se encuentra en fase 1/2 para evaluar su eficacia y seguridad mediante inyección intratecal de tres dosis diferentes del compuesto en 12 pacientes con NP-C. El estudio se inició en marzo 2017 y su finalización está prevista para diciembre 2018, actualmente se encuentra reclutando pacientes (Identificador: NCT02912793; ver enlaces).

2.9.3 Arimoclomol® (ensayo clínico)

Las proteínas de choque térmico se generan en la célula como respuesta a una situación de estrés y actúan como chaperonas, ayudando a las proteínas que se están desnaturalizando por culpa de ese estrés, a conservar su estructura y por lo tanto su funcionalidad. En la familia de proteínas HSP con un peso de 70kDa esta función se relaciona con el lisosoma ya que se ha observado que forma complejos con la membrana lisosomal aunque el mecanismo exacto se desconoce [143].

Arimoclomol (Orphazyme, Copenhagen, Dinamarca) es una HSF70 humana recombinante que se encuentra en fase 2/3 de ensayo clínico para el tratamiento de NP-C (Identificador NCT02612129, ver enlaces). Estudios en fibroblastos y ratones deficientes para el gen *NPC1*, así como estudios con otras neuropatías, han demostrado su eficacia en el tratamiento de la sintomatología neurológica [144].

Estudios de la molécula a diferentes concentraciones han demostrado su eficacia y seguridad en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica, así como su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica [145,146].

2.9.4 Vorinostat® (ensayo clínico)

Se ha observado una desregulación de la acetilación de las histonas en células deficientes en el gen *NPC1* y su recuperación cuando estas células se tratan con un inhibidor de histona deacetilasas (HDACi). El inhibidor utilizado es Vorinostat (Zolinza®) que además tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica [147]. Estudios en fibroblastos demostraron que dosis de hasta 10µM del compuesto pueden normalizar el acúmulo de colesterol [148].

El ensayo clínico con Vorinostat en pacientes con enfermedad de NP-C se inició en abril de 2014 y se completó en diciembre de 2016 (NCT02124083, ver enlaces), analizándose la seguridad y eficacia del tratamiento en 12 pacientes, pero los resultados aún no se encuentran publicados.

Uno de los problemas que presenta esta molécula es su poca solubilidad que podría comportar una rápida eliminación y reducir su capacidad de distribuirse por los tejidos. Por este motivo se están realizando estudios que combinan las ciclodextrinas (altamente solubles) con el Vorinostat

para crear una molécula con una mayor biodisponibilidad. Este compuesto híbrido permite una mayor vida media del fármaco facilitando su accesibilidad al cerebro y se ha comprobado que frena la progresión de la enfermedad neurológica y reduce la inflamación sistémica en modelos animales [149].

2.9.5 Carbonato de litio (ensayo clínico)

Recientemente, en julio de 2017 se ha abierto un nuevo ensayo clínico en fase 1/2 para comprobar la capacidad protectora del carbonato de litio a nivel cerebral en pacientes con NP-C (identificador: NCT03201627, ver enlaces).

2.9.6 Acetil-DL-leucina

En 2015 se publicó una serie de doce pacientes de enfermedad de NP-C tratados con acetil-DL-leucina (Tanganil®, Pierre Fabre, Castres, Francia), observándose una mejoría en la ataxia que presentaban y en consecuencia una mejora en la calidad de vida de los pacientes [150].

En Francia, lugar de realización del estudio, el tratamiento con acetil-DL-leucina está aprobado para el tratamiento del vértigo desde 1957 pero su mecanismo de acción se desconoce [150].

2.9.7 Terapia génica

Actualmente se están desarrollando estudios con modelos animales y celulares, para probar la eficiencia de la terapia génica utilizando AVV9 como vector. Los resultados muestran una mejoría significativa en los ratones, pero a nivel cerebral el tratamiento es poco eficaz. Para mejorar su eficacia a nivel neurológico se están probando nuevos serotipos del vector, obteniendo resultados prometedores [151].

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



3.1 HIPÓTESIS

La dificultad que plantea el diagnóstico de la enfermedad de Niemann-Pick C induce a la búsqueda de indicadores diagnósticos a tres niveles: técnicas simplificadas de cribado, análisis de los mejores biomarcadores y profundizar en el estudio genético. Estas mejoras permitirían la identificación precoz de pacientes con riesgo de desarrollar daño neurológico irreversible.

3.2 OBJETIVOS

Para dar respuesta a estas necesidades nos planteamos una serie de objetivos distribuidos en dos grandes bloques, un primer apartado en el que se intenta mejorar el cribado y la evaluación de biomarcadores para la enfermedad, y un segundo bloque, de estudio molecular, en el que se pretende mejorar el conocimiento de los genes implicados y de posibles mecanismos reguladores de los mismos.

Los objetivos detallados se presentan a continuación:

3.2.1 BLOQUE 01: Estudios para detectar la enfermedad

3.2.1.1 Desarrollo de nuevos sistemas de cribado para NP-C

Este objetivo pretende desarrollar un nuevo sistema de cribado, simple, rápido y económico para detectar posibles pacientes de enfermedades de depósito lisosomal asociadas a alteraciones en el transporte del colesterol.

3.2.1.2 Mejorar la determinación y valoración combinada de biomarcadores

Este objetivo pretende discernir la constelación de biomarcadores más sensibles y específicos en la enfermedad de Niemann-Pick tipo C. Para ello se ha evaluado la puntuación otorgada en el NPC-SI y se ha comparado con las concentraciones plasmáticas de 7-cetocolesterol y CCL18/PARC y la actividad quitotriosidasa corregida por el genotipo.

3.2.2 BLOQUE 02: Estudio genético de la enfermedad de NP-C

3.2.2.1 Caracterización de los genes *NPC1* y *NPC2* en población española

Las variantes génicas pueden ser diferentes entre poblaciones. El efecto fundador puede provocar una desproporción entre la frecuencia de variantes patogénicas. Además, la identificación de una variante más frecuente entre la población a estudio facilita el diagnóstico de la enfermedad y reduce costes. Por lo tanto, en este apartado nos proponemos conocer la distribución de variantes en los genes *NPC1* y *NPC2* en nuestra población.

3.2.2.2 Asignación de efecto a variantes de significado incierto

Uno de los principales problemas para el diagnóstico de la NP-C es el gran número de variantes sin significado conocido. Cuando estas variantes se combinan entre ellas o con una variante patogénica no podemos afirmar que sean causantes de la enfermedad.

Por este motivo, en este objetivo pretendemos evaluar varias de estas variantes observadas en nuestra población para asignarles un efecto benigno o patogénico.

3.2.2.3 Otros factores que pueden afectar la expresión del gen *NPC1*

Existen otros factores, externos a la secuencia del gen *NPC1* que pueden estar afectando a su expresión y por lo tanto pueden estar implicados en la expresión fenotípica de la NP-C. Pudiendo existir otros genes implicados en el desarrollo de la sintomatología, así como microRNAs que regulen la expresión del gen *NPC1*.

Evaluar caracteres genéticos comunes en los sujetos con sintomatología de la enfermedad y sin una justificación genética para los mismos así como evaluar la presencia de alteraciones en el miR33a podría esclarecer el mecanismo por el que se desarrolla la enfermedad en estos pacientes. .

4 MATERIAL Y MÉTODOS



4.1 MATERIAL

4.1.1 Pacientes

Los sujetos a estudio se han dividido de la siguiente manera en base a los objetivos marcados:

- Objetivo 1: para su realización se ha incluido 121 sujetos incluyendo controles sanos y pacientes con sospecha de NP-C, y DLAL.
- Objetivos 2 ,3 y 4: para su realización se han incluido 180 individuos con sospecha de NP-C, todos ellos se trataban de casos índices.
- Objetivo 5: para su realización se han incluido 11 sujetos, con manifestaciones clínicas de NP-C pero sin un diagnóstico genético concluyente.

Todos los sujetos han sido informados del estudio y se les ha entregado hoja informativa y consentimiento informado para la cesión de las muestras biológicas destinadas a la investigación. En la Unidad de Investigación Traslacional del Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón) en el Hospital Universitario Miguel Servet, se recibe además de la muestra extraída, dicho consentimiento informado firmado. Este fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica de Aragón (CEICA), del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (Zaragoza, España) y la investigación llevada a cabo cumple los principios éticos para la investigación con humanos recogidos en la Declaración de Helsinki (Finlandia, 1964) y sus posteriores modificaciones (Brasil, 2013).

A los pacientes con sospecha clínica de NP-C se les aplicó el índice de sospecha (NPC-SI, ver enlaces), según la versión de 2016[105,106], para la orientación en el diagnóstico de la enfermedad. Este índice otorga un riesgo de padecer NP-C en base a sintomatología visceral, neurológica y psiquiátrica, y como se combinan estos síntomas. Además, tiene en consideración los antecedentes familiares y la edad del paciente, ya que existen dos sistemas para realizar el cálculo en función de si el sujeto es mayor o menor de 4 años.

4.1.2 Material biológico

En el presente trabajo se han utilizado muestras biológicas de los individuos descritos en el apartado 3.1.1 con sospecha de sufrir enfermedad de depósito lisosomal (EDL), principalmente

enfermedad de Niemann Pick tipo C (NP-C) aunque también se han incluido en alguno de los apartados de análisis muestras de déficit de lipasa ácida lisosomal (DLAL), ya sea como controles o por el interés que reportaba trabajar con las diferentes enfermedades simultáneamente.

Todas las muestras de pacientes provienen de excedente de material obtenido para el diagnóstico clínico. Los especímenes biológicos con los que se realiza el proyecto son:

1. Sangre total (10 mL) obtenida por punción venosa recogida en tubo con anticoagulante K2 EDTA.
2. Sangre total (3 mL) obtenida por punción venosa y recogida en tubo TEMPUS, específico para la preservación del RNA.
3. Plasma.
4. DNA procedente de leucocitos.
5. RNA procedente de leucocitos.

4.1.3 Aparatos e instrumentos

La mayor parte del aparataje utilizado para el desarrollo del proyecto se ubica en la Unidad de Investigación Traslacional del Hospital Universitario Miguel Servet, formando parte de las instalaciones el Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón).

A continuación, se indican los instrumentos utilizados para el desarrollo del proyecto, remarcando la ubicación del mismo sólo en aquellos casos en los que varía de la anteriormente citada (Tabla 4.1.1).

FUNCIÓN	NOMBRE	MODELO	MARCA	OBSERVACIONES
Esterilización	Autoclave	80-LRV	Matachana	Material de plástico y disoluciones (120°C, 1 atm, 20 min)
	Estufa de secado	UFP800DW	Memmert	Secado de material a 65°C
Pesado	Balanza analítica	KB 800-2	Kern	
	Balanza de precisión	TP-214	Denver Instruments	
Almacenamiento	Ultracongelador	MDF-U54V	Sanyo	Almacenamiento de muestras -80°C
		MDF-U52VF	Sanyo	
	Frigoríficos	PTE-01-2_z2(E)HC	Pecomark	Almacenamiento general 4°C

FUNCIÓN	NOMBRE	MODELO	MARCA	OBSERVACIONES
		Efficient	Edesa	
		3KEB5611	Balay	
	Congeladores	12.339	Koxka Zaragoza	Almacenamiento general -20°C
		DGN3063	Liebherr	
Material volumétrico	Micropipetas	Finppipette	ThermoScientific	
	Micropipetas multicanal	Corning	Lambda Plus	
Medida de pH	pHmetro	pH25	Crison	
Atemperado	Bloques térmicos	Multiplacas TS-100	Selecta	Atemperación de medios y reacciones
	Estufas	Heraeus	BioSan	
		Series 6000	Thermo	
Centrífugas	Microcentrífugas	24D	Labnet	Procesado de muestras
		L1301-230V	Labnet	
	Temperatura ambiente	5702	Eppendorf	
	Termostatzadas	5810R	Eppendorf	
		Digicen21R	Ortoalresa	Procesado RNA
PCR	Termocicladores	2720	Applied Biosystems	
		Verity® 96	Applied Biosystems	
		Well c1000 Touch	BioRad	
	Real-time PCR*	ViiA7	Applied Biosystems	
		StepOne	Applied	
		Plus	Byosistems	
Secuenciación	Secuenciador capilar*	3500 XL Genetic Analyzer	Applied Biosystems	Secuenciación capilar tipo Sanger
	NGS**	HiSeq 2000	Illumina	Secuenciación exómica
Técnicas fluorimétricas y espectrofotométricas	Lector de microplacas	Sinergy HR	BioTek	Absorbancia
	Nano-drop	Nanodrop 2000c	Applied Biosystems	Calidad DNA/RNA
	Fluorímetro	Qubit™ 3.0	Thermo Fisher Scientific	

FUNCIÓN	NOMBRE	MODELO	MARCA	OBSERVACIONES
		LSD45	PerkinElmer	Fluorescencia
Electroforesis	Cubetas	T-B-Gel	Scie-Plas	
	Fuentes de alimentación	PowerPack HC	BioRad	Muestras DNA/RNA
	Transiluminador	Gbox	Syngene	
Proteómica	Espectrómetro de masas*	4800plus	ABSciex	
		MALDI-TOF / TOF		
Agitadores	Agitador de placas	PMS-1000	Grant-bio	Determinaciones enzimáticas
	Agitador orbital	F200	FALC	DNA
		Bio Vortex	Biosan	
	Vórtex	V1		Procesado de muestras
Cabinas de flujo laminar		7001721	Selecta	
		Titan	ScanLaf	Extracción RNA

Tabla 4.1.1. Aparataje utilizado para el desarrollo del proyecto. *Estos equipos se encuentran ubicados en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA). **Este equipo se encuentra en la empresa Sistemas Genómicos (Valencia, España).

4.1.4 Reactivos

4.1.4.1 Reactivos generales

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico o apto para biología molecular. La mayoría de ellos pertenecían a las casas comerciales Sigma-Aldrich, Merk, Gibco, Panreac® e Invitrogen.

4.1.4.2 Reactivos para estudios moleculares

Los iniciadores para PCR fueron obtenidos de la literatura o diseñados mediante el programa informático Oligo7 a partir de secuencias de referencia de la base de datos NCBI. Fueron validados mediante PrimerBlast 3 y sintetizados por *Integrated DNAes Scientific* (IDT; Leuven, Belgium).

Las secuencias de los iniciadores utilizados para la amplificación de DNA genómico se muestran en la siguiente tabla (Tabla 4.1.2).

Iniciadores para la amplificación del gen <i>CHIT1</i>			
NOMBRE	REGIÓN AMPLIFICADA	SECUENCIA	TAMAÑO FRAGMENTO
D-Ch-Ex10	Exón 10*	5'-AGCTATCTGAAGCAGAAG-3'	75 pb
R-Ch-Ex10		5'-GGAGAAGCCGGCAAAGTC-3'	
Iniciadores para la amplificación del gen <i>NPC1</i>			
NOMBRE	REGIÓN AMPLIFICADA	SECUENCIA	TAMAÑO FRAGMENTO
D-NPC1_Del(1)	Región intergénica	5'- TCATGCCACTAGACTACAACC -3'	7 Kb
R-NPC1_Del(1)	Hasta intrón 01	5'- GCACACTGTCTTCATGACCA -3'	
D-NPC1-Amp01	5'-UTR /	5'-AGAGCGTGGCCGGAGACA-3'	501 pb
R-NPC1-Amp01	Exón 01	5'-GAAGGGCAACACGGGGAC-3'	
D-NPC1-In01	Intrón 01	5'-GCACCAATCGACTCTAGC-3'	902 pb
R-NPC1-In01		5'-ATCCTGCCGAAAGAAGCAAC-3'	
D-NPC1-Amp02	Exón 02*	5'-TGAGTGGGCACTTCTTGTTG-3'	282 pb
R-NPC1-Amp02		5'-CACCTCCACCCTGCAATAAC-3'	
D-NPC1-Amp03	Exón 03*	5'-TGAGGAATGTTGACCTTACTCTAAC-3'	239 pb
R-NPC1-Amp03		5'-GAAAGCTGAGCATTACCAGTTC-3'	
D-NPC1-Amp04	Exón 04*	5'-TTTAAAATCGTTCTTGCTGGC-3'	304 pb
R-NPC1-Amp04		5'-CAATTTGCTCTGCTGCCTG-3'	
D-NPC1-Amp05	Exón 05*	5'-TCTTGCCTCGTGAATTACAGC-3'	302 pb
R-NPC1-Amp05		5'-ACTGTGCCCAGCCAGTTC-3'	
D-NPC1-Amp06	Exón 06*	5'-TTCAGTGGGCTTTTCTTTGAG-3'	411 pb
R-NPC1-Amp06		5'-CAAATGAAAGCTCAAAGTGCC-3'	
D-NPC1-Amp07	Exón 07*	5'-TGGGATTACAGGAATGTCCC-3'	233 pb
R-NPC1-Amp07		5'-GCAACCCCACTGAGGAAAC-3'	
D-NPC1-Amp08	Exón 08*	5'-ACTTTCAGGAACGGCTTGG-3'	494 pb
R-NPC1-Amp08		5'-CATGTAAAAGCCAGCAAACC-3'	

NOMBRE	REGIÓN AMPLIFICADA	SECUENCIA	TAMAÑO FRAGMENTO
D-NPC1-Amp09	Exón 09*	5'- TGACCCTCAGGGCAATG-3'	416 pb
R-NPC1-Amp09		5'- TTTGCTCACCTCTGGGTTATG-3'	
D-NPC1-In09	Intrón 09	5'-GCGTCCTCATAACCCCAAGT-3'	915 pb
R-NPC1-In09		5'-CAAGTCTGTATGCCGGGTA-3'	
D-NPC1-Amp10	Exón 10*	5'- AGGGCCCATGTTGCCTTAG-3'	338 pb
R-NPC1-Amp10		5'- GGTAAGAAATTAACAAAACACTGCC-3'	
D-NPC1-Amp11	Exón 11*	5'- CCCCTGGTATGTGTCTAATTTTC-3'	229 pb
R-NPC1-Amp11		5'- AAGTGTCTAGCTTCCCACAATG-3'	
D-NPC1-Amp12	Exón 12*	5'- AAAACGTGGCCTTTGTATCG-3'	448 pb
R-NPC1-Amp12		5'- GAAAATAGATGTAGGCAACAGAAAC-3'	
D-NPC1-Amp13	Exón 13*	5'- AAGTGGGACAGACAACCCTG-3'	305 pb
R-NPC1-Amp13		5'- CAGGAGCCATTCACAGTCC-3'	
D-NPC1-Amp14	Exón 14*	5'- ACACAAGGCAGCAAGAAATG-3'	250 pb
R-NPC1-Amp14		5'- AGCTCCTCTTTCTCCAGGC-3'	
D-NPC1-Amp15	Exón 15 /	5'- CATGAACATAAGACCTGCAGAGAG-3'	504 pb
R-NPC1-Amp15	Exón 16*	5'- TCTTAGAAGGCATGTGATAATCTG-3'	
D-NPC1-Amp16	Exón 17*	5'- TGCTTAAGATTTTATTCTGGTCG-3'	264 pb
R-NPC1-Amp16		5'- AGCAGGCACCTTGCTTGAAC-3'	
D-NPC1-Amp17	Exón 18*	5'- GATCCTCGCCTTGCTTAGTTAC-3'	319 pb
R-NPC1-Amp17		5'- GACTGCCTGGCTGAGAGC-3'	
D-NPC1-Amp18	Exón 19*	5'- TGAAACTAAAGACTTCTCCCTG-3'	272 pb
R-NPC1-Amp18		5'- CAAATAGGTATAAACTGAGGCACG-3'	
D-NPC1-Amp19	Exón 20*	5'- AAGAAAGTAATGCCCCTCACTG-3'	319 pb
R-NPC1-Amp19		5'- CCATGCAACTGTCTTAGCCC-3'	
D-NPC1-Amp20	Exón 21*	5'- TTTGCTTAGCCTCAAGTGCTC-3'	339 pb
R-NPC1-Amp20		5'- ACCCAGTGTAGGCCCTTTG-3'	
D-NPC1-Amp21	Exón 22*	5'- GTGACAGGATGAACACGCAG-3'	370 pb
R-NPC1-Amp21		5'- TCTAAGACAGCCAATTCCCC-3'	
D-NPC1-Amp22	Exón 23*	5'- TGCCTAGGGTCTTCAACAGG-3'	226 pb
R-NPC1-Amp22		5'- GAGGAGGATTACTTTGTGGTGC-3'	
D-NPC1-Amp23	Exón 24*	5'- CTTGAACCTGGGAGAAATCC-3'	321 pb
R-NPC1-Amp23		5'- TCAGGATAGAATTCCTTTTCAG-3'	
D-NPC1-Amp24	Exón 25 /	5'- TATGCCAGCCAAGTCTC-3'	202 pb
R-NPC1-Amp24	3'-UTR*	5'- AGTGGTAAACCGACCGACC-3'	

Iniciadores para la amplificación del gen *NPC2*

NOMBRE	REGIÓN AMPLIFICADA	SECUENCIA	TAMAÑO FRAGMENTO
D-NPC2-Amp01	5'-UTR / Exón 01*	5'- ACAGGTTTGTCTTGACCG-3'	229 pb
R-NPC2-Amp01		5'- AGCCCCAGGGGTCTCAG-3'	
D-NPC2-Amp02	Exón 02*	5'- GCCTAGCTGGCTTATTTCTCC-3'	247 pb
R-NPC2-Amp02		5'- TCCATCCCATGCTTATTC-3'	
NOMBRE	REGIÓN AMPLIFICADA	SECUENCIA	TAMAÑO FRAGMENTO
D-NPC2-Amp03	Exón 03*	5'- GACCCTAGGAATGCTGTTGC-3'	359 pb
R-NPC2-Amp03		5'- CCCATCTCTGCTTCTTGCC-3'	
D-NPC2-Amp04	Exón 04*	5'- CCAATTATGGATAGAAAGTCAGGTC-3'	193 pb
R-NPC2-Amp04		5'- TTTCTCCTCCACTTTCTTCCC-3'	
D-NPC2-Amp05	Exón 05	5'- CTTGCCCTAGGGTTATTGCC-3'	153 pb
R--NPC2-Amp05	/ 3'-UTR*	5'- GGTGCTGTCAAGAGTCTCAGC-3'	

Iniciadores para la amplificación del *microRNA33a*

NOMBRE	REGIÓN AMPLIFICADA	SECUENCIA	TAMAÑO FRAGMENTO
D-primi33a	Intrón 16 <i>SREBP2</i>	5'-AGGTGGACTCCTTTTTCATCCCTT-3'	654 pb
R-primi33a		5'-TGCCCAGGTCCACTGACAATACTA-3'	

Iniciadores para la amplificación de *SMPD1*

NOMBRE	REGIÓN AMPLIFICADA	SECUENCIA	TAMAÑO FRAGMENTO
D-SMPD1_E03	Exón 03	5'-TGGGGAAGATGCATGTATGCTTTTACCCT -3'	718 pb
R-SMPD1_E03		5'-GATGCCCTCTTCTCCAACCTGTTCTAGTG -3'	
D-SMPD1_E06	Exón06 /	5'-CTACCGCCTGGCACAACCTGGTATA-3'	688 pb
R_SMPD1_E06	3'-UTR	5'- AGATCTCCTTGCCCTGCTTGCCCT-3'	

Iniciadores para la amplificación de *ANK1*

NOMBRE	REGIÓN AMPLIFICADA	SECUENCIA	TAMAÑO FRAGMENTO
D-ANK1	Exón 39	5'-GCCCCAGTGTGGACCAT-3'	762 pb
R-ANK1		5'-AGAGAAACGGAAGCACCACC-3'	

Iniciadores para la amplificación de *SPG7*

NOMBRE	REGIÓN AMPLIFICADA	SECUENCIA	TAMAÑO FRAGMENTO
D-SPG7	Exón 11	5'-AGCCTAGCCAACCTTTCGAAA-3'	??? pb
R-SPG7		5'-CCACACAGCAGGAAAAGCATC-3'	

Iniciadores para la amplificación de *POLG*

NOMBRE	REGIÓN AMPLIFICADA	SECUENCIA	TAMAÑO FRAGMENTO
D-POLG	Exón 13	5'-TCATTTCCAGCTGATGACGAC-3'	Pb
R-POLG		5'-GCTCCCTGCATAATAACAAATCGG-3'	

Tabla 4.1.2. Iniciadores utilizados para la amplificación de DNA. * Iniciadores no diseñados para el proyecto. Se ha obtenido de publicaciones previas ajenas al grupo.

Las secuencias de los iniciadores utilizados para la amplificación de cDNA se muestran en la siguiente tabla (Tabla 4.1.3).

Iniciadores para la amplificación del cDNA de *β -Actina*

NOMBRE	REGIÓN AMPLIFICADA	SECUENCIA	TAMAÑO FRAGMENTO
D-Actina	Exones 04-06	5'- ACACTGTGCCATCTACGAGG -3'	621pb
R-Actina		5'- AGGGGCCGGACTCGTCATACT -3'	

Iniciadores para la amplificación del cDNA de *NPC1*

NOMBRE	REGIÓN AMPLIFICADA	SECUENCIA	TAMAÑO FRAGMENTO
D-cNPC1-A01	Exones 01-06	5'-AGGTGGACTCCTTTTCATCCCTT-3'	716 pb
R-cNPC1-A01		5'-CACAGACAATAGAGCAGTCTTGGA-3'	
D-cNPC1-A02	Exones 06-09	5'-CAAAGGCTGTGACGAGTCT-3'	769 pb
R-cNPC1-A02		5'-GTGCAGTTCGTGTATACGG-3'	
D-cNPC1-A03	Exones 08-12	5'-CCCTTTGGACTCCGCTTGAC-3'	793 pb
R-cNPC1-A03		5'-CCAGGAACGGGATGACTCAATCAC-3'	

NOMBRE	REGIÓN AMPLIFICADA	SECUENCIA	TAMAÑO FRAGMENTO
D-cNPC1-A04	Exones 11-16	5'-TGACAGTGATGTCTTCACCGTTGTA-3'	745 pb
R-cNPC1-A04		5'-CGAAAGAGACTGATCCAATCCAAT-3'	
D-cNPC1-A05	Exones 15-21	5'-CTGCTAAAGGACTGGTATGAGACCAA-3'	798 pb
R-cNPC1-A05		5'-GATGGTCAGGTACTGTTCTAGAAAG-3'	
D-cNPC1-A06	Exones 20-25	-CAGTGCCTACCGAGTATTTCTTACAGTGT-3'	595 pb
R-cNPC1-A06		5'-CCTTTGTATCGCTCTTCAGTGGCACAACCTT-3	

Iniciadores para la amplificación del cDNA de *NPC2*

NOMBRE	REGIÓN AMPLIFICADA	SECUENCIA	TAMAÑO FRAGMENTO
D-cNPC2-A00	Exones 1-5	5'GTTTCCTGGCAGCTACATTCT-3'	798 pb
R-cNPC2-A00		5'GAGATGAGAAACGATCTGTACTGGG-3'	

Tabla 4.1.3. Iniciadores para la amplificación de cDNA.

La Taq polimerasa utilizada para la reacción de PCR fue BioTools DNA Polymerase (BioTools, Madrid) proporcionada junto a una solución de MgCl₂ 50 mM y una solución tamponadora (Tris HCl 750 mM, KCl 500 mM y (NH₄)₂SO₄ 200 mM).

Los oligonucleótidos y las sondas TaqMan utilizadas para qRT-PCR fueron diseñados y sintetizados por Applied Biosystems (California, USA; Tabla 4.1.4).

Iniciadores para la cuantificación de la expresión del gen *NPC1*

NOMBRE	REGIÓN AMPLIFICADA	REFERENCIA	FLUORÓGENO
NPC1_E09	Exones 09-10	Hs00264835_m1	FAM
GADPH	Exón 08	Hs02786624_g1	VIC

Tabla 4.1.4. Iniciadores utilizados para la cuantificación de la expresión del gen *NPC1*.

4.1.4.3 Kits comerciales

NOMBRE	UTILIDAD	CASA COMERCIAL
BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit	Reacción de secuenciación	Applied Biosystems
Cholesterol Farb-Test colorimetric method	Cuantificación de concentración de colesterol	Boehringer Mannheim
DuoSet Human CCL18/PARC	Cuantificación de la concentración de la quimiocina CCL18/PARC	Vitro
ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent	Purificación de fragmentos amplificados por PCR	BioTools
High Capacity cDNA reverse transcription	Retro-transcripción	Applied Biosystems
Microcon® 30	Purificación de DNA	Millipore
Nucleon BACC3	Extracción de DNA	GE Healthcare
PowerUp™ SYBR® Green Master Mix	PCR cuantitativa	Applied Biosystems
Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit	Medición de la concentración de DNA	Invitrogen™
TaqMan Multiplex Master Mix	PCR cuantitativa	Applied Biosystems
Tempus™ Spin	Extracción de RNA	Thermo Fisher Scientific

Tabla 4.1.5. Kits utilizados para el desarrollo del proyecto.

4.2 MÉTODOS

Los métodos utilizados en cada una de las publicaciones asociadas a este trabajo se presentan a continuación (Tabla 4.2.6).

MÉTODO	PUBLICACIÓN
Separación de extractos	Neurología 2017*,
Determinación de biomarcadores plasmáticos	Neurología 2017*, Clinica Chimica Acta 2018**
Test de resistencia osmótica eritrocitaria	Clinica Chimica Acta 2018**
Cuantificación de colesterol en membrana eritrocitaria	Clinica Chimica Acta 2018**
Análisis molecular del gen <i>CHIT1</i>	Neurología 2017*, Clinica Chimica Acta 2018**
Análisis molecular de los genes <i>NPC1</i> y <i>NPC2</i>	Neurología 2017*, Clinica Chimica Acta 2018**
Análisis de variantes genéticas	European Journal of Medical Genetics 2018*** (en revisión)
Análisis molecular de la transcripción de <i>NPC1</i> y <i>NPC2</i>	Neurología 2017*,
Cuantificación de la expresión del gen <i>NPC1</i>	
Análisis de exomas	
Análisis molecular del <i>pri-miR-33a</i> .	

Tabla 4.2.1. Publicaciones asociadas a los métodos descritos. * Nueva variante asociada a enfermedad de Niemann-Pick tipo C: manifestaciones neurológicas y caracterización bioquímica, molecular y celular. López de Frutos L, Romero-Imbroda J, Rodríguez-Sureda V, Giraldo P. Neurología 2017. **The erythrocyte osmotic resistance test as screening tool for cholesterol-related lysosomal storage diseases. López de Frutos L, Cebolla JJ, Irún P, Köhler R, Giraldo P. Clinica Chimica Acta 2018. *** Web-based bioinformatics predictors: Recommendations to assess lysosomal cholesterol trafficking diseases related genes. López de Frutos L, Cebolla JJ, Irún P, Köhler R, Giraldo P. European Journal of Medical Genetics 2018.

A continuación, se describe cada técnica con mayor detalle de lo realizado en las publicaciones.

4.2.1 Separación de extractos

A partir del tubo de sangre total anticoagulado con K2 EDTA se obtuvo una fracción de plasma, DNA genómico y un extracto del colesterol embebido en la membrana eritrocitaria.

4.2.1.1 Separación plasmática

Reactivos:

- Butil hidroxitolueno (BHT)
- NaCl 0,9% (v/v)

Procedimiento:

Mediante la centrifugación de los tubos K2 EDTA a 2.000 g durante 15 minutos en una centrífuga no refrigerada se consiguió la separación de tres fracciones, la fracción superior formada por el plasma se dividió en 4 alícuotas, a una de las cuales se añadió un 1% de BHT como antioxidante. Las cuatro alícuotas fueron conservadas a -20°C hasta su utilización.

Para evitar la alteración de los elementos formes, el volumen de plasma recuperado de cada tubo fue sustituido por solución salina, NaCl al 0,9% (p/v).

4.2.1.2 Extracción de colesterol total de la membrana eritrocitaria

Reactivos:

- Agua destilada
- Tritón 100x
- Butil hidroxitolueno (BHT)

Procedimiento:

El colesterol contenido en los eritrocitos se obtuvo a partir de 150 µL de sangre total obtenida en tubos K2 EDTA.

Para ello se centrifugaron las muestras a 2.000 g durante 15 minutos para separar las tres fases, eliminando mediante aspiración al vacío los dos superiores (plasma y leucocitos). A continuación, se lisaron los eritrocitos mediante una solución hipotónica (agua destilada). La fracción de colesterol se aisló mediante modificaciones del método Bordier [152,153] para ello se realizó una primera incubación con Tritón 100x durante 10 minutos a 4°C y otra de 5 minutos a 37°C, seguida de una centrifugación de las muestras para recuperar el sobrenadante repetir el procedimiento con Tritón 100x al 80%.

El sobrenadante final se recuperó y se conservó a -20°C hasta su uso, conservada con butil hidroxitolueno (BHT) para evitar la oxidación de la muestra.

4.2.1.3 Obtención de DNA genómico

4.2.1.3.1 A partir de sangre total

Reactivos:

- Nucleon BACC3
- Perclorato sódico
- Cloroformo
- Etanol absoluto
- Etanol 70% (v/v)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- Tris aminometano

Procedimiento:

El DNA genómico se obtuvo a partir de sangre total extraída por punción venosa y recogida en un tubo con anticoagulante EDTA. La extracción del DNA se realizó mediante el kit comercial Nucleon BACC3 siguiendo las instrucciones del mismo, que constan de tres pasos.

En el primer paso se realizó la lisis celular, mediante la mezcla de 7,5 mL de sangre total y 42 mL de reactivo A diluido, tras agitar durante 10 minutos en un agitador orbital se centrifugó a 1.500 g durante 5 minutos, para poder eliminar el sobrenadante. El reactivo A presenta una elevada concentración de azúcares, por lo que es importante realizar este paso en una zona esterilizada. Tras la centrifugación se añadieron 2 mL de reactivo B y se agitó mediante vórtex para terminar la lisis celular.

El segundo paso fue la eliminación de proteínas mediante la adición de 500 µL de perclorato sódico, una suave agitación y la adición de 2 mL de cloroformo para homogeneizar nuevamente la muestra. Se dejó reposar hasta la aparición de dos fases, tras la cual se añadieron 300 µL de la resina proporcionada por el kit comercial y se centrifugó a 1.300 g durante 3 minutos.

La fase inferior correspondía a la fase orgánica en la que quedan las proteínas, por lo que fue la fase superior, que contiene el DNA, la que se recuperó. El DNA se precipitó mediante la adición de etanol absoluto frío, la solución fue homogeneizada por inversión hasta que se observó la formación de hebras de DNA que se pudieron separar del solvente. Este DNA fue lavado en una solución de etanol al 70% y se conservó diluido en 300 μ L de Tris-EDTA 1x.

El producto final se dejó en agitación durante 24 horas para su total disolución y se conservó a -20°C hasta su uso.

4.2.1.3.2 A partir de gota de sangre seca

Reactivos:

- Agua destilada
- Hidróxido de sodio 0,1N
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- Tris aminometano
- Ácido clorhídrico

Procedimiento:

El DNA fue extraído a partir de sangre total depositada en una tarjeta de papel de filtro Whatman, tras dejarla secar un mínimo de 4 horas y conservándola a -20°C junto con un desecante hasta su uso.

De la tarjeta se obtuvo una muestra de 3 mm de diámetro que se incubó tres veces con 300 μ L de agua durante 10 minutos, con intención de eliminar el máximo de hematíes. Tras los lavados se realizó otra incubación de 5 minutos con 35 μ L una solución 0,1 N de hidróxido de sodio y 0,3 mM de EDTA con un pH final de 13. Tras esta, se adicionaron 65 μ L de una solución tampón a pH 7 (0,1 M de Tris- HCl) y se dejó reposar 10 minutos.

Finalmente se realizó una centrifugación a 10.000 rpm durante 30 segundos y el sobrenadante fue recogido y conservado a -20°C hasta su uso.

4.2.1.3.3 Determinación de calidad y pureza

La calidad, pureza y concentración del DNA obtenido fue realizada principalmente mediante medición por espectrofotometría en un Nanodrop 2000c.

Los ácidos nucleicos, a causa de su estructura formada por bases nitrogenadas aromáticas, absorben radiación a una longitud de onda (λ) de 260 nm. Las proteínas al presentar aminoácidos aromáticos la absorben a una λ de 280 nm.

Por este motivo mediante la medición de la absorbancia a 260 nm se puede cuantificar el DNA presente en una muestra y la ratio 260/280 nos proporciona información sobre la pureza de la misma, considerándose correcta cuando los valores son cercanos a 1,8. Valores inferiores son indicativos de que la muestra se encuentra contaminada con proteínas.

Un subgrupo de muestras además fue valorado por un método fluorométrico mediante Qubit™. Para realizar la medición se preparó una dilución del reactivo de reacción con un tampón proporcionado por la casa comercial, mezclados en proporción 10:200 con unos estándares también proporcionados, y en proporción 1:200 con las muestras a estudio. Tras una incubación de 2 minutos se analizaron los estándares en el fotómetro para realizar la calibración del mismo, y posteriormente se analizaron las muestras.

4.2.1.4 Obtención de RNA leucocitario

Reactivos:

- Tempus Spin RNA Isolation Reagent Kit
- Absolute RNA wash solution

Procedimiento:

El RNA proveniente de leucocitos se obtuvo a partir de 3 mL de sangre total extraída mediante punción venosa en tubos TEMPUS. Estos tubos contienen un agente estabilizador del RNA que permite una mayor conservación de la muestra.

La extracción fue realizada mediante el kit comercial Tempus Spin RNA Isolation Reagent Kit. Tras mezclar los 9 mL contenidos en el tubo TEMPUS (3 de sangre y 6 de agente estabilizador) y

3 mL de PBS se agitó vigorosamente en el vórtex, para a continuación centrifugar la mezcla a 3000 g durante 30 minutos a una temperatura de 4°C.

El sobrenadante fue eliminado cuidadosamente y se eliminaron los restos de líquido mediante inversión, dejando el tubo abierto y boca abajo durante un par de minutos. El precipitado fue resuspendido en 400 µL de solución de resuspensión de RNA, agitado vigorosamente y mantenido en hielo hasta su uso.

Se preparó la columna de extracción dentro de un tubo de recogida y se humedeció su membrana con 100 µL de solución de lavado número 1. Añadimos el RNA resuspendido en el paso anterior y se centrifugó a 16.000 g durante 30 segundos, para desechar el contenido del tubo de recogida y añadimos otros 500 µL de la solución de lavado número 1 sobre la membrana para volver a centrifugar en las mismas condiciones. Nuevamente se desechó el eluido y añadimos 500 µL de la solución de lavado número 2 para repetir la centrifugación, pero esta vez a 16000 g durante 1 minuto.

En el siguiente paso consistió en eliminar los restos de DNA genómico que conservaba el resuspendido inicial, para ello se realizó un tratamiento con DNAsas, añadiendo 100 µL de una solución de lavado absoluta (*Absolute RNA wash solution*) y dejando incubar 15 minutos. Una vez transcurridos se añadieron 500 µL de la solución de lavado número 2 e incubamos 5 minutos más, para a continuación centrifugar a 16.000 g durante 30 segundos. Eliminamos el eluido y repetimos este último lavado, finalmente se centrifugó la columna sin añadir solución alguna durante otros 30 segundos para secar totalmente la membrana.

Cambiamos el tubo de recuperación por uno limpio, ya que el siguiente paso consistía en recuperar el RNA adherido a la membrana de la columna de extracción. Para ello se añadieron 100 µL de la solución de elución y realizamos una incubación de 2 minutos a 70°C para a continuación centrifugar a 16000 g durante 30 segundos. Finalmente recuperamos el eluido y lo depositamos nuevamente en la columna, volviendo a centrifugarlo a 16.000 g durante 2 minutos, de forma que recuperamos todo el RNA remanente en la columna.

Recuperaremos 10 µL del eluido para medir la concentración de la muestra y el resto se dividió en alícuotas de 15 µL a una concentración de 100 ng/µL cada una. Estas fueron conservadas a -80°C hasta su uso.

4.2.1.4.1 Determinación de calidad y pureza

La calidad, pureza y concentración del RNA obtenido se determinó mediante medición por espectrofotometría en un Nanodrop 2000c.

Como consecuencia de la diferencia entre el uracilo y la timina los valores de absorbancia varían ligeramente respecto al DNA, por ese motivo la ratio 260/280 se encuentra un poco elevada, considerándose que la muestra tiene una pureza suficiente cuando se obtienen valores entre 2 y 2,2.

4.2.1.4.2 Determinación de la integridad del RNA

Reactivos:

- Agarosa
- Bromuro de etidio
- Azul de bromofenol
- Marcador de DNA de bajo peso molecular
- TAE 1x:
 - Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
 - Tris aminometano
 - Ácido acético

Procedimiento:

La integridad del RNA se valoró en un gel de agarosa al 1% con un 0,1% de bromuro de etidio, en el que se analizaron 500 ng de RNA mezclados con 2 μ L de azul de bromofenol como tampón de carga. Utilizando un marcador de DNA de bajo peso molecular se comprobó la migración de las bandas. La electroforesis fue realizada en tampón TAE 1x a 90V durante 30 minutos y visualizada en el transiluminador, para verificar los parámetros de calidad.

Si el RNA extraído se encontraba en un estado de conservación correcto se observaban únicamente dos bandas con pesos moleculares de 4,5 y 1,9 kb. El barrido observado entre 12 y 0,5 kb correspondía a los fragmentos de mRNA presentes en la muestra.

4.2.2 Determinación de biomarcadores plasmáticos

4.2.2.1 Determinación de actividad quitotriosidasa

La actividad de la enzima quitotriosidasa se determinó a partir de la fracción de plasma aislada según se detalla en el apartado 4.2.1.1.

Reactivos:

- 4-metilumbeliferil- β -D-N-N'-N''-triacetilquitotriósido
- Ácido cítrico 0,1 M
- Hidrogeno fosfato de sodio 0,2 M
- Glicina 0,3 M
- Agua destilada

Procedimiento:

Se prepararon dos tubos por muestra a analizar con 200 μ L del sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-N-N'-N''-triacetilquitotriósido. A cada tubo se añadieron 5 μ L de plasma, dejando un intervalo de tiempo fijo entre cada muestra, para que la incubación fuera homogénea. Tras 15 minutos de incubación a 37°C (este tiempo se cumplió para cada muestra en función del intervalo establecido para la adición del plasma), se detuvo la reacción adicionando 2 mL de glicina 0,3 M.

La determinación de fluorescencia se realizó mediante un fluorímetro en cubeta de cuarzo a una λ de excitación de 366 nm y una λ de emisión de 446 nm. Para la lectura se utilizó un atenuador al 1%. La actividad de quitotriosida (nmol/mL/h) se obtuvo de extrapolar los valores de fluorescencia frente a una recta de calibrado realizada a concentraciones conocidas de 4-metilumbeliferona. Como control de calidad se estableció que los duplicados con una diferencia mayor al 10% debían repetirse.

4.2.2.2 Determinación de la quimiocina CCL18/PARC

El ligando de quimiocina CC 18 (CCL18), se determina a partir de la fracción de plasma aislado según el procedimiento explicado anteriormente.

Reactivos:

- DuoSet Human CCL18/PARC
- PBS
- Tween 20
- Agua destilada
- Albúmica sérica bovina
- Solución de parada (ZEU-InmunoTek)
- Solución cromogénica (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; ZEU-InmunoTek)

Procedimiento:

La medida fue realizada mediante un experimento tipo ELISA, trabajando en placa de 96 pocillos y montando cada determinación por duplicado. Para cada muestra se realizó la determinación a dos concentraciones de plasma (realizando la dilución en solución de bloqueo).

En cada pocillo fueron añadidos 100 μL de anticuerpo de captura a concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se cubrió la placa con aluminio para preservar la oscuridad y se dejó incubar toda la noche a temperatura ambiente para que el anticuerpo se uniera a la superficie de la placa. En la mañana siguiente se realizaron tres lavados con 400 μL de solución de lavado (PBS y Tween 20 diluido en agua destilada) y se eliminó el exceso de la misma golpeando la placa sobre una superficie limpia. A continuación, las zonas de pocillo que no habían unido anticuerpo fueron bloqueadas mediante la adición de 300 μL de solución de bloqueo para evitar futuras uniones inespecíficas, y se dejó incubar durante 1 hora con agitación continua. Transcurrido este tiempo se realizaron otros tres lavados con 400 μL de la solución de lavado, utilizando el mismo método de secado que anteriormente.

A cada pocillo se le añadieron 100 μL de la dilución de muestra correspondiente o de standard (este último fue utilizado para realizar una recta de calibrado en la que se extrapolaron los resultados de las muestras a estudio), se tapó la placa y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación continua. Se realizaron otros tres lavados con 400 μL de la solución de lavado utilizando el mismo método de secado.

A continuación, se añadieron 100 μL del anticuerpo de detección en cada pocillo y se incubó otras 2 horas en las mismas condiciones (temperatura ambiente y agitación continua), se

repetieron los lavados y se añadieron 100 μL de una mezcla de Streptavidina-HRP. Nuevamente se cubrió la placa y se incubó 20 minutos en agitación continua para seguidamente, realizar otros 3 lavados. Finalmente añadimos 100 μL de la solución cromogénica (TMB) e incubamos en la oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente y con agitación continua, tras esta incubación se añadieron 50 μL de solución de parada y se agitó durante 5 minutos para asegurar que la reacción sea uniforme.

La medida de absorbancia fue realizada en el espectrofluorímetro de placas Sinergy HT (BioTek Instruments), a una λ de 450 nm, y se extrapolaron los resultados de las muestras a partir de las determinaciones obtenidas en la recta de calibrado realizada con los estándares.

Si la recta de calibrado difiere más de un 10% de la realizada en el experimento anterior, el experimento fue considerado no válido. Cuando diferencia con el valor obtenido en el experimento anterior en las muestras control fue superior a un 20% tampoco se aceptaron los resultados y el experimento fue repetido.

4.2.2.3 Determinación de la concentración 7-cetocolesterol

La concentración del oxisterol 7-cetocolesterol se evalúa a partir del extracto plasmático recogido con BHT a partir del procedimiento indicado en el apartado 4.2.1.1.- Separación plasmática.

Reactivos:

- Estándar interno: 7-Cetocolesterol con 7 deuterios (d7-7CC)
- Estándar externo: 7-Cetocolesterol
- Metanol
- Agua destilada

Procedimiento:

La medida fue realizada mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas. En el laboratorio se prepararon los estándares y las muestras a analizar, y se enviaron al Servicio de Proteómica del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud para su procesamiento.

Todas las reacciones fueron preparadas en viales de vidrio.

Se preparó un estándar interno a concentración 0,05 ppm utilizando metanol como diluyente. Para realizar la recta patrón en la que se extrapolaron los resultados se realizaron 11 diluciones seriadas de 7-CC utilizando agua como diluyente, y se añadió una concentración conocida y constante del estándar interno.

Las muestras que analizar fueron descongeladas a 4°C, tras este proceso se agitaron vigorosamente y se centrifugaron ligeramente para ver si existía precipitado de la fracción proteica. A partir de este momento se trabajó con las muestras en hielo para dificultar la evaporación del metanol con el que se trabaja.

Se preparó una mezcla de 25 µL de muestra (procurando no incluir en estos el precipitado formado anteriormente) con 100 µL de metanol con d7-7CC. La mezcla se agitó vigorosamente durante 5-10 segundos para mezclar bien las dos fases, y posteriormente se centrifugó a 13.300 g durante 5 minutos a temperatura ambiente para separarlas, de forma que obtuvimos una fase inferior formada por el precipitado de proteínas, y una fase superior que contenía la fracción apolar de la muestra (los esteroides).

De esta fase superior se aspiraron 100 µL y se traspasaron a microviales con tapón septum de silicona y se trasladaron al Servicio de Proteómica para su procesamiento mediante HPLC y fragmentación iónica para el análisis en el espectrómetro de masas.

4.2.3 Test de resistencia osmótica eritrocitaria

Reactivos:

- Solución salina 0,9% (v/v)
- Agua destilada

Procedimiento:

Para realizar el test de resistencia osmótica eritrocitaria (ROE) se prepararon diluciones de cloruro sódico desde concentración 0% a 0,9% con un intervalo de 0,1% entre ellas, y a concentración de 0,41% a 0,55% con un intervalo de 0,01%.

Se añadieron 495 µL de cada una de las soluciones en un tubo eppendorf de 1,5 mL y se mezclaron con 5 µL de sangre total obtenida mediante punción venosa en un tubo con

anticoagulante EDTA. Se agitó enérgicamente para homogeneizar totalmente la solución y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente, para seguidamente, centrifugar las muestras brevemente a 2.000 rpm durante 5 minutos para precipitar los restos celulares y que no interfirieran en la lectura.

Un volumen de 150 μL fue añadido a una placa de 96 pocillos, para analizar la reacción, preparando pocillos duplicados para cada muestra. La absorbancia de la hemoglobina fue medida mediante el espectofluorímetro Sinergy HT a una λ de 540 nm.

El valor de fluorescencia obtenido fue corregido restando el obtenido a una concentración salina del 0,9% ya que en una solución isotónica el porcentaje de hemólisis osmótica debería ser del 0. Se calculó el porcentaje de hemólisis sufrido en cada reacción considerando que la hemólisis en una solución al 0% de solución salina debe ser del 100%. De este modo, al normalizar las muestras frente a sí mismas, se evitó que las variaciones entre muestras pudieran deberse a la composición de las mismas (recuento eritrocitario, concentración de hemoglobina...).

4.2.4 Cuantificación de la concentración del colesterol contenido en la membrana eritrocitaria

Reactivos:

- Cholesterol Farb-Test colorimetric method
- Isopropanol

Procedimiento:

La determinación del colesterol se analizó en la fracción de lipídica recuperada de la membrana eritrocitaria. El método utilizado consistió en una medida colorimétrica realizada a partir de un kit comercial proporcionado por casa Boehringer Mannheim (Ingelheim, Germany).

Junto con la muestra se prepararon un blanco y tres determinaciones a concentración conocida de colesterol (1 mg/mL, 0,6 $\mu\text{g/mL}$ y 0,2 $\mu\text{g/mL}$) como control de la técnica. Todas las muestras fueron procesadas por duplicado.

Los tubos utilizados fueron de vidrio ya que el colesterol se adhiere al plástico y los resultados podían verse alterados. Las muestras fueron diluidas en isopropanol en una proporción 1:10. El

reactivo necesario fue preparado mezclando 3/5 partes de solución 1 con 2/5 partes de solución 2 (proporcionadas por el kit) obteniendo un volumen final de 600 µL por muestra.

De la mezcla de soluciones 260 µL fueron añadidos a un vial de vidrio, al que también se añadieron 24 µL de la dilución de la muestra y 2,6 µL de solución 3. Tras una homogeneización vigorosa, se taparon los viales y se incubó durante 1 hora a 37°C. Transcurrido ese tiempo la reacción fue detenida mediante una incubación de 1 hora a temperatura ambiente.

Se transfirieron 100 µL de reacción a una placa de 96 pocillos, y el resultado se analizó por triplicado, midiendo la absorbancia mediante el espectrofluorímetro Sinergy HT a una λ de 450 nm.

Las medidas obtenidas fueron rectificadas respecto a la medida del blanco y se hicieron las medias de las determinaciones realizadas para cada muestra. La transformación de fluorescencia a concentración de colesterol fue realizada siguiendo la ecuación:

$$\left(\frac{V * MW * df}{\epsilon * d * v * 1000} \right) * \Delta A$$

Siendo V el volumen final de la reacción (0,675 mL), MW el peso molecular del colesterol (384,64 g/mol), df la dilución aplicada a la muestra durante la reacción (no incluye la dilución previa de la misma), ϵ corresponde al coeficiente de extinción del colorante lutidina a una λ de 450 nm (7,4 l/mmol/cm), d al recorrido de la luz calculado en base al volumen de la lectura (0,252 mL), v el volumen de muestra en el que se realiza la lectura (0,05 mL) y ΔA la absorbancia corregida de la muestra.

La concentración de colesterol obtenida fue multiplicada por 10 para rectificar la dilución inicial de la muestra.

Si la concentración calculada para los controles difería más de un 20% de la esperada el ensayo se consideraba no valido, además si la diferencia entre las dos réplicas de cada muestra superaba el 10% también se repetía.

4.2.5 Análisis molecular del gen *CHIT1*

Reactivos:

- Agua destilada libre de DNAsas y RNAsas
- Buffer de reacción
- $MgCl_2$
- Iniciadores
- Enzima Taq polimerasa
- Agarosa
- Bromuro de etidio
- Azul de bromofenol
- Marcador de pesos moleculares
- TAE (Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) + Tris aminometano + Ácido acético)

Procedimiento:

Fue necesario determinar la presencia/ausencia de una duplicación de 24 pares de bases en el gen *CHIT1* que codifica para la quitotriosidasa ya que la presencia de la misma provoca la síntesis de una proteína no funcional y por lo tanto esos sujetos tienen valores de actividad de 0 nmol/mL/hora, no siendo esta determinación útil para el diagnóstico y el seguimiento en estos pacientes.

El análisis de esta variante se realizó por amplificación de un fragmento del exón 10 del gen, utilizándose para el diseño de los iniciadores la secuencia génica con referencia NG_012867.1 de la base de datos Gene del Centro Nacional de Información Bioinformática (NCBI) americano (ver enlaces). Los iniciadores utilizados fueron publicados por Boot R et al en 1998 [154]. La amplificación se realizó en tubos de 0,2 mL en los que se añadió la polimerasa termoestable, el DNA a estudio, un tampón y $MgCl_2$, además de los iniciadores y los nucleótidos (dNTPs). Los volúmenes y concentraciones finales de la reacción se especifican en la tabla 4.2.2.

REACTIVO	VOLUMEN (μL)	Concentración final
ddH ₂ O estéril	12,6	
Tampón (10x)	2	1 x
dNTPs (2 mM)	2	200 nM
DNA (100 ng/ μL)	2	10 ng
MgCl ₂ (50 mM)	0,5	1,25 μM
Iniciador directo (10 μM)	0,4	200 nM
Iniciador reverso (10 μM)	0,4	200 nM
Taq Polimerasa 5 U/ μL	0,1	0,5 U/ μL

Tabla 4.2.2. Cantidades y concentraciones finales para las amplificaciones por PCR del gen *CHIT1*.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador 2720[®]. El programa térmico consistió en una desnaturalización de 2 minutos a 95°C, 32 ciclos de desnaturalización durante 20 segundos a 95°C, hibridación durante 40 segundos a 50°C y elongación de 30 segundos a 72°C, para terminar con una elongación de 5 minutos a 72°C y una reducción a 4°C para mantener el producto hasta que se recoja.

El resultado de las amplificaciones se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio al 0,1%. Se mezclaron 8 μL del producto de la PCR con 2 μL del tampón de carga azul de bromofenol diluido al 1x, además de las muestras en el gel se analizó un marcador de pesos moleculares. Se aplicó un voltaje de 90 V durante 40 minutos, para posteriormente revelar el gen en el transiluminador.

En función de genotipo del paciente se debe observar una banda de 75 pb si es homocigoto para el alelo salvaje, una banda de 99 pb si es homocigoto para la duplicación de 24 pb o dos bandas, una de 75 pb y otra de 99 pb si se trata de un probando heterocigoto.

4.2.6 Análisis molecular de los genes *NPC1* y *NPC2*

El análisis de variantes en la secuencia de los genes *NPC1* y *NPC2* se realizó mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los 25 exones de *NPC1*, los 5 exones de *NPC2*, parte de las regiones no transcritas de los extremos 5' y 3' de ambos genes, los nexos exón-intrón y dos regiones dentro de los intrones 1 y 9 del gen *NPC1* en las que se han descrito variantes asociadas a la enfermedad.

Las secuencias génicas utilizadas para el diseño de los iniciadores se obtuvieron de la base de datos Gene del NCBI, siendo la referencia de las mismas NG_012795.1 para el gen *NPC1* y NG_007117.1 para *NPC2*.

4.2.6.1 Amplificación de los fragmentos

Reactivos:

- Agua destilada libre de DNAsas y RNAsas
- Buffer de reacción
- $MgCl_2$
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Iniciadores
- Enzima Taq polimerasa
- Agarosa
- Bromuro de etidio
- Xilencianol
- Marcador de pesos moleculares
- TAE (Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) + Tris aminometano + Ácido acético)

Procedimiento:

El diseño de las amplificaciones por PCR se obtuvo, en su mayoría, de la publicación de Zech et al. en 2013 [127]. Los iniciadores para la región 5'UTR y el exón 1 de *NPC1*, así como los iniciadores de las regiones intrónicas del mismo gen, se diseñaron mediante el software Oligo v.7.0 y se validaron mediante Primer Blast, para comprobar que el diseño no hibridara en otras regiones del mismo gen ni del genoma completo.

Para realizar las amplificaciones, en un vial de 0,2 μ L se añadieron la polimerasa termoestable, el tampón y el $MgCl_2$ necesarios, los nucleótidos (dNTPs), los iniciadores y el DNA. Llegando a un volumen final de trabajo de 20 μ L con agua destilada libre de DNAsas y RNAsas. Si el DNA de partida no procedía de sangre total sino de una extracción de DNA de gota de sangre seca, el volumen de DNA necesario para realizar la reacción fue mayor, ya que la concentración y calidad de DNA obtenido era menor.

Las cantidades y concentraciones finales se muestran en la tabla 4.2.3

REACTIVO	VOLUMEN (μL)		Concentración final
	DNA obtenido de sangre total	DNA obtenido de gota de sangre seca	
ddH ₂ O estéril	13,3	9,3	
Tampón (10x)	2	2	1 x
dNTPs (2 mM)	2	2	200 nM
DNA (50 ng/ μL)	1	5	2,5 ng*
MgCl ₂ (50 mM)	0,6	0,6	1,5 mM
Iniciador directo (10 μM)	0,5	0,5	250 nM
Iniciador reverso (10 μM)	0,5	0,5	250 nM
Taq Polimerasa 5 U/ μL	0,1	0,1	0,5 U/ μL

Tabla 4.2.3.- Cantidades y concentraciones finales para las amplificaciones por PCR de los genes *NPC1* y *NPC2*. *La concentración de DNA obtenido a partir de gota de sangre seca no puede determinarse a causa de lo baja que es, por lo que se desconoce la concentración final

Al fragmento 01 del gen *NPC1* que contiene la región 5'UTR y el exón 1, se le añadieron 0,5 μL de DMSO para reducir las interacciones inespecíficas e incrementar la eficiencia de la reacción.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Verity®. Los programas térmicos para cada amplificación se diferenciaban únicamente en la temperatura de hibridación de los iniciadores. Las condiciones térmicas para la amplificación de los genes *NPC1* y *NPC2* partiendo de DNA obtenido a partir de sangre total, se muestran en la tabla 4.2.4. Si el DNA provenía de una extracción a partir de gota de sangre seca, el número de ciclos debía incrementarse de 40 a 60.

PROCESO	TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)	TIEMPO (minutos)	CICLOS DE REPETICIÓN
Desnaturalización	95	5	1
Desnaturalización	95	0,5	
Hibridación			
<i>NPC1</i> : Amp 01-16	62		40
<i>NPC1</i> : Amp 17-24	63	0,5	
<i>NPC2</i> : Amp 01-03	61		

<i>NPC2</i> : Amp 04	60		
<i>NPC2</i> : Amp05	58		
Elongación	72	1	
Elongación	72	10	1
Elongación	25	0,5	1
Mantenimiento	4	∞	1

Tabla 4.2.4. Condiciones de la amplificación por PCR de los fragmentos de los genes *NPC1* y *NPC2*.

Los iniciadores utilizados para cada fragmento y el origen de los mismos, se detalla en su apartado 4.1.4.2 de materiales.

El resultado de las amplificaciones se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio al 0,1%, aplicando un voltaje de 90 V durante 20 minutos, mezclando 2 μ L del producto con 2 μ L del tampón de carga Xilencianol 1x para posteriormente revelarse en el transiluminador.

Las amplificaciones fueron conservadas a 4°C hasta su uso.

4.2.6.2 Purificación de los productos de PCR mediante ExoSap-IT®

Reactivos:

- Agua destilada libre de DNAsas y RNAsas
- ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent

Procedimiento:

El proceso de purificación de los amplicones obtenidos mediante PCR consistió en eliminar el DNA monocatenario, principalmente de los iniciadores y extremos incompletos, que quedaban restante en el vial donde se había realizado la reacción, así como hidrolizar los dNTPs sobrantes de la reacción.

Para eso se utiliza el reactivo ExoSap-IT® que consta de dos enzimas, una exonucleasa I que degrada el DNA monocatenario y una fosfatasa alcalina (SAP) que hidroliza los dNTPs.

La reacción se realizó en un vial de 0,2 mL en el que se introdujeron 5 μ L del producto de la PCR, 1 μ L de exonucleasa I y 1 μ L de fosfatasa alcalina. La muestra fue incubada en un termociclador

2720 a 37°C durante 15 minutos para que la reacción tuviese lugar, y se detuvo cambiando la temperatura de incubación a 80°C durante otros 15 minutos.

El producto de la reacción se conserva a 4°C hasta su uso, prácticamente inmediato.

4.2.6.3 Análisis de la secuencia de los amplicones mediante Sanger

Reactivos:

- Iniciadores
- BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit
- Agua destilada libre de DNAsas y RNAsas
- EDTA
- Acetato de sodio
- Etanol 96% (v/v)
- Etanol 70% (v/v)
- Hi-Di Formamida

Procedimiento:

A partir del producto de PCR purificado según se indica en el apartado 4.2.6.2, se realizaron dos reacciones de secuenciación, una para la hebra directa y otra para la reversa utilizándose los mismos iniciadores que para la reacción de PCR descrita en el apartado 4.1.4.2 pero concentración 2,1 mM.

La reacción de secuenciación se realizó según el protocolo del kit comercial BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, California, USA), preparándose las reacciones en placas de 96 pocillos.

El kit comercial viene premezclado conteniendo en un único vial la enzima, dNTPs y disdesoxinucleótidos trifosfato terminadores (ddNTPs) marcados con fluoresceína y fluoróforos derivados de la rodamina, diferentes para cada ddNTP. Estos ddNTPs actúan como dadores y aceptores y permiten la identificación automática posteriormente.

Se trabajó a un volumen final de 10 µL y los volúmenes y concentraciones necesarias para llevar a cabo la reacción se muestran en la tabla 4.2.5.

REACTIVO	VOLUMEN (µL)
----------	--------------

ddH ₂ O estéril	4,5
Tampón (5 x)	2
BigDye terminator mix	0,5
Amplificación purificada	1,5
Iniciador (2,1 μM)	1,5

Tabla 4.2.5. Volúmenes necesarios para una reacción de secuenciación.

La reacción de secuenciación tuvo lugar en las condiciones mostradas en la tabla 4.2.6

PROCESO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (segundos)	CICLOS DE REPETICIÓN
Desnaturalización	96	60	1
Desnaturalización	96	10	
Hibridación	55	5	25
Elongación	60	240	
Mantenimiento	4	∞	1

Tabla 4.2.6. Condiciones de la reacción de secuenciación.

El producto de la reacción fue purificado mediante un proceso de precipitación alcohólica. Para ello se añadieron 52 μL de etanol al 96%, 6 μL de ddH₂O, 4 μL de EDTA 62,5 mM a pH 8, y 2 μL de acetato sódico 3 M a pH 5,2 y se incubaron las muestras durante 15 minutos a temperatura ambiente, protegidas de la luz, para posteriormente, centrifugarlas a 2100 g durante 30 minutos a 4°C. Tras esta centrifugación en la que la reacción de secuenciación precipitó al fondo del pocillo, se procedió a secar la placa para eliminar el remanente de etanol mediante una centrifugación invertida a 900 rpm durante 1 minuto y con la placa destapada. Después se añadieron 70 μL de etanol al 70% (v/v) y se centrifugaron las muestras nuevamente a 2.100 g durante 15 minutos a 4°C. De nuevo se eliminó el sobrenadante por centrifugación de la muestra invertida y destapada a 900 rpm durante 1 minuto.

Finalmente, las muestras fueron resuspendidas en 20 μL de solución de Hi-Di Formamida e incubadas a 94°C durante dos minutos antes de mandarlas al servicio de secuenciación del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, donde se analizaron mediante un secuenciador Abi 3.500 xL en bloques de 24 reacciones.

4.2.6.4 Análisis de variantes

El análisis de los resultados de la secuenciación por fragmentos de los genes *NPC1* y *NPC2* se realizó mediante el programa informático *Variant Reporter*, utilizando las mismas secuencias de referencia que para el diseño de los iniciadores.

Para asignar el efecto de las variantes se tuvo en consideración la significación clínica asignada en la base de datos ClinVar (ver enlaces), y si la variante tiene un efecto reportado en la literatura, así como la información sobre la misma disponible en HGMD (ver enlaces) y NPC-db2 (ver enlaces) y la frecuencia poblacional publicada en 1000 genomas para población ibérica, en ExAC para población europea no finlandesa y en la base de datos del Spanish Variant Server del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER; ver enlaces).

Cuando la variante no presentaba un efecto descrito, a pesar de la frecuencia poblacional de la misma, se realizó un análisis “*in silico*” para predecir el efecto del cambio producido a nivel de secuencia genómica, proteica y un análisis del cambio en la entropía de la proteína.

Para seleccionar el mejor predictor “*in silico*” para nuestras variantes se utilizaron 23 métodos de predicción de efecto, todos ellos de uso gratuito y disponibles en la red (ver enlaces). Los programas bioinformáticos que se utilizaron para esta selección, se muestran la tabla 4.2.7.

Análisis realizado	Predictor
Estudio de ajuste molecular	SpliceSite Prediction by Neural Network [155]
	Human Splicing Finder [156]
	Sroogle [157]
	FSPLICE
	SPL
	GENESCAN web server by MIT [158]
	NetGene2 server [159]
	Spliceport [160]
Cambios en la composición de la proteína	Predict SNP1 [161]
	Predict SNP2 [162]
	PROVEAN Protein [163]
	PROVEAN Genome variants [163]
	SIFT [164]
Mutation Assessor	

Análisis realizado	Predictor
	FATHMM-MKL [165]
	FATHMM-Inherited Disease [166]
	Polyphen2 [167]
	SNPs&GO [168]
	SNPs&GO 3D [169]
	SNAP2 [170]
	PMuT [171]
	Hansa [172]
	MutPred1 [173]

Tabla 4.2.7. Predictores de efecto "*in silico*" utilizados.

Además, i-Mutant suit y DUET fueron utilizados para realizar el estudio de cambios energéticos en las proteínas (ver enlaces) [174,175].

Se analizaron 45 variantes cuyo efecto se encontraba publicado en la base de datos ClinVar y coincidía entre lo indicado en los repositorios de NCBI y del Instituto Europeo de Bioinformática (Ensembl; ver enlaces). Todas las variantes patogénicas seleccionadas están descritas en la literatura, mientras que las benignas presentaban una frecuencia poblacional superior al 1% y mucho mayor a la frecuencia de la enfermedad (Tabla 4.2.8).

GEN	dbSNP	REGIÓN GÉNICA	ALELO REF.	ALELO VAR.	EFECTO CLÍNICO	FREC. ALELO MIN.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
<i>NPC2</i>	rs104894458	Exón	G	A	Patogénico	ND	Millat (2005) Mol Genet Metab 86, 220
<i>NPC2</i>	rs80358266	Exón	C	A	Patogénico	1,65E-05	Millat (2001) Am J Hum Genet 69, 1013
<i>NPC2</i>	rs80358264	Exón	A	G	Patogénico	0,00E+00	Chikh (2005) Hum Mutat 26, 20
<i>NPC2</i>	rs11694	Exón	A	G	Patogénico	ND	Millat (2001) Am J Hum Genet 69, 1013
<i>NPC2</i>	rs80358268	Intrón	C	T	Patogénico	0,00E+00	Millat (2001) Am J Hum Genet 69, 1013
<i>NPC2</i>	rs80358261	Exón	C	T	Patogénico	3,27E-05	Klunemann (2002) Ann Neurol 52, 743
<i>NPC2</i>	rs879253740	Intrón	A	G	Patogénico	ND	Sheth (2017) BMC Med Genet 18, 5
<i>NPC2</i>	rs80358260	Exón	C	A	Patogénico	8,46E-05	Naureckiene (2000) Science 290, 2298
<i>NPC2</i>	rs483352893	Exón	C	A	Patogénico	1,75E-05	Fanello (2009) Neurogenetics 10, 229
<i>NPC1</i>	rs2510344	Intrón	T	C	Benigno	4,60E-01	
<i>NPC1</i>	rs120074131	Exón	C	G	Patogénico	ND	Greer (1999) Am J Hum Genet 65, 1252
<i>NPC1</i>	rs61731969	Exón	T	C	Benigno	3,00E-02	Bean (2013) Hum Mut 34,1183
<i>NPC1</i>	rs28942105	Exón	T	C	Patogénico	3,78E-05	Carstea (1997) Science 277, 228
<i>NPC1</i>	rs374526072	Exón	C	T	Patogénico	ND	Sun (2001) Am J Hum Genet 68, 1361

GEN	dbSNP	REGIÓN GÉNICA	ALELO REF.	ALELO VAR.	EFECTO CLÍNICO	FREC. ALELO MIN.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
<i>NPC1</i>	rs28942106	Exón	T	C	Patogénico	ND	Yamamoto (1999) Hum Genet 105, 10
<i>NPC1</i>	rs6507717	Intrón	C	T	Benigno	9,00E-02	Bean (2013) Hum Mut 34,1183
<i>NPC1</i>	rs80358259	Exón	A	G	Patogénico	4,06E-04	Yamamoto (1999) Hum Genet 105, 10
<i>NPC1</i>	rs80358258	Exón	C	T	Patogénico	ND	Millat (2001) Am J Hum Genet 68, 1373
<i>NPC1</i>	rs483352886	Exón	G	A	Patogénico	ND	Zhang (2014) Orphanet J Rare Dis 9,82
<i>NPC1</i>	rs28942107	Exón	G	A	Patogénico	1,50E-05	Ribeiro (2001) Hum Genet 109, 24
<i>NPC1</i>	rs797044431	Intrón	T	-	Patogénico	ND	Yamamoto (1999) Hum Genet 105, 10
<i>NPC1</i>	rs80358257	Exón	G	C	Patogénico	1,95E-04	Greer (1999) Am J Hum Genet 65, 1252
<i>NPC1</i>	rs80358254	Exón	C	A	Patogénico	1,50E-05	Greer (1998) Am J Hum Genet 63, 52
<i>NPC1</i>	rs28942108	Exón	G	A	Patogénico	3,01E-05	Ribeiro (2001) Hum Genet 109, 24
<i>NPC1</i>	rs483352892	Intrón	G	C	Patogénico	ND	Zhang (2014) Orphanet J Rare Dis 9,82
<i>NPC1</i>	rs6507720	Intrón	A	G	Benigno	4,82E-01	
<i>NPC1</i>	rs120074132	Exón	C	T	Patogénico	3,07E-05	Bauer (2002) Hum Mutat 19, 30
<i>NPC1</i>	rs120074135	Exón	C	T	Patogénico	ND	Millat (2001) Am J Hum Genet 68, 1373
<i>NPC1</i>	rs200103695	Intrón	A	G	Benigno	1,00E-02	
<i>NPC1</i>	rs28940897	Exón	T	G	Patogénico	ND	Carstea (1997) Science 277, 228
<i>NPC1</i>	rs730880963	Exón	G	A	Patogénico	ND	Stampfer (2013) Orphanet J Rare Dis 8,
<i>NPC1</i>	rs120074130	Exón	C	T	Patogénico	ND	Yamamoto (1999) Hum Genet 105, 10
<i>NPC1</i>	rs372030650	Exón	T	A	Patogénico	6,01E-05	Millat (2001) Am J Hum Genet 68, 1373
<i>NPC1</i>	rs483352891	Exón	C	T	Patogénico	ND	Zhang (2014) Orphanet J Rare Dis 9,82
<i>NPC1</i>	rs80358253	Exón	T	G	Patogénico	1,50E-05	Millat (2001) Am J Hum Genet 68, 1373
<i>NPC1</i>	rs483352890	Exón	C	G	Patogénico	ND	Zhang (2014) Orphanet J Rare Dis 9,82
<i>NPC1</i>	rs483352888	Exón	A	G	Patogénico	ND	Zhang (2014) Orphanet J Rare Dis 9,82
<i>NPC1</i>	rs72283949	Intrón	-	CA	Benigno	2,90E-03	
<i>NPC1</i>	rs55809701	Intrón	C	CC	Benigno	2,70E-01	
<i>NPC1</i>	rs3745024	Intrón	C	A	Benigno	3,20E-01	Bean (2013) Hum Mut 34,1183
<i>NPC1</i>	rs483352887	Exón	T	C	Patogénico	ND	Zhang (2014) Orphanet J Rare Dis 9,82
<i>NPC1</i>	rs13381670	Exón	G	A	Benigno	2,00E-02	
<i>NPC1</i>	rs483352885	Exón	T	A	Patogénico	ND	Zhang (2014) Orphanet J Rare Dis 9,82
<i>NPC1</i>	rs120074134	Exón	A	G	Patogénico	ND	Millat (2001) Am J Hum Genet 68, 1373
<i>NPC1</i>	rs120074136	Exón	A	G	Patogénico	ND	Blom (2003) Hum Mol Genet 12, 257

Tabla 4.2.8. Listado de variantes utilizadas para la validación de predictores.

4.2.7 Síntesis de cDNA

Reactivos:

- Agua destilada libre de DNAsas y RNAsas
- High Capacity cDNA reverse transcription

Procedimiento:

La síntesis de cDNA fue realizada a partir de 100 ng de RNA en un volumen final de 20 μ L. Se realizó en el laboratorio de RNA trabajando en la cabina de extracción.

La reacción se realizó con el kit “*High capacity cDNA reverse transcription*” de Applied Biosystems (California, USA), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

En un tubo de 0,2 mL se añaden los volúmenes de reactivo para cada muestra indicados en la Tabla 4.2.9.

REACTIVO	VOLUMEN (μ L)	Concentración final
ddH ₂ O estéril	3,2	
Tampón (10x)	2	1 x
dNTPs (100 mM)	0,8	4 mM
Iniciadores de unión aleatoria (10x)	2	1x
Inhibidor de RNAsas	1	
Transcriptasa reversa 50 U/ μ L	1	2,5 U/ μ L
RNA (100 ng/ μ L)	10	50 ng

Tabla 4.2.9. Cantidades y concentraciones finales para la reacción de retrotranscripción.

La reacción de retrotranscripción fue realizada en el termociclador 2720. Las condiciones de la misma fueron una primera incubación de 10 minutos a 25°C, seguida de otra de 2 horas a 37°C y un paso final de 5 minutos a 65°C, para dejar bajar la temperatura a 4°C hasta que se retirase la reacción del termociclador.

4.2.7.1 Control de síntesis de cDNA mediante amplificación

Reactivos:

- Agua destilada libre de DNAsas y RNAsas
- Buffer de reacción
- MgCl₂
- Iniciadores
- Enzima Taq polimerasa
- Agarosa
- Bromuro de etidio
- Azul de bromofenol
- Marcador de pesos moleculares
- TAE (Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) + Tris aminometano + Ácido acético)

Procedimiento:

La comprobación de la correcta síntesis del cDNA fue realizada mediante la amplificación de un fragmento del RNA mensajero de la molécula β -actina. Los iniciadores se sintetizaron mediante el programa Oligo 7, a partir de la secuencia de referencia NM_001101.3 del NCBI, creando un fragmento que incluye varios exones.

La secuencia de los iniciadores se encuentra reflejada en la tabla 4, en el apartado de materiales. Las amplificaciones se realizaron en un vial de 0,2 mL al que se le añadieron los iniciadores, el cDNA a analizar, la enzima TaqPolimerasa y el tampón y MgCl₂ correspondientes a esta enzima, utilizando agua libre de DNAsas y RNAsas para llegar a un volumen de 20 μ L. Los volúmenes y concentraciones finales de cada reactivo se muestran en la tabla 4.2.10.

REACTIVO	VOLUMEN (μ L)	Concentración final
ddH ₂ O estéril	13,8	
Tampón (10x)	2	1 x
dNTPs (2 mM)	2	200 nM
cDNA	0,5	
MgCl ₂ (50 mM)	0,6	1,5 mM
Iniciador directo (10 μ M)	0,5	250 nM

REACTIVO	VOLUMEN (μL)	Concentración final
Iniciador reverso (10 μM)	0,5	250 nM
TaqPolimerasa 5 U/ μL	0,1	0,5 U/ μL

Tabla 4.2.10. Cantidades y concentraciones finales para las amplificaciones por PCR.

4.2.8 Análisis molecular de la transcripción de los genes *NPC1* y *NPC2* en leucocitos

El análisis molecular del cDNA de los genes *NPC1* y *NPC2* fue utilizado para comprobar el efecto de variantes que, según los predictores bioinformáticos, podrían afectar al ajuste molecular. Al igual que el estudio de variantes en DNA genómico fue realizado mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los 25 exones de *NPC1* y los 5 exones de *NPC2*.

4.2.8.1 Amplificación de los fragmentos

Reactivos:

- Agua destilada libre de DNAsas y RNAsas
- Tampón de reacción
- MgCl_2
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Iniciadores
- Enzima Taq polimerasa
- Agarosa
- Bromuro de etidio
- Azul de bromofenol
- Marcador de pesos moleculares
- TAE (Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) + Tris aminometano + Ácido acético)

Procedimiento:

Las secuencias génicas utilizadas para el diseño de los iniciadores se obtuvieron de la base de datos Gene del NCBI, siendo la referencia de las mismas NM_000271.4 para *NPC1* y NM_006432.3 para *NPC2*. Los iniciadores fueron diseñados mediante el software Oligo v.7.0, validados mediante Primer Blast y sintetizados por IDT.

El diseño de los mismos genera fragmentos solapantes, de forma que el final del primer fragmento amplificado forma parte de la secuencia del segundo. De este modo la secuencia queda totalmente cubierta, existiendo regiones que se encuentran en dos fragmentos. Los 6 iniciadores utilizados para amplificar la totalidad del RNA mensajero del gen *NPC1*, el fragmento que engloba toda la secuencia codificante de *NPC2* se detallan en la tabla 3.1.3 del apartado de materiales.

Las amplificaciones fueron realizadas en viales de 0,2 mL, en los que se añadió la polimerasa termoestable, el tampón y el $MgCl_2$ necesarios, los nucleótidos (dNTPs), los iniciadores y el cDNA. Llegando a un volumen final de trabajo de 20 μ L con agua destilada libre de DNAsas y RNAsas. Las cantidades y concentraciones finales se muestran en la tabla 4.2.11.

REACTIVO	VOLUMEN (μ L)	Concentración final
ddH ₂ O estéril	13,8	
Tampón (10x)	2	1 x
dNTPs (2 mM)	2	200 nM
cDNA (100 ng/ μ L)	0,5	2,5 ng
$MgCl_2$ (50 mM)	0,6	1,5 mM
Iniciador directo (10 μ M)	0,5	250 nM
Iniciador reverso (10 μ M)	0,5	250 nM
Taq Polimerasa 5 U/ μ L	0,1	0,5 U/ μ L

Tabla 4.2.11. Cantidades y concentraciones finales para las amplificaciones por PCR de los genes *NPC1* y *NPC2*.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Verity. Los programas térmicos para cada amplificación se diferenciaban únicamente en la temperatura de hibridación de los iniciadores. Las condiciones térmicas para la amplificación se muestran en la tabla 4.2.12.

PROCESO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (minutos)	CICLOS DE REPETICIÓN
Desnaturalización	95	5	1
Desnaturalización	95	0,5	
Hibridación:			
<i>cDNA NPC1</i> : Amp 01, Amp03, Amp06	69		
<i>cDNA NPC1</i> : Amp 02	59		35
<i>cDNA NPC1</i> : Amp 04	62	0,5	
<i>cDNA NPC1</i> : Amp 05 / <i>cDNA NPC2</i>	65		
Elongación	72	0,5	
Elongación	72	10	1
Mantenimiento	4	∞	1

Tabla 4.2.12. Condiciones de la amplificación por PCR de los fragmentos de cDNA los genes *NPC1* y *NPC2*.

El resultado de las amplificaciones fue comprobado en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio al 0,1%, realizando una electroforesis en solución tamponadora TAE 1x, con un voltaje de 90 V durante 20 minutos. Para la misma se utilizaron 2 µL del producto con 2 µL del tampón de carga xilencianol 1x para posteriormente revelarse en el transiluminador.

Las amplificaciones fueron conservadas a 4°C hasta su purificación, que fue realizada siguiendo el mismo procedimiento que se detalla en el apartado 4.2.6.2.- Purificación de los productos de PCR mediante ExoSap-IT®.

El análisis de las secuencias fue realizado mediante secuenciación capilar tipo Sanger, según el protocolo especificado en el apartado 4.2.6.3.- Análisis de la secuencia de los amplicones mediante Sanger.

Mediante el programa informático *Variant Reporter v.1* se analizaron los resultados, utilizando como secuencia de referencia la misma que para el diseño de los iniciadores. Se comprobó que las variantes en región exónica fueran las mismas que las detectadas en el estudio genómico.

4.2.9 Cuantificación de la expresión del gen *NPC1* en leucocitos mediante técnica de PCR cuantitativa (RT-qPCR)

La PCR cuantitativa es una variante de la amplificación por polimerasa que permite cuantificar el producto al mismo tiempo que se sintetiza.

Existen diferentes métodos de cuantificación, para este proyecto se utilizaron sondas TaqMan que permiten medir la síntesis mediante un sistema de sondas doblemente marcadas.

4.2.9.1 Análisis mediante el uso de sondas TaqMan

Las sondas TaqMan poseen un fluoróforo en el extremo 3' y un supresor que fluorescencia en el extremo 5'. Esta sonda hibrida en la zona central del producto a amplificar.

Al realizar la reacción de amplificación con la sonda y los iniciadores específicos, la primera hibrida en el amplicón. El fluoróforo debería emitir señal, pero no lo hace por la proximidad con el supresor. Al actuar la polimerasa, su actividad exonucleasa 5'→3' hidroliza la sonda, provocando la separación del supresor y por lo tanto que el fluoróforo pueda emitir fluorescencia, relacionándose la cantidad de fluorescencia emitida con la cantidad de amplicón producida (Figura 4.2.1).

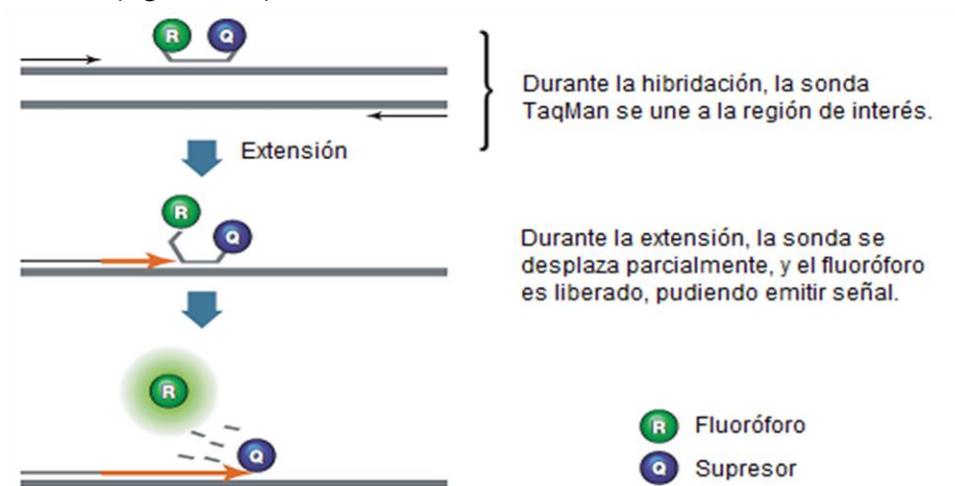


Figura 4.2.1 Sistema de emisión de fluorescencia mediante sondas TaqMan. Adaptada del libro de aplicaciones de BioRad

Se realizó la cuantificación relativa del gen *NPC1* y un gen control (*GADPH*). En primer lugar, se optimizó la cantidad de cDNA necesaria para conseguir la máxima eficiencia de reacción,

trabajando por triplicado con cantidades de cDNA de 100 a 0,01 ng. Las eficiencias de reacción obtenidas en la reacción multiplex fueron de: 112% para *NPC1* y 113% para *GADPH*.

Cada reacción fue realizada por duplicado a partir de 1 ng de cDNA. El experimento fue realizado en multiplex, para ello se mezclaron 10 μL de la TaqMan® Multiplex Mastermix con 1 μL de sonda de NPC marcada en FAM y 1 μL de sonda para GADPH macada con el fluoróforo VIC. Se añadió el cDNA y se utilizó agua ultrapura para llegar a un volumen final de 20 μL . Las sondas utilizadas se describen en la tabla 3.4. del aparatado de materiales.

La reacción fue realizada con el siguiente programa térmico: 95°C durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. La amplificación fue realizada en un equipo ViiA7® (Applied Biosystems). Los datos fueron obtenidos mediante el programa informático ViiA7™ Software v.1.2.3.

Cada reacción fue realizada por duplicado a partir de 1 ng de cDNA. El experimento fue realizado en multiplex, para ello se mezclaron 10 μL de la TaqMan® Multiplex Mastermix con 1 μL de sonda de *NPC1* marcada en FAM y 1 μL de sonda para *GADPH* macada con el fluoróforo VIC. Se añadió el cDNA y se utilizó agua ultrapura para llegar a un volumen final de 20 μL . Las sondas utilizadas se describen en la tabla 3.5. del aparatado de materiales.

La reacción fue realizada con el siguiente programa térmico: 95°C durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. La amplificación fue realizada en un equipo StepOne Plus® (Applied Biosystems). Los datos fueron obtenidos mediante el programa informático StepOne Software v.2.2.2.

4.2.9.2 Rectas estándar

Se evaluó la eficiencia de las reacciones mediante la construcción de una recta estándar para cada análisis mediante el uso de diluciones 1/10 de un cDNA control por triplicado, partiendo de una cantidad de cDNA de 100 ng hasta 0,01 ng. Se calculó el valor C_T medio y su desviación estándar (DE) entre réplicas para a continuación representar el \log_{10} de la cantidad de cDNA en cada dilución frente al C_T medio obtenido. Seguidamente, se ajustaron los puntos de la recta y se determinó el coeficiente de determinación (R^2), para calcular la eficiencia de la amplificación (E) a partir de la pendiente de la recta.

Se consideró la reacción optimizada cuando las réplicas fueron consistentes entre ellas ($DE < 0,2$), la recta era prácticamente lineal ($R^2 < 0,9$) y la eficiencia de la reacción se encontraba entre 85-115%

4.2.9.3 Normalización de los datos

El estándar interno utilizado, como gen de referencia, fue *GADPH*. Su cuantificación debe ser aproximadamente la misma en los tres experimentos realizados ya que su expresión se considera estable.

Para cada reacción se normalizó el C_T medio de *GADPH* mediante la fórmula:

$$E_{NPC1}^{C_T, NPC1} / E_{GADPH}^{C_T, GADPH}$$

Siendo C_T ("cycle threshold") el ciclo en el que la amplificación pasa a ser exponencial y E la eficiencia de amplificación. El valor del C_T es inversamente proporcional a la cantidad de DNA molde.

4.2.9.4 Cuantificación relativa

Utilizamos medidas de expresión génica de eficiencia corregida utilizando el método descrito por Pfaffl en 2006.

4.2.9.5 Asignación de efecto para variantes

El estudio de efecto de variantes se realizó mediante métodos bioinformáticos. Tras la predicción del efecto mediante predictores "in silico" se realizó un análisis conservacional de la secuencia genómica. Mediante el programa en red, Clustal Omega ((EMBI-EBI; ver enlaces) se comparó la secuencia a estudio con la secuencia del gen *NPC1* en treinta especies distintas.

Posteriormente, mediante el programa Swiss PDB Viewer se comprobó el efecto causado por cada variante en la estructura tridimensional de la proteína NPC1, superponiendo la estructura de la proteína salvaje con la variante.

4.2.10 Análisis exómico

El estudio del exoma completo fue realizado en 11 sujetos con sintomatología sugestiva de enfermedad de NP-C.

El estudio fue contratado a Sistemas Genómicos (Valencia, España) para su realización utilizando la plataforma Illumina HiSeq 2000 y el sistema de captura SureSelect Human AB Exon 74 Mb.

El DNA proporcionado fue extraído de sangre total, fue purificado y se evaluó su integridad con la intención de cumplir los criterios de calidad impuestos por el proveedor del servicio. Se suministraron 5 µg de DNA de cada probando, diluidos en agua destilada libre de DNAsas y RNAsas.

4.2.10.1 Purificación del DNA

El DNA fue purificado mediante un sistema de columnas Microcon®. El procedimiento consistió en colocar una columna en un tubo de recogida de 2 mL y añadir 100 µL de DNA para a continuación realizar una centrifugación de 10 minutos a 14.000 g. Tras esta el tubo de recogida fue sustituido por uno nuevo y la columna se invirtió sobre el mismo, realizando una nueva centrifugación de 3 minutos a 1.000 g para recuperar la fracción de DNA adherida a la membrana de la columna. Esta fracción fue diluida en 50 µL de agua destilada libre de DNAsas y RNAsas.

4.2.10.2 Valoración de la integridad del DNA

La integridad del DNA a enviar fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con 0.1% de bromuro de Etidio. Se analizaron 50 ng de DNA mezclados con 2 µL de azul de bromofenol. La electroforesis fue realizada en tampón TAE1x sometiendo el gel a 94 V durante 1 hora, para posteriormente analizar el gel en el transiluminador.

4.2.10.3 Análisis de los resultados

Los resultados fueron analizados mediante la plataforma GeneSystems proporcionada por la misma empresa que realizó la parte experimental.

Se pasaron controles de calidad que consistían en evaluar el porcentaje de lecturas útiles, la cobertura y la profundidad de los mismos.

En un primer cribado se analizó la secuencia exómica de cada paciente independientemente, buscando variantes patogénicas conocidas asociadas a otras enfermedades que pudiesen justificar la sintomatología clínica que presentaban. A continuación, se agruparon los pacientes por similitud y se analizó la presencia de variantes de baja frecuencia o sin frecuencia descrita buscando alteraciones comunes entre los diferentes sujetos que formaban cada grupo. Siempre se tuvo en consideración que las variantes estudiadas afectaran a la isoforma canónica de la proteína.

4.2.10.4 Validación de las variantes genéticas observadas

Los resultados obtenidos en el apartado anterior se validaron mediante secuenciación Sanger de los fragmentos de interés, utilizando los iniciadores descritos en la Tabla 4.1.2. Las condiciones de amplificación para cada uno de los fragmentos se especifican en la tabla 4.2.13.

PROCESO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (minutos)	CICLOS DE REPETICIÓN
Desnaturalización	95	5	1
Desnaturalización	95	0,5	
Hibridación:			
<i>SMPD1</i>	65		
<i>ANK1</i>	56		35
<i>SPG7</i>	58	0,5	
<i>POLG</i>	63		
Elongación	72	0,5	
Elongación	72	10	1
Mantenimiento	4	∞	1

Tabla 4.2.13. Condiciones de la amplificación por PCR de los fragmentos de DNA para validar las variantes asociadas a patogenicidad detectadas mediante el estudio de exomas

Todos los fragmentos se prepararon para la reacción de secuenciación siguiendo los protocolos establecidos en los apartados 4.2.6.2 y 4.2.6.3. El análisis de los resultados de la secuenciación por fragmentos se realizó mediante el programa informático Variant Reporter, utilizando las mismas secuencias de referencia que para el diseño de los iniciadores, para el gen *SMPD1* se utilizó la secuencia NG_011780.1, para *ANK1* fue NG_012820.1, para el gen *SPG7* se usó la secuencia de referencia NG_008082.1 y para *POLG* la NG_0008218.2.

Todas las variantes analizadas se encontraban registradas en la base de datos HGMD y se contrastaron con la bibliografía existente para confirmar su patogenicidad.

4.2.11 Análisis molecular del premiR33a

El análisis de variantes en la secuencia del pri-miR33a se realizó mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región genómica donde se encuentra ubicada, en el intrón 16 del gen *SEBRF2*.

La secuencia génica utilizada para el diseño de los iniciadores se obtuvo de la base de datos Gene del NCBI. En este caso, dado que se pretendía realizar una amplificación mayor que la secuencia de referencia del *pri-miR33a* (NR_029507.1) no se utilizó esta sino la secuencia de referencia del gen *SEBRF2* (NC_000022.11), ya que la primera se encuentra ubicada en el intrón 16 de este gen.

4.2.11.1 Amplificación de los fragmentos

Reactivos:

- Agua destilada libre de DNAsas y RNAsas
- Buffer de reacción
- MgCl₂
- Iniciadores
- Enzima Taq polimerasa
- Agarosa
- Bromuro de etidio
- Azul de bromofenol
- Marcador de pesos moleculares
- TAE (Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) + Tris aminometano + Ácido acético)

Procedimiento:

El diseño de la amplificación por PCR se realizó para este proyecto mediante el programa informático Oligo v.7.0 y se validó mediante Primer Blast, para comprobar que el diseño no hibridara en otras regiones del mismo gen ni del genoma completo.

Para realizar las amplificaciones, en un vial de 0,2 μL se añadieron la polimerasa termoestable, el tampón y el MgCl_2 necesarios, los nucleótidos (dNTPs), los iniciadores y el DNA. Llegando a un volumen final de trabajo de 20 μL con agua destilada libre de DNAsas y RNAsas.

Las cantidades y concentraciones finales se muestran en la tabla 4.2.14.

REACTIVO	VOLUMEN (μL)	Concentración final
ddH ₂ O estéril	13,3	
Tampón (10x)	2	1 x
dNTPs (2 mM)	2	200 nM
DNA (50 ng/ μL)	1	2,5ng
MgCl_2 (50 mM)	0,6	1,5 mM
Iniciador directo (10 μM)	0,5	250 nM
Iniciador inverso (10 μM)	0,5	250 nM
Taq Polimerasa 5 U/ μL	0,1	0,5 U/ μL

Tabla 4.2.14. Cantidades y concentraciones finales para las amplificaciones por PCR del pri-miR-33a.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Verity. El programa de amplificación utilizado consistió en una desnaturalización de 5 minutos a 94°C seguida de 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 67°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, para finalizar con una elongación a 72°C durante 5 minutos y un mantenimiento de la reacción a 4°C hasta su uso.

Las amplificaciones fueron purificadas mediante el kit ExoSap-IT® como se describe en el apartado “4.2.6.2.-Purificación de los productos de PCR mediante ExoSap-IT®” y analizadas mediante el sistema de secuenciación Sanger descrito en el apartado “4.2.6.3.- Análisis de la secuencia de los amplicones mediante Sanger”. Los resultados fueron analizados mediante el programa *Variant Reporter v.1.1*, utilizando como secuencia de referencia la utilizada para el diseño de los iniciadores. Las variantes observadas se analizaron mediante predictores bioinformáticos de efecto.

4.2.12 Análisis estadístico de los datos

El programa informático IBM SPSS Statistics v22 fue utilizado para llevar a cabo todos los análisis estadísticos. El test de Kolmogorov-Smirnov se utilizó para comprobar el ajuste de las variables a la normal.

Cuando las variables se ajustaban correctamente se utilizaron test paramétricos para su análisis, en caso contrario se trataron de ajustar mediante métodos logarítmicos, o fraccionales y en caso de no conseguir el ajuste a la normalidad se utilizaron test no paramétricos para su análisis. Los p-valores menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Así mismo, los datos de sensibilidad, especificidad, exactitud, precisión, y el coeficiente de correlación de Matthew (ecuaciones 1, 2, 3, 4, y 5 respectivamente) se utilizaron para el análisis de los mejores predictores de efecto en los genes *NPC1* y *NPC2*.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FB} \quad (1)$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VB}{VB+FP} \quad (2)$$

$$\text{Exactitud} = \frac{VP+VB}{VP+VB+FP+FV} \quad (3)$$

$$\text{Precisión} = \frac{VP}{VP+FP} \quad (4)$$

$$\text{MCC} = \frac{VP*VB-FP*FB}{\sqrt{(VP+FP)(VP+FB)(TB+FP)(TB+FB)}} \quad (5)$$

4.2.13 Procedimiento de trabajo

El procedimiento de trabajo habitual cuando llegaban muestras con sospecha de NPC al laboratorio consistía en realizar la separación de fracciones y seguidamente analizar los biomarcadores plasmáticos.

Cuando los niveles de biomarcadores (CT, CCL18/PARC y 7-CC) o el NPC-SI eran indicativos de proseguir con el estudio, se procedía al análisis mediante secuenciación Sanger de los genes *NPC1* y *NPC2*.

Si en el estudio aparecía alguna variante de significado incierto se solicitaba una nueva muestra para poder realizar el estudio del RNA mensajero y de expresión. El flujo de trabajo descrito se muestra en la Figura 4.2.2.

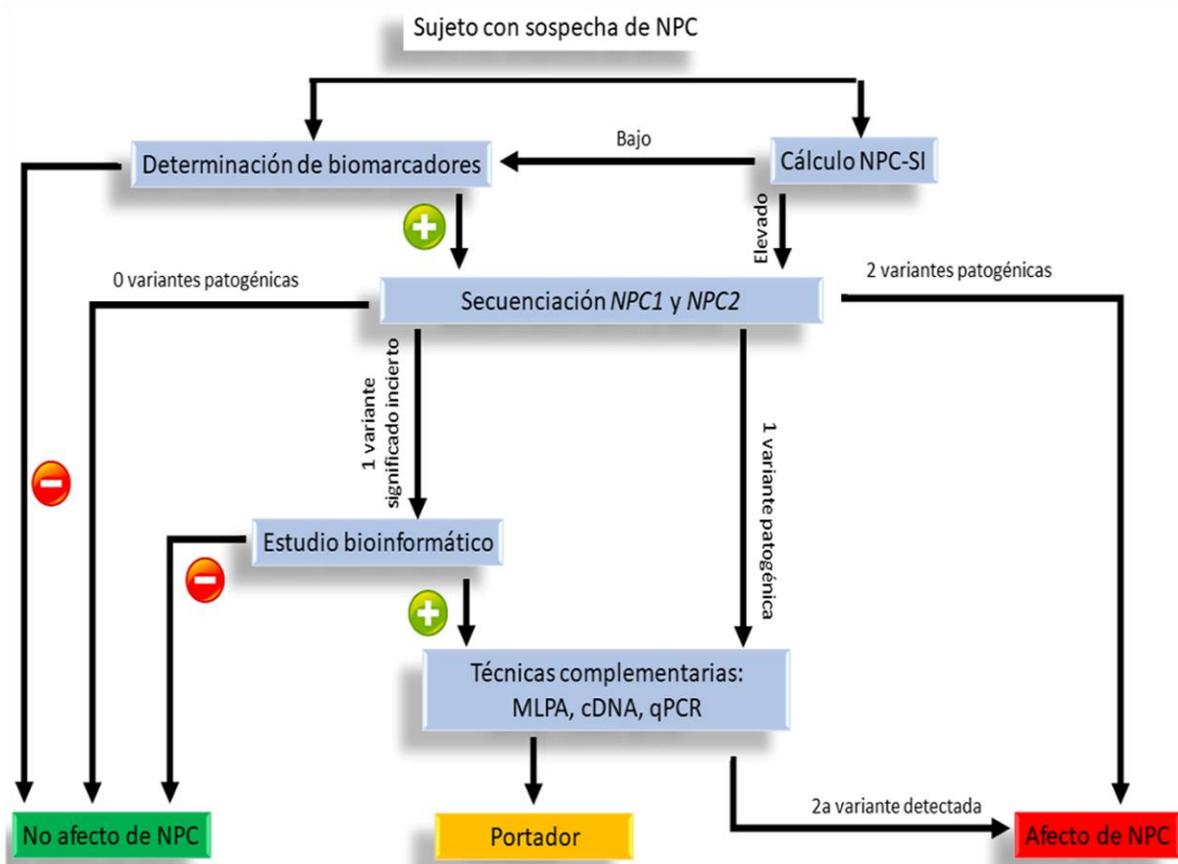


Figura 4.2.2 Esquema de trabajo tras recibir una muestra con sospecha de Enfermedad de Niemann Pick tipo C.

5 RESULTADOS



A continuación, se presentarán los resultados obtenidos para esta memoria. Parte de ellos se encuentran publicados en diferentes artículos o pendientes de aceptación de los mismos.

Este apartado está estructurado en base a los objetivos marcados para el proyecto.

5.1 BLOQUE 01: ESTUDIOS PARA LA DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD

5.1.1 Desarrollo de nuevos sistemas de cribado para NP-C

El trabajo que se presenta a continuación se publicó en Clinica Chimica Acta en 2018 (Manuscrito 1).

5.1.1.1 Descripción de los pacientes

Las muestras utilizadas para el desarrollo de este objetivo incluyen controles y pacientes con enfermedad de Niemann Pick tipo C, y sujetos afectados de otras enfermedades de depósito lisosomal (EDL).

Los sujetos a estudio se han dividido en función de la presencia o ausencia de EDL, clasificados según los valores de biomarcadores y los estudios genéticos correspondientes. Posteriormente, el grupo de afectados se ha subdividido de acuerdo con la enfermedad que presentaban los sujetos (Figura 5.1.1.).

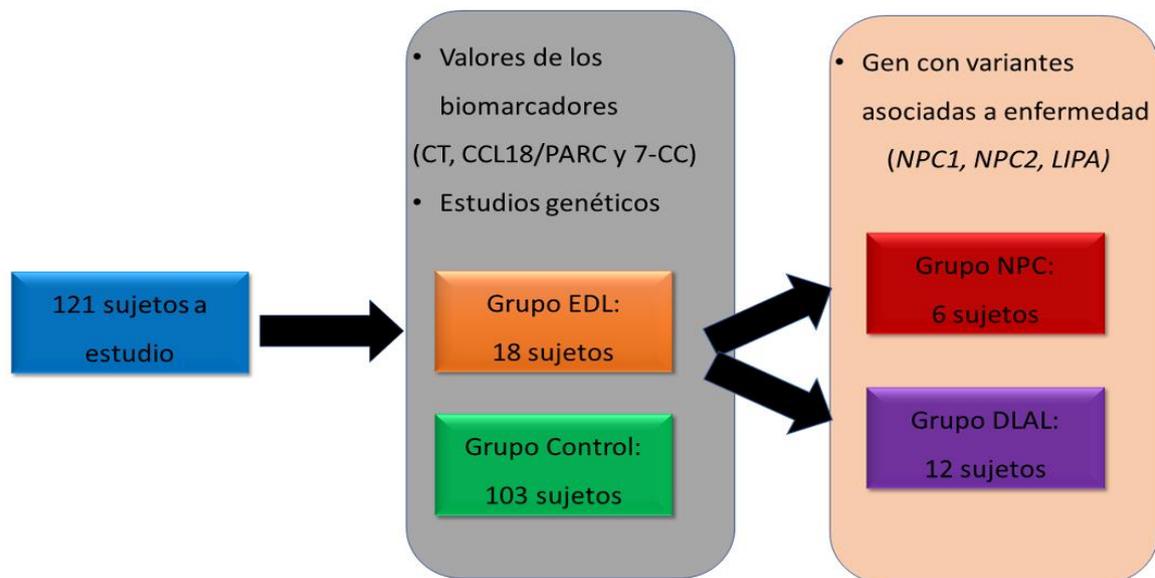


Figura 5.1.1 Esquema de trabajo tras recibir una muestra con sospecha de Enfermedad de Niemann Pick tipo C.

5.1.1.2 Test de resistencia osmótica eritrocitaria

5.1.1.2.1 Cribado de pacientes al diagnóstico

Se evaluó el grado de hemólisis a diferentes concentraciones de solución salina, y mediante la evaluación de curvas características operativas del receptor (ROC, acrónimo en inglés), determinando que la concentración que permitía una mayor discriminación entre los sujetos sanos y afectados de EDL era la de 0,49% de NaCl, con un área bajo la curva (AUC) de 0,84 y un intervalo de confianza (IC) entre 0,74 y 0,94 (Figura 5.1.2.).

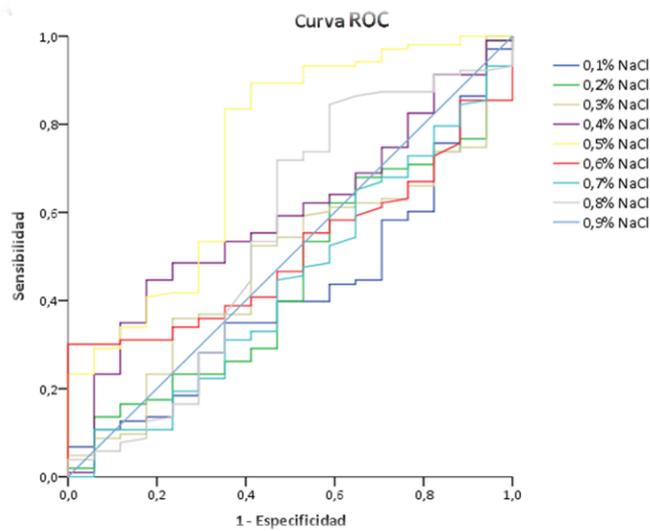
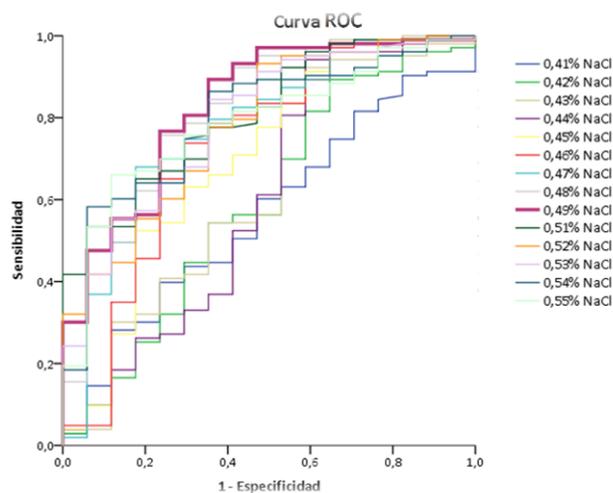


Figura 5.1.2 Curva ROC para las diferentes concentraciones de solución salina testadas.

(A) Concentraciones de 0,1 a 0,9%



(B) Concentraciones de 0,41 a 0,55%. La mejor curva esta resaltada en mayor tamaño y corresponde a una concentración de 0,49% de NaCl.

Mediante el test U de Mann-Whitney se analizó la existencia de diferencias entre los controles y los afectados de EDL, observándose que las mismas eran significativas (p -valor=0,00), siendo la resistencia osmótica mayor en el grupo de afectados que en los controles (Figura 5.1.3.).

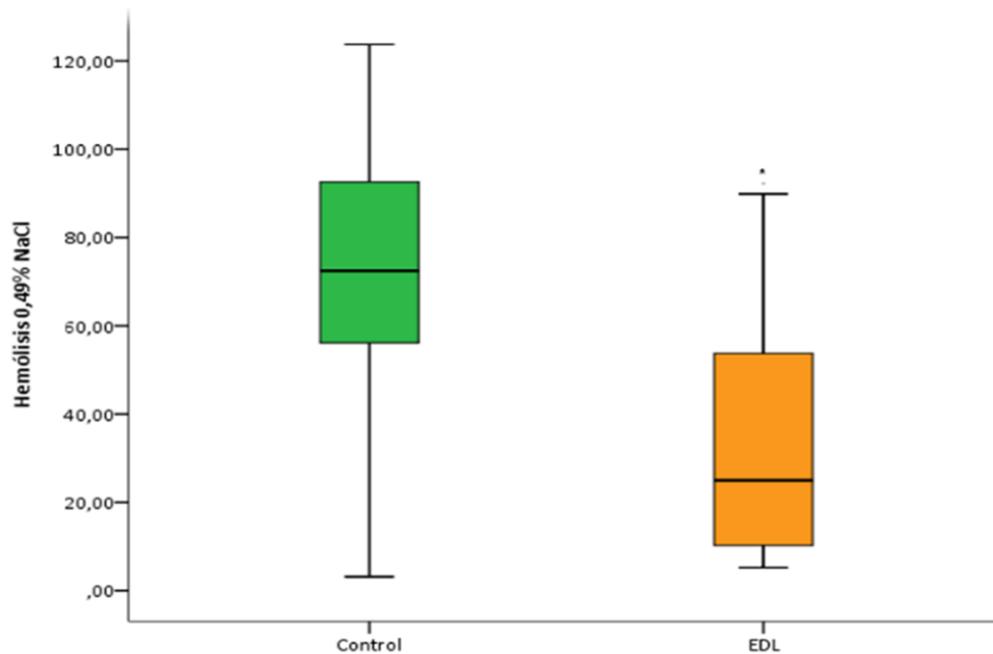


Figura 5.1.3 Boxplot afectados de NP-C o DLAL vs controles. Boxplot afectados de EDL vs controles. Representación de la diferencia de resistencia eritrocitaria observada a una concentración de solución salina del 0,49% entre los sujetos afectados de EDL y el grupo control. *Diferencia estadísticamente significativa con un p-valor=0,00

Se realizó el mismo test entre los pacientes EDL divididos por enfermedad y el grupo control, observándose nuevamente una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes de NP-C o DLAL y los controles (p-valor=0,01 y 0,00 respectivamente) pero, según el test de DeLonge esta diferencia no se observaba entre los pacientes con diagnóstico de NP-C y DLAL (p-valor>0,05; Figura 5.1.4.).

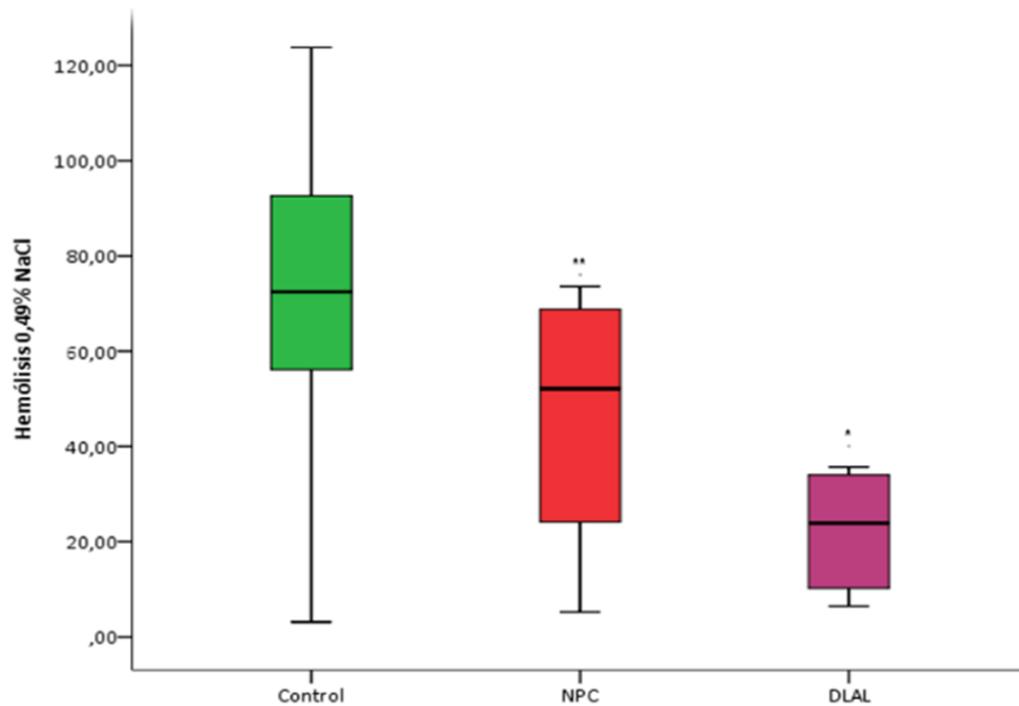


Figura 5.1.4 Boxplot afectados de EDL vs controles. Representación de la diferencia de resistencia eritrocitaria observada a una concentración de solución salina del 0,49% entre los sujetos afectados de EDL y el grupo control. *Diferencia estadísticamente significativa.

Se consideraron aceptables un valor de sensibilidad del 80% y de especificidad del 70%. Utilizando estos valores como puntos de corte, se consideró que valores de hemólisis por debajo del 51% en los test de resistencia osmótica, debían considerarse como sujetos susceptibles a ser afectados de EDL y por lo tanto debía ampliarse el estudio siguiendo el protocolo establecido (Figura 5.1.5).

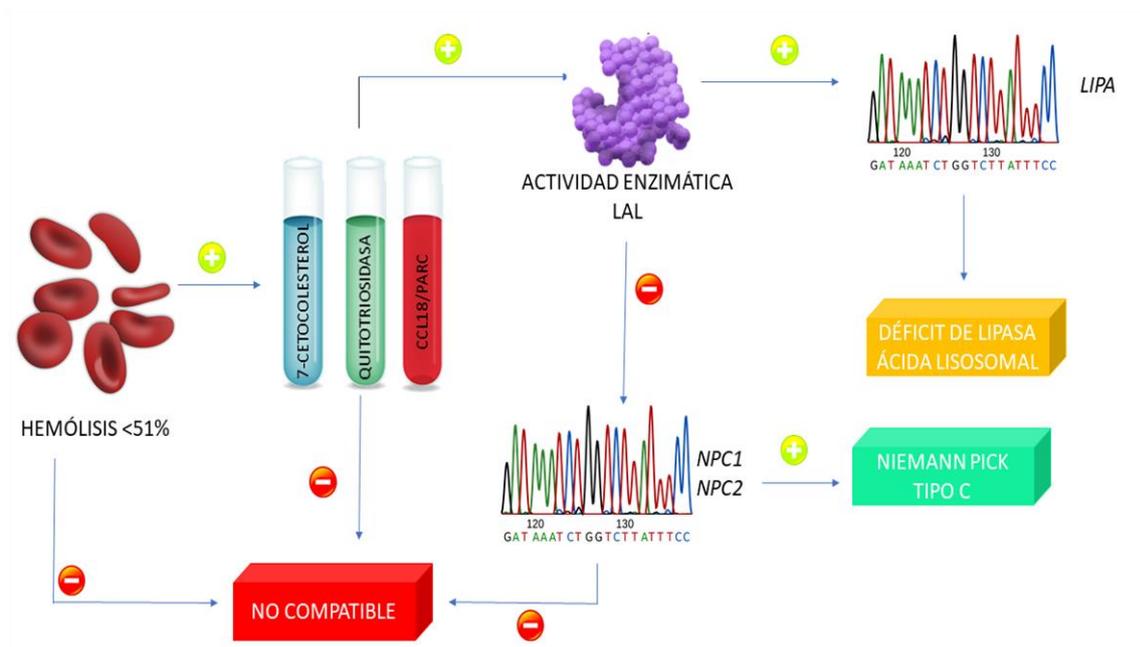


Figura 5.1.5 Protocolo de estudio de muestras en función del resultado del test de hemólisis. Representación de la diferencia de resistencia eritrocitaria observada a una concentración de solución salina del 0,49% entre los sujetos afectados de NP-C, los sujetos afectados de DLAL y el grupo control.
* $p = 0,00$. ** $p = 0,01$.

5.1.1.2.2 Aplicación del test de hemólisis para la monitorización de pacientes

Un grupo formado por 10 pacientes (2 NP-C, 8 DLAL) fue monitorizado para analizar el porcentaje de hemólisis producido por una solución salina al 0,49% en el seguimiento de la respuesta al tratamiento.

Los pacientes de DLAL en tratamiento con Sebelipasa (Alexion, USA) presentaron un incremento en el % de hemólisis, llegando a valores superiores al 51%. El paciente DLAL-1, que no ha recibido tratamiento, mantiene la disminución en el grado de hemólisis. (Figura 5.1.6). En todos los casos el paciente ha recibido tratamiento durante un mínimo de dos meses antes de la determinación en la que se observa la mejora, en los casos DLAL-2, DLAL-4 y DLAL-5 se observa una nueva disminución en el porcentaje de hemólisis en la última determinación, sin que exista un empeoramiento del resto de biomarcadores en estos sujetos, por lo que es necesario seguir controlando a estos pacientes para determinar si se trata de una alteración puntual, o si se trata de un indicador temprano de empeoramiento del paciente.

Los dos pacientes de enfermedad de NP-C monitorizados no muestran una mejora en este marcador, uno de ellos no está en tratamiento y el otro parece no ser un buen respondedor al tratamiento con Miglustat (Actelion a Janssen Pharmaceutical Company).

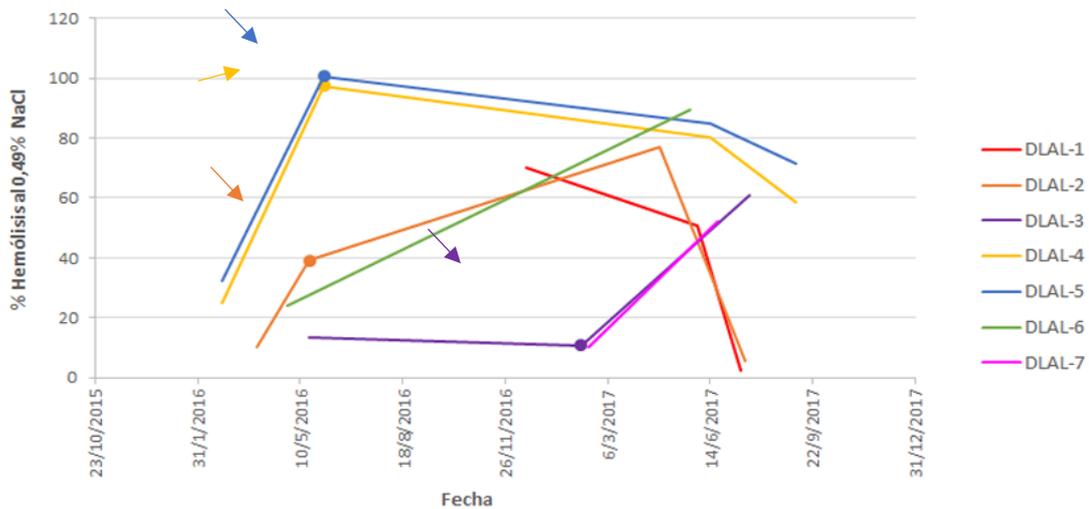


Figura 5.1.6 Gráfico de evolución de los pacientes de DLAL monitorizado. La primera muestra recibida tras el inicio del tratamiento está indicada con una flecha en cada uno de ellos.

5.1.1.3 Cuantificación del colesterol contenido en la membrana eritrocitaria

El contenido de colesterol contenido en la membrana eritrocitaria se evaluó en 73 sujetos de los cuales 10 eran afectados de EDL (5 afectados de DLAL y 5 de NP-C) y 63 eran controles sanos.

Los resultados obtenidos de la cuantificación (Tabla 5.1.1) no seguía una distribución normal, y no pudo adaptarse mediante conversión logarítmica ni fraccional por lo que se utilizó el método no paramétrico de Kruskal-Wallis para analizar si los valores obtenidos mostraban diferencias significativas entre los dos grupos, no siendo estas estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Muestra	Sexo	[Colesterol] (mg/mL)	Muestra	Sexo	Colesterol (mg/mL)	Muestra	Sexo	Colesterol[(mg/mL)
Control	♀	3,32	Control	♂	3,84	Control	♀	6,21
Control	♀	2,93	Control	♂	4,18	Control	♀	2,40
Control	♂	2,25	Control	♂	3,21	Control	♀	2,17
Control	♂	1,64	Control	♀	3,43	Control	♂	3,73
Control	♀	3,62	Control	♂	3,13	Control	♀	3,67
Control	♀	3,13	Control	♂	3,54	Control	♂	1,27
Control	♂	4,75	Control	♂	3,35	Control	♀	3,50
Control	♀	2,97	Control	♀	3,69	Control	♀	3,80
Control	♂	2,57	Control	♂	3,46	Control	♂	6,17
Control	♀	2,52	Control	♂	3,73	Control	♀	3,10
Control	♀	3,18	Control	♂	5,23	Control	♂	3,51
Control	♂	2,06	Control	♀	2,40	Control	♀	2,53
Control	♀	3,34	Control	♂	1,87	Control	♀	1,22
Control	♂	2,85	Control	♀	1,96	Control	♀	3,26
Control	♀	3,63	Control	♀	1,91	Control	♂	1,40
Control	♀	1,47	Control	♂	3,56	Afecto	♀	3,26
Control	♀	2,00	Control	♂	1,22	Afecto	♀	2,91
Control	♂	3,28	Control	♂	4,22	Afecto	♀	1,13
Control	♀	3,52	Control	♀	4,43	Afecto	♂	2,51
Control	♂	2,99	Control	♂	4,51	Afecto	♂	1,38
Control	♀	3,13	Control	♀	2,19	Afecto	♂	3,21
Control	♀	3,21	Control	♂	1,86	Afecto	♀	3,37
Control	♂	2,65	Control	♀	2,30	Afecto	♀	4,24
Control	♂	5,64	Control	♂	2,30	Afecto	♂	3,51
						Afecto	♀	3,78
Media		Control	3,11	2,30 – 3,63				
		Afecto	2,93	2,61 – 3,48				

Tabla 5.1.1. Concentración de colesterol embebido en la membrana eritrocitaria en los controles y pacientes analizados.

5.1.2 Valoración de la determinación combinada de biomarcadores

Para un grupo de 165 sujetos, no relacionados entre ellos, se ha realizado la determinación de la actividad quitotriosidasa, y se evaluó la concentración de la quimiocina CCL18/PARC y del oxisterol 7-cetocolesterol. En todos aquellos casos en que se disponía de información clínica se ha calculado el índice de sospecha de sufrir NP-C (NPC-SI).

El estudio genético permitió clasificar estos individuos en 148 sanos, 5 portadores de una variante asociada a patogenicidad y 8 sujetos con dos variantes descritas previamente como causales de NP-C y 4 individuos cuyas variantes se reclasificarán como causales de la enfermedad al finalizar este trabajo pero que ya se incluyen en el grupo de afectados para este análisis.

5.1.2.1 Validación de la utilidad del NPC-SI

Se disponía de información clínica de un 89,70% (148/165) de los sujetos, para los que se evaluó el NPC-SI utilizando la aplicación online existente (Ver enlaces).

Los riesgos obtenidos se clasificaron en elevado, medio y bajo con la intención de poder categorizar de forma conjunta aquellos sujetos menores de 4 años, y los mayores de esta edad. Para esta categorización se utilizaron los rangos de puntuación recomendados por los desarrolladores de la aplicación (Tabla 5.1.2).

	< 4 años	> 4 años
Riesgo bajo	< 3	< 20
Riesgo moderado	3-5	20-39
Riesgo elevado	≥ 6	≥ 40

Tabla 5.1.2. Equivalencias entre las puntuaciones obtenidas y el riesgo asignado por edad.

En la categoría de bajo riesgo se incluyeron a 21 sujetos (14,19%), en riesgo moderado 39 (26,35%) y el mayor grupo fue el formado con pacientes con un elevado riesgo de sufrir enfermedad de NP-C con 88 (59,46%) sujetos.

Según el estudio genético realizado a los 148 sujetos con información clínica, 11 de ellos eran afectados de la enfermedad, 5 portadores de esta y 132 no presentaban ninguna variante genética asociada con la enfermedad.

Ninguno de los sujetos afectados se encontraba englobado en la categoría de bajo riesgo. Todos los portadores y 3 afectados mostraban según el NPC-SI un riesgo moderado de sufrir la enfermedad mientras que los 8 afectados restantes se clasificaron correctamente en el grupo de alto riesgo.

Los tres afectados considerados de riesgo moderado presentaban únicamente sintomatología visceral, no habiendo desarrollado síntomas neurológicos en la fecha de presentación de este proyecto.

Considerando estos resultados la sensibilidad del NPC-SI es del 72,72%, mientras que su especificidad es del 42,85%.

5.1.2.2 Validación de la utilidad de la actividad quitotriosidasa

La actividad de la enzima quitotriosidasa se determinó, en una muestra de plasma, para los 165 sujetos. El estudio se realizó siguiendo los protocolos descritos en los apartados 4.2.1.1 y 4.2.2.1 de material y métodos.

Cuando los valores de actividad detectados eran inferiores a 23 o superiores a 75 nmol/mL/h se analizó la presencia de la duplicación de 24 pb en el gen *CHIT1*, que provoca la inactivación de la enzima (apartado 3.2.5 de material y métodos), y se corrigió la actividad detectada multiplicando por dos el valor obtenido en aquellos sujetos heterocigotos para la duplicación. Seis sujetos presentaron la duplicación de 24pb en homocigosidad, por lo que no tenían actividad quitotriosidasa y tuvieron que ser excluidos del estudio.

Los sujetos que no presentaban ninguna variante asociada a patogenicidad en los genes *NPC1* y *NPC2*, presentaron un valor medio de actividad quitotriosidasa de $82,10 \pm 144,00$ nmol/mL/h (media \pm desviación estándar), mientras que los sujetos portadores de una o dos variantes asociadas a la enfermedad de NP-C presentaban valores de $183,00 \pm 264,16$ nmol/mL/h y $567,42 \pm 528,09$ nmol/mL/h respectivamente.

Según la prueba t de Student la diferencia entre la media de los sujetos sanos (portadores o no de la enfermedad) y los afectados, es estadísticamente significativa ($p=0,009$; Figura 5.1.7) por lo que el valor de actividad quitotriosidasa es útil como sistema de cribado entre sujetos sanos y afectados, siempre que el sujeto no presente un genotipo nulo (homocigosidad para la duplicación).

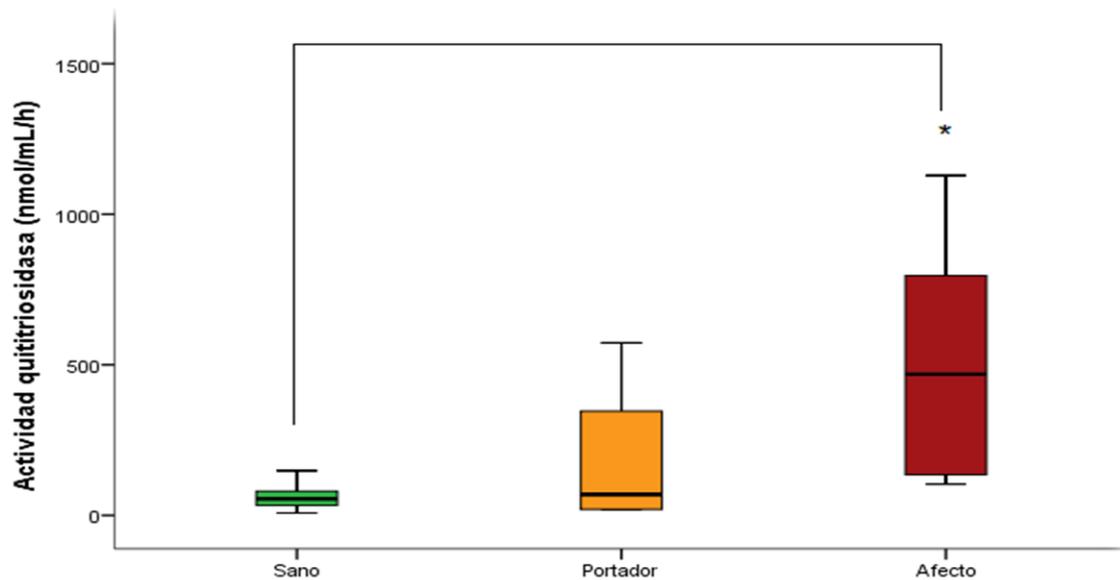


Figura 5.1.8 Boxplot con los resultados de actividad quitotriosidasa para cada grupo. $^* = p < 0,05$

Se realizó la curva ROC, comparando únicamente los individuos sanos frente a los afectos (Figura 5.1.8) que presentaba un AUC de 0,95 (IC=0,91-0,99) y estableciendo unos criterios de sensibilidad y especificidad del 100% y del 84% se estableció el punto de corte para la actividad quitotriosidasa en 102 nmol/mL/h.

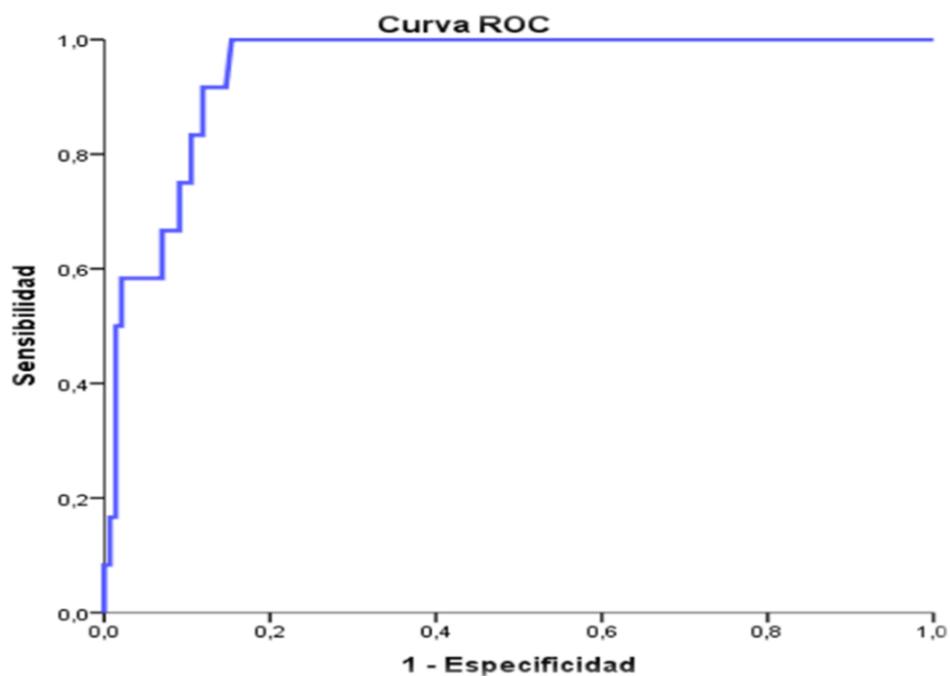


Figura 5.1.7 Curva ROC para la utilidad de la actividad quitotriosidasa como biomarcador de enfermedad de NP-C.

5.1.2.3 Validación de la utilidad de la concentración de CCL18/PARC

La concentración de la quimiocina CCL18/PARC se determinó, en una muestra de plasma, para los 165 sujetos. El estudio se realizó siguiendo los protocolos descritos en los apartados 4.2.1.1 y 4.2.2.2 de material y métodos.

Los sujetos sanos presentaban una concentración de $78,05 \pm 60,36$ ng/mL, los portadores de una variante patogénica tenían unos niveles de $129,80 \pm 66,49$ ng/mL, mientras que los afectados llegaban a niveles de $416,12 \pm 281,72$ ng/mL. Estas diferencias eran estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los sujetos sanos y los afectados (Figura 5.1.9).

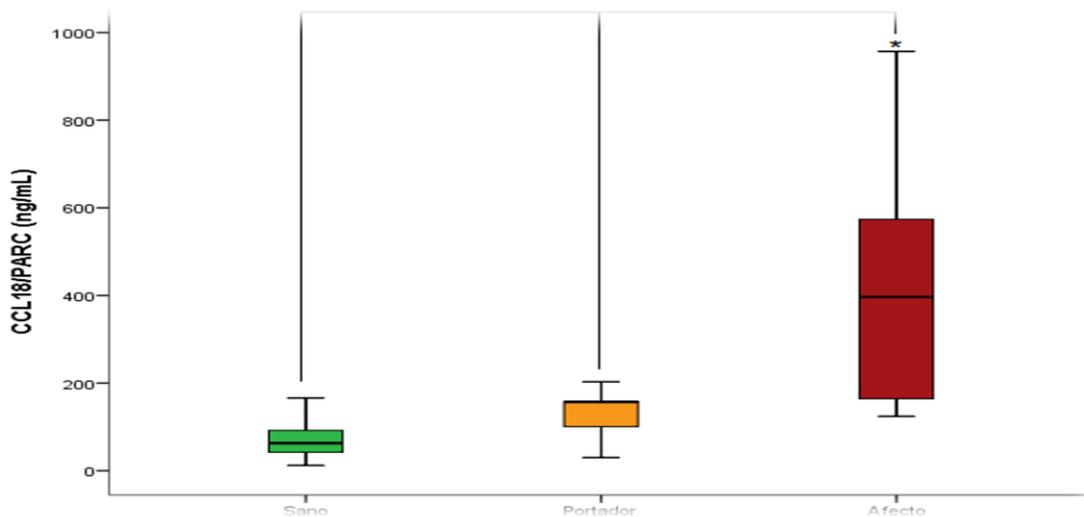


Figura 5.1.9 Boxplot con los resultados de la concentración CCL18/PARC para cada grupo. $*=p < 0,05$

La diferencia entre la media de los sujetos sanos y los afectados era estadísticamente significativa según la prueba t de Student. Además, la curva ROC (Figura 5.1.10) mostraba un AUC de 0,96 (IC=0,93-0,99) lo que permitió establecer, con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 84% un punto de corte para este biomarcador de 120 ng/mL.

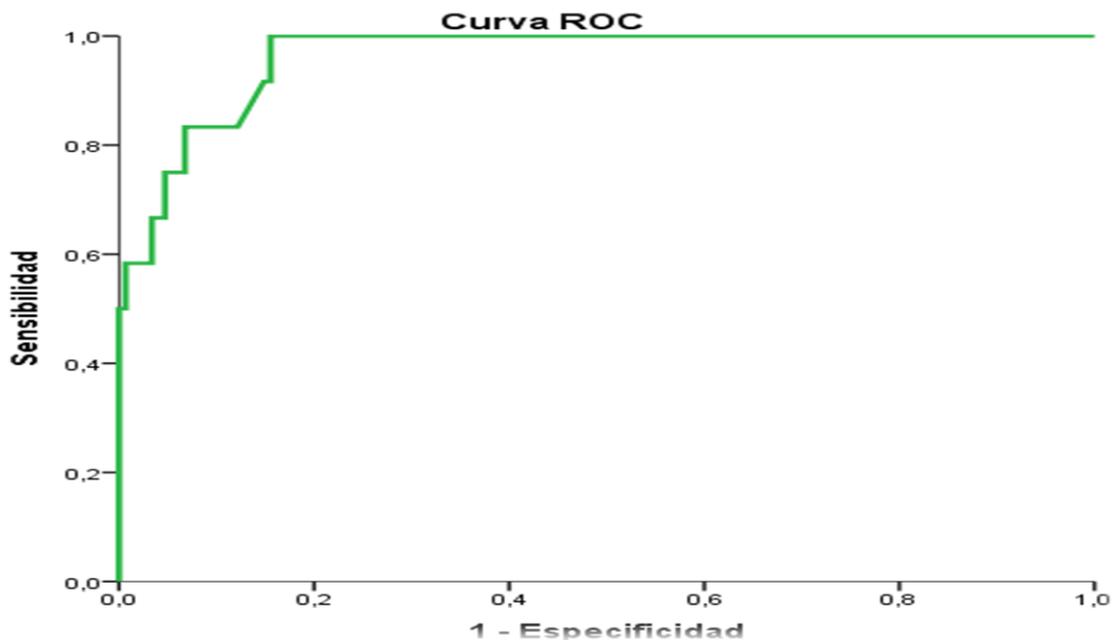


Figura 5.1.10 Curva ROC para la utilidad de la concentración de la quimiocina CCL18/PARC como biomarcador de enfermedad de NP-C.

5.1.2.4 Validación de la utilidad de la concentración de 7-cetocolesterol

La concentración del oxisterol 7-cetocolesterol se determinó, en una muestra de plasma conservada con BHT, para los 165 individuos. El estudio se realizó siguiendo los protocolos descritos en los apartados 4.2.1.1 y 4.2.2.3 de material y métodos.

Los sujetos sanos presentaban una concentración de $13,17 \pm 44,17$ ng/mL, los portadores de una variante patogénica tenían unos niveles de $913,40 \pm 1857,00$ ng/mL, mientras que los afectados llegaban a niveles de $580,85 \pm 812,13$ ng/mL. Estas diferencias eran estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre sujetos sanos y afectados (Figura 5.1.11). Los valores elevados detectados en los portadores, se deben a la existencia de tres individuos portadores con sintomatología clínica de los que se está ampliando el estudio. Cuando excluimos estos tres sujetos del estudio los valores de 7-cetocolesterol de los portadores se reducen a $10,24 \pm 11,67$ ng/mL y la diferencia entre portadores y afectados pasa a ser estadísticamente significativa.

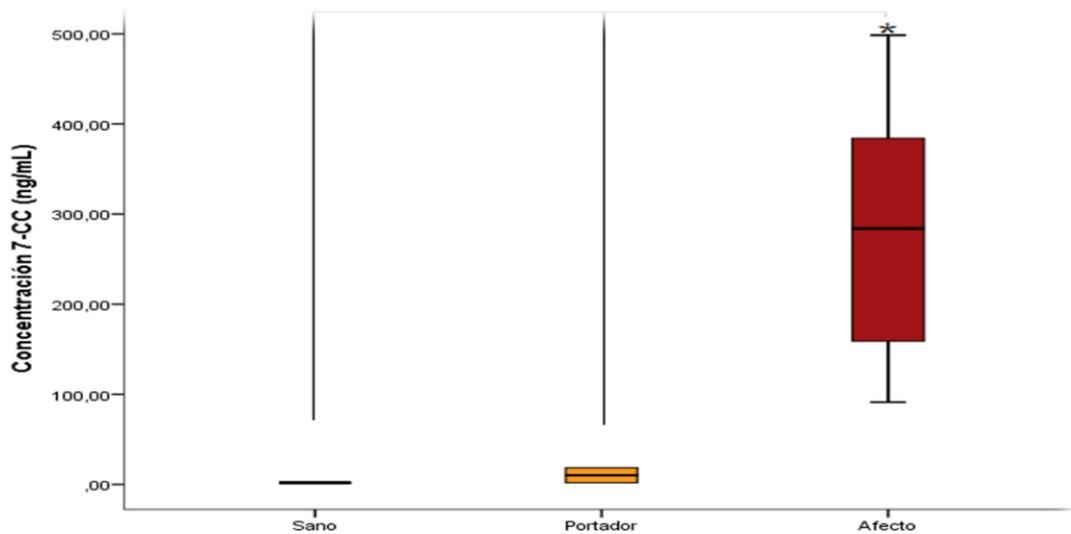


Figura 5.1.12 Boxplot con los resultados de la concentración de 7-CC para cada grupo. *= $p < 0,05$

La diferencia entre la media de los individuos sanos y los afectados era estadísticamente significativa según la prueba t de Student, así como la media entre los portadores y los afectados. Además, la curva ROC (Figura 5.1.12) mostraba un AUC de 0,99 (IC=0,97-1,00) lo que permitió establecer, con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 95% un punto de corte para este biomarcador de 59,9 ng/mL.

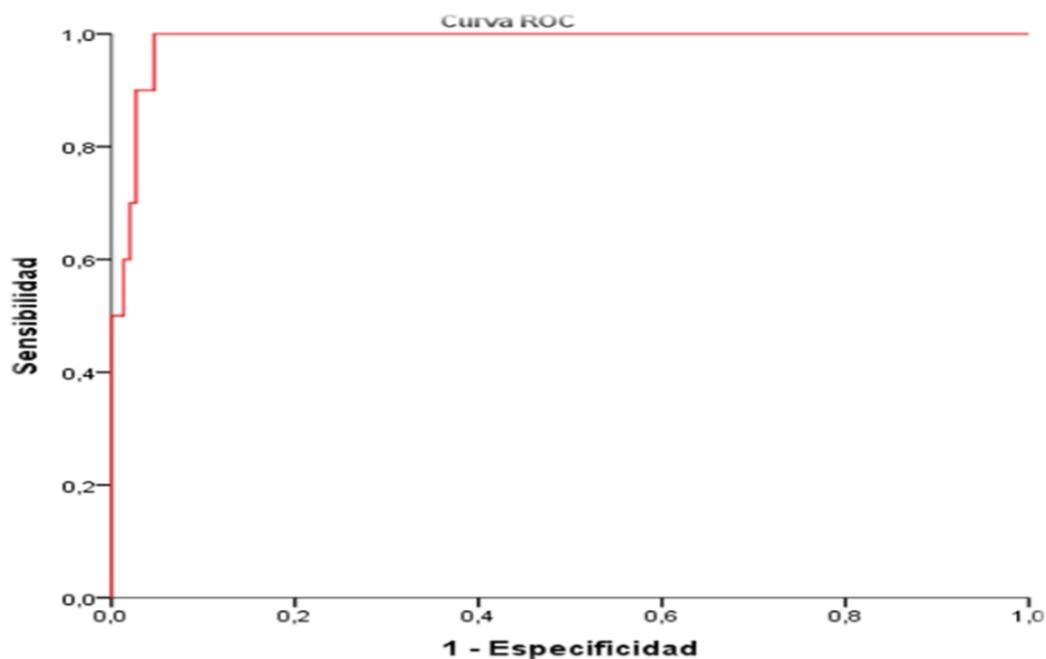


Figura 5.1.11 Curva ROC para la utilidad de la concentración del oxisterol 7-CC como biomarcador de enfermedad de NP-C

5.1.2.5 Valoración combinada de los tres biomarcadores

Solamente 14 individuos presentaban valores superiores al punto de corte establecido para los tres biomarcadores, y uno presentaba una actividad quitotriosidasa nula, pero valores superiores al punto de corte para CCL18/PARC y 7-CC (Tabla 5.1.3.).

Individuo	Estado	Qt (nmol/mL/h)	CCL18/PARC (ng/mL)	7-CC (ng/mL)
1	Portador	119,00	158,00	104,00
2	Portador	0,00	203,00	4232,00
3	Portador	573,00	157,00	210,50
4	Afectado	1837,00	834,00	498,50
5	Afectado	104,00	124,00	153,80
6	Afectado	139,00	151,00	1156,50
7	Afectado	653,00	178,00	333,50
8	Afectado	1129,00	514,00	388,20
9	Afectado	876,00	957,00	278,00
10	Afectado	113,00	208,00	91,30
11	Afectado	620,00	346,00	231,30
12	Afectado	716,00	634,00	239,90
13	Afectado	131,00	477,00	159,00
14	Afectado	173,00	447,00	384,10
15	Afectado	318,00	127,00	3006,00

Tabla 5.1.3. Estado y valores observados en los sujetos que mostraban elevación de los tres biomarcadores.

La utilización combinada de los tres biomarcadores permitió detectar a los 12 individuos afectos y a tres portadores con sintomatología clínica.

5.2 BLOQUE 02: ESTUDIOS GENÉTICOS

5.2.1 Caracterización de los genes *NPC1* y *NPC2* en población española

Se realizó un estudio de despistaje de enfermedad de NP-C en 180 individuos, no relacionados entre ellos.

De los individuos analizados noventa y ocho (54,1%) eran varones y ochenta y dos (45,3%) mujeres, con una media de edad de cuarenta y un años, comprendidos en un rango de 0 a 80 años.

Según los datos publicados, 135 de los individuos analizados no portaban ninguna variante asociada a patogenicidad para la enfermedad de NP-C, 10 sujetos se clasificaron inicialmente como afectados de la enfermedad por presentar dos variantes patogénicas, y 9 portadores de variantes asociadas a la misma. Los 26 sujetos restantes portaban variantes cuyo efecto se desconoce, dos de ellos presentaban deleciones del gen, uno tenía una deleción de gran tamaño y otro una deleción puntual.

Las principales manifestaciones clínicas de los individuos considerados afectos fueron clasificadas en tres grandes bloques: manifestaciones viscerales, neurológicas y/o psiquiátricas.

Las principales manifestaciones viscerales que se reportaron fueron visceromegalias (esplenomegalia y/o hepatomegalia), observándose en un 27,6% de los casos. Respecto a las manifestaciones neurológicas las más frecuentes fueron la ataxia (55,8%) y las alteraciones cognitivas, principalmente demencia (42,0%), seguidas de la parálisis de la mirada vertical (33,7) y la distonía (32,0%). Las manifestaciones psiquiátricas más frecuentes fueron los trastornos psiquiátricos (esquizofrenia, trastorno bipolar...) con una frecuencia del 40,3% (Tabla 5.2.1).

ALTERACIÓN	SÍNTOMA/SIGNO	CASOS DETECTADOS n	TOTAL n (%)
VISCERAL	Ascitis neonatal	0	0,00%
	Organomegalia (hepatomegalia y/o esplenomegalia)	51	28,24%
	Ictericia neonatal	13	7,65%
	Bilirrubinemia directa	0	0,00%
	Colestasis	4	2,20%
	Infiltrados pulmonares	0	0,00%
NEUROLÓGICA	Alteración del movimiento ocular vertical	61	33,70%
	Ataxia	101	55,80%
	Cataplejía	10	5,50%
	Convulsiones gelásticas	9	5,00%
	Demencia	76	42,00%
	Disatría y/o disfagia	37	20,40%
	Distonia muscular	58	32,00%
	Espasticidad	8	4,40%

ALTERACIÓN	SÍNTOMA/SIGNO	CASOS DETECTADOS n	TOTAL n (%)
	Mioclónía	9	5,00%
	Epilepsia	12	6,60%
	Discapacidad intelectual	0	0,00%
	Síntomas psicóticos (alucinaciones, ilusiones, etc.)	14	7,70%
PSIQUIÁTRICA	Alteraciones psicóticas (esquizofrenia, trastorno bipolar, etc.)	73	40,30%
	Resistencia a tratamientos antipsicóticos	12	6,60%
	Comportamiento agresivo	9	5,00%

Tabla 5.2.1. Descripción clínica de los 180 individuos analizados

El valor del NPC-SI fue calculado en el laboratorio siempre que las muestras fueran acompañadas de información clínica (85,60% de los casos). El test proporciona un valor numérico y un riesgo de padecer la enfermedad. En esta cohorte un 51,9% presentaban alto riesgo, un 22,1% un riesgo moderado y solamente un 11,6% de las muestras presentaban un riesgo bajo de padecer NP-C.

Entre los 10 individuos afectados de la enfermedad de NP-C, las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron las visceromegalias (5/10; 50,00%), desglosándose en 5 esplenomegalias (50,00%) y 3 hepato-esplenomegalias (30,00%). Los síntomas neurológicos más frecuentes fueron la ataxia y la demencia (4/10; 40,00%) y el psiquiátrico las alteraciones psicóticas (3/10; 30,00%). En la Tabla 5.2.2 se muestra la sintomatología presentada por cada uno de los sujetos.

		1*	2	3	4	5*	6	7	8	9	10	
VISERAL	Ascitis		x								x	
	Hepatomegalia		x					x			x	
	Esplenomegalia		x	x			x	x			x	
	Parálisis mirada vertical							x				
	Ataxia				x			x	x	x		
NEUROLÓGICA	Cataplejía								x			
	Demencia				x			x	x	x		
	Disfagia o Disartria								x	x		
	Distonía								x			
	Espasticidad											
	Mioclonias											
	Discapacidad intelectual						x		x			
	Hipotonía											x
	PSIQUIÁTRICA	Síntomas psicóticos										
		Alteraciones psicóticas				x			x		x	

Tabla 5.2.2. Información clínica de los individuos con mínimo 1 variante patogénica en el gen *NPC1*.

Antes de analizar los resultados obtenidos del análisis de las secuencias, se realizó un estudio de varios predictores online para las variantes génicas, con la intención de utilizar siempre el más indicado para los genes estudiados.

5.2.1.1 Valoración de programas de predicción de efecto de variantes genéticas

Entre los resultados obtenidos por diferentes sistemas de predicción existen discordancias notables, en este estudio se realizó una evaluación de los resultados obtenidos mediante varios algoritmos de predicción, con el objetivo de seleccionar los mejores predictores para los genes *NPC1* y *NPC2*. Estos resultados no coinciden completamente con los del artículo que se encuentra en revisión en la revista *Proteins*, ya que para la publicación se incluyó el gen *LIPA* que también afecta a la vía de transporte del colesterol a nivel lisosomal (Manuscrito 2).

5.2.1.1.1 Variantes localizadas en región exónica

Los predictores analizados proporcionaron un valor de riesgo de patogenicidad para cada variante (Tabla 5.2.3) y estos se dividieron dicotómicamente en base al punto de corte establecido en las guías de cada predictor para considerar una variante patogénica.

GEN	EFEECTO	SNPs	PROVEAN genómico	PROVEAN proteico	SIFT	Mutation Assessor	FATHMM -MKL
NPC1	Patogénico	rs28942108	-2,16	-2,16	0,05	2,38	0,99
NPC1	Patogénico	rs28942107	-3,60	-3,60	0,00	3,52	1,00
NPC1	Patogénico	rs28942106	-8,64	-8,64	0,00	3,77	0,99
NPC1	Patogénico	rs28942105	-4,80	-4,80	0,00	3,27	1,00
NPC1	Patogénico	rs28940897	-2,84	-2,84	0,08	1,94	0,98
NPC1	Patogénico	rs80358253	-5,40	-5,40	0,01	3,62	0,98
NPC1	Patogénico	rs80358254	-3,86	-3,06	0,00	3,24	0,99
NPC1	Patogénico	rs80358257	-7,78	-7,78	0,00	2,89	1,00
NPC1	Patogénico	rs80358258	-2,85	-2,85	0,01	3,18	1,00
NPC1	Patogénico	rs80358259	-3,84	-3,84	0,00	2,54	0,90
NPC1	Patogénico	rs120074130	-1,82	-1,82	0,22	2,85	1,00
NPC1	Patogénico	rs120074131	-3,50	-3,50	0,00	3,91	0,94
NPC1	Patogénico	rs120074132	-3,25	-3,25	0,03	3,45	0,96
NPC1	Patogénico	rs120074134	-3,98	-3,98	0,00	2,47	0,96
NPC1	Patogénico	rs120074135	-1,02	-1,02	0,20	1,80	0,91
NPC1	Patogénico	rs120074136	-10,97	-10,97	0,00	3,69	0,99
NPC1	Patogénico	rs372030650	-5,48	-5,48	0,05	3,47	0,99
NPC1	Patogénico	rs374526072	-3,84	-3,84	0,00	4,02	1,00
NPC1	Patogénico	rs483352885	-6,76	-6,76	0,00	2,99	0,99
NPC1	Patogénico	rs483352887	-7,00	-7,00	0,00	3,12	0,99
NPC1	Patogénico	rs483352888	-5,00	-5,00	0,00	3,00	0,99
NPC1	Patogénico	rs483352890	-5,52	-5,52	0,00	2,68	1,00
NPC1	Patogénico	rs483352891	-4,86	-4,86	0,00	3,72	0,98
NPC1	Patogénico	rs730880963	-3,76	-3,76	0,01	3,72	1,00
NPC1	Patogénico	rs876661319	-3,96	-3,96	0,01	3,10	0,99
NPC1	Benigno	rs13381670	-2,88	-2,88	0,00	2,35	0,99
NPC1	Benigno	rs61731969	0,32	0,32	1,00	-0,78	0,27
NPC2	Patogénico	rs11694	-3,59	-3,60	0,07	3,46	0,99
NPC2	Patogénico	rs80358260	-1,99	-1,96	0,37	2,74	0,99
NPC2	Patogénico	rs80358261	-2,58	-2,58	0,00	3,19	0,99
NPC2	Patogénico	rs80358264	-10,82	-10,82	0,00	3,85	0,99
NPC2	Patogénico	rs80358266	-2,20	-2,20	0,19	2,52	0,99
NPC2	Patogénico	rs104894458	-7,99	-7,99	0,00	3,84	0,99
NPC2	Patogénico	rs483352893	-1,36	-1,37	0,00	10,00	1,00
Benigno / Neutral cuando:			>-2,5	>-2,5	>0,05	<1,9	<0,5

GEN	CON EFECTO	SNPs	FATHMM Enf. Her	Polyphen2	SNPs&GO	SNPs&GO 3D	SNAP2
-----	------------	------	-----------------	-----------	---------	------------	-------

<i>NPC1</i>	Patogénico	rs28942108	-3,24	0,96	0,94		76,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs28942107	-3,64	1,00	0,99	0,99	94,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs28942106	-2,99	1,00	0,99	0,98	81,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs28942105	-2,87	1,00	0,97	0,99	93,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs28940897	-3,31	0,08	0,99	0,96	85,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs80358253	-4,22	1,00	0,99		82,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs80358254	-3,25	0,79	0,93	0,88	-47,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs80358257	-3,53	1,00	0,95	0,97	60,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs80358258	-2,10	1,00	0,96	0,93	14,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs80358259	-2,40	0,88	0,97	0,95	80,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs120074130	-4,49	1,00	0,93	0,95	44,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs120074131	-3,17	1,00	0,97	0,98	96,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs120074132	-3,33	1,00	0,94	0,98	87,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs120074134	-2,69	0,97	0,93	0,94	69,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs120074135	-3,32	0,01	0,74	0,42	47,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs120074136	-5,13	1,00	0,98	0,98	99,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs372030650	-3,36	0,43	0,95	0,92	16,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs374526072	-2,03	1,00	0,99	0,98	79,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs483352885	-2,43	0,94	0,97	0,94	42,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs483352887	-3,10	0,99	0,95	0,98	50,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs483352888	-3,96	0,99	0,95	0,94	61,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs483352890	-3,82	0,94	0,90	0,97	58,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs483352891	-4,34	1,00	0,98		66,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs730880963	-3,32	1,00	0,94	0,70	29,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs876661319	-3,47	0,87	0,95	0,89	29,00
<i>NPC1</i>	Benigno	rs13381670	-2,38	0,98	0,86	0,73	83,00
<i>NPC1</i>	Benigno	rs61731969	-1,94	0,00	0,55	0,54	-93,00
<i>NPC2</i>	Patogénico	rs11694	-2,34	1,00	0,76		58,00
<i>NPC2</i>	Patogénico	rs80358260	-2,46	1,00	0,44		24,00
<i>NPC2</i>	Patogénico	rs80358261	-2,64	1,00	0,54		76,00
<i>NPC2</i>	Patogénico	rs80358264	-7,51	1,00	0,93		87,00
<i>NPC2</i>	Patogénico	rs80358266	-0,97	0,97	0,55		12,00
<i>NPC2</i>	Patogénico	rs104894458	-4,01	1,00	0,82		64,00
<i>NPC2</i>	Patogénico	rs483352893	-2,39	0,98	0,22		44,00
Benigno/neutral cuando:			>-1,5	< 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	< 0

GEN	CON EFECTO	SNPs	PMuT	Hansa	MutPred 1	Predict SNP1	Predict SNP2
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs28942108	0,58	Con efecto	0,85	Neutral	1,00

<i>NPC1</i>	Patogénico	rs28942107	0,77	Con efecto	0,87	Con efecto	1,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs28942106	0,85	Con efecto	0,90	Con efecto	1,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs28942105	0,81	Con efecto	0,94	Con efecto	1,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs28940897	0,65	Con efecto	0,83	Con efecto	0,02
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs80358253	0,87	Con efecto	0,90	Con efecto	1,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs80358254	0,66	Con efecto	0,87	Neutral	1,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs80358257	0,66	Con efecto	0,91	Con efecto	1,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs80358258	0,80	Con efecto	0,86	Con efecto	1,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs80358259	0,74	Con efecto	0,95	Con efecto	1,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs120074130	0,34	Con efecto	0,97	Neutral	1,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs120074131	0,89	Con efecto	0,97	Con efecto	1,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs120074132	0,66	Con efecto	0,82	Con efecto	1,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs120074134	0,61	Con efecto	0,88	Con efecto	0,14
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs120074135	0,30	Neutral	0,80	Neutral	-1,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs120074136	0,81	Con efecto	0,97	Con efecto	1,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs372030650	0,74	Con efecto	0,85	Con efecto	0,08
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs374526072	0,87	Con efecto	0,90	Con efecto	1,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs483352885	0,67	Con efecto	0,58	Con efecto	0,16
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs483352887	0,86	Con efecto	0,65	Con efecto	1,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs483352888	0,73	Con efecto	0,69	Con efecto	1,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs483352890	0,73	Con efecto	0,64	Neutral	0,16
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs483352891	0,82	Con efecto	0,93	Con efecto	1,00
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs730880963	0,79	Con efecto	0,94	Con efecto	-0,27
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs876661319	0,73	Con efecto	0,64	Con efecto	1,00
<i>NPC1</i>	Benigno	rs13381670	0,58	Con efecto	0,22	Neutral	1,00
<i>NPC1</i>	Benigno	rs61731969	0,03	Neutral	0,57	Neutral	-1,00
<i>NPC2</i>	Patogénico	rs11694	0,74	Con efecto	0,81	Con efecto	1,00
<i>NPC2</i>	Patogénico	rs80358260	0,26	Con efecto	0,53	Neutral	1,00
<i>NPC2</i>	Patogénico	rs80358261	0,42	Con efecto	0,89	Con efecto	1,00
<i>NPC2</i>	Patogénico	rs80358264	0,80	Con efecto	0,99	Con efecto	1,00
<i>NPC2</i>	Patogénico	rs80358266	0,26	Con efecto	0,57	Neutral	0,64
<i>NPC2</i>	Patogénico	rs104894458	0,73	Con efecto	0,97	Con efecto	1,00
<i>NPC2</i>	Patogénico	rs483352893	0,69	Neutral	0,94	Neutral	-1,00
	Neutral cuando:		<=0,5	Neutral	<=0,5	Neutral	<0,06

Tabla 5.2.3. Datos crudos proporcionados por cada predictor

Para todos los predictores utilizados en este apartado del estudio, se obtuvo una elevada sensibilidad, que oscilaba del 75% al 100%. La exactitud y la precisión de las predicciones

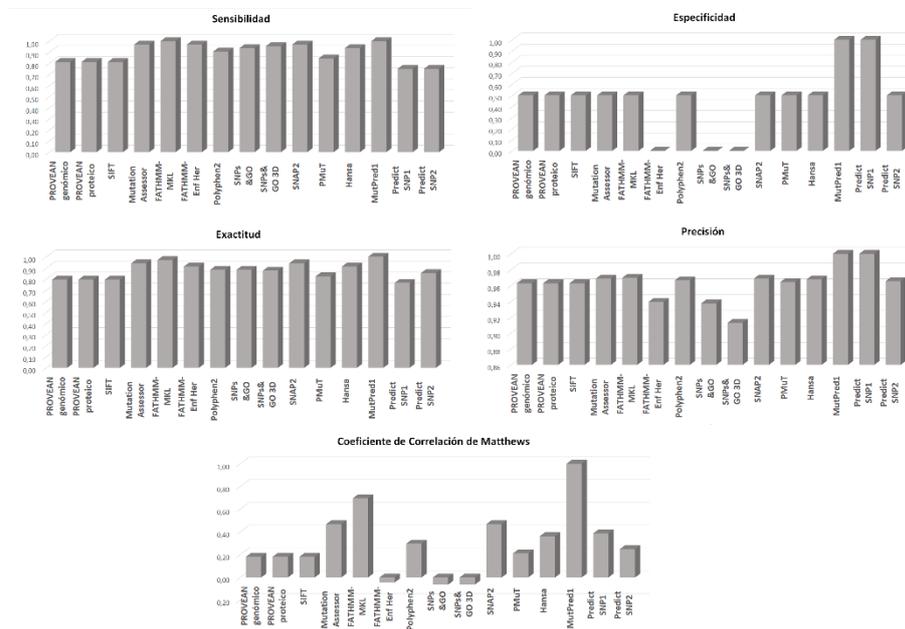


Figura 5.2.1 Representación gráfica de los valores de sensibilidad, especificidad, CCM, exactitud y precisión de cada predictor analizado

también eran muy elevadas (76-100% y 91-100% respectivamente; Figura 5.2.1.).

La eficiencia era muy variable entre los predictores, teniendo algunos como FATHMM en su versión para enfermedades hereditarias o las dos versiones de SNP&GO que valoraron erróneamente las dos variantes benignas analizada, por lo que su eficiencia fue del 0% (Figura 5.2.1).

El coeficiente de correlación de Matthew también presentaba grandes diferencias entre los predictores oscilando entre valores negativos y el 100% (Figura 5.2.1), también a causa de las predicciones falsamente patogénicas.

Se utilizaron curvas ROC para evaluar los predictores, obteniendo un área bajo la curva (AUC) de 1 para el predictor MutPred1 (Figura 5.2.2.).

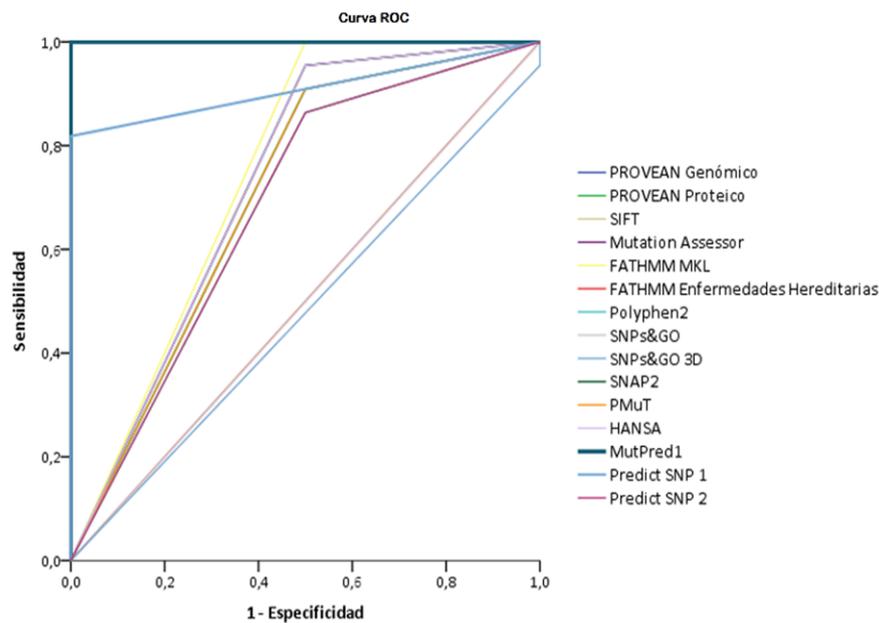


Figura 5.2.2 Curvas ROC para los predictores de efecto de variantes en regiones exónicas. El AUC para MutPred1 es de 1,00 siendo el mejor predictor. La curva para Predict SNP 1 tiene un AUC de 0,90

El predictor SNPs&GO 3D solo se evaluó para NPC1 ya que requiere la existencia de un modelo estructural de la proteína, y para NPC2 no existe.

5.2.1.1.2 Variantes localizadas en región intrónica

Los predictores se analizaron mayoritariamente por comparación entre los resultados obtenidos con la forma salvaje y la forma variante del gen. Los resultados se clasificaron en base a si existía o no alguna diferencia entre las dos formas (Tabla 5.2.4.)

GEN	EFEECTO	SNP	FATHMM-MKL	Predict SNP2	Splice Site Prediction	Human Splicing Finder	Sroogle
NPC1	Patogénico	rs483352892	0,91	-0,27	NO	SI	SI
NPC1	Patogénico	rs797044431			SI	SI	SI
NPC1	Benigno	rs72283949			NO	NO	NO
NPC1	Benigno	rs3745024	0,29	-0,49	NO	NO	NO
NPC1	Benigno	rs6507717	0,11	-1,00	NO	NO	NO
NPC1	Benigno	rs55809701			NO	NO	NO

GEN	EFEECTO	SNP	FATHMM-MKL	Predict SNP2	Splice Site Prediction	Human Splicing Finder	Sroogle
<i>NPC1</i>	Benigno	rs200103695	0,11	-1,00	NO	NO	NO
<i>NPC1</i>	Benigno	rs2510344	0,20	-1,00	NO	NO	NO
<i>NPC1</i>	Benigno	rs6507720	0,17	-1,00	NO	NO	NO
<i>NPC2</i>	Patogénico	rs80358268	0,99	1,00	NO	SI	SI
<i>NPC2</i>	Patogénico	rs879253740	0,99	1,00	NO	SI	SI

GEN	EFEECTO	SNP	FSPLICE	SPL	The GENSCAN	NetGene2 Server	SplicePort
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs483352892	SI	NO	NO	NO	NO
<i>NPC1</i>	Patogénico	rs797044431	SI	NO	SI	SI	NO
<i>NPC1</i>	Benigno	rs72283949	NO	NO	NO	NO	NO
<i>NPC1</i>	Benigno	rs3745024	NO	NO	NO	NO	NO
<i>NPC1</i>	Benigno	rs6507717	NO	NO	NO	NO	NO
<i>NPC1</i>	Benigno	rs55809701	NO	NO	NO	NO	NO
<i>NPC1</i>	Benigno	rs200103695	NO	NO	NO	SI	NO
<i>NPC1</i>	Benigno	rs2510344	NO	NO	NO	NO	NO
<i>NPC1</i>	Benigno	rs6507720	NO	NO	NO	SI	NO
<i>NPC2</i>	Patogénico	rs80358268	NO	NO	SI	NO	NO
<i>NPC2</i>	Patogénico	rs879253740	SI	SI	SI	SI	SI

Tabla 5.2.4. Datos crudos proporcionados por cada predictor.

Tres de los predictores evaluados, FATHMM-MKL, HSF y Sroogle obtienen la mayor puntuación en sensibilidad, especificidad, MCC, exactitud y precisión, pero FATHMM-MKL no permite evaluar variantes causadas por inserciones y deleciones, por lo que presenta una mayor proporción de datos perdidos (Figura 5.2.3).

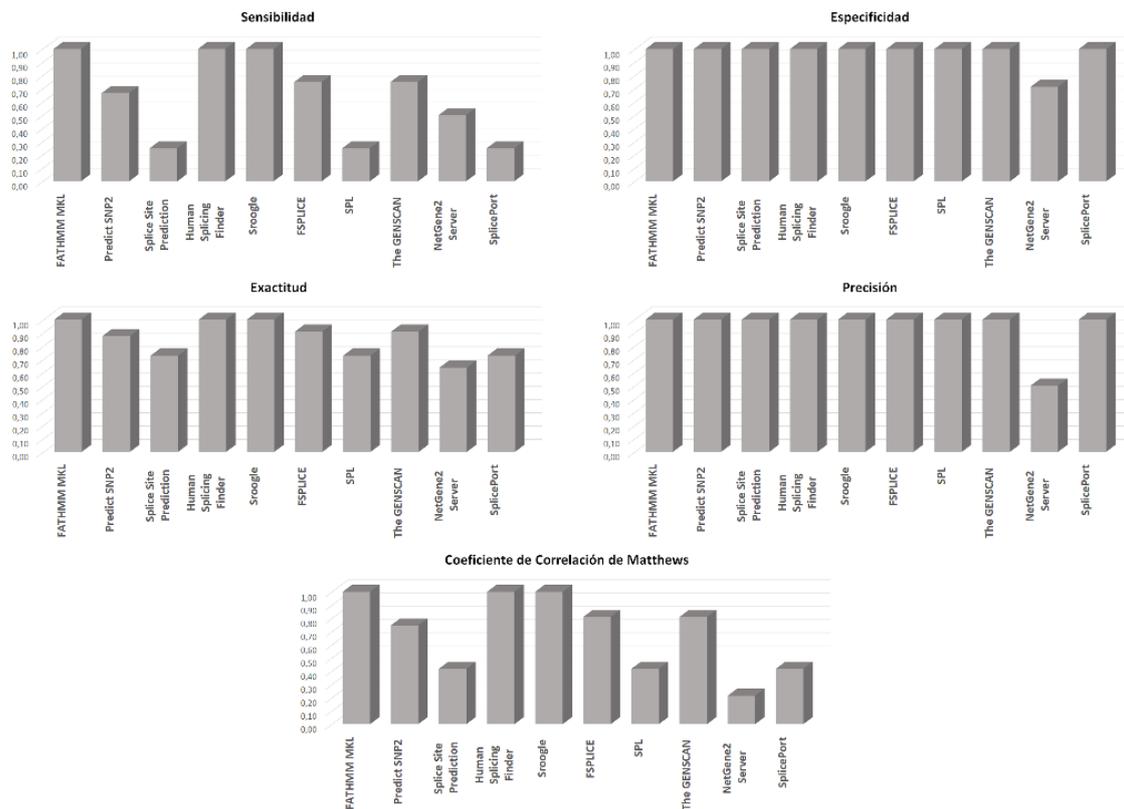


Figura 5.2.4 Representación gráfica de los valores de sensibilidad, especificidad, CCM, exactitud y precisión de cada predictor analizado.

Se realizaron curvas ROC para cada uno de los predictores, obteniendo valores de 1 de AUC para HSF y Sroogle (Figura 5.2.4.).

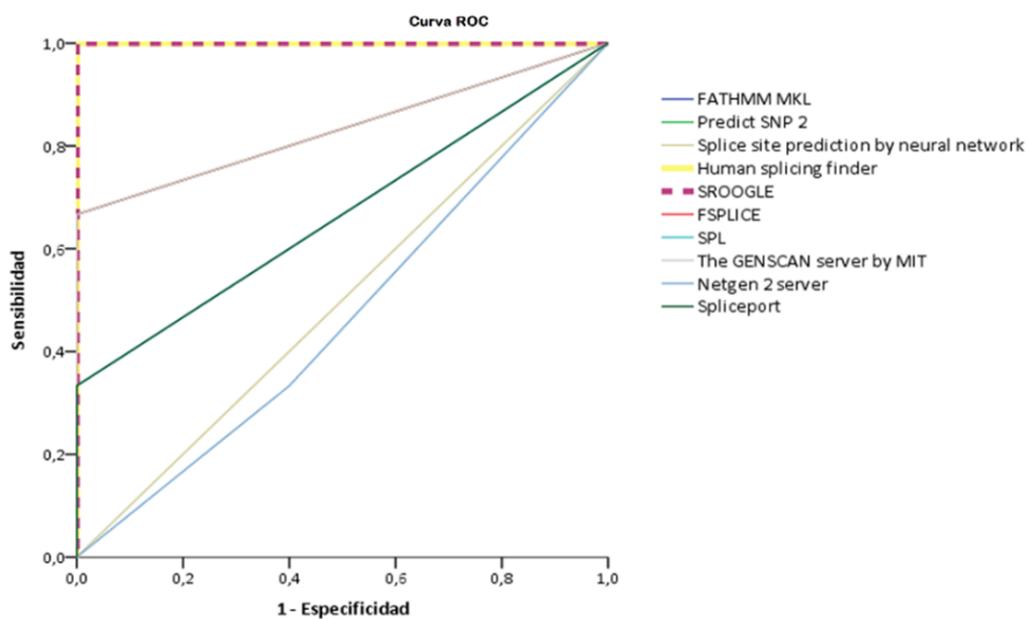


Figura 5.2.3 Curvas ROC para los predictores de efecto de variantes en regiones intrónicas. El AUC para Human Splicing Finder y Sroogle es de 1,00 siendo los mejores predictores.

5.2.1.2 Estudio de las variantes detectadas en el gen *NPC2*

De las 180 muestras analizadas solamente dos presentaron una variante en el gen *NPC2* en heterocigosidad.

En ambos casos se trataba de la sustitución de una guanina por una adenina en región intrónica (NG_007117.1:g.12067G>A; NM_006432.3_c.190+14G>A). Según la base de datos ClinVar se trata de una sustitución de significado incierto, y según las bases de datos 1000 genomas y ExAC se trata de una variante con una frecuencia superior al 1% tanto en población ibérica como en población europea-no finlandesa.

El estudio realizado en nuestras muestras mostraba una frecuencia del 0,5% por lo que no podría considerarse una variante frecuente en la población. Por ese motivo se procedió a realizar un análisis bioinformático mediante el predictor Human Splicing Finder. Los resultados mostraron una posible alteración en lugares de unión de factores reguladores del ajuste, pero según el programa no se consideró que pudiera tener suficiente impacto como para provocar cambios en la proteína.

Se solicitó muestra para poder hacer el estudio el RNA mensajero, con la intención de evaluar si la variante causaba algún efecto en el mismo, pero en ninguno de los dos casos nos remitieron la muestra solicitada.

Los pacientes no presentaban una elevación de los biomarcadores 7-CC ni QT, solamente uno de ellos mostraba una ligera elevación del biomarcador CCL18/PARC. La sintomatología clínica de los dos pacientes tampoco presentaba rasgos comunes, ya que uno de ellos era una mujer en edad geriátrica con sintomatología neurológica, el otro era un neonato con clínica visceral (Tabla 5.2.5). Ambos sujetos siguen vivos en la fecha de presentación de este proyecto.

ID	Demográficos		Biomarcadores			Sintomatología		
	Sexo	Edad	CCL18/PARC	QT	7-CC	Visceral	Neurológica	Psiquiátrica
1	♀	80	164,00	92,00	<2,00	No	Distonía	Depresión
2	♂	0,1	0,13	22,00	22,90	Esplenomegalía	No	No

Tabla 5.2.5. Descripción demográfica, niveles de biomarcadores y sintomatología clínica de los sujetos con variantes en *NPC2*.

5.2.1.3 Estudio de las variantes detectadas en el gen *NPC1*

De los 180 individuos analizados, dieciocho (9,90%) de ellos no presentaba ninguna variante respecto a la secuencia salvaje del gen *NPC1*.

Diez de ellos presentaban dos variantes conocidas, asociadas a patogenicidad en heterocigosis, y nueve una única variante patogénica también en forma heterocigota. De estos, cinco presentaban una variante de significado incierto que, en tres casos, ha podido ser reclasificada como patogénica. Además, uno de los sujetos estudiados presentaba una delección homocigota de una base, variante no descrita hasta el momento y otro una delección homocigota del exón 1 del gen *NPC1* (Figura 5.2.5).

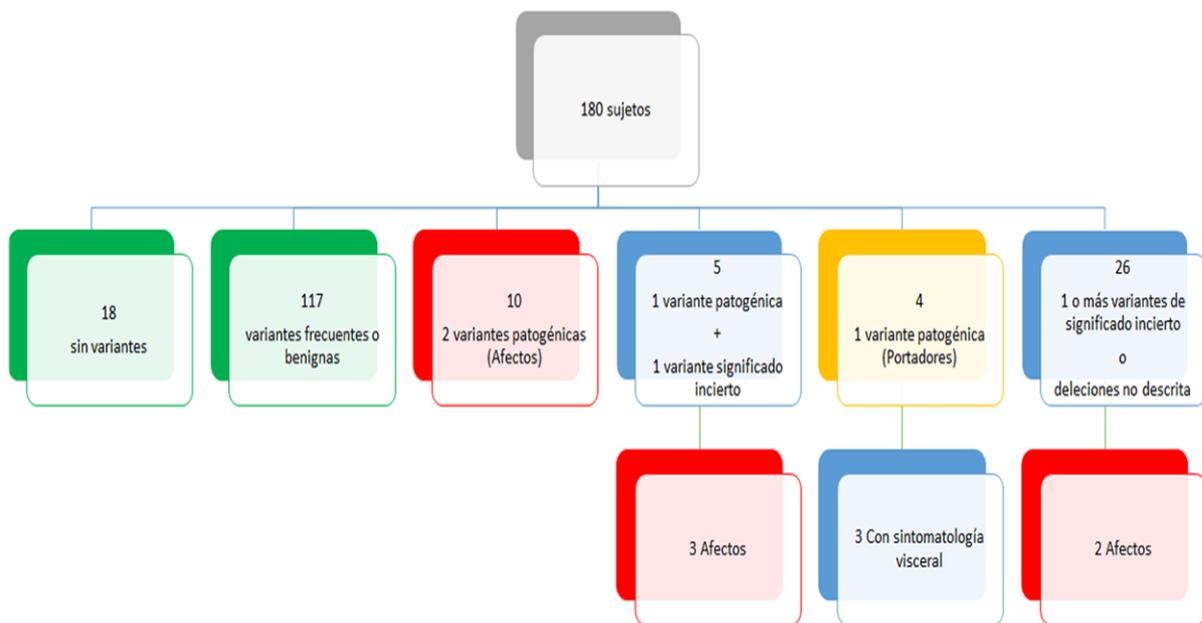


Figura 5.2.5 Esquema con los resultados del análisis de las 180 secuencias de *NPC1*.

En total se observaron 64 variantes, 41 de las cuales se localizaban en región exónica y por lo tanto podían afectar a la secuencia de la proteína (Figura 5.2.6) y el resto se ubicaban en los intrones pudiendo tener efecto a nivel de ajuste de la secuencia del mRNA. Según la información recogida a fecha 11 de noviembre de 2017 en la base de datos ClinVar o la literatura publicada, 17 de ellas eran benignas, 5 variantes de significado incierto, 23 patogénicas y para las 19 restantes no existía información sobre su efecto en la base de datos o existían conflictos en la interpretación del mismo.

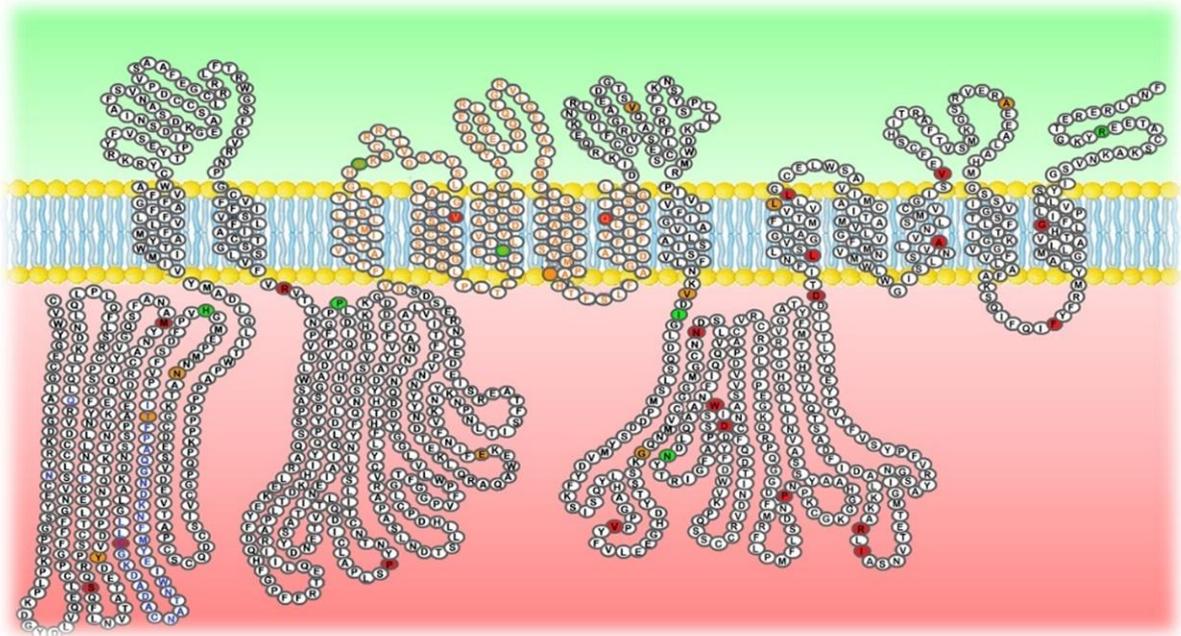


Figura 5.2.6 Estructura de la proteína NPC1. En color azul se muestran las posiciones de reconocimiento de esteroides, y en color naranja la región SSD. Con el fondo verde se identifican las variantes benignas, en naranja las de significado incierto y en rojo se identifican las posiciones observadas con cambios asociados a patogenicidad. Adaptación de Davies and Ioannou, J Biol. Chem. 275:24367-74 (2000).

5.2.1.3.1 Variantes con efecto neutral

Las muestras analizadas presentaron un total de 17 variantes publicadas en las bases de datos como benignas o posiblemente benignas (Tabla 5.2.6).

La frecuencia descrita para estas variantes y la observada en nuestro estudio no mostró diferencias estadísticamente significativas, excepto para las variantes NM_00271.3:c.1947+14G>T cuya frecuencia era inferior a la esperada según las bases de datos consultadas, y NM_00271.3:c.1947+16dupG cuya frecuencia era mucho menor que la esperada según 1000 genomas (0,26% vs 16%) pero coincidía con la del CIBERER.

Tres de estas variantes no se habían descrito previamente en población ibérica según la base de datos 1000 genomas, aumentando esta cifra hasta seis si nos referimos a la población española control utilizada en el registro de variantes del CIBERER.

Variante	Frecuencia proyecto	Frecuencia publicada	
		CIBERER	1000 genomas
NM_000271.3:c.-238C>G	20,00%	NA	16,00%
NM_000271.3:c.-22A>C	6,67%	NA	3,00%
NM_000271.3:c.387T>C	15,56%	19,00%	17,00%
NM_000271.3:c.463+19A>G	0,83%	0,60%	1,00%
NM_000271.3:c.644A>G	34,72%	32,10%	36,00%
NM_000271.3:c.1300C>T	0,28%	NA	0,00%
NM_000271.3:c.1926G>C	58,89%	62,90%	36,00%
NM_000271.3:c.1947+8G>C	0,83%	NA	0,00%
NM_000271.3:c.1947+14G>T	0,28%	42,30%	1,00%
NM_000271.3:c.1947+16dupG	0,28%	NA	16,00%
NM_000271.3:c.2073G>A	0,28%	0,60%	2,00%
NM_000271.3:c.2514+6C>T	0,28%	NA	0,00%
NM_000271.3:c.2572A>G	44,72%	43,10%	45,00%
NM_000271.3:c.2793C>T	43,06%	43,10%	45,00%
NM_000271.3:c.2911+28T>C	45,56%	42,90%	45,00%
NM_000271.3:c.3754+34A>G	41,39%	42,60%	46,00%
NM_000271.3:c.3797G>A	5,56%	5,61%	3,00%

Tabla 5.2.6. Variantes con efecto neutral según los datos publicados en ClinVar. Se describe la frecuencia observada en nuestra población y las frecuencias publicadas para población española e ibérica. NA: Datos no publicados

Se realizó un test de chi cuadrado para comprobar si las variantes observadas se encontraban en equilibrio de ligamiento, detectando que NM_000271.3:c.-22A>C, c.1926G>C y c.2793C>T no presentaban este equilibrio ($p < 0,05$), pero solamente una de ellas se vio asociada un incremento en la concentración de quimiocina CCL18/PARC en aquellos sujetos que también presentaban una variante asociada a patogenicidad (test de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$).

La mayor parte de estas variantes se encuentran localizadas fuera del tercer bucle luminal y de las regiones transmembrana 9-13 (Figura 5.2.6).

5.2.1.3.2 Variantes con efecto patogénico

Se observaron 23 variantes patogénicas (Tabla 5.2.7), ya sea descrita en la base de datos ClinVar o en la literatura. La mayoría de estas variantes no tienen frecuencia poblacional descrita.

Variante	Frecuencia proyecto	Publicación
NM_000271.3:c.352-353delAG	0,59%	Yamamoto (1999) <i>Hum Genet</i> 105, 10
NM_000271.3:c.467T>C	0,29%	Pyle (2015) <i>Brain</i> 138, 276
NM_000271.3:c.530G>A	0,88%	Ribeiro (2001) <i>Hum Genet</i> 109, 24
NM_000271.3:c.1114C>T	0,29%	Fernandez-Valero (2005) <i>Clin Genet</i> 68, 245
NM_000271.3:c.1420C>G	0,29%	Jesús (2013) <i>Parkinsonism Relat Disord</i> 19, 91
NM_000271.3:c.1554-1009G>A	0,59%	Rodríguez-Pascau (2009) <i>Hum Mutat</i> 30, E993
NM_000271.3:c.1990G>A	0,29%	Park (2003) <i>Hum Mutat</i> 22, 313
NM_000271.3:c.2324A>C	0,88%	Millat (2001) <i>Am J Hum Genet</i> 68, 1373
NM_000271.3:c.2665G>A	0,29%	Yamamoto (1999) <i>Hum Genet</i> 105, 10
NM_000271.3:c.2746_2748delAAT	0,29%	Macías-Vidal (2011), <i>Clin Genet</i> 80, 39
NM_000271.3:c.2747A>G	0,29%	Lario (2016), <i>Med Clin</i> 146,11
NM_000271.3:c.2826G>T	0,29%	Ribeiro (2001) <i>Hum Genet</i> 109, 24
NM_000271.3:c.2830G>A	0,29%	Millat (2001) <i>Am J Hum Genet</i> 68, 1373
NM_000271.3:c.3019C>G	0,29%	Greer (1999) <i>Am J Hum Genet</i> 65, 1252
NM_000271.3:c.3175C>T	0,29%	Fernandez-Valero (2005) <i>Clin Genet</i> 68, 245
NM_000271.3:c.3182T>C	0,29%	Yamamoto (1999) <i>Hum Genet</i> 105, 10
NM_000271.3:c.3289G>A	0,29%	Millat (2005) <i>Mol Genet Metab</i> 86, 220
NM_000271.3:c.3317T>C	0,29%	Macías-Vidal (2011), <i>Clin Genet</i> 80, 39
NM_000271.3:c.3349dupC	0,29%	Macías-Vidal (2011), <i>Clin Genet</i> 80, 39
NM_000271.3:c.3451G>A	1,11%	Garver (2010) <i>J Lipid Res</i> 51, 406
NM_000271.3:c.3493G>A	0,29%	Sun (2001) <i>Am J Hum Genet</i> 68, 1361
NM_000271.3:c.3672C>G	0,29%	Fernandez-Valero (2005) <i>Clin Genet</i> 68, 245
NM_000271.3:c.3718G>A	0,29%	Runz (2008) <i>Hum Mutat</i> 29, 345

Tabla 5.2.7. Variantes con efecto patogénico según los datos publicados en ClinVar o en HGMD. Se describe la frecuencia observada en nuestra población y la publicación donde se describe su patogenicidad.

La variante patogénica NM_000271.3:c.3182T>C es la más frecuente según lo publicado para población europea tanto en la literatura como en la base de datos NPC-db2, en cambio en nuestro grupo de estudio es NM_000271.3:c.3451G>A la variante patogénica más común. La primera se localiza en el tercer bucle intralisoosomal, mientras que la más frecuente en nuestro estudio lo hace en el onceavo dominio transmembrana.

La mayor parte de las variantes patogénicas detectadas se localizan a partir del tercer bucle intralisoosomal (Figura 5.2.6).

5.2.1.3.3 Variantes con efecto incierto

Se observaron 5 variaciones puntuales cuyo efecto se definía como de significado incierto en la base de datos ClinVar, y otras 19 para las que se desconocía el efecto o existían conflictos entre varias publicaciones.

Se analizó la frecuencia de las diferentes variantes observadas en las bases de datos publicadas y en nuestra población (Tabla 5.2.8), además todas ellas se analizaron mediante predictores bioinformáticos utilizando en todos los casos Human Splicing Finder para valorar si la variante alteraba el patrón de ayuste, MutPred1 si la variante provocaba un cambio aminoacídico y FATHMM-MKL si la sustitución tenía lugar en región codificante pero no modificaba la secuencia de la proteína. Siempre que fue posible también se utilizaron predictores de estabilidad proteica (Tabla 5.2.9).

	Frecuencia proyecto	Frecuencia publicada	
		CIBERER	1000 genomas (IBS)
NM_000271.3:c.58-3601G>A	11,67%	NA	64,00%
NM_000271.3:c.385delT	0,56%	NA	NA
NM_000271.3:c.612C>T	0,56%	0,20%	0,00%
NM_000271.3:c.665A>G	0,83%	0,40%	0,00%
NM_000271.3:c.882-40T>A	1,11%	1,10%	0,00%
NM_000271.3:c.1554-880C>G	36,67%	NA	36,00%
NM_000271.3:c.1554-681C>T	3,33%	NA	3,00%
NM_000271.3:c.1554-74A>G	0,56%	NA	NA
NM_000271.3:c.1554-57G>A	0,28%	NA	0,00%
NM_000271.3:c.1654+58T>C	0,83%	NA	0,00%
NM_000271.3:c.1757delA	0,28%	NA	NA
NM_000271.3:c.1758-21A>G	0,28%	NA	0,00%
NM_000271.3:c.1947+90T>C	11,94%	NA	16,00%
NM_000271.3:c.2269G>A	0,28%	NA	NA
NM_000271.3:c.2428G>T	0,56%	1,10%	0,00%
NM_000271.3:c.2567T>C	0,28%	NA	NA
NM_000271.3:c.2711G>A	0,28%	NA	NA
NM_000271.3:c.2911+72C>T	1,67%	1,60%	1,00%
NM_000271.3:c.3331C>T	0,28%	0,60%	0,00%
NM_000271.3:c.3477+14C>T	0,56%	NA	NA

	Frecuencia proyecto	Frecuencia publicada	
		CIBERER	1000 genomas (IBS)
NM_000271.3:c.3561G>T	0,56%	0,20%	1,00%
NM_000271.3:c.3591+35C>T	0,56%	NA	0,00%
NM_000271.3:c.3592-70T>C	0,83%	1,50%	2,00%
NM_000271.3:c.3717C>T	0,28%	NA	0,00%

Tabla 5.2.8. Variantes con efecto de significado incierto o sin efecto descrito según los datos publicados en ClinVar.

Se describe la frecuencia observada en nuestra población y en las bases de datos. NA: variante no anotada en la base de datos

Variante	Resultados predictores "in silico"				
	HSF	MutPred1	FATHMM-MKL	iMutant2	DUET
NM_000271.3:c.58-3601G>A	NO	NA	NO	NA	NA
NM_000271.3:c.612C>T	SI	NA	SI	NA	NA
NM_000271.3:c.665A>G	SI	SI	SI	Desestabiliza	Estabiliza
NM_000271.3:c.882-40T>A	NO	NA	NO	NA	NA
NM_000271.3:c.1554-880C>G	NO	NA	NO	NA	NA
NM_000271.3:c.1554-681C>T	NO	NA	NO	NA	NA
NM_000271.3:c.1554-74A>G	NO	NA	NO	NA	NA
NM_000271.3:c.1554-57G>A	NO	NA	NO	NA	NA
NM_000271.3:c.1654+58T>C	NO	NA	NO	NA	NA
NM_000271.3:c.1757delA	SI	NA	NA	NA	NA
NM_000271.3:c.1758-21A>G	NO	NA	NO	NA	NA
NM_000271.3:c.1947+90T>C	NO	NA	NO	NA	NA
NM_000271.3:c.2269G>A	SI	SI	SI	Desestabiliza	Desestabiliza
NM_000271.3:c.2428G>T	NO	NO	NO	Desestabiliza	Desestabiliza
NM_000271.3:c.2567T>C	NO	SI	SI	Desestabiliza	Desestabiliza
NM_000271.3:c.2711G>A	SI	SI	SI	Estabiliza	Estabiliza
M_000271.3:c.2911+72C>T	NO	NA	NO	NA	NA
NM_000271.3:c.3331C>T	SI	NA	NO	NA	NA
NM_000271.3:c.3477+14C>T	NO	NA	NO	NA	NA
NM_000271.3:c.3561G>T	SI	NA	NO	NA	NA
NM_000271.3:c.3591+35C>T	NO	NA	NO	NA	NA
NM_000271.3:c.3592-70T>C	NO	NA	NO	NA	NA
NM_000271.3:c.3717C>T	SI	NA	SI	NA	NA

Tabla 5.2.9. Resultado del estudio de predictores "in silico" para las variantes de significado incierto. NA: no analizable. SI: con efecto en el ajuste. NO: sin efecto en el ajuste.

Tres de estas variantes (NM_000271.3:c.387delT, c.1654+58T>C y c.3592-70T>C) se encuentran en desequilibrio de ligamiento. No se observaron diferencias estadísticamente significativas que asocien a dos de estas variantes (NM_000271.3:c.1654+58T>C y c.3592-70T>C) con los valores de biomarcadores o con la sintomatología clínica que presentaban los sujetos a estudio ($p < 0,05$). La tercera variante en desequilibrio de ligamiento (NM_000271.3:c.387delT) resultó presentar un efecto patogénico como se explica en el apartado 5.2.2.1.4 de esta tesis.

La mayoría de estas variantes se localizan en región intrónica, aquellas que se localizan en región exónica (Figura 5.2.6) son mayoritariamente, aunque no todas, sustituciones sinónimas que no afectan a la secuencia aminoacídica de la proteína.

Una de estas variantes detectadas, la NM_000271.3:c.665A>G presenta controversia sobre su efecto, ya que se ha descrito como patogénica en algunas publicaciones pero también como benigna. Esta variante codifica para el cambio NP_000262:p.Asn222Ser causante de la pérdida de un lugar de N-glicosilación.

En el siguiente apartado se describe como algunas de estas variantes de significado incierto han podido reclasificarse en variantes patogénicas o benignas.

5.2.2 Evaluación del efecto de variantes de significado incierto

Como se ha comentado en el apartado anterior, a partir del análisis de las 180 secuencias, se detectaron 25 variantes de significado incierto y una deleción del exón 1 no publicada hasta el momento. Para diez de estas conseguimos realizar una ampliación del estudio para poder caracterizarlas, cuatro de ellas han resultado ser variantes asociadas a patogenicidad y las otras seis han demostrado ser variantes sin efecto. A continuación se describen los resultados.

5.2.2.1 Descripción de nuevas variantes patogénicas

A continuación, se describen las variantes observadas, no descritas previamente y cuyo efecto es patogénico.

5.2.2.1.1 NM_000271.4:c.2567T>C (NP000262:p.Val856Ala)

El trabajo que se presenta a continuación se publicó en la revista Neurología, en agosto de 2017. (Manuscrito 3).

La paciente de 26 años y etnia bereber presentaba disartria, hipomimia facial, parálisis de la mirada vertical, bradicinesia global con mioclonias y marcha atáxica. El NPC-SI de la paciente era de 104. Se determinaron los biomarcadores para EDL presentando valores por encima del rango normal en los tres (CT, CCL18/PARC y 7-CC) y se secuenciaron los genes *NPC1* y *NPC2*, observándose dos variantes en heterocigosidad en el gen *NPC1*. Una de ellas descrita previamente (NP000262:p.Ile1061Thr), y la otra una variante no registrada hasta el momento (NP000262:p.Val856Ala).

Para confirmar que la paciente no presentaba otra patología se descartaron la enfermedad de Gaucher, NP-A/B y DLAL mediante la determinación de actividades enzimáticas.

Se realizó el estudio bioinformático de la nueva variante, se analizó mediante MutPred1 y PredictSNP1 que la consideraron posiblemente patogénica. Del mismo modo se utilizaron los predictores de estabilidad proteica DUET y i-Mutant2 que indicaron una disminución de la entropía en la proteína (Tabla 5.2.10).

	MutPred1	PredictSNP1	DUET ($\Delta\Delta G$)	i-Mutant2 ($\Delta\Delta G$)
NP000262:p.Val856Ala	0,731	51% patogénica	-1,457 Kcal/mol	-2,05 Kcal/mol
NP000262:p.Ile1061Thr	0,95	87% patogénica	-1,044 Kcal/mol	-2,15 Kcal/mol

Tabla 5.2.10. Predicciones de efecto para las dos variantes que presenta la paciente. Se han utilizado los predictores para región codificante mejor valorados en el apartado de resultados 4.3.1 y dos predictores de estabilidad

Mediante Clustal Omega se comparó la variante con las secuencias para el gen *NPC1* en 30 especies, observando que se trataba de una región altamente conservada (Figura 5.2.7), incluso más conservada que la posición de la otra variante patogénica que portaba la paciente.

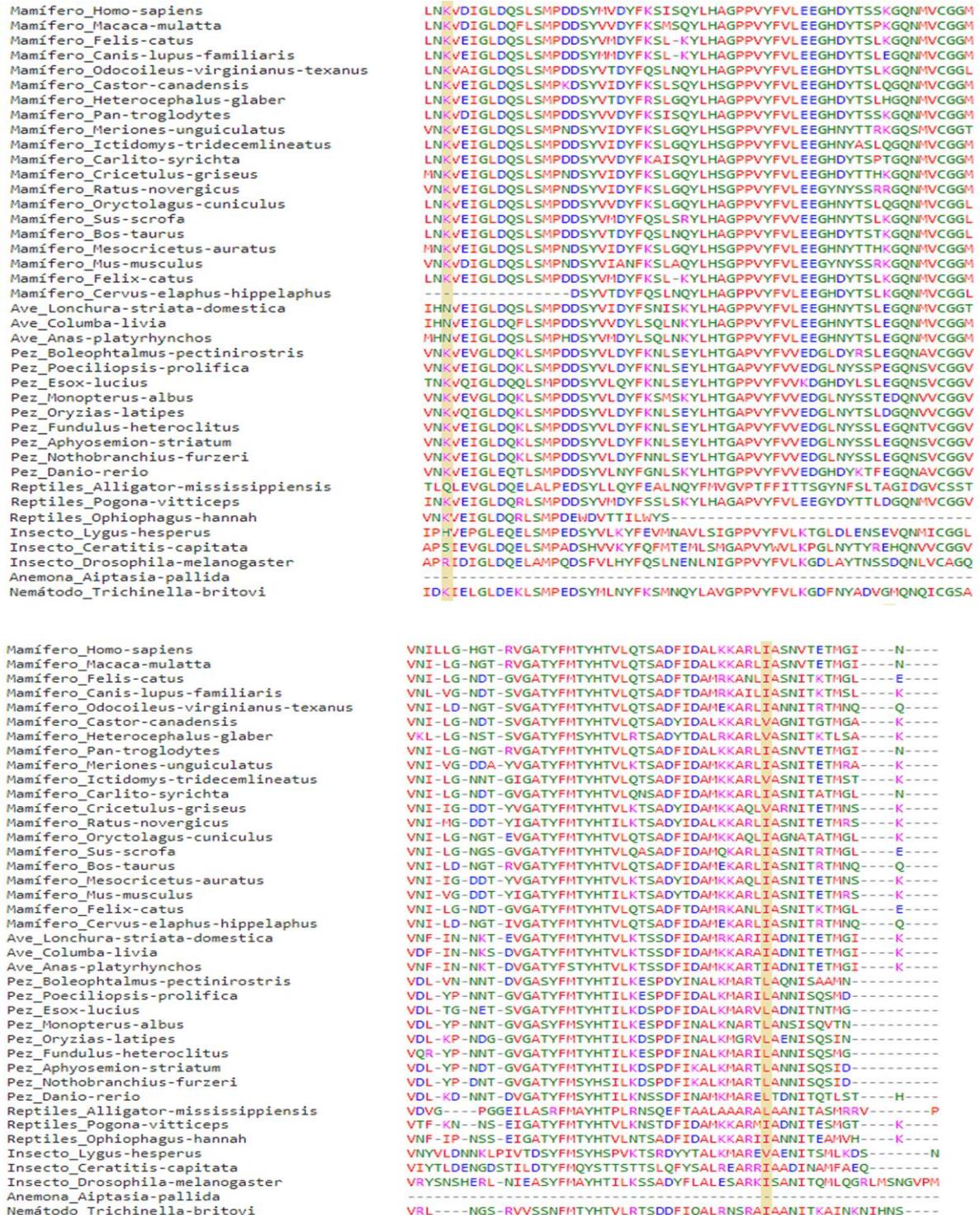


Figura 5.2.7 Alineamiento de parte de la secuencia de NPC1 entre diferentes especies. Imagen superior: Alineamiento de la nueva variante (p.Val856Ala), esta se encuentra remarcada con el fondo en color. Imagen inferior: Alineamiento de la variante ya conocida presentada por el paciente (p.Ile1061Thr), igual que antes se encuentra remarcada en color.

Finalmente, se realizó un estudio estructural, mediante el programa informático Swiss PDB Viewer v 4.1.0 (Instituto de Bioinformática Suizo, acrónimo en inglés SIB) solapando la estructura de la proteína salvaje con la estructura de la proteína con las variantes de la paciente, trabajando con la estructura registrada en el *Protein Data Bank* en 2016 con referencia 3JD8 (Figura 5.2.8).

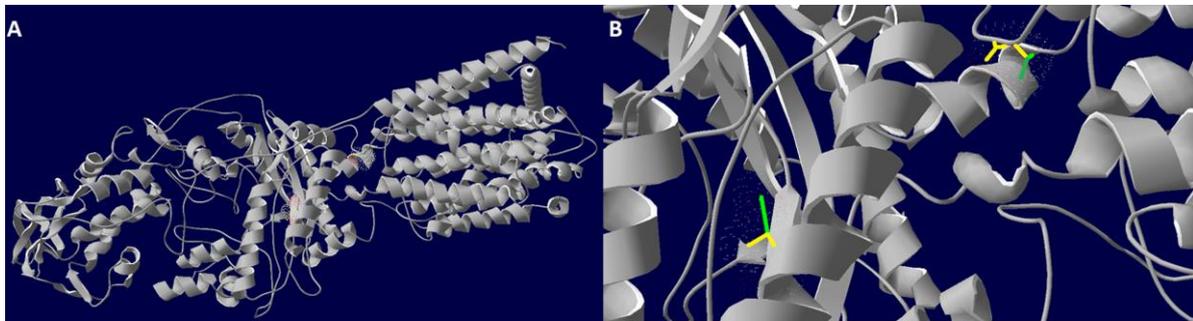


Figura 5.2.8 Estructura de la proteína NPC1 realizada con Swiss-PDBViewer. **(A)** Estructura de referencia utilizada (3JD8). **(B)** Aminoácidos modificados. En color amarillo se muestra la estructura solapante entre el aminoácido original y el variante, en color verde la región del aminoácido original que se diferencia del aminoácido variante.

El mismo programa permite analizar la energía correspondiente a cada aminoácido, observando nuevamente una disminución en la entropía tanto para la variante conocida como para la que se describe en este apartado (Tabla 5.2.11).

Residuo		Enlaces covalentes	Ángulos	Torsión	Corrección ángulos	van der Waals	Electro estática	Entropía total
856	Val	0,688	1,168	2,366	0,400	99999904	-2,690	99999904
856	Ala	0,321	0,484	2,295	0,353	25640	-2,240	25642
1061	Ile	1,329	1,301	3,564	0,332	36	-10,000	33
1061	Trh	0,747	1,273	2,553	0,220	-18	-16,680	-30

Tabla 5.2.11. Energía calculada por SwissProtViewer para cada aminoácido posible en la secuencia de nuestro paciente. Se observa una clara disminución de la energía total para las dos posiciones cuando el paciente presenta las variantes patogénica.

Según los estudios realizados, las guías del Colegio Americano de Genética Medica reclasificarían la variante como patogénica [176].

5.2.2.1.2 NM_000271.4:c.1757delA (NP000262:p.Glu586Glyfs*6)

El paciente en el que se observó esta nueva variante, reclasificada como patogénica era un varón de 22 meses de edad con hepato-esplenomegalia y afectación del sistema nervioso. Según la puntuación del NPC-SI para menores de 4 años, el paciente presentaba un alto riesgo de padecer NP-C.

Los tres biomarcadores plasmáticos presentaron valores elevados, por lo que se procedió a secuenciar los genes asociados a NP-C, observándose en *NPC1*, además de múltiples variantes conocidas sin efecto en la proteína y de alta frecuencia en la población, las variantes NM_000271.4:c.1575delA (NP000262:p.Glu586Glyfs*6) y NM_000271.4:c.2746_2748delAAT (NP000262:p.Asn916del) en heterocigosidad. Esta última se encuentra descrita con efecto patogénico en la bibliografía [177], mientras que la segunda no está registrada en ninguna de las bases de datos utilizadas tanto de variantes generales como en bases de datos específicas de NP-C.

Siguiendo el mismo esquema de trabajo que para la variante descrita en el apartado anterior, mediante determinación de actividades enzimáticas se descartó la presencia de otras enfermedades lisosomales con sintomatología compartida (EG, NP-A/B y DLAL), y se procedió a realizar el estudio bioinformático de la nueva variante.

Dado que se trata de una variante de cambio de marco de lectura el predictor MutPred1 no permite analizarla correctamente, ya que sólo interpreta el efecto del cambio de aminoácido (la glicina por el glutámico). Para los cambios de marco de lectura y generación de codón de parada la consideración general es que su efecto siempre es patogénico, dado que proteína de menor tamaño no pueden ser totalmente funcionales y por lo tanto no existe una gran variedad de predictores, por este motivo la disponibilidad de predictores bioinformáticos es escasa.

Se utilizaron los predictores SIFT, PROVEAN y Variant Effect Predictor. Los dos últimos indicaron que se trata de una variante que provoca un desplazamiento en el marco de lectura, sin dar más detalles al respecto. SIFT proporcionó la misma información, mostrando además que esta variante provocaba una pérdida de aminoácidos a partir del 592, y una activación de los mecanismos de degradación del RNA mediante mutación terminadora, de modo que esta secuencia de menor tamaño es eliminada y no se sintetiza proteína.

No se analizaron los predictores de estabilidad proteica dado que solo permiten el estudio de sustituciones aminoacídicas y no de pérdida de aminoácidos en la secuencia.

Siguiendo con el estudio como en el apartado 5.2.2.1.1 se procedió a la comparación filogenética para asegurar que en otros organismos la proteína más pequeña, de tan solo 592 aminoácidos no era la forma funcional, observando en el análisis que ningún organismo tenía la glicina en la posición del glutamato ni terminaban la secuencia en esta región (Figura 5.2.9.).

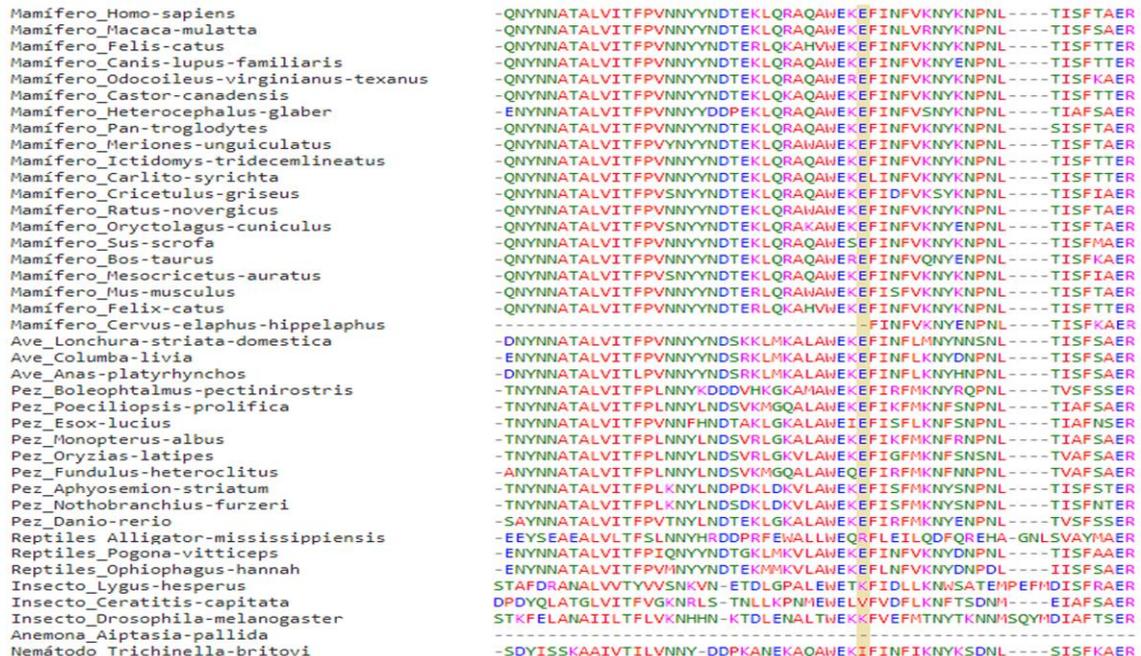


Figura 5.2.9 Alineamiento de parte de la secuencia de NPC1 entre diferentes especies. La región marcada corresponde a la posición 586, pudiendo apreciar su gran conservación y que en ningún caso aparece una glicina en esta posición.

Para terminar el estudio se analiza la estructura tridimensional de la proteína salvaje comparándola con la forma variante. Esta forma, en caso de sintetizarse, perdería 11 dominios transmembrana, y la región de reconocimiento de esteroides, relacionada con la homeostasis del colesterol (Figura 5.2.10).

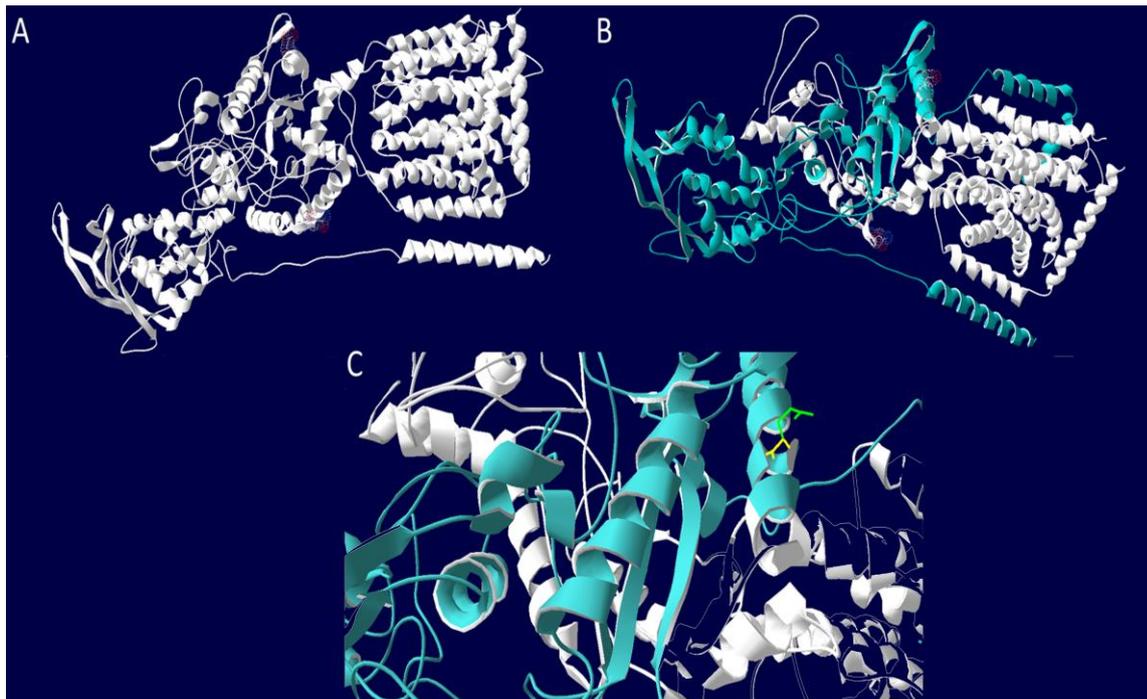


Figura 5.2.10 Estructura de la proteína NPC1. Imagen A: Proteína salvaje con los aminoácidos afectados marcados. Imagen B: En color verde se superpone la proteína que se formaría por la sustitución E586G. Imagen C: Detalle de la sustitución aminoacídica, en amarillo la zona común entre los dos aminoácidos y en verde la región exclusiva del glutámico

El estudio mediante secuenciación Sanger del RNA de este paciente mostró nuevamente las variantes observadas, y analizando la secuencia por codones se observó la aparición de un codón de parada con inicio en la posición NM_000271.4:c.1772.

La cuantificación de la expresión del gen *NPC1* mostró una expresión normal de mRNA.

5.2.2.1.3 NM_000271.4:c.2711G>A (NP000262:p.Gly904Glu)

La variante NM_000271.4:c.2711G>A (NP000262:p.Gly904Glu) fue detectada en forma heterocigota en un sujeto del que solamente se pudo analizar la secuencia genética ya que remitieron DNA y no sangre completa.

Mediante secuenciación Sanger de los genes *NPC1* y *NPC2*, se observó una heterocigosis compuesta por la variante que se presenta y la variante NM_000271.4:c.3175C>T (NP000262:p.Arg1059Ter) publicada como variante patogénica a causa de la formación de un codón de parada a falta de más de 200 aminoácidos para completar la proteína [178].

El diseño de la estructura tridimensional de la proteína, con la nueva variante y no teniendo en consideración la deleción presente en el otro alelo, mostró que la nueva variante es mucho mayor, por lo que confiere mayor rigidez a la proteína en una región donde no debería tenerla (Figura 5.2.11.)

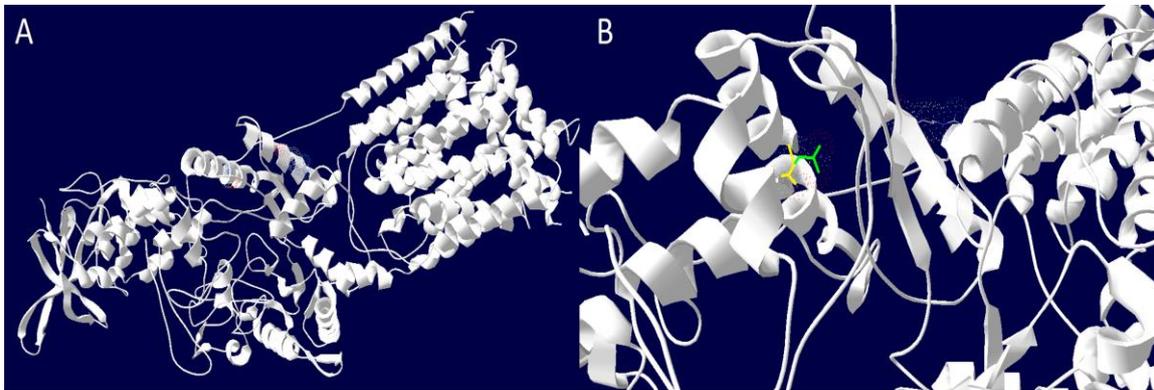


Figura 5.2.11 Estructura de la proteína NPC1. Imagen A: Proteína completa con los dos cambios que presenta el sujeto marcados. Imagen B: Detalle de la sustitución aminoacídica, en amarillo la zona común entre la secuencia salvaje y la variante y en verde la región presente únicamente en la forma variante

El estudio bioinformático para predecir el efecto de la nueva variante detectada se realizó mediante MutPred1 obteniendo un riesgo de patogenicidad del 57%. El estudio de estabilidad realizado mediante i-mutant2 también mostró una ligera disminución de la energía libre de Gibbs de la proteína variante respecto a la forma salvaje (-0.11 Kcal/mol) mientras que DUET indicaba un incremento de la estabilidad proteica debido a este cambio (0.733 Kcal/mol). El estudio filogenético confirmó una alta conservación del aminoácido modificado no observándose esa sustitución en ninguna de las especies analizadas y existiendo variaciones en esa posición sólo en las especies más alejadas como la *Drosophila melanogaster*, *Trichinella spiralis* o *Anthopleura aureoradiata* (Figura 5.2.12.).

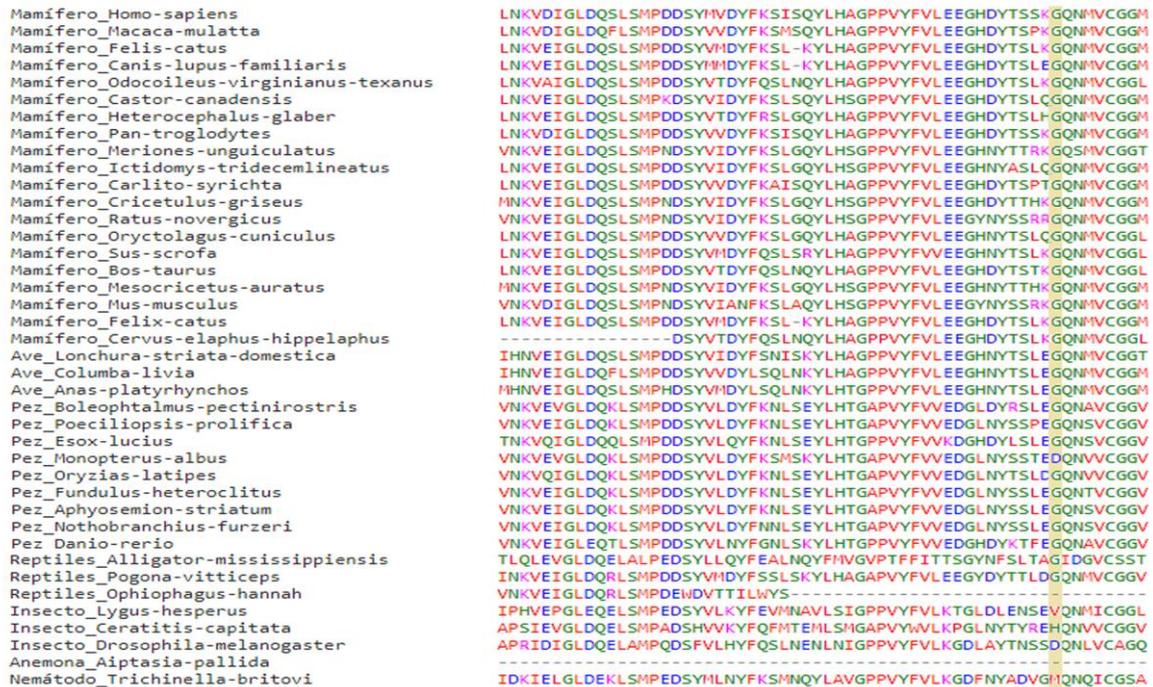


Figura 5.2.12 Alineamiento de parte de la secuencia de NPC1 entre diferentes especies. La región marcada corresponde a la posición 904.

5.2.2.1.4 NM_000271.4:c.385delT (NP000262:p.Tyr129Metfs*13)

Variante detectada en un varón de dos años que presentaba una esplenomegalia de 13cm y una grave encefalopatía. Se realizó la secuenciación del gen *NPC1* observándose en homocigosidad la variante no descrita c:385delT que provoca un corrimiento en el marco de lectura y genera un codón de parada a 13 aminoácidos del cambio.

Dado que la alteración generada no es un cambio aminoacídico ni una alteración en el ajuste fisiológico su efecto no pudo analizarse “*in silico*”, pero sí pudo hacerse el diseño tridimensional de la proteína deletada (Figura 5.2.13). El estudio conservacional no se consideró relevante ya que la proteína truncada es demasiado pequeña para ser funcional, ya que no presenta ninguna de las regiones transmembrana y pierde gran parte de la región de unión de colesterol y transferencia del mismo al lisosoma.

El análisis de la secuencia de RNA confirmó la presencia de la variante, y la cuantificación del exón 9 del gen *NPC1* mediante qPCR no detectó una disminución en la expresión de la misma.

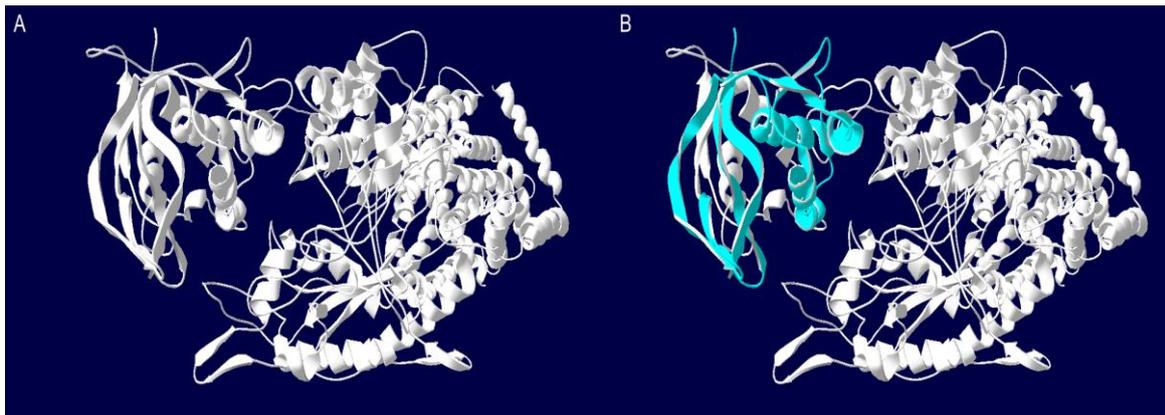


Figura 5.2.13 Estructura de la proteína NPC1. Imagen A: Proteína completa. Imagen B: Marcado en color azul la proteína que se sintetizaría a causa de la variante

5.2.2.1.5 Deleción del promotor y el exón 01 del gen *NPC1* (NP000262:p.X)

Esta variante se presentaba en forma homocigota en una niña de dos años que presentaba una severa afectación neurológica. Fue remitida desde otro centro, sin estudio genético, tras haber intentado tratarla con Miglustat® (Actelion, Suiza) y con ciclodextrinas (Vtesse, Maryland, USA) que debieron ser retiradas a causa de la baja tolerancia al tratamiento. Actualmente ha sido excluida del ensayo con Arimoclomol® (Orphazyme, Dinamarca) por no cumplir los criterios de inclusión.

Se realizó la secuenciación de los genes *NPC1* y *NPC2* en gota de sangre seca, obteniendo dos variantes descritas como benignas en homocigosidad en el gen *NPC1* y ninguna variante respecto a la secuencia salvaje en *NPC2*, pero el fragmento formado por la región 5'UTR y el exón 1 de *NPC1* no logró amplificarse. Tras repetir el estudio en DNA obtenido a partir de sangre total con el mismo resultado se amplió varias veces la región a analizar. El extremo 3' se delimitó dentro de la región del intrón 1 pero el 5'UTR no conseguimos delimitarlo, observándose una deleción de más de 7 kb.

5.2.2.2 Conversión de variantes de significado incierto a variantes benignas

Las variantes NM_000271.3:c.882-40T>A, NM_000271.3:c.1554-74A>G y NM_000271.3:c.1758-21A>G no presentan un efecto descrito en la base de datos ClinVar, y su frecuencia poblacional es inferior al 1% (Tabla 5.2.12). Así mismo las variantes NM_000271.3:c.612C>T y

NM_000271.3:c.3717C>T se presentan en las bases de datos como variantes de significado incierto.

	Efecto ClinVar	Frecuencia	Frecuencia publicada	
		proyecto	CIBERER	1000 genomas
NM_000271.3:c.612C>T	Conflicto de interpretación	0,56%	0,20%	0,00%
NM_000271.3:c.882-40T>A	NA	1,11%	1,10%	0,00%
NM_000271.3:c.1554-74A>G	NA	0,56%	NA	NA
NM_000271.3:c.1758-21A>G	NA	0,28%	NA	0,00%
NM_000271.3:c.3717C>T	VUS	0,28%	NA	0,00%

Tabla 5.2.12. Frecuencia de las variantes analizadas. El significado de estas variantes ha pasado de ser desconocido a ser neutral. NA: No se observa la variante en la población analizada .

Todas ellas se analizaron mediante predictores “*in silico*” para valorar si la sustitución aminoacídica producida o la alteración de la secuencia se podían considerar como teóricamente patogénicas obteniendo como resultado una posible patogenicidad para las variantes NM_000271.3:c.612C>T y NM_000271.3:c.3717C>T presentando las dos últimas un posible efecto sobre el ajuste de la secuencia (Tabla 5.2.13).

Variante	Resultados predictores "in silico"					
	HSF	SROOGLE	MutPred1	FATHMM-MKL	iMutant2	DUET
NM_000271.3:c.612C>T	SI		NA	SI	NA	NA
NM_000271.3:c.882-40T>A	NO	NO	NA	NO	NA	NA
NM_000271.3:c.1554-74A>G	NO		NA	NO	NA	NA
NM_000271.3:c.1758-21A>G	NO		NA	NO	NA	NA
NM_000271.3:c.3717C>T	SI		NA	NO	NA	NA

Tabla 5.2.13. Efecto teórico de la variante analizada según diferentes predictores.

Mediante secuenciación Sanger se analizó la secuencia del cDNA con intención de valorar la presencia de inserciones o deleciones de material genético en el mRNA, no observándose diferencias respecto a la forma de ajuste canónica en ninguno de los casos.

Finalmente, se cuantificó la expresión de mRNA para confirmar que no existiera una disminución del mismo provocada por un mecanismo de degradación del RNA mediante mutación terminadora, observando en todos los casos la misma expresión que en la población control.

5.2.3 Otros factores que pueden regular la expresión de *NPC1*

5.2.3.1 Estudio del exoma de candidatos a padecer NP-C

Se estudió el exoma completo de 11 sujetos con clínica sugestiva de NP-C y una única variante patogénica en heterocigosidad en el gen *NPC1* o al menos, un biomarcador elevado. Solamente 6/11 (54,54%) presentaban información sobre el acúmulo de colesterol en el lisosoma detectado mediante tinción por filipina, siendo positiva en todas ellas (Tabla 5.2.14).

ID	Fenotipo clínico	Variante detectada		Biomarcadores		
		(NM_000271 / NP_000262)	Filipina	Qt (nmol/mL/h)	CCL18/PARC (ng/mL)	7-CC (ng/mL)
1	Visceral	c.3662delT (p.L1241X)	Clásica	53	123	34,3
2	Neurológico	c.2324A>C (p.Q775P)	Clásica	167	198	<2
3	Neurológico	c.1351G>A (p.E451K)	Variante	771	550	258
4	Neurológico	c.665A>G (p.N222S)	NA	73	156	32,5
5	Neurológico	c.665A>G (p.N222S)	Variante	67	87	18
6	Neurológico	c.882-40T>A	Variante	100	32	<2
7	Neurológico	c.2911+72C>T	Variante	29	101	<2
8	Neurológico	c.467T>C (p.M156T)	NA	65	84	28,5
9	Visceral	c.2324A>C (p.Q775P)	NA	119	158	104
10	Visceral	c.2324A>C (p.Q775P)	NA	0	203	423
11	Visceral	c.3451G>A (p.A1151T)	NA	573	157	201,5

Tabla 5.2.14. Descripción de los pacientes incluidos en el estudio de reguladores de la expresión de *NPC1*. NA: variante no analizada

En primer lugar se realizó un estudio individual para cada uno de los sujetos, con la intención de descartar la presencia de otras patologías con sintomatología concomitante, de este modo se realizó el diagnóstico de 4 de sujetos que presentaban otras patologías. Las variantes genéticas observadas asociadas a estas patologías se confirmaron mediante secuenciación Sanger, utilizando los iniciadores descritos en el apartado 4.1.4.2 de materiales y métodos.

De este modo el sujeto 01 fue diagnosticado de Esferocitosis Hereditaria por presentar una variante en heterocigosidad en el gen *ANK1* (NM_020476.2:c.5097-34C>T). Esta enfermedad presenta un patrón de herencia autosómico dominante, y la variante se ha asociado a formas leves, con la esplenomegalia y una leve esferocitosis como características principales [179]

El sujeto 03 fue diagnosticado de Enfermedad de Niemann Pick tipo A/B por presentar dos variantes asociadas a patogenicidad en heterocigosidad el gen *SMPD1* (NM_000543.4:c.1177T>C y NM_000543.4:c.1829_1831delGCC) [180,181]. Esto explicaría la elevación de todos los biomarcadores así como el fenotipo neurológico que presentaba el paciente.

En el sujeto 04 se detectó una variante en forma homocigota en el gen *POLG* (NM_002693.2:c.2243G>C), que se asocia a la enfermedad de SANDO y explicaría la sintomatología neurológica del paciente [182]. Mutaciones en este gen se han asociado a formas de la enfermedad sin afectación del tejido muscular.

Finalmente, el individuo 05 mostró en homocigosidad una variante en el gen *SPG7* (NM_003119.3: c.1529C>T) asociada a Paraplejía espástica [183]. Esta enfermedad presenta un patrón de herencia autosómica recesiva y una sintomatología neurológica que correspondía exactamente con el fenotipo que presentaba nuestro paciente.

A continuación, se analizaron los 7 individuos restantes, pero no se observaron variantes conocidas asociadas a patogenicidad y que fueran comunes en todos ellos ni analizando el grupo completo ni dividiéndolo en función de la presencia/ausencia de sintomatología neurológica. Tampoco se observó una presencia diferencial de variantes frecuentes entre estos sujetos y los 4 afectados de otras enfermedades.

5.2.3.2 Relación de miR33a con la enfermedad de NP-C

Se analizó la secuencia del pri-miR-33a en los 7 individuos que no fueron diagnosticados de otras patologías.

El análisis mediante secuenciación Sanger identificó dos variantes en heterocigosidad en uno de los individuos a estudio. Las variantes se identificaron según la secuencia de referencia para el miR33a, siendo NR_029507.1:n.-245T>C la común en dos pacientes y NR_029507.1:n.-15C>T.

Ambas variantes se encuentran fuera de la región de referencia del miR33a y presentan una elevada frecuencia poblacional, por lo que se consideró que su efecto no era relevante en la expresión de miR33a.

A pesar de esa consideración, se realizó un estudio bioinformático para evaluar su posible efecto, en este caso, no se pudieron utilizar los predictores mejor valorados para región codificante ya que no se sintetiza una proteína, y tampoco los predictores de ajuste ya que una forma alternativa del mismo provocaría un cambio en la proteína SBREF2 y no en el miR33a. Por ese motivo FATHMM-MKL fue utilizado, ya que permitía introducir una secuencia genética en lugar de una sustitución aminoacídica, pero no consideró las variantes observadas como posiblemente patogénicas (Tabla 5.2.15).

VARIANTES	FATHMM-MKL
NR_029507.1:n.-245T>C	0,09585
NR_029507.1:n.-15C>T	0,20561

Tabla 5.2.15. Predicciones de efecto para las dos variantes detectadas próximas a la región del miR33a.

Se estudió el nivel de expresión del gen *NPC1* en el sujeto que presentaba variantes, con la finalidad de observar si existía una desregulación de la expresión del mismo, pero no se observaron diferencias respecto a la expresión cuantificada en los controles analizados (Figura 5.2.14).

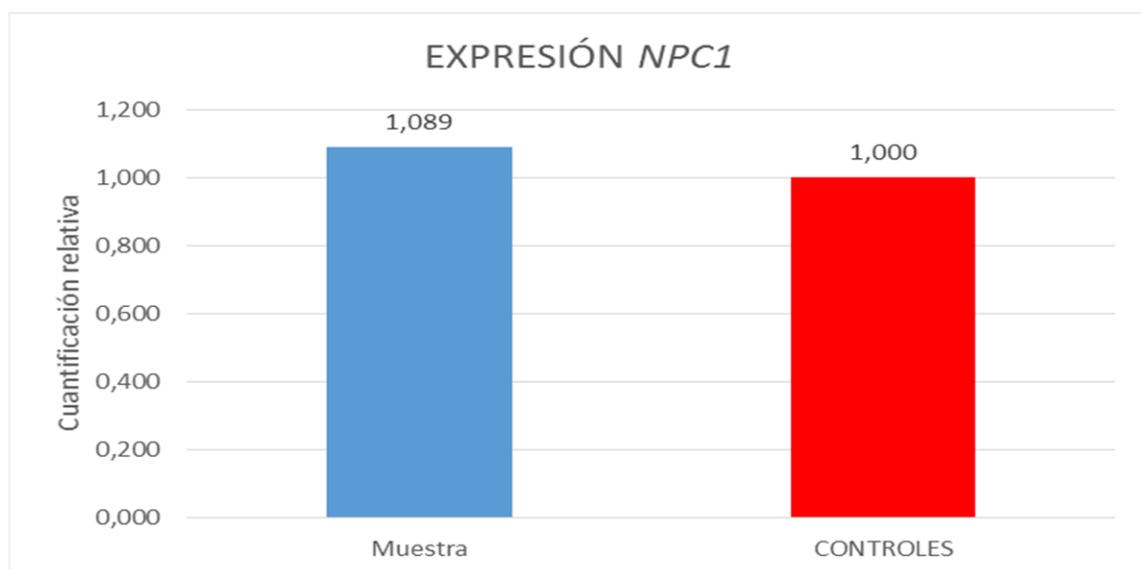


Figura 5.2.14 Cuantificación de la expresión de *NPC1*. No se observan diferencia en la expresión de *NPC1* entre el paciente que presenta las variantes en el primir33a y los controles

6 DISCUSIÓN



6.1 DETECCIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD

El diagnóstico precoz es el propósito para el diagnóstico de cualquier enfermedad, pero es primordial en aquellas con una grave y progresiva afectación y para las que disponemos de un tratamiento, ya sea este más o menos eficaz.

En el caso de la enfermedad de Niemann Pick tipo C, al igual que para todas las enfermedades de baja frecuencia, llegar al diagnóstico es aún más complejo, ya que, como hemos referido en la introducción, su sintomatología solapa con un gran espectro de enfermedades mucho más comunes y que, por lo tanto, suelen descartarse antes de considerar la enfermedad de Niemann Pick tipo C.

En los pacientes que se detecta una trombocitopenia y esplenomegalia sin causa aparente, lo más frecuente en nuestro medio es sospechar la presencia de una neoplasia hematológica, la frecuencia global de las cuales es muy superior a la de la enfermedad de Niemann Pick tipo C, por ejemplo teniendo en consideración solamente la de los linfomas no Hodgkin, su frecuencia mundial es de 1/16.666 habitantes, en lugar de la 1/45.454 que es la frecuencia estimada más elevada para la enfermedad de Niemann Pick tipo C [12,184]. Si el síntoma psiquiátrico es un trastorno esquizofrénico, tampoco tiende a pensarse que pueda ser derivado de una enfermedad de baja frecuencia. Es por este motivo que los algoritmos de sospecha clínica, como el índice de sospecha, sean una herramienta crucial [31,105]. Sin embargo en este trabajo se ha mostrado como un indicador poco efectivo. Este índice de sospecha presenta una muy baja especificidad, pero, en realidad lo que se pretende generalizando su uso es obtener una alta sensibilidad, de forma que, aunque se estudie y plantee el diagnóstico diferencial con la enfermedad de Niemann Pick tipo C en muchos casos, es muy poco probable que un afecto se escape si la herramienta y los test consiguientes se realizan correctamente.

En esta línea, también es importante descartar rápidamente la presencia de la enfermedad una vez se plantea la posibilidad. Por este motivo hemos introducido en nuestro protocolo de estudio de sospechas de enfermedad de depósito lisosomal el test de resistencia osmótica eritrocitaria que supone una buena herramienta ya que de forma rápida, sencilla y económica permite descartar la presencia de una lipidosis, aunque al igual que ocurre con la sospecha clínica, seguimos observando un considerable número de falsos positivos aunque este se reduce respecto al detectado por el índice de sospecha (90% vs 60% de falsos positivos).

Para determinar la utilidad de la predicción combinada con los biomarcadores quitotriosidasa, la quimiocina CCL18/PARC y el oxisterol 7-cetocolesterol, en este estudio hemos demostrado que la combinación de los tres nos proporciona una alta sensibilidad (100%), por lo que en el protocolo de cribado se reduce la necesidad de confirmación mediante secuenciación pacientes con una sospecha de enfermedad, en nuestro caso solamente se habrían secuenciado un 8.3% de las sospechas registradas.

Los resultados que hemos obtenido del estudio de biomarcadores y la combinación de ellos coinciden con los resultados previamente publicados en 236 sospechas de Niemann Pick tipo C [108]. A pesar de que los valores de los biomarcadores en nuestro estudio son algo superiores y los puntos de corte que establecemos para considerar la positividad del biomarcador algo más bajos, los dos estudios coinciden en que el incremento en los niveles de los tres biomarcadores permite identificar con una alta fiabilidad a los afectados de enfermedad de Niemann Pick tipo C [108]. Hammerschmidt et al. analizan biomarcadores en el momento del diagnóstico de la enfermedad de Niemann Pick tipo C mostrando unos niveles de actividad quitotriosidasa en población sana con un rango superior similar a la estimada en nuestro laboratorio, pero un rango inferior muy por debajo, posiblemente porque no corrigen sus resultados en base al estudio genético del gen *CHIT1* [112]. A pesar de su gran sensibilidad y especificidad para discernir entre afecto y sano, esta última se reduciría sensiblemente si incluimos en el estudio otras enfermedades de depósito lisosomal, ya que la triada de biomarcadores alterados también puede detectarse en el déficit de lipasa ácida lisosomal o en la enfermedad de Niemann Pick tipos A/B [185].

Por lo tanto, el algoritmo que proponemos para el diagnóstico ante la sospecha clínica de enfermedad de Niemann Pick tipo C consiste en realizar el test de resistencia osmótica eritrocitaria para acotar falsos positivos y determinar los biomarcadores para reducirlos aún más. Solamente los pacientes que muestren una mayor resistencia osmótica y positividad para la determinación de estos serán candidatos a la determinación genética en busca de las variantes causales de la enfermedad.

No solamente el diagnóstico de la enfermedad es un punto crucial para estos pacientes sino la posibilidad de poder disponer de herramientas objetivas para el seguimiento y para valorar la eficacia del tratamiento también es importante. En este punto consideramos que las mejores herramientas de las que disponemos son los biomarcadores que se utilizan para el diagnóstico,

a pesar de la escasa bibliografía que se encuentra sobre monitorización bioquímica de pacientes afectados de esta enfermedad. Además en las referencias bibliográficas tienden a utilizar el colestano $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol, un oxisterol similar al utilizado en nuestro estudio en lugar del 7-cetocolesterol, observando una marcada disminución del mismo tras el inicio del tratamiento con miglustat [112].

Existen oxisteroles más específicos de afectación neurológica, como el 24(S)-hidroxicolesterol para el que se ha observado un incremento progresivo en respuesta al tratamiento con ciclodextrinas [186]. La asociación de este oxisterol con la afectación neurológica en enfermedad de Niemann Pick tipo C se realizó tras conocer que se encontraba disminuido en enfermedades neurológicas como el Parkinson, Alzheimer, etc. [187] por lo que no es necesario seguir encontrando vinculaciones entre estas enfermedades para explorar nuevos biomarcadores más eficientes que aquellos de los que disponemos actualmente, sobre todo para la afectación neurológica que es la peor monitorizada.

Respecto al test de resistencia osmótica eritrocitaria, se ha probado que los valores se normalizan con el tratamiento en afectados por déficit de lipasa ácida lisosomal, pero no disponemos de suficientes determinaciones tras el inicio del tratamiento en pacientes afectados de enfermedad de Niemann Pick tipo C.

Las condiciones fisiopatológicas por las que se ven alterados la mayoría de biomarcadores están bien esclarecidas, quitotriosidasa y CCL18/PARC son marcadores de inflamación secretados por los macrófagos activados por lo que su concentración se encuentra elevada en cualquier enfermedad que produzca una inflamación crónica, siendo dos buenos biomarcadores para las lipodosis ya que parte de su sintomatología se debe a fenómenos inflamatorios pero no son unos biomarcadores específicos [114,188]. Los oxisteroles son productos derivados de la oxidación del colesterol y existe cierta discrepancia sobre cuál es el más indicado para su determinación. Múltiples estudios utilizan el colestano $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol, pero en este trabajo se ha preferido trabajar con el 7-cetocolesterol ya que su determinación está bien establecida en nuestro laboratorio. La elección sobre cuál de los oxisteroles se ponía a punto se basó en la existencia de un estándar interno deuterado comercial disponible para el 7-cetocolesterol pero no para el colestano $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol.

Desconocemos los mecanismos fisiopatológicos por los que observamos una alteración en la resistencia osmótica eritrocitaria y no existe literatura que vincule la enfermedad de Niemann

Pick tipo C ni otras enfermedades de depósito lisosomal con esta alteración. Varias hipótesis podrían justificar la mayor resistencia osmótica eritrocitaria que presentan los pacientes afectos de lipidosis, en este estudio se ha descartado que se deba a una alteración en la concentración de colesterol en la membrana, hipótesis que se sostenía en el hecho de que en el déficit de lipasa ácida lisosomal y en la enfermedad de Niemann Pick tipo C existe una disfunción en el transporte intracelular del mismo y en el conocimiento de que las membranas de fibroblastos de afectos de enfermedad de Niemann Pick tipo C presentan una menor concentración de colesterol [189].

Otras hipótesis podrían justificar el incremento en la resistencia eritrocitaria. Una de ellas es la mayor activación macrofágica que presentan los afectos de esta enfermedad; esta activación, demostrada por el incremento en los niveles de CCL18/PARC, produciría un incremento en el cociente de aclaramiento eritrocitario que se compensaría con una mayor producción de eritrocitos y por lo tanto aparece una disminución en la vida media de los mismos [190]. La mayor tasa de eritrocitos “jóvenes” y más resistentes sería la explicación a los resultados que hemos obtenido [191]. Para comprobar esta hipótesis sería necesario analizar la cifra de reticulocitos de estos pacientes, que debería estar incrementada y medir la actividad macrofágica de las células de Kupffer, responsables del aclaramiento eritrocitario.

Otra opción, cuyo fin es el mismo que en el supuesto anterior, una mayor tasa de renovación eritrocitaria, sería que esta se debe a que la afectación de hígado y bazo provocan una mayor erosión celular y por lo tanto, para compensar la concentración eritrocitaria y volveríamos a necesitar una mayor generación de los mismos. En este caso, la cifra de reticulocitos también estaría incrementada, pero detectaríamos la misma alteración en la resistencia en pacientes con afectación hepática por causas no inflamatorias, como la cirrosis alcohólica o infecciones virales. Estas dos teorías pierden fuerza dado que otras enfermedades de depósito lisosomal, como las mucopolisacaridosis, que también cursan con un incremento de la actividad macrofágica y con afectación de hígado y bazo no muestran valores alterados en la resistencia osmótica eritrocitaria respecto a sujetos normales (datos propios no publicados).

Siguiendo con hipótesis que puedan explicar los resultados obtenidos en el test de hemólisis, otra posible explicación es el incremento de oxisteroles intracelular. Como se ha comentado en la introducción la alteración en la concentración de iones calcio, junto con otros factores, provoca una disfunción en la producción de ATP en las mitocondrias y un incremento en la generación de especies oxígeno reactivas por lo que existe una mayor síntesis de derivados

oxidados de las sustancias de acúmulo. La alteración en la homeostasis del calcio se ha comprobado en fibroblastos de nuestros pacientes, ya que estos presentan una alteración en la función de los canales KCa3.1, unos canales de potasio localizados en la membrana celular que se encuentran regulados por la concentración de iones calcio [192], esta alteración favorece la formación de especies oxígeno reactivas que a su vez interaccionan con los acúmulos en el interior de la mitocondria y del lisosoma, provocando la formación de oxisteroles y otros derivados oxidados. Los oxisteroles son unos potentes reguladores de la eriptosis y por lo tanto tienen una influencia directa en la muerte eritrocitaria [193] además actúan regulando la distribución lipídica de la membrana interaccionando en la formación de los balsas lipídicas [100]. Dado que la desregulación del sistema provoca una mayor eriptosis inducida por el triol y el 7-cetocolesterol, para mantener el número de hematíes circulantes es necesaria una mayor síntesis de estos y por lo tanto, podríamos detectar un incremento en la cantidad de reticulocitos. Una manera de probar esta hipótesis sería analizar la cantidad de especies oxígeno reactivas que se forma en nuestros pacientes e intentar correlacionarla con el incremento en la resistencia eritrocitaria, esto se ha intentado hacer de forma indirecta pero no se ha observado una correlación entre la cantidad del oxisterol 7-cetocolesterol y la resistencia osmótica eritrocitaria.

Uno de los soportes de la implicación de la homeostasis iónica, es el hecho de que tanto la inhibición del canal KCa3.1, cuya función está regulada por el ion Ca^{2+} , como la mayor resistencia osmótica se dan en pacientes de otras enfermedades de depósito lisosomal como la enfermedad de Gaucher o la enfermedad de Fabry, con la limitación de que se ha estudiado en otros tipos celulares, (datos no publicados). Además, la inhibición “*in vitro*” de este canal en los hematíes, provoca una mayor fragilidad, ya que esta no puede ser compensada por la activación de la eritropoyesis como suponemos que ocurre “*in vivo*” (datos no publicados). Esto apoyaría que implicación de la homeostasis iónica y la posible implicación de los derivados de la oxidación de sustancias de acúmulo, pero no de los oxisteroles en concreto ya que estos no se encuentran elevados en las otras patologías comentadas.

Hasta la publicación de las recomendaciones diagnósticas del año 2017, el “*gold standard*” para el diagnóstico de la enfermedad de Niemann Pick tipo C era el estudio de acúmulo de colesterol mediante tinción por filipina [102]. Esta técnica actualmente, no se puede decir que este en desuso ya que sigue incluida como técnica complementaria en el algoritmo diagnóstico, pero si ha quedado relegada a un segundo plano dado los avances en secuenciación. La necesidad de

una biopsia de piel, obtenida por una técnica invasiva, además de la tardanza en obtener resultados a causa de la necesidad de esperar a que crezcan los cultivos celulares “*in vitro*”, sumado a la falta de un método objetivo para cuantificar el acúmulo hace que sea una técnica mucho más compleja que el estudio genético [107]. Además, se trata de una técnica poco específica ya que se han detectado casos positivos para la tinción de acúmulo de colesterol en otras enfermedades, no necesariamente de depósito lisosomal (gangliosidosis, lesiones ateroscleróticas o Alzheimer entre otras) [194–196]. Por estos motivos, esta técnica no se ha incluido en el presente trabajo, ni siquiera para validar las variantes de significado incierto, aunque no se debe menospreciar su utilidad para valorar el acúmulo de colesterol en modelos celulares, ya que su capacidad para validar variantes de significado incierto o su capacidad para definir la presencia/ausencia de enfermedad en aquellos casos en que los otros estudio son inconcluyentes sigue vigente en las guías publicadas en abril de 2018 [197].

6.2 ESTUDIO GENÉTICO DE LA ENFERMEDAD

Como en todas las enfermedades genéticas conocer las variantes causales de las mismas es fundamental para el diagnóstico de pacientes e identificación de portadores y es importante para poder hacer un buen consejo genético, pero en aquellos casos, como la enfermedad de Niemann Pick tipo C en los que no existe la posibilidad de un diagnóstico bioquímico preciso, un correcto diagnóstico genético no es importante sino imprescindible.

Una de las primeras decisiones que deben tomarse ante este estudio es que tipo de muestra se analizará, si se realiza el estudio en DNA genómico como realizamos en este trabajo o si se trabaja a partir de cDNA como realizan en muchas de las publicaciones sobre la enfermedad de Niemann Pick tipo C [177,198–200]. En caso de elegir trabajar a partir de cDNA es necesario tener en consideración que se trata de un material mucho más delicado que el DNA y su degradación es mucho más rápida. En este proyecto, dado que las muestras no se han recogido en el mismo centro de análisis y la extracción tampoco podía realizarse inmediatamente después de la recepción de la muestra se ha preferido trabajar con un material más resistente. Además, si los transcritos no tienen proporciones equitativas podemos encontrarnos que al realizar una amplificación exponencial, el transcrito minoritario no sea detectado.

Otro de los grandes puntos a tener en consideración cuando se realizan estudios genéticos es la aparición de variantes cuyo significado se desconoce, un problema que se agrava cuando se trabaja con enfermedades con una sintomatología que solapa con la de tantas otras enfermedades, la pregunta que se plantea en estos casos es si la variante detectada es realmente causante de la enfermedad o si el paciente tiene otra enfermedad y nuestra nueva variante es benigna. Por este motivo y dado que una caracterización funcional de las variantes detectadas requiere un tiempo del que normalmente el paciente no dispone ya que se ha probado que el tratamiento es más eficiente cuando más precozmente se administra, disponer de buenos sistemas “*in silico*” que nos permitan identificar la patogenicidad de las variantes es importante.

En esta línea existen múltiples sistemas bioinformáticos que trabajan para predecir el efecto, tanto a nivel funcional como estructural de los cambios en la secuencia aminoacídica, y cada vez más, en la secuencia genética [201]. Estos predictores, normalmente entrenados mediante SwissVar se centran en la conservación de la secuencia entre especies y en las diferencias existentes entre los aminoácidos, pero cada vez más incluyen el efecto a nivel de conformación tridimensional y a nivel de interacciones inter-proteínas [202,203]. Generalmente los estudios que comprueban la eficacia de los predictores “*in silico*” incluyen una gran cantidad de genes y generalizan el resultado [204] pero cuando se trabaja con una pequeña cantidad de genes es recomendable analizar cuál es el mejor predictor para ese grupo de genes en concreto (Xavier de la Cruz Montserrat (ICREA), comunicación personal, 9 de diciembre de 2015).

En relación con las enfermedades de depósito lisosomal no existe mucha bibliografía sobre la utilidad de estos predictores. Las publicaciones existentes incluyen menos predictores y no tienen en cuenta los genes afectados en la enfermedad de Niemann Pick tipo C. Una de ellas, centrada únicamente en el gen causal de la enfermedad de Fabry analiza tres predictores, dos de los cuáles se incluyen en este trabajo y el otro estudio, trabaja con 7 predictores en 11 genes responsables de enfermedades de depósito lisosomal y señala Polyphen2 y PROVEAN como los mejores predictores [205,206]. Ninguno de estos estudios analiza la aplicabilidad de MutPred1 ni de FATHMM que han resultado ser los que mejores predicciones dan en lo que a sustituciones aminoacídicas se trata, según nuestro estudio.

Si como se ha comentado hay pocos estudios para validar los predictores de efecto en genes implicados en enfermedades de depósito lisosomal cuando tratamos de analizar variantes que

provocan un cambio aminoacídico, es mucho más complejo cuando se pretende analizar variantes en región intrónica que puedan estar afectando al mecanismo de ajuste. Hasta la fecha no se ha encontrado ningún estudio sobre estas variantes en genes relacionados con enfermedades de depósito lisosomal, pero los trabajos existentes relacionados con otras enfermedades muestran siempre una alta eficiencia de los predictores, siendo *Splicing Finder* (HSF) y *Splice Site Prediction by Neural Network* los más utilizados [207–209]. Estudios sobre el efecto de variantes en el ajuste en el gen *CFTR*, que codifica para la proteína transmembrana responsable de la fibrosis quística utiliza prácticamente los mismos predictores que nuestro estudio y presenta como mejores predictores HSF (coincidiendo con nuestro estudio) y, *Automated Splice Site and Exon Definition Analysis* (ASSEDA) [210], pero este último predictor no es de acceso público y por lo tanto no está incluido en nuestro estudio.

Finalmente, el tercer punto que debe tenerse en cuenta antes de realizar un diagnóstico genético es el conocimiento que se tiene del gen a estudio en la población general. Dada la diversidad genética entre poblaciones es importante conocer la frecuencia de las variantes en aquella que se está estudiando para poder proporcionar una correcta asistencia a los pacientes, ya que el análisis de variantes patogénicas frecuentes es mucho más eficiente que el análisis del gen completo, y más en casos en que el gen es tan grande como *NPC1* [211].

El gen *NPC2* es un gen poco variable del que solamente se han descrito 2 variantes posiblemente benignas ninguna de las cuales se considera frecuente en la población. Una de ellas se encuentra localizada en zona reguladora y la otra corresponde a una variante en región intrónica. Este estudio solamente ha detectado una variante en este gen, esta se considera variante de significado incierto en las bases de datos y según los estudios de 1.000 Genomas y ExAC, se trata de una variante frecuente en la población aunque en la población española incluida en el *Spanish Variant Server* o en nuestro trabajo, su frecuencia es menor. Adjudicarle un posible efecto a esta variante, igual que para cualquier otra es complejo, como hemos comentado en los resultados (apartado 4.2.1.2) en predictor “*in silico*” *Human Splicing Finder* no considera que la variante tenga un efecto en el ajuste, además de que los pacientes muestran una presentación clínica muy diversa. En este caso sería de utilidad poder realizar un estudio de la secuencia del RNA mensajero y de la expresión de la isoforma canónica de la proteína pero esto no ha sido posible ya que, al tratarse de una variante presente en heterocigosidad en los dos pacientes no se disponía de argumentos diagnósticos para que la nueva muestra fuera autorizada.

Respecto a *NPC1*, a finales de Marzo de 2018 existen 70 variantes con efecto benigno o posiblemente benigno registradas en la base de datos ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>, 25 de ellas con una frecuencia polimórfica en la población general, mientras que si nos centramos exclusivamente en población ibérica que es la estudiada en este trabajo, según la base de datos 1000 Genomas existen 28 variantes con una frecuencia superior al 1%, y según el CIBERER *Spanish Variant Server*, de las 76 variantes descritas en población general solamente 19 de ellas tienen una frecuencia polimórfica. En este estudio se han detectado 16 variantes frecuentes en la población, 10 de ellas están descritas como variantes benignas en las bases de datos y las otras, a pesar de considerarse variantes de significado incierto no tienen efecto patogénico ya que su frecuencia en la población general es demasiado elevada para poder ser una variante causal de una enfermedad de baja frecuencia. A pesar de que la frecuencia de las variantes en la población nos puede servir para descartar la patogenicidad de las mismas, no descarta que se traten de variantes moduladoras, un tema del que prácticamente no hay nada publicado. Una de las variantes más frecuentemente detectada en este estudio (NM_000271.4:c.2793C>G), a pesar de no provocar cambio aminoacídico genera una nueva posición donora de ajuste que, en una baja proporción del mRNA sintetizado provoca una forma de ajuste alternativa que codifica para una proteína truncada, por lo que a pesar de tener bajo impacto por la poca eficiencia de la nueva posición donora, podría estar actuando como modulador en la gravedad o presentación de la sintomatología [212]. El efecto de la presencia de esta variante en homocigosidad, junto con la presencia de una variante patogénica descrita se ha intentado estudiar en paralelo a este trabajo mediante el uso de iniciadores específicos que solamente deberían amplificar en presencia de la inserción intrónica que provoca la variante, sorprendentemente esta inserción se ha detectado en todos los sujetos analizados, tanto homocigotos para la forma minoritaria como para la forma salvaje, por lo que el estudio, que pretendía cuantificar en primer lugar la cantidad de mRNA que presentaba la variante y a continuación la cantidad de proteína funcional, no ha podido completarse aún.

En el análisis realizado en este trabajo a 180 sospechas de enfermedad de Niemann Pick tipo C, se observaron tres variantes en baja frecuencia, publicadas como variantes benignas, que no estaban descritas en población ibérica. Además, se describieron 24 variantes de significado incierto, 6 de ellas presentaban una elevada frecuencia en la población por lo que deberían pasar a considerarse variantes no causales de enfermedad. Estas variantes de efecto desconocido deberían analizarse para comprobar si tienen un efecto patogénico o por el contrario son sustituciones neutras pero no existe literatura que contemple el posible efecto de estas

variantes ya que en la mayoría de publicaciones se tratan variantes polimórficas o patogénicas pero no se tienen en consideración aquellas cuyo efecto se desconoce. Por este motivo, en este trabajo se analizaron las 24 variantes mediante predictores de efecto “*in silico*” encontrando que 4 de ellas podían tener un efecto patogénico mediante la mayoría de predictores utilizados, de estas una de ellas presenta una elevada controversia sobre su patogenicidad. La variante NM_000271.3:c.665A>C provoca la sustitución de una asparagina por una serina, perdiendo una posición de glicosilación en la proteína variante. La proteína NPC1 presenta en su extremo N-terminal cuatro asparraginas que se glicosilan y la pérdida de una única posición no provoca una deslocalización de la proteína ni una pérdida de función de la misma por lo que el cambio en la secuencia no se considera lo suficientemente grave como para ser causal de enfermedad, aún así, en 2003 esta variante fue publicada como patogénica por Park et al. y se ha relacionado con la enfermedad en otras publicaciones, normalmente asociada a fenotipos viscerales [14,57,62,213].

De forma complementaria al estudio “*in silico*” se pretendía analizar cambios en el RNA mensajero de estas variantes de significado incierto, en busca de alteraciones en el patrón de ajuste, pero a causa de la baja disponibilidad de muestra sólo pudieron analizarse cuatro variantes, tres de ellas localizadas en región intrónica, para las que no se detectó ninguna alteración en la secuencia transcrita de la misma. Tras este estudio se cuantificó la cantidad de RNA detectado en las muestras y se comparó con el expresado en controles para poder asegurarnos de que no existiera una disminución en su expresión que pudiera estar enmascarando un efecto deletéreo de las variantes, detectando la misma cantidad de RNA mensajero en los portadores de estas sustituciones que en población control. Por este motivo, en este estudio consideramos que la evidencia de la que disponemos actualmente permite reclasificar estas variantes como neutrales para la enfermedad de Niemann Pick tipo C. A pesar de las evidencias de las que disponemos, sería ideal encontrar un sujeto portador de estas variantes en homocigosidad y sin fenotipo clínico para poder confirmar los resultados que hemos obtenido, o poder diseñar células modificadas genéticamente que presentasen estas variantes, también de forma homocigota, en las que cuantificar la expresión de biomarcadores y de la proteína, así como el acúmulo del colesterol para poder clasificar completamente el efecto de las variantes de significado incierto detectadas en la secuenciación. La mayoría de publicaciones que otorgan efecto a variantes de significado desconocido lo realizan mediante aproximaciones “*in silico*”, estudio de la secuencia y expresión del RNA mensajero y mediante estudio “*in vitro*” con células modificadas portadoras de las variantes a estudio, pero en todos

los casos las variantes que se pretende identificar son patogénicas y están asociadas a sujetos con fenotipos clínicos [214–216] .

Gracias a la presencia de estos fenotipos clínicos y de los estudios “*in silico*” ha resultado mucho más fácil reclasificar aquellas variantes de significado desconocido o no publicadas hasta la fecha a las que se les ha asociado un efecto patogénico. En este trabajo se presentan 5 nuevas variantes causales de enfermedad no descritas previamente detectadas en el gen *NPC1*, una de ellas es una delección parcial del gen que provoca que no se sintetice la proteína, otras dos son variantes que provocan un codón de parada y por lo tanto una proteína de menor tamaño que no presenta la región de identificación de esteroides. Las dos variantes restantes provocan un cambio aminoacídico en el tercer bucle transmembrana, la región con más variantes patogénicas de la proteína. En los cinco casos, la región que presenta la variante se encuentra altamente conservada entre especies y en cuatro, obtuvimos RNA para poder validar la presencia de la variante y cuantificar la expresión del gen. Para las variantes que generan codones de parada o sustituciones aminoacídicas es posible que la síntesis de RNA mensajero no se vea afectada y el defecto se detecte únicamente a nivel proteico, respecto a la delección parcial del gen una posible justificación para la detección de expresión es que la selección de sondas ha sido inadecuada, ya que los exones 9 y 24 también se observan en isoformas no funcionales, transcritas a partir del exón 6 del gen [46]. Una técnica que nos permitiría detectar el efecto de las variantes que generan codones de parada o para la delección del gen, sería cuantificar la proteína mediante *Western Blot*, esta técnica también nos permitiría confirmar la patogenicidad de las sustituciones aminoacídicas si estas provocan un plegamiento incorrecto de la proteína y por lo tanto una mayor degradación de esta, pero no sería de utilidad si lo que generan es una pérdida de función [63,217]. El mejor sistema sería, igual que en la validación de variantes benignas, el diseño de cultivos celulares “*in vitro*” con la variante a estudio en homocigosidad y sin ninguna otra variante respecto a la secuencia salvaje. Aunque como ya se ha comentado anteriormente, la mayoría de variantes que se describen se basan casi exclusivamente en la presentación clínica y bioquímica del paciente, sin hacer confirmación *in vitro* del efecto descrito [218,219].

Volviendo al estudio poblacional de las variantes detectadas, observamos que en la población española que se ha estudiado la variante causal más frecuente no coincide con la publicada en la literatura (NM_00271.4:c.3451G>A y NM_00271.4:c.3182T>C respectivamente) [49]. Esto se puede justificar mediante dos mecanismos, el primero sería la existencia de un efecto fundador

en nuestra población ya que nuestra frecuencia de la variante NM_00271.4:c.3451G>A alcanza frecuencias de variante polimórfica (1.11%). También es posible que la elevada frecuencia que detectamos en nuestra población se deba a un sesgo del estudio, ya que se ha trabajado con sospechas de la enfermedad por lo que la frecuencia de variantes causales puede ser superior a la de la población general. Esta elevada frecuencia nos puede llevar a plantear la posibilidad de iniciar el estudio genético con la evaluación de esta variante mediante la técnica de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), pero bajo porcentaje de población homocigota provoca que el estudio completo del gen *NPC1* siga siendo necesario y por lo tanto esta incorporación solamente produciría una demora en el diagnóstico.

A pesar de la descripción de nuevas variantes asociadas a patogenicidad e incluso aunque consideramos como causales todas las variantes de significado incierto detectadas, existe aproximadamente un 1% de sujetos con sintomatología clínica pero sin diagnóstico genético [102]. En estos casos, si no se pueden diagnosticar mediante la ampliación de técnicas propuestas en el algoritmo diagnóstico (estudio de RNA mensajero y MLPA) podría ser de utilidad el uso de paneles de genes que permitan estudiar aquellos que se asocian al fenotipo clínico de la enfermedad de Niemann Pick tipo C, incluyendo otras enfermedades de depósito y enfermedades asociadas al fenotipo visceral y al neurológico, incluyendo las cuatro que se han diagnosticado mediante el estudio del exoma presentado en este trabajo. En este caso consideramos de mayor utilidad el uso de paneles definidos que el estudio del exoma a pesar de ser la técnica de elección en este proyecto, ya que a diferencia de en el trabajo presentado, lo que se pretende con estos paneles es reorientar el diagnóstico de los pacientes, descartando totalmente la presencia de otra patología antes de seguir profundizando en el estudio de la enfermedad de Niemann Pick tipo C. En esta línea ya existen múltiples paneles diseñados tanto por grupo de patología (paneles para detectar enfermedades de depósito lisosomal con tratamiento) como por sintomatología, existiendo paneles para esplenomegalias de origen incierto, ataxias, etc. [132,134].

Pero una vez descartado que se trate de otra patología, es necesario seguir profundizando y estudiando los mecanismos por los que estos pacientes manifiestan la enfermedad, para ello es importante investigar en los mecanismos epigenéticos que regulan la expresión de las proteínas NPC1 y NPC2 y comprobar que las modificaciones post-traduccionales se producen correctamente. Por ejemplo, una nueva estrategia para seguir estudiando el mecanismo patogénico sería comprobar el nivel de glicosilación de las proteínas NPC1 y NPC2.

Se ha observado que pacientes con un fenotipo similar al déficit de factor XII no presentan esta patología sino un trastorno de glicosilación congénito por el que esta proteína no se glicosila correctamente y por lo tanto no es completamente funcional [220]. Dado que in vitro se ha comprobado que la ausencia de glicosilación en las cuatro asparaginas del extremo N-terminal provoca un déficit de función en NPC1, sería interesante comprobar la presencia de esta alteración en estos casos sin diagnóstico genético [57].

Otra línea en la que seguir estudiando sobre los mecanismos genéticos de la enfermedad de Niemann Pick tipo C es estudiar los patrones de metilación de los genes responsables ya que estos pueden alterarse por mecanismos de estrés oxidativo y se han detectado alteraciones tanto en otras enfermedades con sintomatología concomitante con la enfermedad de Niemann Pick tipo C como en el gen *NPC1*, sin haberse asociado a la enfermedad de Niemann Pick tipo C hasta el momento [53,221,222]. También, en la línea de los mecanismos reguladores es importante considerar la posibilidad de la implicación de otros miRNA, a pesar de que en este trabajo no se haya detectado implicación del miR33a es posible que esto se deba al bajo número de pacientes incluidos en el estudio, o a que sea otro el miRNA que se ve alterado en estos casos, por ejemplo miR33b que también actúa regulando el transporte de colesterol, aunque no sea mediante regulación de *NPC1* [53].

Otros mecanismos que podrían afectar a la expresión de *NPC1* o *NPC2* son la presencia de variaciones del número de copias o de regiones *Alu* que provocasen duplicaciones o deleciones del gen, que normalmente deberían detectarse mediante MLPA, pero a veces esta detección es más compleja de lo esperado [223–225].

7 CONCLUSIONES



Los objetivos de este proyecto se dividían en dos grandes bloques para mejorar el cribado de posibles pacientes e incrementar el conocimiento sobre las alteraciones genéticas presentes en la enfermedad de Niemann Pick tipo C.

Las conclusiones, se dividirán del mismo modo, dando respuesta a cada uno de los objetivos propuestos:

7.1 BLOQUE 01: ESTUDIOS PARA DETECTAR LA ENFERMEDAD

1. Se ha desarrollado un nuevo sistema de cribado, mediante el test de resistencia osmótica eritrocitaria, para detectar pacientes con la enfermedad de Niemann Pick tipo C. Por eso proponemos un nuevo algoritmo diagnóstico que incluya esta prueba, rápida, fácil y económica, como un paso intermedio entre la evaluación clínica y la determinación de biomarcadores. De este modo, reducimos los tiempos de respuesta diagnóstica en los casos de negatividad para la enfermedad.
2. Podemos hipotetizar el incremento de la resistencia osmótica eritrocitaria, por mediación de las alteraciones en la homeostasis del calcio y la mayor formación de especies reactivas al oxígeno.
3. No hemos detectado alteraciones en la concentración de colesterol en la membrana eritrocitaria en los sujetos afectados de enfermedad de Niemann Pick tipo C a pesar de lo publicado en otros tipos celulares.
4. La valoración combinada de los biomarcadores plasmáticos quitotriosidasa, quimiocina CCL18/PARC y 7-cetocolésterol muestra, en el presente trabajo, una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98% para el diagnóstico de la enfermedad de Niemann Pick tipo C.

7.2 BLOQUE 02: ESTUDIO GENÉTICO DE LA ENFERMEDAD DE NIEMANN PICK TIPO C

5. La frecuencia de variantes detectada en nuestra población, con la limitación del tamaño de la muestra, no se corresponde a la observada en otras poblaciones europeas, ya que en este estudio es NM_000271.3:c.3182T>C la variante asociada a patogenicidad más frecuente.

6. Se han observado tres variantes, NM_000271.3:c.1300C>T, c.1947+8G>C y c.2514-6C>T no descritas en población ibérica. La frecuencia de estas variantes es inferior al 1% pero no se asocian a patogenicidad según la información de las bases de datos.
7. Las variantes de significado incierto detectadas en *NPC1* y *NPC2* deben evaluarse mediante los predictores de efecto “*in silico*” MutPred1 y FATHMM-MKL o *Human Splicing Finder* y SROOGLE en función de su localización, ya que son los más adecuados para estos genes.
8. Las evidencias de las que disponemos actualmente nos permiten clasificar las variantes NM_000271.3:c.612C>T, c.882-40T>A, c.1554-74A>G, c.1758-21A>G, c.3717C>T como variantes neutrales para la enfermedad de Niemann Pick tipo C. Hasta el momento estas variantes no tenían un efecto asociado.
9. Detectamos 5 variantes en el gen *NPC1*, no descritas hasta la elaboración de este proyecto, asociadas a patogenicidad. NM_000271.3:c.385delT, c.1757delA, c.2567T>C, c.2711G>A, y una la delección de la región 5’UTR y del exón 01. Dos de ellas generan un codón de parada prematuro, otras dos un cambio aminoacídico en el tercer bucle luminal de la proteína y la última provoca la inexistencia de la proteína.
10. El estudio realizado no detecta ninguna variante, no asociada a los genes *NPC1* o *NPC2*, que pueda justificar el desarrollo de la enfermedad de Niemann Pick tipo C en aquellos sujetos portadores de una única variante patogénica en heterocigosidad.

8 REFERENCIAS



- [1] A.C. CROCKER, S. FARBER, Niemann-Pick disease: a review of eighteen patients., *Medicine (Baltimore)*. 37 (1958) 1–95.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13516139> (accessed December 14, 2017).
- [2] A.C. CROCKER, The cerebral defect in Tay-Sachs disease and Niemann-Pick disease., *J. Neurochem.* 7 (1961) 69–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13696518> (accessed December 14, 2017).
- [3] R. O Brady, J.N. Kanfer, M.B. Mock, D.S. Fredrickson, THE METABOLISM OF SPHINGOMYELIN, H. EVIDENCE OF AN ENZYMATIC DEFICIENCY IN NIEMANN-PICK DISEASE, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 55 (1966) 366–9.
- [4] G.T. Besley, A.J. Hoogeboom, A. Hoogeveen, W.J. Kleijer, H. Galjaard, Somatic cell hybridisation studies showing different gene mutations in Niemann-Pick variants., *Hum. Genet.* 54 (1980) 409–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6249719> (accessed December 14, 2017).
- [5] P.G. Pentchev, M.E. Comly, H.S. Kruth, M.T. Vanier, D.A. Wenger, S. Patel', R. O Brady, A defect in cholesterol esterification in Niemann-Pick disease (type C) patients (cholesterol-storage disorder/fluorescence microscopy/non-lipoprotein cholesterol), *Med. Sci.* 82 (1985) 8247–8251.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC391480/pdf/pnas00363-0452.pdf> (accessed December 14, 2017).
- [6] E.D. Carstea, M.H. Polymeropoulou, C.C. Parker, S.D. Detera-Wadleigh, R.R. O'neill, M.C. Patterson, E. Goldin, H. Xiaot, R.E. Straub, M.T. Vanier, R. O Brady, P.G. Pentchev, Linkage of Niemann-Pick disease type C to human chromosome 18, *Genetics*. 90 (1993) 2002–2004. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC46008/pdf/pnas01464-0377.pdf> (accessed December 14, 2017).
- [7] S.J. Steinberg, C.P. Ward, A.H. Fensom, S.J. Steinberg C P Ward A H Fensom, Complementation studies in Niemann-Pick disease type C indicate the existence of a second group, *J Med Genet. Med Genet.* 3131 (1994).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1049805/pdf/jmedgene00283-0057.pdf> (accessed December 14, 2017).

- [8] W.L. Greer, D.C. Riddell, D.M. Byers, J.P. Welch, G.S. Girouard, S.M. Sparrow, T.L. Gillan, P.E. Neumann¹, Linkage of Niemann-Pick Disease Type D to the Same Region of Human Chromosome 18 as Niemann-Pick Disease Type C, *Am. J. Hum. Genet.* 61 (1997) 139–142. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1715879/pdf/ajhg00007-0167.pdf> (accessed December 14, 2017).
- [9] W.L. Greer, D.C. Riddell, T.L. Gillan, G.S. Girouard, S.M. Sparrow, D.M. Byers, M.J. Dobson, P.E. Neumann, The Nova Scotia (Type D) Form of Niemann-Pick Disease Is Caused by a G 3097 rT Transversion in NPC1, *Am. J. Hum. Genet.* 63 (1998) 52–54. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1377252/pdf/9634529.pdf> (accessed December 14, 2017).
- [10] E.D. Carstea, J.A. Morris, K.G. Coleman, S.K. Loftus, D. Zhang, C. Cummings, J. Gu, M.A. Rosenfeld, W.J. Pavan, D.B. Krizman, J. Nagle, M.H. Polymeropoulos, S.L. Sturley, Y.A. Ioannou, M.E. Higgins, M. Comly, A. Cooney, A. Brown, C.R. Kaneski, E.J. Blanchette-mackie, N.K. Dwyer, E.B. Neufeld, T.-Y. Chang, L. Liscum, J.F. Strauss III, K. Ohno, M. Zeigler, R. Carmi, J. Sokol, D. Markie, R.R. O'Neill, O.. van Diggelen, M. Elleder, M.C. Patterson, R.O. Brady, M.T. Vanier, P.G. Pentchev, D.A. Tagle, Niemann-Pick C1 Disease Gene : Homology to Mediators of Cholesterol Homeostasis, *Science* (80-.). 277 (1997) 3–6. doi:10.1126/science.277.5323.228.
- [11] S. Neureckiene, D.E. Sleat, H. Lackland, A. Fensom, M.T. Vanier, R. Wattiaux, M. Jadot, P. Lobel, Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease, *Science* (80-.). 29 (2000) 2298–301.
- [12] R. Pinto, C. Caseiro, M. Lemos, L. Lopes, A. Fontes, H. Ribeiro, E. Pinto, E. Silva, S. Rocha, A. Marcão, I. Ribeiro, L. Lacerda, G. Ribeiro, O. Amaral, M.C. Sá Miranda, Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal, *Eur. J. Hum. Genet.* 12 (2004) 87–92. doi:10.1038/sj.ejhg.5201044.
- [13] P.J. Meikle, J.J. Hopwood, A.E. Clague, W.F. Carey, Prevalence of Lysosomal Storage Disorders, *JAMA.* 281 (1999) 249. doi:10.1001/jama.281.3.249.
- [14] C. a Wassif, J.L. Cross, J. Iben, L. Sanchez-Pulido, A. Cougnoux, F.M. Platt, D.S. Ory, C.P. Ponting, J.E. Bailey-Wilson, L.G. Biesecker, F.D. Porter, High incidence of unrecognized visceral/neurological late-onset Niemann-Pick disease, type C1, predicted by analysis of

massively parallel sequencing data sets., *Genet. Med.* 18 (2015) 1–8.
doi:10.1038/gim.2015.25.

- [15] C.J. Hendriksz, M. Anheim, P. Bauer, O. Bonnot, A. Chakrapani, J.-C. Corvol, T.J. de Koning, Degtyareva Anna, C. Dionisi-Vici, S. Doss, T. Duning, P. Giunti, R. Iodice, T. Johnston, D. Kelly, H.-H. Klünemann, S. Lorenzl, A. Padovani, M. Pocovi, M. Synofzik, A. Terblanche, F. Then Bergh, M. Topçu, C. Tranchant, M. Walterfang, C. Velten, S.A. Kolb, The hidden Niemann-Pick type C patient: clinical niches for a rare inherited metabolic disease, *Curr. Med. Res. Opin.* (2017). doi:10.1080/03007995.2017.1294054.
- [16] V. Di Lazzaro, M. Marano, L. Florio, S. De Santis, Niemann–Pick type C: focus on the adolescent/adult onset form, *Int. J. Neurosci.* 126 (2016) 963–971.
doi:10.3109/00207454.2016.1161623.
- [17] E. Mengel, H.-H. Klünemann, C.M. Lourenço, C.J. Hendriksz, F. Sedel, M. Walterfang, S. a Kolb, Niemann-Pick disease type C symptomatology: an expert-based clinical description., *Orphanet J. Rare Dis.* 8 (2013) 166. doi:10.1186/1750-1172-8-166.
- [18] C. Iturriaga, M. Pineda, E.M. Fernández-valero, M.T. Vanier, M.J. Coll, Niemann – Pick C disease in Spain : Clinical spectrum and development of a disability scale, *J. Neurol. Sci.* 249 (2006) 1–6. doi:10.1016/j.jns.2006.05.054.
- [19] J.I.S. Dasgupta, G.T.N.B.C. Harris, L.H.S. Knight, M.T.V.A.H. Fensom, C.W.E. Jacklin, C.W.J.E. Wraith, The natural history of Niemann – Pick disease type C in the UK, *J. Inherit. Metab. Dis.* (2007) 51–59. doi:10.1007/s10545-006-0384-7.
- [20] B. Yerushalmi, R.J. Sokol, M.R. Narkewicz, D. Smith, J.W. Ashmead, D.A. Wenger, Niemann-Pick Disease Type C in Neonatal Cholestasis at a North American Center, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 35 (2002) 44–50.
- [21] B. Héron, H. Ogier, La maladie de Niemann-Pick type C La maladie de Niemann-Pick type C : diagnostic clinique des formes pédiatriques Niemann-Pick type C disease: Clinical presentations in pediatric patients, *Arch. Pédiatrie.* 17 (2010) S45–S49.
doi:10.1016/S0929-693X(10)70011-7.
- [22] I. Pin, S. Pradines, O. Pincemaille, P. Frappat, E. Brambilla, M.T. Vanier, M. Bost, [A fatal

- respiratory form of type C Niemann-Pick disease]., Arch. Fr. Pediatr. 47 (1990) 373–5.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2369271>.
- [23] O. Schofer, B. Mischo, W. Püschel, K. Harzer, M. Vanier, Early-lethal pulmonary form of Niemann-Pick type C disease belonging to a second, rare genetic complementation group, Eur J Pediatr. 157 (1998) 45–49.
- [24] J. Sheth, J.J. Joseph, K. Shah, M. Muranjan, M. Mistri, F. Sheth, Pulmonary manifestations in Niemann-Pick type C disease with mutations in NPC2 gene: case report and review of literature, BMC Med. Genet. 18 (2017). doi:10.1186/s12881-017-0367-x.
- [25] M. Griese, F. Brasch, V. Aldana, M. Cabrera, U. Goelnitz, E. Ikonen, B. Karam, G. Liebisch, M. Linder, P. Lohse, W. Meyer, G. Schmitz, A. Pamir, J. Ripper, A. Rolfs, A. Schams, F. Lezana, Respiratory disease in Niemann-Pick type C2 is caused by pulmonary alveolar proteinosis, Clin. Genet. 77 (2010) 119–130. doi:10.1111/j.1399-0004.2009.01325.x.
- [26] M. Griese, Pulmonary Alveolar Proteinosis: A Comprehensive Clinical Perspective, Pediatrics. 140 (2017) e20170610.
- [27] N. Platt, A.O. Speak, A. Colaco, J. Gray, D. Smith, I. Williams, K. Wallom, F. Platt, Immune dysfunction in Niemann-Pick disease type C, J. Neurochem. 136 (2016) 74–80. doi:10.1111/jnc.13138.
- [28] A.O. Speak, D. Te Vruchte, L.C. Davis, A.J. Morgan, D.A. Smith, N.M. Yanjanin, L. Simmons, R. Hartung, H. Runz, E. Mengel, M. Beck, J. Imrie, E. Jacklin, J.E. Wraith, C. Hendriksz, R. Lachmann, C. Cognet, R. Sidhu, H. Fujiwara, D.S. Ory, A. Galione, F.D. Porter, E. Vivier, F.M. Platt, Altered distribution and function of natural killer cells in murine and human Niemann-Pick disease type C1., Blood. 123 (2014) 51–60. doi:10.1182/blood-2013-03-488692.
- [29] C.R. Greenberg, J.G. Barnes, S. Kogan, L.E. Seargeant, Case Report A rare case of Niemann – Pick disease type C without neurological involvement in a 66-year-old patient, Mol. Genet. Metab. 3 (2015) 18–20. doi:10.1016/j.ymgmr.2015.02.004.

- [30] W.R.H. Evans, C.J. Hendriksz, Niemann-Pick type C disease - the tip of the iceberg? A review of neuropsychiatric presentation, diagnosis and treatment, *BJPsych Bull.* 41 (2017) 109–114. doi:10.1192/pb.bp.116.054072.
- [31] O. Bonnot, C.S. Gama, E. Mengel, M. Pineda, M.T. Vanier, L. Watson, M. Watissée, B. Schwierin, M.C. Patterson, Psychiatric and neurological symptoms in patients with Niemann-Pick disease type C (NP-C): Findings from the International NPC Registry, *World J. Biol. Psychiatry.* (2017) 1–10. doi:10.1080/15622975.2017.1379610.
- [32] C. Heitz, S. Epelbaum, Y. Nadjar, Cognitive impairment profile in adult patients with Niemann pick type C disease, *Orphanet J. Rare Dis.* 12 (2017). doi:10.1186/s13023-017-0714-1.
- [33] E. Salsano, C. Umeh, A. Rufa, D. Pareyson, D.S. Zee, Vertical supranuclear gaze palsy in Niemann-Pick type C disease, *Neurol. Sci.* 33 (2012) 1225–1232. doi:10.1007/s10072-012-1155-1.
- [34] L.A. Abel, E.A. Bowman, D. Velakoulis, M.C. Fahey, P. Desmond, M.D. Macfarlane, J. Chee, L. Looi, C.L. Adamson, M. Walterfang, Saccadic Eye Movement Characteristics in Adult Niemann-Pick Type C Disease: Relationships with Disease Severity and Brain Structural Measures, *PLoS One.* 7 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0050947.
- [35] S. Nia, Psychiatric signs and symptoms in treatable inborn errors of metabolism, *J Neurol.* 261 (2014) s559–s568. doi:10.1007/s00415-014-7396-6.
- [36] A. Maubert, C. Hanon, F. Sedel, Troubles psychiatriques dans la maladie de Niemann-Pick de type C chez l'adulte, *Encephale.* 42 (2016) 208–213. doi:10.1016/j.encep.2015.11.003.
- [37] J.J. Higgins, M.C. Patterson, J.M. Dambrosia, A.T. Pikus, P.G. Pentchev, S. Sato, R.O. Brady, N.W. Barton, A clinical staging classification for type C Niemann-Pick disease., *Neurology.* 42 (1992) 2286–90. doi:10.1212/WNL.42.12.2286.
- [38] M.T. Vanier, Niemann-Pick disease type C, *Orphanet J. Rare Dis.* (2010) 1–18.
- [39] R. Spiegel, A. Raas-Rothschild, O. Reish, M. Regev, V. Meiner, R. Bargal, V. Sury, K. Meir, M. Nadjari, G. Hermann, T.C. Iancu, S.A. Shalev, M. Zeigler, The clinical spectrum of fetal

- Niemann-Pick type C, *Am. J. Med. Genet. Part A.* 149A (2009) 446–450.
doi:10.1002/ajmg.a.32642.
- [40] Y. Tang, H. Li, J. Liu, Niemann – Pick disease Type C : From molecule to clinic, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 37 (2010) 132–140. doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05235.x.
- [41] A. V Degtyareva, S. V Mikhailova, E.Y. Zakharova, E.L. Tumanova, A.A. Puchkova, Visceral symptoms as a key diagnostic sign for the early infantile form of Niemann– Pick disease type C in a Russian patient: a case report, *J. Med. Case Rep.* 10 (2016).
doi:10.1186/s13256-016-0925-4.
- [42] M. Patterson, Niemann-Pick Disease Type C, in: *GeneReviews* [Internet], 2013.
- [43] M. Usui, A. Miyauchi, Y. Nakano, S. Nakamura, E. Jimbo, S. Itamura, K. Adachi, E. Nanba, A. Narita, T. Yamagata, H. Osaka, Miglustat therapy in a case of early-infantile Niemann-Pick type C, *Brain Dev.* 39 (2017) 886–890. doi:10.1016/j.braindev.2017.05.006.
- [44] M. Sévin, G. Lesca, N. Baumann, G. Millat, O. Lyon-Caen, M.T. Vanier, F. Sedel, The adult form of Niemann-Pick disease type C., *Brain.* 130 (2007) 120–33.
doi:10.1093/brain/awl260.
- [45] M.T. Vanier, P. Gissen, P. Bauer, M.J. Coll, A. Burlina, C.J. Hendriksz, P. Latour, C. Goizet, R.W.D. Welford, T. Marquardt, S.A. Kolb, Diagnostic tests for Niemann-Pick disease type C (NP-C): A critical review, *Mol. Genet. Metab.* 118 (2016) 244–254.
doi:10.1016/j.ymgme.2016.06.004.
- [46] D.R. Zerbino, P. Achuthan, W. Akanni, M.R. Amode, D. Barrell, J. Bhai, K. Billis, C. Cummins, A. Gall, C.G. Girón, L. Gil, L. Gordon, L. Haggerty, E. Haskell, T. Hourlier, O.G. Izuogu, S.H. Janacek, T. Juettemann, J.K. To, M.R. Laird, I. Lavidas, Z. Liu, J.E. Loveland, T. Maurel, W. McLaren, B. Moore, J. Mudge, D.N. Murphy, V. Newman, M. Nuhn, D. Ogeh, C.K. Ong, A. Parker, M. Patricio, H.S. Riat, H. Schuilenburg, D. Sheppard, H. Sparrow, K. Taylor, A. Thormann, A. Vullo, B. Walts, A. Zadissa, A. Frankish, S.E. Hunt, M. Kostadima, N. Langridge, F.J. Martin, M. Muffato, E. Perry, M. Ruffier, D.M. Staines, S.J. Trevanion, B.L. Aken, F. Cunningham, A. Yates, P. Flicek, *Ensembl 2018, Nucleic Acids Res.* 46 (2018) D754–D761. doi:10.1093/nar/gkx1098.

- [47] P.D. Stenson, M. Mort, E. V. Ball, K. Howells, A.D. Phillips, D.N. Cooper, N.S.T. Thomas, The human gene mutation database: 2008 update, *Genome Med.* (2009). doi:10.1186/gm13.
- [48] M.J. Landrum, J.M. Lee, M. Benson, G. Brown, C. Chao, S. Chitipiralla, B. Gu, J. Hart, D. Hoffman, J. Hoover, W. Jang, K. Katz, M. Ovetsky, G. Riley, A. Sethi, R. Tully, R. Villamarin-Salomon, W. Rubinstein, D.R. Maglott, ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016). doi:10.1093/nar/gkv1222.
- [49] G. Millat, C. Marçais, M.A. Rafi, T. Yamamoto, J.A. Morris, P.G. Pentchev, K. Ohno, D.A. Wenger, M.T. Vanier, Niemann-Pick C1 Disease: The I1061T Substitution Is a Frequent Mutant Allele in Patients of Western European Descent and Correlates with a Classic Juvenile Phenotype, *Am. J. Hum. Genet.* 65 (1999) 1321–1329. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1288284/pdf/AJHGv65p1321.pdf> (accessed January 13, 2018).
- [50] D.P. Bartel, MicroRNAs: target recognition and regulatory functions., *Cell.* 136 (2009) 215–33. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002.
- [51] L. Goedeke, F.M. Vales-Lara, M. Fenstermaker, D. Cirera-Salinas, A. Chamorro-Jorganes, C.M. Ramirez, J.A. Mattison, R. de Cabo, Y. Suarez, C. Fernandez-Hernando, A Regulatory Role for MicroRNA 33* in Controlling Lipid Metabolism Gene Expression, *Mol. Cell. Biol.* 33 (2013) 2339–2352. doi:10.1128/MCB.01714-12.
- [52] K.J. Rayner, Y. Suárez, A. Dávalos, S. Parathath, M.L. Fitzgerald, N. Tamehiro, E.A. Fisher, K.J. Moore, C. Fernández-Hernando, L. Michael, N. Tamehiro, E.A. Fisher, K.J. Moore, MiR-33 Contributes to the Regulation of Cholesterol Homeostasis, *Science* (80-.). 328 (2010) 1570–1573. doi:10.1126/science.1189862.MiR-33.
- [53] K.V.E. Braun, T. Voortman, K. Dhana, J. Troup, W.M. Bramer, J. Troup, R. Chowdhury, A. Dehghan, T. Muka, O.H. Franco, The role of DNA methylation in dyslipidaemia: A systematic review, *Prog. Lipid Res.* 64 (2016) 178–191. doi:10.1016/j.plipres.2016.10.002.
- [54] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov,

- P.E. Bourne, The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 235–242.
doi:10.1093/nar/28.1.235.
- [55] X. Li, F. Lu, M.N. Trinh, P. Schmiede, J. Seemann, J. Wang, G. Blobel, 3.3 Å structure of Niemann-Pick C1 protein reveals insights into the function of the C-terminal luminal domain in cholesterol transport., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) 9116–9121.
doi:10.1073/pnas.1711716114.
- [56] Y.A. Ioannou, The Structure and Function of the Niemann – Pick C1 Protein, *Mol. Genet. Metab.* 181 (2000) 175–181. doi:10.1006/mgme.2000.3061.
- [57] H. Watari, E.J. Blanchette-Mackie, N.K. Dwyer, M. Watari, E.B. Neufeld, S. Patel, P.G. Pentchev, J.F.S. Iii, J.F. Strauss, Mutations in the Leucine Zipper Motif and Sterol-sensing Domain Inactivate the Niemann-Pick C1 Glycoprotein *, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 21861–21866. doi:10.1074/JBC.274.31.21861.
- [58] R.E. Infante, A. Radhakrishnan, L. Abi-Mosleh, L.N. Kinch, M.L. Wang, N. V. Grishin, J.L. Goldstein, M.S. Brown, Purified NPC1 protein II. Localization of sterol binding to a 240-amino acid soluble luminal loop, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 1064–1075.
doi:10.1074/jbc.M707944200.
- [59] R.E. Infante, L. Abi-Mosleh, A. Radhakrishnan, J.D. Dale, M.S. Brown, J.L. Goldstein, Purified NPC1 Protein I. BINDING OF CHOLESTEROL AND OXYSTEROLS TO A 1278-AMINO ACID MEMBRANE PROTEIN * □ S, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 1052–1063.
doi:10.1074/jbc.M707943200.
- [60] M.S. Deffieu, S.R. Pfeffer, J.L. Goldstein, Niemann–Pick type C 1 function requires luminal domain residues that mediate cholesterol-dependent NPC2 binding, *PNAS.* 108 (2011) 18932–18936. doi:10.1073/pnas.1110439108.
- [61] M.T. Vanier, P. Gissen, P. Bauer, M.J. Coll, A. Burlina, C.J. Hendriksz, P. Latour, C. Goizet, R.W.D. Welford, T. Marquardt, S.A. Kolb, Diagnostic test for Niemann-Pic disease type C (NP-C): A critical review, *Mol. Genet. Metab.* (2016).
- [62] C. Tängemo, D. Weber, S. Theiss, E. Mengel, H. Runz, Niemann-Pick Type C disease: characterizing lipid levels in patients with variant lysosomal cholesterol storage., *J. Lipid*

Res. 52 (2011) 813–25. doi:10.1194/jlr.P013524.

- [63] M.E. Gelsthorpe, N. Baumann, E. Millard, S.E. Gale, S.J. Langmade, J.E. Schaffer, D.S. Ory, Niemann-Pick Type C1 I1061T Mutant Encodes a Functional Protein That Is Selected for Endoplasmic Reticulum-associated Degradation Due to Protein Misfolding, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 8229–8236.
- [64] N. Friedland, H.-L. Liou, P. Lobel, A.M. Stock, C.P. by Matthew Scott, Structure of a cholesterol-binding protein deficient in Niemann–Pick type C2 disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 2512–7.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC151372/pdf/pq0503002512.pdf>
(accessed January 15, 2018).
- [65] M.T. Vanier, G. Millat, K. Chikh, Niemann – Pick type C disease : importance of N-glycosylation sites for function and cellular location of the NPC2 protein, *Mol. Genet. Metab.* 83 (2004) 220–230. doi:10.1016/j.ymgme.2004.06.013.
- [66] D.C. Ko, J. Binkley, A. Sidow, M.P. Scott, The integrity of a cholesterol-binding pocket in Niemann-Pick C2 protein is necessary to control lysosome cholesterol levels., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 2518–2525. doi:10.1073/pnas.0530027100.
- [67] M. Willenborg, C.K. Schmidt, P. Braun, J. Landgrebe, K. Von Figura, P. Saftig, E. Eskelinen, Mannose 6-phosphate receptors, Niemann-Pick C2 protein, and lysosomal cholesterol accumulation, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 2559–2569. doi:10.1194/jlr.M500131-JLR200.
- [68] Y. Gong, M. Duvvuri, M. Duncan, J. Liu, J. Krise, Niemann-Pick C1 Protein Facilitates the Efflux of the Anticancer Drug Daunorubicin from Cells According to a Novel Vesicle-Mediated Pathway, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316 (2005) 242–247.
doi:10.1124/jpet.105.089482.
- [69] A.M. Kaufmann, J.P. Krise, Niemann-Pick C1 functions in regulating lysosomal amine content., *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 24584–93. doi:10.1074/jbc.M803715200.
- [70] D. Naren, J. Wu, Y. Gong, T. Yan, K. Wang, W. Xu, X. Yang, F. Shi, R. Shi, Niemann-Pick disease type C1(NPC1) is involved in resistance against imatinib in the imatinib-resistant

- Ph+ acute lymphoblastic leukemia cell line SUP-B15/RI, *Leuk. Res.* 42 (2016) 59–67. doi:10.1016/j.leukres.2016.01.007.
- [71] M. Côté, J. Misasi, T. Ren, A. Bruchez, K. Lee, C.M. Filone, L. Hensley, Q. Li, D. Ory, K. Chandran, J. Cunningham, Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for ebolavirus infection, *Nature*. 477 (2012) 344–348. doi:10.1038/nature10380.
- [72] H. Wang, Y. Shi, J. Song, J. Qi, G. Lu, J. Yan, G.F. Gao, Ebola Viral Glycoprotein Bound to Its Endosomal Receptor Niemann-Pick C1., *Cell*. 164 (2016) 258–268. doi:10.1016/j.cell.2015.12.044.
- [73] Y. Zhao, J. Ren, K. Harlos, D.I. Stuart, C.D.I. Stuart, Structure of glycosylated NPC1 luminal domain C reveals insights into NPC2 and Ebola virus interactions, *FEBS Lett.* 509 (2016) 605–612. doi:10.1002/1873-3468.12089.
- [74] Y.-J. Liao, C.-C. Fang, C.-H. Yen, S.-M. Hsu, C.-K. Wang, S.-F. Huang, Y.-C. Liang, Y.-Y. Lin, Y.-T. Chu, Y.-M. Arthur Chen, Niemann-Pick type C2 protein regulates liver cancer progression via modulating ERK1/2 pathway: Clinicopathological correlations and therapeutical implications, *Int. J. Cancer*. 137 (2015) 1341–1351. doi:10.1002/ijc.29507.
- [75] T. Kamata, H. Jin, S. Giblett, B. Patel, F. Patel, C. Foster, C. Pritchard, The cholesterol-binding protein NPC2 restrains recruitment of stromal macrophage-lineage cells to early-stage lung tumours., *EMBO Mol. Med.* 7 (2015) 1119–37. doi:10.15252/emmm.201404838.
- [76] T. Adachi, Y. Matsumoto, Y. Inagaki, K. Sekimizu, Niemann-Pick disease type C2 protein induces autophagy and inhibits growth in FM3A breast cancer cells., *Drug Discov. Ther.* 9 (2015) 282–8. doi:10.5582/ddt.2015.01014.
- [77] K. Heo, U. Jariwala, J. Woo, Y. Zhan, K.A. Burke, L. Zhu, W.F. Anderson, Y. Zhao, Involvement of Niemann-Pick type C2 protein in hematopoiesis regulation., *Stem Cells*. 24 (2006) 1549–55. doi:10.1634/stemcells.2005-0458.
- [78] E.-M. Kuech, G. Brogden, H.Y. Naim, Alterations in membrane trafficking and pathophysiological implications in lysosomal storage disorders, *Biochimie*. 130 (2016) 152–162. doi:10.1016/j.biochi.2016.09.011.

- [79] S. Torres, E. Balboa, S. Zanlungo, C. Enrich, C. Garcia-Ruiz, J.C. Fernandez-Checa, Lysosomal and Mitochondrial Liaisons in Niemann-Pick Disease, *Front. Physiol.* Nov 30 (2017) 982. doi:10.3389/fphys.2017.00982.
- [80] R. Van Der Kant, J. Neefjes, Small regulators, major consequences – Ca²⁺ and cholesterol at the endosome–ER interface, *J. Cell Sci.* 127 (2014) 929–938. doi:10.1242/jcs.137539.
- [81] S.G. Pfisterer, J. Peränen, E. Ikonen, LDL-cholesterol transport to the endoplasmic reticulum: current concepts., *Curr. Opin. Lipidol.* 27 (2016) 282–7. doi:10.1097/MOL.0000000000000292.
- [82] K. Zhao, N.D. Ridgway, Oxysterol-Binding Protein-Related Protein 1L Regulates Cholesterol Egress from the Endo-Lysosomal System., *Cell Rep.* 19 (2017) 1807–1818. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.028.
- [83] X. Du, A. Zadoorian, I.E. Lukmantara, Y. Qi, A.J. Brown, H. Yang, Oxysterol-binding protein-related protein 5 (ORP5) promotes cell proliferation by activation of mTORC1 signaling, *J. Biol. Chem.* (2018) jbc.RA117.001558. doi:10.1074/jbc.RA117.001558.
- [84] K. Zab, J. Bandorowicz-piku, Mitochondrial dysfunction in fibroblasts derived from patients with Niemann-Pick type C disease, *Arch. Biochem. Biophys.* 593 (2016) 50–59. doi:10.1016/j.abb.2016.02.012.
- [85] M.P. Jackson, E.W. Hewitt, Cellular proteostasis: degradation of misfolded proteins by lysosomes, *Essays Biochem.* 60 (2016) 173–180. doi:10.1042/EBC20160005.
- [86] L. Segatori, Impairment of homeostasis in lysosomal storage disorders, *IUBMB Life.* 66 (2014) 472–477. doi:10.1002/iub.1288.
- [87] A. Aufschnaiter, V. Kohler, S. Büttner, Taking out the garbage: cathepsin D and calcineurin in neurodegeneration., *Neural Regen. Res.* 12 (2017) 1776–1779. doi:10.4103/1673-5374.219031.
- [88] D. Höglinger, P. Haberkant, A. Aguilera-Romero, H. Riezman, F.D. Porter, F.M. Platt, A. Galione, C. Schultz, Intracellular sphingosine releases calcium from lysosomes., *Elife.* 4 (2015). doi:10.7554/eLife.10616.

- [89] H. Xu, D. Ren, Lysosomal physiology., *Annu. Rev. Physiol.* 77 (2015) 57–80. doi:10.1146/annurev-physiol-021014-071649.
- [90] J. Xiong, M.X. Zhu, Regulation of lysosomal ion homeostasis by channels and transporters, *Sci China Life Sci.* 59 (2016) 777–791. doi:10.1007/s11427-016-5090-x.
- [91] X. Zhang, L. Yu, H. Xu, Lysosome calcium in ROS regulation of autophagy., *Autophagy.* 12 (2016) 1954–1955. doi:10.1080/15548627.2016.1212787.
- [92] M.A. Samie, H. Xu, Lysosomal exocytosis and lipid storage disorders., *J. Lipid Res.* 55 (2014) 995–1009. doi:10.1194/jlr.R046896.
- [93] A. Aufschnaiter, L. Habernig, V. Kohler, J. Diessl, D. Carmona-Gutierrez, T. Eisenberg, W. Keller, S. Büttner, The Coordinated Action of Calcineurin and Cathepsin D Protects Against α -Synuclein Toxicity., *Front. Mol. Neurosci.* 10 (2017) 207. doi:10.3389/fnmol.2017.00207.
- [94] K. Todkar, H.S. Ilamathi, M. Germain, Mitochondria and Lysosomes: Discovering Bonds, *Front. Cell Dev. Biol. Front. Cell Dev. Biol.* 5 (2017). doi:10.3389/fcell.2017.00106.
- [95] A. Saffari, S. Kölker, G.F. Hoffmann, D. Ebrahimi-Fakhari, Linking mitochondrial dysfunction to neurodegeneration in lysosomal storage diseases, *J. Inherit. Metab. Dis.* 40 (2017) 631–640. doi:10.1007/s10545-017-0048-0.
- [96] J. Harris, N. Deen, S. Zamani, M.A. Hasnat, Mitophagy and the release of inflammatory cytokines, *Mitochondrion.* (2017). doi:10.1016/j.mito.2017.10.009.
- [97] R. Shi, M. Guberman, L.A. Kirshenbaum, Mitochondrial quality control: The role of mitophagy in aging., *Trends Cardiovasc. Med.* 0 (2017). doi:10.1016/j.tcm.2017.11.008.
- [98] R. Fu, N.M. Yanjanin, S. Bianconi, W.J. Pavan, D. Forbes, Oxidative Stress in Niemann-Pick disease, type C, *Mol. Genet. Metab.* 101 (2011) 214–218. doi:10.1016/j.ymgme.2010.06.018.Oxidative.
- [99] M. de la Mata, D. Cotán, M. Villanueva-Paz, I. de Lavera, M. Álvarez-Córdoba, R. Luzón-Hidalgo, J.M. Suárez-Rivero, G. Tiscornia, M. Oropesa-Ávila, Mitochondrial Dysfunction in Lysosomal Storage Disorders., *Dis. (Basel, Switzerland).* 4 (2016).

doi:10.3390/diseases4040031.

- [100] M.C. Vázquez, E. Balboa, A.R. Alvarez, S. Zanlungo, Oxidative Stress: A Pathogenic Mechanism for Niemann-Pick Type C Disease, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 11 (2012). doi:10.1155/2012/205713.
- [101] A. Papandreou, P. Gissen, Diagnostic workup and management of patients with suspected Niemann-Pick type C disease, *Ther. Adv. Neurol. Disord. Ther Adv Neurol Disord.* 9 (2016) 216–229. doi:10.1177/.
- [102] M.C. Patterson, P. Clayton, P. Gissen, M. Anheim, P. Bauer, O. Bonnot, A. Dardis, C. Dionisi-Vici, H.-H. Klünemann, P. Latour, C.M. Lourenço, D.S. Ory, A. Parker, M. Pocoví, M. Strupp, M.T. Vanier, M. Walterfang, T. Marquardt, Recommendations for the detection and diagnosis of Niemann-Pick disease type C: An update, *Neurol. Clin. Pract.* 7 (2017) 499–511. doi:10.1212/CPJ.0000000000000399.
- [103] F.A. Wijburg, F. Sedel, M. Pineda, C.J. Hendriksz, M. Fahey, M. Walterfang, M.C. Patterson, J.E. Wraith, S.A. Kolb, Development of a suspicion index to aid diagnosis of Niemann-Pick disease type C., *Neurology.* 78 (2012) 1560–7. doi:10.1212/WNL.0b013e3182563b82.
- [104] J.E. Wraith, F. Sedel, M. Pineda, F.A. Wijburg, Niemann-Pick type C Suspicion Index tool : analyses by age and association of manifestations, *J. Inherit. Metab. Dis.* (2014) 93–101. doi:10.1007/s10545-013-9626-y.
- [105] M. Pineda, E. Mengel, H. Jahnová, B. Héron, J. Imrie, C.M. Lourenço, V. Van Der Linden, P. Karimzadeh, V. Valayannopoulos, P. Jesina, J. V Torres, S.A. Kolb, A Suspicion Index to aid screening of early-onset Niemann-Pick disease Type C (NP-C), *BMC Pediatr.* 16 (2016). doi:10.1186/s12887-016-0641-7.
- [106] C.J. Hendriksz, M. Pineda, M. Fahey, M. Walterfang, M. Stampfer, H. Runz, M.C. Patterson, J. V Torres, S.A. Kolb, The Niemann-Pick Disease Type C Suspicion Index: Development of a New Tool to Aid Diagnosis, *J. Rare Disord. Diagnosis Ther.* 1 (2015).
- [107] M.T. Vanier, P. Latour, Laboratory diagnosis of Niemann–Pick disease type C: The filipin staining test, in: *Lysosomes Lysosomal Dis.*, 2015: pp. 357–375.

- [108] I. De Castro-Orós, P. Irún, J.J. Cebolla, V. Rodriguez-Sureda, M. Mallén, M.J. Pueyo, P. Mozas, C. Dominguez, M. Pocoví, on behalf of the S.N.-C. Spanish NP-C Group, Assessment of plasma chitotriosidase activity, CCL18/PARC concentration and NP-C suspicion index in the diagnosis of Niemann-Pick disease type C: a prospective observational study., *J. Transl. Med.* 15 (2017) 43. doi:10.1186/s12967-017-1146-3.
- [109] C.E.M. Hollak, S. Van Weely, M.H.J. Van Oers, J.M.F.G. Aerts, Rapid Publication Marked Elevation of Plasma Chitotriosidase Activity A Novel Hallmark of Gaucher Disease Key words: Gaucher disease * glucosylcerami- dosis * chitotriosidase * enzyme therapy * acid phosphatase, *J Clin Invest.* 93 (1994) 1288–1292.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC294082/pdf/jcinvest00032-0378.pdf> (accessed January 21, 2018).
- [110] Y. Guo, W. He, A.M. Boer, R.A. Wevers, A.M. de Bruijn, J.E. Groener, C.E. Hollak, J.M. Aerts, H. Galjaard, O.P. van Diggelen, Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders., *J. Inherit. Metab. Dis.* 18 (1995) 717–22.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8750610> (accessed January 21, 2018).
- [111] M. Ries, E. Schaefer, T. Lührs, L. Mani, J. Kuhn, M.T. Vanier, F. Krummenauer, A. Gal, M. Beck, E. Mengel, Critical assessment of chitotriosidase analysis in the rational laboratory diagnosis of children with Gaucher disease and Niemann-Pick disease type A/B and C., *J. Inherit. Metab. Dis.* 29 (2006) 647–52. doi:10.1007/s10545-006-0363-3.
- [112] T.G. Hammerschmidt, G. de Oliveira Schmitt Ribas, M.L. Saraiva-Pereira, M.P. Bonatto, R.G. Kessler, F.T.S. Souza, F. Trapp, K. Michelin-Tirelli, M.G. Burin, R. Giugliani, C.R. Vargas, Molecular and biochemical biomarkers for diagnosis and therapy monitorization of Niemann-Pick type C patients, *Int J Dev Neurosci.* 66 (2017) 18–23. doi:10.1016/j.ijdevneu.2017.11.007.
- [113] P. Irún, P. Alfonso, S. Aznarez, P. Giraldo, M. Pocovi, Chitotriosidase variants in patients with Gaucher disease. Implications for diagnosis and therapeutic monitoring, *Clin. Biochem.* 46 (2013) 1804–1807. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.09.006.
- [114] E. Schutyser, A. Richmond, J. Van Damme, Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes, *J. Leukoc. Biol.* 78 (2005) 14–26. doi:10.1189/jlb.1204712.

- [115] R.G. Boot, M. Verhoek, M. De Fost, C.E.M. Hollak, M. Maas, B. Bleijlevens, M.J. Van Breemen, M. Van Meurs, L.A. Boven, J.D. Laman, M.T. Moran, T.M. Cox, J.M.F.G. Aerts, Marked elevation of the chemokine CCL18 / PARC in Gaucher disease : a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention, *Blood*. 103 (2004) 33–40. doi:10.1182/blood-2003-05-1612.Reprints.
- [116] M. Pineda, M.S. Perez-Poyato, M. O’Callaghan, M.A. Vilaseca, M. Pocovi, R. Domingo, L.R. Portal, A.V. Pérez, T. Temudo, A. Gaspar, J.J.G. Peñas, S. Roldán, L.M. Fumero, O.B. de la Barca, M.T.G. Silva, J. Macías-Vidal, M.J. Coll, Clinical experience with miglustat therapy in pediatric patients with Niemann-Pick disease type C: a case series., *Mol. Genet. Metab.* 99 (2010) 358–66. doi:10.1016/j.ymgme.2009.11.007.
- [117] S. Pajares, A. Arias, J. García-Villoria, J. Macías-Vidal, E. Ros, J. de las Heras, M. Girós, M.J. Coll, A. Ribes, Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol: high levels in Niemann-Pick type C, cerebrotendinous xanthomatosis, and lysosomal acid lipase deficiency., *J. Lipid Res.* 56 (2015) 1926–35. doi:10.1194/jlr.M060343.
- [118] giulia Polo, A. Burlina, F. Furlan, T. Kolamunnage, M. Cananzi, L. Giordano, M. Zaninotto, M. Plebani, A. Burlina, High level of oxysterols in neonatal cholestasis: a pitfall in analysis of biochemical markers for Niemann-Pick type C disease, *Clin Chem Lab Med.* (2015). doi:10.1515.
- [119] S. Boenzi, F. Deodato, R. Taurisano, B.M. Goffredo, C. Rizzo, C. Dionisi-Vici, Evaluation of plasma cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol and 7-ketocholesterol in inherited disorders related to cholesterol metabolism, *J. Lipid Res.* 57 (2016) 361–367. <http://www.jlr.org/content/57/3/361.full.pdf>.
- [120] H. Zhang, Y. Wang, N. Lin, R. Yang, W. Qiu, L. Han, J. Ye, X. Gu, Diagnosis of Niemann-Pick disease type C with 7-ketocholesterol screening followed by NPC1 / NPC2 gene mutation confirmation in Chinese patients, *Orphanet J. Rare Dis.* (2014).
- [121] M. Voorink-Moret, S.M.I. Goorden, A.B.P. van Kuilenburg, F.A. Wijburg, J.M.M. Ghauharali-van der Vlugt, F.S. Beers-Stet, A. Zoetekouw, W. Kulik, C.E.M. Hollak, F.M. Vaz, Rapid screening for lipid storage disorders using biochemical markers. Expert center data and review of the literature, *Mol. Genet. Metab.* (2017). doi:10.1016/j.ymgme.2017.12.431.

- [122] C. Helmschrodt, S. Becker, J. Thiery, U. Ceglarek, Preanalytical standardization for reactive oxygen species derived oxysterol analysis in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446 (2014) 726–30. doi:10.1016/j.bbrc.2013.12.087.
- [123] F. Kannenberg, J.-R. Nofer, E. Schulte, J. Reunert, T. Marquardt, M. Fobker, Determination of serum cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol by gas chromatography–mass spectrometry for identification of Niemann-Pick type C (NPC) disease, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 169 (2017) 54–60. doi:10.1016/j.jsbmb.2016.02.030.
- [124] A.-K. Giese, H. Mascher, U. Grittner, S. Eichler, G. Kramp, J. Lukas, D. te Vruchte, N. Al Eisa, M. Cortina-Borja, F.D. Porter, F.M. Platt, A. Rolfs, A novel, highly sensitive and specific biomarker for Niemann-Pick type C1 disease., *Orphanet J. Rare Dis.* 10 (2015) 78. doi:10.1186/s13023-015-0274-1.
- [125] L. Kuchar, J. Sikora, M.E. Gulinello, H. Poupetova, A. Lugowska, V. Malinova, H. Jahnova, B. Asfaw, J. Ledvinova, Quantitation of plasmatic lysosphingomyelin and lysosphingomyelin-509 for differential screening of Niemann-Pick A/B and C diseases, *Anal. Biochem.* 525 (2017) 73–77. doi:10.1016/j.ab.2017.02.019.
- [126] F. Mazzacuva, P. Mills, K. Mills, S. Camuzeaux, P. Gissen, E.-R. Nicoli, C. Wassif, D. te Vruchte, F.D. Porter, M. Maekawa, N. Mano, T. Iida, F. Platt, P.T. Clayton, Identification of novel bile acids as biomarkers for the early diagnosis of Niemann-Pick C disease, *FEBS Lett.* 590 (2016) 1651–1662. doi:10.1002/1873-3468.12196.
- [127] M. Zech, G. Nübling, F. Castrop, A. Jochim, E.C. Schulte, B. Mollenhauer, P. Lichtner, A. Peters, C. Gieger, T. Marquardt, M.T. Vanier, P. Latour, H. Klünemann, C. Trenkwalder, J. Diehl-Schmid, R. Pernecky, T. Meitinger, K. Oexle, B. Haslinger, S. Lorenzl, J. Winkelmann, Niemann-Pick C disease gene mutations and age-related neurodegenerative disorders., *PLoS One.* 8 (2013) e82879. doi:10.1371/journal.pone.0082879.
- [128] S. Castellana, T. Mazza, Congruency in the prediction of pathogenic missense mutations: state-of-the-art web-based tools, *Brief. Bioinform.* 14 (2013) 448–459. doi:10.1093/bib/bbt013.

- [129] R. Vaz-Drago, N. Custódio, M. Carmo-Fonseca, Deep intronic mutations and human disease, *Hum. Genet.* 136 (2017) 1093–1111. doi:10.1007/s00439-017-1809-4.
- [130] L. Rodríguez-Pascau, C. Toma, J. Macías-Vidal, M. Cozar, B. Cormand, L. Lykopoulou, M.J. Coll, D. Grinberg, L. Vilageliu, Characterisation of two deletions involving NPC1 and flanking genes in Niemann–Pick Type C disease patients, *Mol. Genet. Metab.* 107 (2012) 716–720.
- [131] J.P. Schouten, C.J. Mcelgunn, R. Waaijer, D. Zwijnenburg, F. Diepvens, G. Pals, Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC117299/pdf/gnf056.pdf> (accessed January 29, 2018).
- [132] S.M. Herbst, S. Schirmer, C. Posovszky, F. Jochum, T.R. € Odl, J.A. Schroeder, T.F. Barth, U. Hehr, M. Melter, J. Vermehren, Taking the next step forward - Diagnosing inherited infantile cholestatic disorders with next generation sequencing, *Mol. Cell. Probes.* 29 (2015) 291–298. doi:10.1016/j.mcp.2015.03.001.
- [133] C. Marelli, C. Guissart, C. Hubsch, M. Renaud, J.-P. Villemin, L. Larrieu, P. Charles, X. Ayrignac, S. Sacconi, P. Collignon, D. Cuntz-Shadfar, L. Perrin, A. Benarrosh, A. Degardin, O. Lagha-Boukbiza, E. Mutez, B. Carlander, R.J. Morales, V. Gonzalez, C. Carra-Dalliere, S. Azakri, C. Mignard, E. Ollagnon, N. Pageot, D. Chretien, C. Geny, J.-P. Azulay, C. Tranchant, M. Claustres, P. Labauge, M. Anheim, C. Goizet, P. Calvas, M. Koenig, Mini-Exome Coupled to Read-Depth Based Copy Number Variation Analysis in Patients with Inherited Ataxias., *Hum. Mutat.* 37 (2016) 1340–1353. doi:10.1002/humu.23063.
- [134] A. Fernández-Marmiesse, M. Morey, M. Pineda, J. Eiris, M.L. Couce, M. Castro-Gago, J.M. Fraga, L. Lacerda, S. Gouveia, M.S. Pérez-Poyato, J. Armstrong, D. Castiñeiras, J.A. Cocho, Assessment of a targeted resequencing assay as a support tool in the diagnosis of lysosomal storage disorders., *Orphanet J. Rare Dis.* 9 (2014) 59. doi:10.1186/1750-1172-9-59.
- [135] M. Rohanizadegan, S.M. Abdo, A. O’Donnell-Luria, I. Mihalek, P. Chen, M. Sanders, K. Leeman, M. Cho, C. Hung, O. Bodamer, Utility of rapid whole-exome sequencing in the diagnosis of Niemann-Pick disease type C presenting with fetal hydrops and acute liver

- failure., Cold Spring Harb. Mol. Case Stud. 3 (2017). doi:10.1101/mcs.a002147.
- [136] Ficha técnica o resumen de las características de Zavesca, Agencia Eur. Del Medicam. (2018). http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000435/WC500046726.pdf.
- [137] M. Pineda, J.E. Wraith, E. Mengel, F. Sedel, W.-L. Hwu, M. Rohrbach, B. Bembi, M. Walterfang, G.C. Korenke, T. Marquardt, C. Luzy, R. Giorgino, M.C. Patterson, Miglustat in patients with Niemann-Pick disease Type C (NP-C): A multicenter observational retrospective cohort study, Mol. Genet. Metab. 98 (2009) 243–249. doi:10.1016/j.ymgme.2009.07.003.
- [138] F.M. Platt, G.R. Neises, R.A. Dwek, T.D. Butters, N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis., J. Biol. Chem. 269 (1994) 8362–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8132559> (accessed January 30, 2018).
- [139] K.A. Lyseng-Williamson, Miglustat: A Review of Its Use in Niemann-Pick Disease Type C, Drugs. 74 (2014) 61–74. doi:10.1007/s40265-013-0164-6.
- [140] E.A. Bowman, D. Velakoulis, P. Desmond, M. Walterfang, Longitudinal Changes in White Matter Fractional Anisotropy in Adult-Onset Niemann-Pick Disease Type C Patients Treated with Miglustat, in: JIMD Rep., 2017. doi:10.1007/8904_2017_42.
- [141] S. V Kurkov, T. Loftsson, Cyclodextrins., Int. J. Pharm. 453 (2013) 167–80. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.06.055.
- [142] D.S. Ory, E.A. Ottinger, N.Y. Farhat, K.A. King, X. Jiang, L. Weissfeld, E. Berry-Kravis, C.D. Davidson, S. Bianconi, L.A. Keener, R. Rao, A. Soldatos, R. Sidhu, K.A. Walters, X. Xu, A. Thurm, B. Solomon, W.J. Pavan, B.N. Machielse, M. Kao, S.A. Silber, J.C. McKew, C.C. Brewer, C.H. Vite, S.U. Walkley, C.P. Austin, F.D. Porter, Intrathecal 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin decreases neurological disease progression in Niemann-Pick disease, type C1: a non-randomised, open-label, phase 1-2 trial., Lancet (London, England). 390 (2017) 1758–1768. doi:10.1016/S0140-6736(17)31465-4.
- [143] M.R. Fernández-Fernández, M. Gragera, L. Ochoa-Ibarrola, L. Quintana-Gallardo, J.M. Valpuesta, Hsp70 - a master regulator in protein degradation, FEBS Lett. 591 (2017)

2648–2660. doi:10.1002/1873-3468.12751.

- [144] T. Kirkegaard, J. Gray, D.A. Priestman, K.-L. Wallom, J. Atkins, O.D. Olsen, A. Klein, S. Drndarski, N.H.T. Petersen, L. Ingemann, D.A. Smith, L. Morris, C. Bornæs, S.H. Jørgensen, I. Williams, A. Hinsby, C. Arenz, D. Begley, M. Jäättelä, F.M. Platt, Heat shock protein-based therapy as a potential candidate for treating the sphingolipidoses., *Sci. Transl. Med.* 8 (2016) 355ra118. doi:10.1126/scitranslmed.aad9823.
- [145] M.E. Cudkowicz, J.M. Shefner, E. Simpson, D. Grasso, H. Yu, H. Zhang, A. Shui, D. Schoenfeld, R.H. Brown, S. Wieland, J.R. Barber, Northeast ALS Consortium, Arimoclomol at dosages up to 300 mg/day is well tolerated and safe in amyotrophic lateral sclerosis, *Muscle Nerve.* 38 (2008) 837–844. doi:10.1002/mus.21059.
- [146] M. Benatar, J. Wu, P.M. Andersen, N. Atassi, W. David, M. Cudkowicz, D. Schoenfeld, Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of arimoclomol in rapidly progressive *SOD1* ALS, *Neurology.* 90 (2018) e565–e574. doi:10.1212/WNL.0000000000004960.
- [147] A.B. Munkacsi, F.W. Chen, M.A. Brinkman, K. Higaki, G.D. Gutiérrez, J. Chaudhari, J. V. Layer, A. Tong, M. Bard, C. Boone, Y.A. Ioannou, S.L. Sturley, An “Exacerbate-reverse” Strategy in Yeast Identifies Histone Deacetylase Inhibition as a Correction for Cholesterol and Sphingolipid Transport Defects in Human Niemann-Pick Type C Disease, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 23842–23851. doi:10.1074/jbc.M111.227645.
- [148] P. Helquist, F.R. Maxfield, N.L. Wiech, O. Wiest, Treatment of Niemann–pick type C disease by histone deacetylase inhibitors., *Neurotherapeutics.* 10 (2013) 688–97. doi:10.1007/s13311-013-0217-2.
- [149] M.S. Alam, M. Getz, K. Haldar, Chronic administration of an HDAC inhibitor treats both neurological and systemic Niemann-Pick type C disease in a mouse model., *Sci. Transl. Med.* 8 (2016) 326ra23. doi:10.1126/scitranslmed.aad9407.
- [150] T. Bremova, V. Malinová, Y. Amraoui, E. Mengel, J. Reinke, M. Kolníková, M. Strupp, Acetyl-dl-leucine in Niemann-Pick type C: A case series., *Neurology.* 85 (2015) 1368–75. doi:10.1212/WNL.0000000000002041.

- [151] C. Davidson, A. Gibson, T. Gu, R. Chandler, B. Deverman, V. Gradinaru, C. Venditti, W. Pavan, Gene therapy for the treatment of Niemann-Pick disease type C1: Comparison of AAV9 to a novel serotype, AAV-PHP.B, *Mol. Genet. Metab.* 123 (2018) S36–S37. doi:10.1016/j.ymgme.2017.12.075.
- [152] T.P.. Ferraz, M.. Fiúza, M.L.. dos Santos, L. Pontes de Carvalho, N.. Soares, Comparison of six methods for the extraction of lipids from serum in terms of effectiveness and protein preservation, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 58 (2004) 187–193. doi:10.1016/j.jbbm.2003.10.008.
- [153] C. Bordier, Phase Separation of Integral Membrane Proteins in Triton X-114 Solution*, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 1604–1607. <http://www.jbc.org/content/256/4/1604.full.pdf>.
- [154] R.G. Boot, G.H. Renkema, M. Verhoek, A. Strijland, J. Blik, T.M. de Meulemeester, M.M. Mannens, J.M. Aerts, The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency., *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 25680–5. doi:10.1074/JBC.273.40.25680.
- [155] M.G. Reese, F.H. Eeckman, D. Kulp, D. Haussler, Improved Splice Site Detection in Genie, *J. Comput. Biol.* 4 (1997) 311–323. doi:10.1089/cmb.1997.4.311.
- [156] F.-O. Desmet, D. Hamroun, M. Lalande, G. Collod-Bérout, M. Claustres, C. Bérout, Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals., *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) e67. doi:10.1093/nar/gkp215.
- [157] S. Schwartz, E. Hall, G. Ast, SROOGLE: webserver for integrative, user-friendly visualization of splicing signals, *Nucleic Acids Res. Web Serv.* 37 (2009) 189–192. doi:10.1093/nar/gkp320.
- [158] C. Burge, S. Karlin, Prediction of complete gene structures in human genomic DNA, *J. Mol. Biol.* 268 (1997) 78–94. doi:10.1006/jmbi.1997.0951.
- [159] S. Brunak, J. Engelbrecht, S. Knudsen, Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence., *J. Mol. Biol.* 220 (1991) 49–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2067018> (accessed March 11, 2018).
- [160] R.I. Dogan, L. Getoor, W.J. Wilbur, S.M. Mount, SplicePort—An interactive splice-site analysis tool, *Nucleic Acids Res. Web Serv.* 35 (2007) 285–291.

doi:10.1093/nar/gkm407.

- [161] J. Bendl, J. Stourac, O. Salanda, A. Pavelka, E.D. Wieben, J. Zendulka, J. Brezovsky, J. Damborsky, PredictSNP: Robust and Accurate Consensus Classifier for Prediction of Disease-Related Mutations, *PLoS Comput. Biol.* 10 (2014) e1003440. doi:10.1371/journal.pcbi.1003440.
- [162] J. Bendl, M. Musil, J. Štourač, J. Zendulka, J. Damborský, J. Brezovský, P.P. Gardner, PredictSNP2: A Unified Platform for Accurately Evaluating SNP Effects by Exploiting the Different Characteristics of Variants in Distinct Genomic Regions, *PLoS Comput Biol.* 12 (2016). doi:10.1371/journal.pcbi.1004962.
- [163] Y. Choi, A.P. Cham, PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels, *Bioinformatics.* 31 (2015) 2745–2747.
- [164] N.-L. Sim, P. Kumar, J. Hu, S. Henikoff, G. Schneider, P.C. Ng, SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins., *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) W452-7. doi:10.1093/nar/gks539.
- [165] H.A. Shihab, M.F. Rogers, J. Gough, M. Mort, D.N. Cooper, I.N.M. Day, T.R. Gaunt, C. Campbell, An integrative approach to predicting the functional effects of non-coding and coding sequence variation, *Bioinformatics.* 31 (2015) 1536–1543.
- [166] H.A. Shihab, J. Gough, D.N. Cooper, P.D. Stenson, G.L.A. Barker, K.J. Edwards, I.N.M. Day, T.R. Gaunt, T. Gaunt, Predicting the Functional, Molecular, and Phenotypic Consequences of Amino Acid Substitutions using Hidden Markov Models, *Hum. Mutat.* 34 (2012) 57–65. doi:10.1002/humu.22225.
- [167] I.A. Adzhubei, S. Schmidt, L. Peshkin, V.E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, A.S. Kondrashov, S.R. Sunyaev, A method and server for predicting damaging missense mutations, *Nat Methods.* 7 (2010) 248–249. doi:10.1038/nmeth0410-248.
- [168] R. Calabrese, E. Capriotti, P. Fariselli, P.L. Martelli, R. Casadio, Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins, *Hum. Mutat.* 30 (2009) 1237–1244.
- [169] E. Capriotti, R. Calabrese, P. Fariselli, P.L. Martelli, R.B. Altman, R. Casadio, WS-

- SNPs&GO: a web server for predicting the deleterious effect of human protein variants using functional annotation, *BMC Genomics*. 14 (2013) S6. doi:10.1186/1471-2164-14-S3-S6.
- [170] M. Hecht, Y. Bromberg, B. Rost, Better prediction of functional effects for sequence variants, *BMC Genomics*. 16 (2015) S1.
- [171] V. López-Ferrando, A. Gazzo, X. De La Cruz, M. Orozco, J.L. Gelpí, PMut: a web-based tool for the annotation of pathological variants on proteins, 2017 update, *Nucleic Acids Res.* (2017).
- [172] V. Acharya, H.A. Nagarajaram, Hansa: An automated method for discriminating disease and neutral human nsSNPs, *Hum. Mutat.* 33 (2012) 332–337.
- [173] B. Li, V.G. Krishnan, M.E. Mort, F. Xin, K.K. Kamati, D.N. Cooper, S.D. Mooney, P. Radivojac, Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions, *Bioinformatics*. 25 (2009) 2744–2750.
- [174] E. Capriotti, P. Fariselli, R. Casadio, I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure, *Nucleic Acids Res. Web Serv.* 33 (2005). doi:10.1093/nar/gki375.
- [175] D.E. V Pires, D.B. Ascher, T.L. Blundell, DUET: a server for predicting effects of mutations on protein stability using an integrated computational approach, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014). doi:10.1093/nar/gku411.
- [176] S. Richards, N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W.W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, H.L. Rehm, Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology, *Genet. Med.* 17 (2015) 405–24. doi:10.1038/gim.2015.30.
- [177] J. Macías-Vidal, L. Rodríguez-Pascau, G. Sánchez-Ollé, M. Lluch, L. Vilageliu, D. Grinberg, M.J. Coll, Molecular analysis of 30 Niemann – Pick type C patients from Spain, *Clin. Genet.* (2011) 39–49. doi:10.1111/j.1399-0004.2010.01504.x.
- [178] E. Fernández-Valero, A. Ballart, C. Iturriaga, M. Lluch, J. Macias, M. Vanier, M. Pineda,

- M. Coll, Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients : genotype-phenotype correlations, *Clin. Genet.* 68 (2005) 245–254.
doi:10.1111/j.1399-0004.2005.00490.x.
- [179] S.W. Eber, J.M. Gonzalez, M.L. Lux, A.L. Scarpa, W.T. Tse, M. Dornwell, J. Herbers, W. Kugler, R. Özcan, A. Pekrun, P.G. Gallagher, W. Schröter, B.G. Forget, S.E. Lux, Ankyrin-1 mutations are a major cause of dominant and recessive hereditary spherocytosis, *Nat. Genet.* 13 (1996) 214–218. doi:10.1038/ng0696-214.
- [180] K. Ferlinz, R. Hurwitz, M. Weiler, K. Suzuki, K. Sandhoff, M.T. Vanier³, Molecular Analysis of the Acid Sphingomyelinase Deficiency in a Family with an Intermediate Form of Niemann-Pick Disease, *Am. J. Hum. Genet.* 56 (1995) 1343–1349.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1801117/pdf/ajhg00032-0092.pdf>
(accessed December 4, 2017).
- [181] O. Levran, R.J. Desnick, E.H. Schuchman, Niemann-Pick Type B Disease Identification of a Single Codon Deletion in the Acid Sphingomyelinase Gene and Genotype/Phenotype Correlations in Type A and B Patients, *J Clin Invest.* 88 (1991) 806–810.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC295465/pdf/jcinvest00062-0088.pdf>
(accessed December 4, 2017).
- [182] G. Van Goethem, P. Luoma, M. Rantamaki, A. Al Memar, S. Kaakkola, P. Hackman, R. Krahe, A. Lofgren, J.J. Martin, P. De Jonghe, A. Suomalainen, B. Udd, C. Van Broeckhoven, POLG mutations in neurodegenerative disorders with ataxia but no muscle involvement, *Neurology.* 63 (2004) 1251–1257.
doi:10.1212/01.WNL.0000140494.58732.83.
- [183] F. Brugman, H. Scheffer, J.H.J. Wokke, W.M. Nillesen, M. de Visser, E. Aronica, J.H. Veldink, L.H. van den Berg, Paraplegin mutations in sporadic adult-onset upper motor neuron syndromes, *Neurology.* 71 (2008) 1500–1505.
doi:10.1212/01.wnl.0000319700.11606.21.
- [184] H. Miyoshi, K. Ohshima, Epidemiology of malignant lymphoma and recent progress in research on adult T-cell leukemia/lymphoma in Japan, *Int. J. Hematol.* 107 (2018) 420–427. doi:10.1007/s12185-018-2430-6.

- [185] M. Romanello, S. Zampieri, N. Bortolotti, L. Deroma, A. Sechi, A. Fiumara, R. Parini, B. Borroni, F. Brancati, A. Bruni, C. V. Russo, A. Bordugo, B. Bembi, A. Dardis, Comprehensive Evaluation of Plasma 7-Ketocholesterol and Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -Triol in an Italian Cohort of Patients Affected by Niemann-Pick Disease due to NPC1 and SMPD1 Mutations, *Clin. Chim. Acta.* 455 (2016) 39–45. doi:10.1016/j.cca.2016.01.003.
- [186] T.J. Maarup, A.H. Chen, F.D. Porter, N.Y. Farhat, D.S. Ory, R. Sidhu, X. Jiang, P.I. Dickson, Intrathecal 2-Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin in a Single Patient with Niemann-Pick C1 HHS Public Access, *Mol Genet Metab.* 116 (2015) 75–79. doi:10.1016/j.ymgme.2015.07.001.
- [187] L. Bretillon, Å. Sidén, L.-O. Wahlund, D. Lütjohann, L. Minthon, M. Crisby, J. Hillert, C.-G. Groth, U. Diczfalusy, I. Björkhem, Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases, *Neurosci. Lett.* 293 (2000) 87–90. doi:10.1016/S0304-3940(00)01466-X.
- [188] M. Kanneganti, A. Kamba, E. Mizoguchi, Role of chitotriosidase (chitinase 1) under normal and disease conditions, (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3579558/pdf/nihms-442678.pdf> (accessed March 20, 2018).
- [189] T. Koike, G. Ishida, M. Taniguchi, K. Higaki, Y. Ayaki, M. Saito, Y. Sakakihara, M. Iwamori, K. Ohno, Decreased membrane fluidity and unsaturated fatty acids in Niemann-Pick disease type C fibroblasts., *Biochim. Biophys. Acta.* 1406 (1998) 327–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9630707>.
- [190] S.M. Qadri, R. Bissinger, Z. Solh, P.-A. Oldenborg, S. Ahola, S. Forsstrom, et al., Eryptosis in health and disease: A paradigm shift towards understanding the (patho)physiological implications of programmed cell death of erythrocytes., *Blood Rev.* 6 (2017) 6494. doi:10.1016/j.blre.2017.06.001.
- [191] P.A. Marks, A.B. Johnson, Relationship between the age of human erythrocytes and their osmotic resistance: a basis for separating young and old erythrocytes., *J. Clin. Invest.* 37 (1958) 1542–8. doi:10.1172/JCI103746.
- [192] A. Oliván-Viguera, J. Lozano-Gerona, L. López de Frutos, J.J. Cebolla, P. Irún, E. Abarca-

- Lachen, A.J. García-Malinis, Á.L. García-Otín, Y. Gilaberte, P. Giraldo, R. Köhler, Inhibition of intermediate-conductance calcium-activated K channel (KCa3.1) and fibroblast mitogenesis by α -linolenic acid and alterations of channel expression in the lysosomal storage disorders, fabry disease, and niemann pick C, *Front. Physiol.* 8 (2017). doi:10.3389/fphys.2017.00039.
- [193] L. Tesoriere, A. Attanzio, M. Allegra, A. Cilla, C. Gentile, M.A. Livrea, Oxysterol mixture in hypercholesterolemia-relevant proportion causes oxidative stress-dependent eryptosis, *Cell. Physiol. Biochem.* 34 (2014) 1075–1089. doi:10.1159/000366322.
- [194] J.R. Arthur, K.A. Heinecke, T.N. Seyfried, Filipin recognizes both GM1 and cholesterol in GM1 gangliosidosis mouse brain, *J. Lipid Res.* 52 (2011) 1345–1351. doi:10.1194/jlr.M012633.
- [195] M.A. Castello, K.D. Howard, A.J. Castaneda, S. Soriano, Advances in Alzheimer's Disease Filipin Levels as Potential Predictors of Alzheimer's Disease Risk, *Adv. Alzheimer's Dis.* 3 (2014) 137–137. doi:10.4236/aad.2014.33013.
- [196] H.S. Kruth, Localization of Unesterified Cholesterol in Human Atherosclerotic Lesions Demonstration Of Filipin-Positive, Oil-Red-O-Negative Particles, *Am J Pathol.* 114 (1984) 201–8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1900338/pdf/amjpathol00185-0019.pdf> (accessed March 27, 2018).
- [197] T. Geberhiwot, A. Moro, A. Dardis, U. Ramaswami, S. Sirrs, M.P. Marfa, M.T. Vanier, M. Walterfang, S. Bolton, C. Dawson, B. Héron, M. Stampfer, J. Imrie, C. Hendriksz, P. Gissen, E. Crushell, M.J. Coll, Y. Nadjar, H. Klünemann, E. Mengel, M. Hrebicek, S.A. Jones, D. Ory, B. Bembi, M. Patterson, Consensus clinical management guidelines for Niemann-Pick disease type C, *Orphanet J. Rare Dis.* 2018 131. 13 (2018) 50. doi:10.1186/s13023-018-0785-7.
- [198] H. Tamura, T. Takahashi, N. Ban, H. Torisu, H. Ninomiya, G. Takada, N. Inagaki, Niemann – Pick type C disease : Novel NPC1 mutations and characterization of the concomitant acid sphingomyelinase deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 87 (2006) 113–121. doi:10.1016/j.ymgme.2005.07.025.
- [199] K.L. Somers, M.A. Royals, E.D. Carstea, M.A. Rafi, D.A. Wenger, M.A. Thrall, Mutation

- analysis of feline Niemann-Pick C1 disease., *Mol. Genet. Metab.* 79 (2003) 99–103.
doi:10.1016/S1096-7192(03)00074-X.
- [200] L. Verot, K. Chikh, E. Freydière, R. Honoré, M.T. Vanier, G. Millat, Niemann – Pick C disease : functional characterization of three NPC2 mutations and clinical and molecular update on patients with NPC2, *Clin. Genet.* 71 (2007) 320–330. doi:10.1111/j.1399-0004.2007.00782.x.
- [201] A. Niroula, M. Vihinen, Variation Interpretation Predictors: Principles, Types, Performance, and Choice, *Hum. Mutat.* 37 (2016) 579–597. doi:10.1002/humu.22987.
- [202] H. Zhou, Y. Yang, H.-B. Shen, Hum-mPloc 3.0: prediction enhancement of human protein subcellular localization through modeling the hidden correlations of gene ontology and functional domain features, *Bioinformatics.* 33 (2016) btw723.
doi:10.1093/bioinformatics/btw723.
- [203] R. Sharma, M. Bayarjargal, T. Tsunoda, A. Patil, A. Sharma, MoRFPred-plus: Computational Identification of MoRFs in Protein Sequences using Physicochemical Properties and HMM profiles, *J. Theor. Biol.* 437 (2017) 9–16.
doi:10.1016/j.jtbi.2017.10.015.
- [204] E. Álvarez, D. Campa, N. Padilla, X. De Cruz, Development of pathogenicity predictors specific for variants that do not comply with clinical guidelines for the use of computational evidence, *BMC Genomics.* 18 (2017) 1–14. doi:10.1186/s12864-017-3914-0.
- [205] L. Ou, M.J. Przybilla, C.B. Whitley, SAAMP 2.0: an algorithm to predict genotype-phenotype correlation of lysosomal storage diseases, *Clin. Genet.* (2018).
doi:10.1111/cge.13226.
- [206] C. Riera, S. Lois, C. Dom, I. Fernandez-cadenas, J. Montaner, V. Rodr, X. De Cruz, Molecular damage in Fabry disease: Characterization and prediction of alpha-galactosidase A pathological mutations, *Proteins.* 83 (2015) 91–104.
doi:10.1002/prot.24708.
- [207] M.P.G. Vreeswijk, J.N. Kraan, H.M. van der Klift, G.R. Vink, C.J. Cornelisse, J.T. Wijnen, E.

- Bakker, C.J. van Asperen, P. Devilee, Intronic variants in *BRCA1* and *BRCA2* that affect RNA splicing can be reliably selected by splice-site prediction programs, *Hum. Mutat.* 30 (2009) 107–114. doi:10.1002/humu.20811.
- [208] M. El Wafi, H. El Housse, N. Zaid, S. Zouine, N. Nourichafi, K. Bouisk, M. Benajiba, N. Habti, Novel intronic RHD variants identified in serologically D-negative blood donors, *Vox Sang.* 112 (2017) 796–802. doi:10.1111/vox.12570.
- [209] A. Baert, E. Machackova, I. Coene, C. Cremin, K. Turner, C. Portugal-Todd, M.J. Asrat, J. Nuk, A. Mindlin, S. Young, A. MacMillan, T. Van Maerken, M. Trbusek, W. McKinnon, M.E. Wood, W.D. Foulkes, M. Santamariña, M. de la Hoya, L. Foretova, B. Poppe, A. Vral, T. Rosseel, K. De Leeneer, A. Vega, K.B.M. Claes, Thorough in silico and in vitro cDNA analysis of 21 putative *BRCA1* and *BRCA2* splice variants and a complex tandem duplication in *BRCA2* allowing the identification of activated cryptic splice donor sites in *BRCA2* exon 11, *Hum. Mutat.* 39 (2018) 515–526. doi:10.1002/humu.23390.
- [210] N. Sharma, P.R. Sosnay, A.S. Ramalho, C. Douville, A. Franca, L.B. Gottschalk, J. Park, M. Lee, B. Vecchio-Pagan, K.S. Raraigh, M.D. Amaral, R. Karchin, G.R. Cutting, Experimental assessment of splicing variants using expression minigenes and comparison with in silico predictions., *Hum. Mutat.* 35 (2014) 1249–59. doi:10.1002/humu.22624.
- [211] E. Poletto, G. Pasqualim, R. Giugliani, U. Matte, G. Baldo, Worldwide distribution of common *IDUA* pathogenic variants, *Clin. Genet.* (2018). doi:10.1111/cge.13224.
- [212] M. Movassagh, P. Mudvari, M. Kokkinaki, N.J. Edwards, N. Golestaneh, A. Horvath, Analysis for co-occurring sequence features identifies link between common synonymous variant and an early-terminated NPC1 isoform, *J. Clin. Bioinforma.* 4 (2014).
- [213] W.D. Park, J.F. O'Brien, P.A. Lundquist, D.L. Kraft, C.W. Vockley, P.S. Karnes, M.C. Patterson, K. Snow, Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1., *Hum. Mutat.* 22 (2003) 313–25. doi:10.1002/humu.10255.
- [214] N. Vasli, V. Laugel, J. Böhm, B. Lannes, V. Biancalana, J. Laporte, Myotubular myopathy caused by multiple abnormal splicing variants in the *MTM1* RNA in a patient with a mild

- phenotype, *Eur. J. Hum. Genet.* 20 (2012) 701–704. doi:10.1038/ejhg.2011.256.
- [215] V. Calò, L. Bruno, L. La Paglia, M. Perez, N. Margarese, F. Di Gaudio, A. Russo, The Clinical Significance of Unknown Sequence Variants in BRCA Genes, *Cancers (Basel)*. 2 (2010) 1644–1660. doi:10.3390/cancers2031644.
- [216] V. Rimoldi, L. Straniero, R. Asselta, L. Mauri, E. Manfredini, S. Penco, G.P. Gesu, A. Del Longo, E. Piozzi, G. Soldà, P. Primignani, Functional characterization of two novel splicing mutations in the OCA2 gene associated with oculocutaneous albinism type II, *Gene*. 537 (2014) 79–84. doi:10.1016/j.gene.2013.11.102.
- [217] R.A. Maue, R.W. Burgess, B. Wang, C.M. Wooley, K.L. Seburn, M.T. Vanier, M.A. Rogers, C.C. Chang, T.-Y. Chang, B.T. Harris, D.J. Graber, C.A.A. Penatti, D.M. Porter, B.S. Szwergold, L.P. Henderson, J.W. Totenhagen, T.P. Trouard, I.A. Borbon, R.P. Erickson, A novel mouse model of Niemann–Pick type C disease carrying a D1005G-Npc1 mutation comparable to commonly observed human mutations, (n.d.). doi:10.1093/hmg/ddr505.
- [218] W.A. Zeiger, N.I. Jamal, M.T. Scheuner, P. Pittman, K.M. Raymond, M. Morra, S.K. Mishra, Probable Diagnosis of a Patient with Niemann–Pick Disease Type C: Managing Pitfalls of Exome Sequencing, in: *JIMD Rep.*, 2018. doi:10.1007/8904_2018_90.
- [219] E. Bountouvi, A. Papadopoulou, M.T. Vanier, G. Nyktari, S. Kanellakis, H. Michelakakis, A. Dinopoulos, Novel NPC1 mutations with different segregation in two related Greek patients with Niemann-Pick type C disease: molecular study in the extended pedigree and clinical correlations., *BMC Med. Genet.* 18 (2017) 51. doi:10.1186/s12881-017-0409-4.
- [220] J. Björkqvist, S. de Maat, U. Lewandrowski, A. Di Gennaro, C. Oschatz, K. Schönig, M.M. Nöthen, C. Drouet, H. Braley, M.W. Nolte, A. Sickmann, C. Panousis, C. Maas, T. Renné, Defective glycosylation of coagulation factor XII underlies hereditary angioedema type III., *J. Clin. Invest.* 125 (2015) 3132–46. doi:10.1172/JCI77139.
- [221] P.L. De Jager, G. Srivastava, K. Lunnon, J. Burgess, L.C. Schalkwyk, L. Yu, M.L. Eaton, B.T. Keenan, J. Ernst, C. McCabe, A. Tang, T. Raj, J. Replogle, W. Brodeur, S. Gabriel, H.S. Chai, C. Younkin, S.G. Younkin, F. Zou, M. Szyf, C.B. Epstein, J.A. Schneider, B.E. Bernstein, A. Meissner, N. Ertekin-Taner, L.B. Chibnik, M. Kellis, J. Mill, D.A. Bennett,

Alzheimer's disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci., *Nat. Neurosci.* 17 (2014) 1156–63. doi:10.1038/nn.3786.

- [222] S. Hassan, E. Sidransky, N. Tayebi, The role of epigenetics in lysosomal storage disorders: Uncharted territory, *Mol. Genet. Metab.* 122 (2017) 10–18. doi:10.1016/j.ymgme.2017.07.012.
- [223] D.M. Ruderfer, T. Hamamsy, M. Lek, K.J. Karczewski, D. Kavanagh, K.E. Samocha, E.A. Exome Aggregation Consortium, M.J. Daly, D.G. MacArthur, M. Fromer, S.M. Purcell, Patterns of genic intolerance of rare copy number variation in 59,898 human exomes., *Nat. Genet.* 48 (2016) 1107–11. doi:10.1038/ng.3638.
- [224] M. Fromer, J.L. Moran, K. Chambert, E. Banks, S.E. Bergen, D.M. Ruderfer, R.E. Handsaker, S.A. McCarroll, M.C. O'Donovan, M.J. Owen, G. Kirov, P.F. Sullivan, C.M. Hultman, P. Sklar, S.M. Purcell, Discovery and statistical genotyping of copy-number variation from whole-exome sequencing depth., *Am. J. Hum. Genet.* 91 (2012) 597–607. doi:10.1016/j.ajhg.2012.08.005.
- [225] B. de la Morena-Barrio, M. de la Morena-Barrio, J. Padilla, R. Teruel-Montoya, S. Asenjo, E. Wypasek, A. Undas, A. Miñano, V. Vicente, J. Corral, Identification of a New Mechanism of Antithrombin Deficiency Hardly Detected by Current Methods: Duplication of SERPINC1 Exon 6, *Thromb. Haemost.* (2018). doi:10.1055/s-0038-1637721.

9 MANUSCRITOS





Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cca

The erythrocyte osmotic resistance test as screening tool for cholesterol-related lysosomal storage diseases

Laura López de Frutos^{a,b,*}, Jorge J. Cebolla^{a,c,d}, Pilar Irún^{a,c}, Ralf Köhler^{c,e}, Pilar Giraldo^{a,b,c}^a Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón) GIS-012, Unidad de Investigación Traslacional, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza 50009, Spain^b Fundación para el Estudio y la Terapéutica de la Enfermedad de Gaucher y Otras Lisosomales (FEETEG), Zaragoza 50009, Spain^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) U-752, Zaragoza 50009, Spain^d Universidad de Zaragoza, Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Zaragoza 50009, Spain^e Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo (ARAID), Zaragoza 50009, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Niemann Pick type C
Lysosomal acid lipase deficiency
Osmotic haemolysis
Cholesterol-related lysosomal diseases
Screening test

ABSTRACT

Background: Erythrocyte volume regulation and membrane elasticity are essential for adaptation to osmotic and mechanical stress, and life span. Here, we evaluated whether defective cholesterol trafficking caused by the rare lysosomal storage diseases (LSDs), Niemann-Pick type C (NPC) and Lysosomal acid lipase (LAL) deficiency (LALD) impairs these properties. Moreover, we tested whether measurements of cholesterol membrane content and osmotic resistance serve as a screening test for these LSDs.

Methods: Patients were genotyped for mutations in *NPC1*, *NPC2*, or *LIPA* genes. We measured LSD plasma biomarkers and LAL activity. Red blood cells (RBC) membrane cholesterol content was evaluated in 73 subjects. Osmotic resistance tests (ORT) were conducted in 121 blood samples from LSD suspected patients and controls. **Results:** We did not find statistically significant differences between RBC cholesterol content between subjects and controls. However, the ORT, particularly at 0.49% (w/v) hypotonic sodium chloride solution, revealed a significant higher osmotic resistance in LSDs patients than in controls. We established a cut-off value of $\leq 51\%$ of haemolysis with sensibility and specificity values of 80% and 70%, respectively.

Conclusions: NPC and LALD do not alter cholesterol content in the RBC membrane but increase osmotic resistance. Therefore, ORT serves as screening test for the studied LSDs.

1. Introduction

Membrane elasticity and deformability of healthy red blood cells (RBC) are special biophysical properties that allow them to squeeze through small arterioles and capillaries, the splenic filter, and adaptation to osmotic stress. This high elasticity is accomplished by a unique composition of membrane phospholipids, cholesterol, and proteins [1]. Their distribution within the membrane differs, with choline phospholipids, such as sphingomyelin, being present mostly in the outer lipid layer. Amino phospholipids, such as phosphatidylserine, are located in the inner layer, enabling interactions with the cytoskeleton, and therefore maintaining structural stability [1,2]. Unesterified cholesterol is equally distributed in both layers. Disturbances in the ratio of cholesterol and phospholipids affect membrane fluidity and elasticity and consequently osmotic resistance such as e.g. in models of

dyslipidemia [3,4]. This may also be the case in some inherited lysosomal storage diseases (LSDs) such as Niemann-Pick type C disease (NPC; MIM#257220), where a high concentration of cholesterol and sphingomyelin was found in the cell membrane of adult patients' fibroblasts [5]. In NPC, de-esterified cholesterol is not properly transport inside the lysosome by NPC2 or transferred to the cytosol by NPC1, due to mutations in the genes that encodes these proteins (*NPC1*: MIM#607623 and *NPC2*: MIM#601015) [6]. Cholesterol metabolism and transport are also impaired in Lysosomal acid lipase (LAL) deficiency (LALD; MIM#278000). In this condition, lacking of the LAL caused by a mutated *LIPA* gene (MIM#613497) [7] fails to de-esterify and liberate cholesterol for further transport via the NPC1/2 way. These diseases are ultra-rare diseases with a prevalence of less 1:100.000, approximately [8,9]. Whether RBC osmotic resistance (OR) is impaired in these diseases has not been studied yet. However, testing

Abbreviations: red blood cells, RBC; lysosomal storage diseases, LSDs; Niemann-Pick type C disease, NPC; lysosomal acid lipase, LAL; lysosomal acid lipase deficiency, LALD; osmotic resistance, OR; chitotriosidase, ChT; chemokine (C–C motif) ligand 18/pulmonary and activation-regulated chemokine, CCL18/PARC; 7-ketocholesterol, 7-KC; osmotic resistance test, ORT; sodium chloride, NaCl; receiver-operating curves, ROC; area under the curve, AUC

* Corresponding author at: Unidad de Investigación Traslacional, Hospital Universitario Miguel Servet, Edificio General, Planta 0, Paseo Isabel la Católica 1-3, 50009 Zaragoza, Spain.
E-mail address: l.lopezdefrutos@sehhs.es (L. López de Frutos).

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.02.010>

Received 14 November 2017; Received in revised form 15 January 2018; Accepted 12 February 2018

Available online 13 February 2018

0009-8981/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

OR may serve as a standard, low-cost test to screen for patients in the general population.

So far, the diagnosis of specific LSDs is challenging because of some overlaps of clinical and biochemical features and the unknown harmfulness and penetrance of mutations. Yet, a common clinical feature is hepatomegaly, splenomegaly, or both. Some of most used biomarkers for lysosomal lipidoses were chitotriosidase activity (ChT) and the concentration of the chemokine (C–C motif) ligand 18/pulmonary and activation-regulated chemokine (CCL18/PARC). Despite their levels were increased on several lysosomal diseases, they are not specific and can be raised by other pathologies [10]. In LALD, the accumulation of triglycerides and esterified cholesterol in several tissues (spleen, liver, adrenal glands and other tissues) produces the clinical symptoms [7]. NPC presents a continuum spectrum of symptoms being the visceral manifestations the first one to show up. The disease evolves adding neurological and psychiatric symptoms. The accumulation of de-esterified cholesterol, sphingolipids, and of other lipids is the mayor trigger here but the mechanism causing neuropsychiatric features remains unclear [10]. The impairment of cholesterol trafficking causes oxidative stress and increased production of oxysterols [11], such as 7-ketocholesterol (7-KC), in LALD and NPC alike [12,13]. Interestingly, it has been shown that oxysterols are related to an increase of the rate of eryptosis, an apoptosis-like cell death that is characterized by phosphatidylserine flip, membrane leakage, and cell shrinkage [14].

In the present study, we tested the hypothesis that cholesterol content in RBC membranes is altered in NPC and LALD and that osmotic resistance test (ORT) may serve as a fast and reliable screening method to identify patients who should undergo specific diagnosis test in the general population.

2. Material and methods

2.1. Patients and controls

We studied 121 subjects of whom 57 were males and 63 were females with a median age of 35 years old. Experiments were performed within 24 h after the extraction of blood samples. All samples were obtained at diagnosis time. The study design was approved by the institutional board of FEETEG foundation and by the ethical committee for clinical research in Aragón (CEIC Aragón). All individuals provided written informed consent and the study was conducted in accordance with the principles stated in the Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, Helsinki, Finland, 1964, and as amended in Fortaleza, Brazil, 2013.

2.2. Osmotic resistance test

The ORT was performed according to the published method [15]. Briefly, we mixed 5 μ L of EDTA-blood with 495 μ L of sodium chloride solutions (NaCl; Fresenius Kabi, Barcelona, Spain) with varying hypotonicity (0.1%-steps from 0% (most hypotonic) solution to 0.9% (isotonic)). We conducted a second test with more finely graduated changes covering the steepest part of response curve (0.01% steps from 0.40% to 0.55% of NaCl). After 30 min, samples were briefly centrifuged to precipitate the non-lysed cells and cell debris. Haemoglobin contents in supernatants were quantified by spectrophotometry at 540 nm (Sinergy HT; Biotek, Winnoski, USA). Data were normalized to maximal haemolysis (set as 100% at 0% of NaCl) and lowest (set as 0% at 0.9%).

2.3. Cholesterol concentration in erythrocyte membranes

The concentration of cholesterol (mg/mL) in RBC membranes was evaluated in 73 of the 121 samples. RBC were lysed in hypotonic lysis-buffer and the cholesterol-containing fraction was isolated using the Bordier's method with slight modifications as previous published [16,17]. The cholesterol quantification in all samples was accomplished

with the Cholesterol Quantification Kit (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and measured with a spectrophotometer (Sinergy HT, Biotek, USA) according to the manufacturers' instructions.

2.4. Plasma LSD biomarkers

2.4.1. Chitotriosidase activity and *CHIT1* genotyping

Chitotriosidase activity (ChT) was fluorometrically measured as previously published [18], using 4-methylumbelliferyl- β -D-N'-N'-triacetylchitotrioside (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) as substrate at non-saturating concentrations. In order to identify carriers of the c.1049_1072dup24 *CHIT1* variant, *CHIT1* genotyping was performed in samples showing low activity values [19]. Of note, this variant is a null allele. Only homozygous subjects show null activity. The observed values were normalized according to genotype by multiplying by two the value obtained from heterozygous patients.

2.4.2. Chemokine CCL18/PARC quantification

Chemokine (C–C motif) ligand 18/pulmonary and activation-regulated chemokine (CCL18/PARC) concentrations were measured by immunoquantification method (R&D Systems Europe, Ltd) according to the manufacturers' instructions [20].

2.4.3. 7-Ketocholesterol (7-KC) quantification

We extracted and separated 7-KC by liquid chromatography and coupled tandem mass spectrometry system as described previously [21–23].

2.4.4. Lysosomal acid lipase enzyme activity

The LAL activity was measured in dry blood spot by fluorometric approaches using 4-methylumbelliferyl-palmitate (Apollo Scientific, GB) as substrate and Lalistat-2 (Chemical tools, LLC, South Bend, IN, USA), as specific LAL inhibitor, based on slightly modified version of the published protocol [24].

2.4.5. Genotyping

All exons and intron-exon boundaries for *NPC1*, *NPC2*, and *LIPA* genes were amplified by PCR using previously described protocols with slight modifications [25] or by home-made design. PCR products were sequenced by capillary electrophoresis using an ABI3500XL analyser (Applied Biosystems). Sequences were compared with reference sequences available in the GenBank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>): *NPC1* (NG_012795.1), *NPC2* (NG_007117.1) and *LIPA* (NG_008194.1).

2.4.6. Statistical analysis

Data sets from patients' groups were compared using the non-parametric tests (Kruskal-Wallis, and Spearman correlation) when appropriate. We also calculated receiver-operating curves (ROC) and the area under the curve (AUC) with a confidence interval of 95%. Calculations were done with the IBM SPSS statistics v22 software and MedCalc v17.7 (and *p*-values < 0.05 were considered significant).

Cut-off for the ORT was established according to 80 and 90% of sensitivity. The proportion of negative results that are true negative (Negative predictive value, NPV) were calculated given the disease's prevalence in our sample. Two other methods, dot plot and $\bar{x} - 2SD$ (\bar{x} : media and SD: standard deviation) were used to evaluate the most accurate cut-off and the results were compared with the decided cut-off according with sensitivity.

3. Results

3.1. Classification of patients

Samples were classified into two groups; healthy control group and patients with LSDs. The patients were further divided according to the

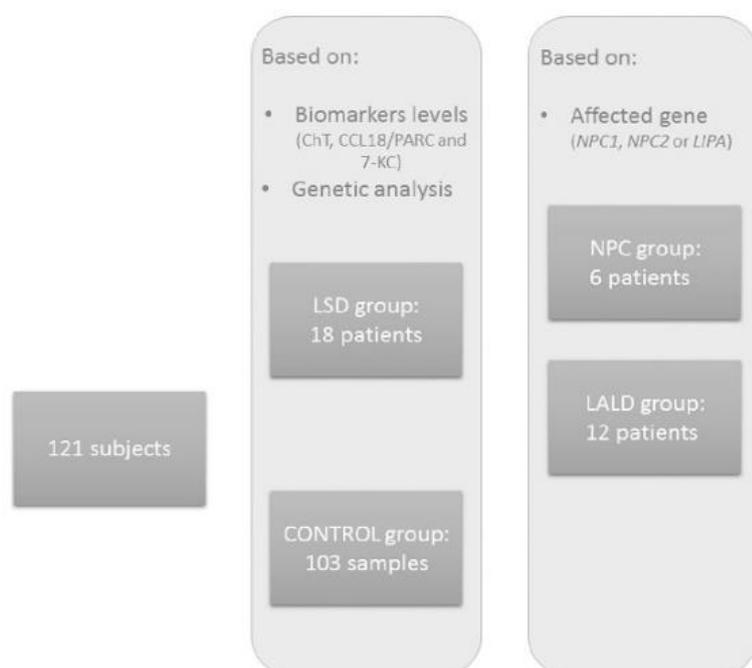


Fig. 1. Subject's classification. The ORT was realized to 121 subjects that were classified as controls or as LSD group. All those patients with harmful variants and at least one plasmatic biomarker higher than the reference range comprised LSD group. The 18 patients were further divided according to the affected gene: NPC group when variants were on *NPC1* or *NPC2* and LALD group when they are on *LIPA*.

type of LSD (Fig. 1).

3.2. ORT

The degree of haemolysis at different hypotonic NaCl concentrations was evaluated to choose the best hypotonicity to find differences between the control and the LSD group. The ROC analysis found 0.49% of NaCl as optimal concentration (AUC = 0.84; CI: 0.74–0.94) (Fig. 2).

We found significant differences between controls and LSDs (p -value < 0.00). In the LSD group, the OR was higher than in the control group.

Further comparisons between specific LSDs (NPC or LALD) and controls revealed that OR was statistically different in both subgroups if compared to controls (p -value 0.01 and 0.00 respectively) but not

between them according with DeLong test (p -value > 0.05) (Fig. 3).

Considering the established sensitivity at 80%, the cut-off value for the percentage of haemolysis at 0.49% of NaCl was 51%. This value presents a 70% of specificity and a 95% of NPV. Therefore, all subjects with lower values must be considered second tier studies.

If we would to improve the sensitivity to 90%, the cut-off value for this NaCl concentration was at 35% but in this case the specificity decrease until 62% and the NPV rise to 97%. This cut-off established is similar to the one calculated by dot plot or $\bar{x} - 2SD$ (data not shown).

3.3. Cholesterol contents in RBC membranes

The content of cholesterol in erythrocyte membranes was evaluated in 73 subjects matched by age and gender (63 controls and 10 LSDs). There was no differences and no significant correlation between cholesterol concentration and subject status (p -value > 0.05).

4. Discussion

The aim of the study was to evaluate whether cholesterol content in the RBC membrane is altered in LSD and whether ORT is suitable screening tool for cholesterol imbalance LSDs. The results showed no difference in cholesterol content whereas differences in the OR of RBC between patients with LSD and controls were found. Therefore, ORT screening can be a useful tool to identify LSDs patients. The early diagnosis in patients with progressive severity disease induces to look for the implementation of a simple and fast screening test. Our proposal based in a simple and fast test with a high negative predictive value and high sensitivity try to discriminate early the suspicious of LSD with defective cholesterol trafficking and possibilities of therapeutic intervention. The test has limitations regarding its specificity, but the high negative predictive value as a screening test must be continued by standard diagnostic procedures.

Changes in OR are feature of several diseases. Regarding LSDs, there are no data available on OR of RBC. Here, we showed for the first that OR was increased in patients with LALD and NPC. This difference was more evident at a 0.49% NaCl and allowed us to discriminate between

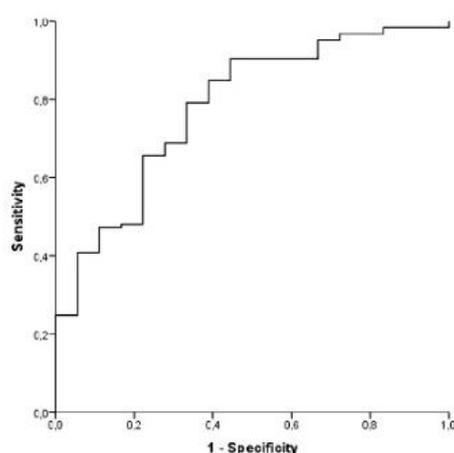


Fig. 2. ROC curve for LSDs group. ROC Curve was evaluated for all NaCl tested concentrations, obtaining the best area under the curve for a solution with 0.49% of NaCl. The obtained AUC was 0.84, with a confidence interval since 0.74 to 0.94.

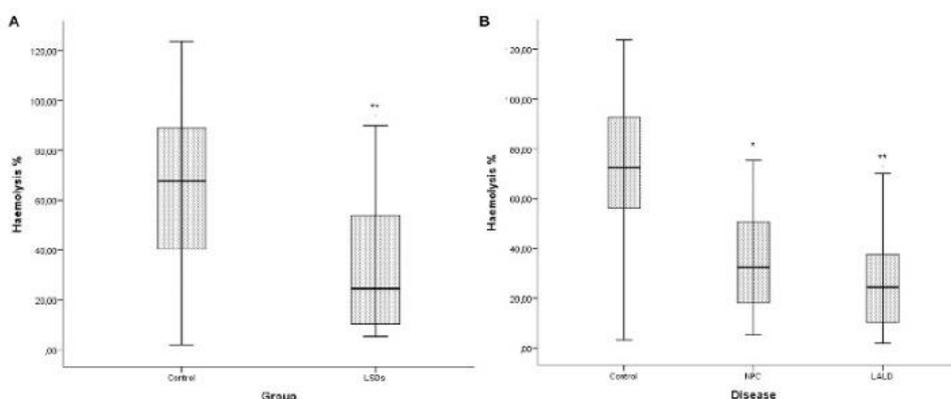


Fig. 3. Boxplot for patients vs controls.

Representative Boxplot for the observed ORT differences at 0.49% NaCl between groups. (A) LSDs patients vs controls: Significant differences were found in LSD patients vs Controls (p -value = 0.00). (B) Each disease vs controls: Significant differences were found in NPC or LALD patients vs controls (p -values 0.01 and 0.00 respectively) but no between NPC and LALD (p -value > 0.05).

the LSDs evaluated in this study and healthies. However, we found the same change in LALD and NPC, which did not allow us to discriminate between these two LSDs. Other LSDs as Gaucher disease (GD) shown the same pattern than LALD and NPC (unpublished data).

The underlying molecular mechanisms causing this increase of OR remain unclear. Yet, we did not find evidence that changes in the cholesterol the RBC membrane were responsible for this change as haemolysis did not correlate with cholesterol concentration. Interestingly, a previous study on NPC patients reported that the amount of cholesterol in fibroblast membrane correlated with the presence of the disease [5].

Lysosomal lipidoses usually produce lipid accumulation and ensuing pathological alterations in macrophages. In fact, a higher degree of macrophage activation is evidenced by an increased synthesis of the chemokine CCL18/PARC and other biomarkers (ChT, ferritin...) [26]. Moreover, a higher number of activated macrophages in liver increased clearance of aged erythrocytes [27]. Because of a higher clearance rate, the renewal rate of RBC raises, with larger number of recently released RBC, compensating the clearance of aged RBCs. Intriguingly, “young” RBC showed a higher OR than aged RBCs [28], which explains the overall higher OR in RBCs from LSD patients. An alternative explanation for the higher OR could be an increased stiffness of the splenic and hepatic vascular system that could produce a higher mechanical stress damaging the RBC membrane and increasing clearance and renewal [29].

Oxidative stress has been reported to be increased in LSDs, such as LALD or NPC, because of an accumulation of non-catalysed substrates inside the lysosomes which leads to their malfunction and among other biochemical features the raising production of reactive species of oxygen or nitrogen which can oxidize the molecules and produce oxidized products, such as oxysterols [30]. Interestingly, at the level of RBC, oxysterols has been reported to enhance eryptosis, membrane leakage, and hemolysis [31]. So, our alterations of OR can be a result of an increased oxidative stress. Taken together, our data suggests that the increased OR was secondary to alterations of RBC turnover because either of higher macrophage activation, hepatic/splenic failure, oxidative stress, or combinations hereof. This hypothesis was enhanced because of the ORT alteration on GD patients. These do not presented an increasing on oxysterols levels but the oxidative stress was increased by other pathways [32], diminishing the hypothesis related with the membrane cholesterol concentration. To further clarify this, it might be useful to include more diseases with hepatic affection in order to support the hypothesis that pathological altered liver functions are the main reason for the higher OR.

Regarding our main hypothesis, we showed that the ORT could be

of utility as first tier of LALD and NPC screening in general population. Yet, a limitation of our study was the reduced sample size per group, which is, however, a general disadvantage when studying rare diseases. A stronghold of the study is that all determinations were performed at diagnosis and there are not interferences with specific therapy for LSDs, probably some LADL patients with high cholesterol levels can be undergoing statins treatment but we have not information about it. Finally still, the differences between LSDs and controls were clear-cut. As a first tier screening test, it understandably cannot compete with or replace current standards for the diagnosis of LSD, but it could be of help to decide on costly and time-consuming genetic and biochemical diagnosis.

Funding source

There are no funding sources for this study.

Ethical approval

The study design was approved by the institutional board of FEETEG foundation and by the ethical committee for clinical research in Aragón (CEIC Aragón).

Informed consent

All individuals provided written informed consent and the study was conducted in accordance with the principles stated in the Declaration of Helsinki.

Authors contribution

Laura López de Frutos designed and performed the research, analysed the data and wrote the paper. Jorge J Cebolla and Pilar Irún performed the research and analysed the data. Ralf Köhler and Pilar Giraldo designed the research. All the authors draft and approved the submitted paper.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank the physicians from hospitals that provided samples for the study: Dr. Barba (Albacete), Dra. Tomasini (Mútua de

Terrassa), Dr. Juanpérez and Dr. Quintero-Bernabéu (Vall d'Hebrón), Dra. García-Jiménez and Dr. Ros-Arnal (Miguel Servet), Dra. Camarena (La Paz), Dr. Gaona (Burgos), Dr. Gil-Ortega (Virgen de la Arrixaca), Dr. de las Heras and Dra. Pérez (Cruces), Dra. Ibarretxe and Dra. Plana (Sant Joan de Reus), Dra. López-Aristegui (Virgen de la Salud), Dra. Martín-Hernández (12 de Octubre), Dr. Ojeda (Puerta de Hierro), Dr. Romero-Imbroda (Melilla) and Dra. Ruiz del Prado (San Pedro).

References

- J. Narla, N. Mohandas, Red cell membrane disorders, *Int. J. Lab. Hematol.* 39 (2017) 47–52, <http://dx.doi.org/10.1111/ijlh.12657>.
- Z. Bystrická, Z. Duračková, Gas chromatography determination of fatty acids in the human erythrocyte membranes – a review, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 115 (2016) 35–40, <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2016.09.007>.
- M. da Silva Garrote-Filho, M. Bernardino-Neto, N. Penha-Silva, Influence of erythrocyte membrane stability in atherosclerosis, *Curr. Atheroscler. Rep.* 19 (4) (2017) 17, <http://dx.doi.org/10.1007/s11883-017-0653-2>.
- J. Donaldson, K. Pillay, M.T. Madziva, K.H. Erlwanger, The effect of different high-fat diets on erythrocyte osmotic fragility, growth performance and serum lipid concentrations in male, Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*), *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 99 (2015) 281–289, <http://dx.doi.org/10.1111/jpn.12250>.
- T. Koike, G. Ishida, M. Taniguchi, K. Higaki, Y. Ayaki, M. Saito, Y. Sakakihara, M. Iwamori, K. Ohno, Decreased membrane fluidity and unsaturated fatty acids in Niemann-Pick disease type C fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta* 1406 (1998) 327–335, [http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4439\(98\)00019-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4439(98)00019-2).
- M. Xu, K. Liu, M. Swaroop, F.D. Porter, R. Sidhu, S. Finkes, D.S. Ory, J.J. Marugan, J. Xiao, N. Southall, W.J. Pavan, C. Davidson, S.U. Walkley, A.T. Remaley, U. Baxa, W. Sun, J.C. Mckew, C.P. Austin, W. Zheng, α -Tocopherol reduces lipid accumulation in Niemann-Pick type C1 and Wolman cholesterol storage disorders, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 39349–39360, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.357707>.
- Z. Reiner, O. Guardamagna, D. Nair, H. Soran, K. Hovingh, S. Bertolini, S. Jones, M. Coric, S. Calandra, J. Hamilton, T. Eagleton, E. Ros, Lysosomal acid lipase deficiency – an under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction, *Atherosclerosis* 235 (2014) 21–30, <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.003>.
- C.J. Hendriks, M. Anheim, P. Bauer, O. Bonnot, A. Chakrapani, J.-C. Corvol, T.J. de Koning, Degtyareva Anna, C. Dionisi-Vici, S. Doss, T. Duning, P. Giunti, R. Iodice, T. Johnston, D. Kelly, H.-H. Klünemann, S. Lorenzl, A. Padovani, M. Poci, M. Synofzik, A. Terblanche, F. Then Bergh, M. Topçu, C. Tranchant, M. Walterfang, C. Velten, S.A. Kolb, The hidden Niemann-Pick type C patient: clinical niches for a rare inherited metabolic disease, *Curr. Med. Res. Opin.* 33 (5) (2017) 877–889, <http://dx.doi.org/10.1080/03007995.2017.1294054>.
- D. Moodie, Lysosomal acid lipase deficiency (LALD), *Congenit. Heart Dis.* 10 (2015) 191–192, <http://dx.doi.org/10.1111/ehd.12274>.
- M.T. Vanier, P. Gissen, P. Bauer, M.J. Coll, A. Burlina, C.J. Hendriks, P. Latour, C. Goizet, R.W.D. Welford, T. Marquardt, S.A. Kolb, Diagnostic test for Niemann-Pick disease type C (NP-C): a critical review, *Mol. Genet. Metab.* 120 (1–2) (2017) 34–37, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.06.004>.
- R. Fu, N.M. Yanjanin, S. Bianconi, W.J. Pavan, D. Forbes, Oxidative stress in Niemann-Pick disease, type C, *Mol. Genet. Metab.* 101 (2011) 214–218, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.06.018>.
- I. De Castro-Orós, P. Irún, J.J. Cebolla, V. Rodríguez-Sureda, M. Mallén, M.J. Pueyo, P. Mozas, C. Dominguez, M. Poci, on behalf of the S.N.-C. Spanish NP-C Group, Assessment of plasma chitotriosidase activity, CCL18/PARC concentration and NP-C suspicion index in the diagnosis of Niemann-Pick disease type C: a prospective observational study, *J. Transl. Med.* 15 (2017) 43, <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-017-1146-3>.
- S. Boenzi, F. Deodato, R. Taurisano, B.M. Goffredo, C. Rizzo, C. Dionisi-Vici, Evaluation of plasma cholestanane-3 β ,5 α ,6 β -triol and 7-ketocholesterol in inherited disorders related to cholesterol metabolism, *J. Lipid Res.* 57 (2016) 361–367, <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M061978>.
- L. Tesoriere, A. Attanzio, M. Allegra, A. Cilla, C. Gentile, M.A. Lívrea, Oxysterol mixture in hypercholesterolemia-relevant proportion causes oxidative stress-dependent eryptosis, *Cell. Physiol. Biochem.* 34 (2014) 1075–1089, <http://dx.doi.org/10.1159/000366322>.
- M.L.G. Bautista, W. Altaf, R. Lall, R.A. Wapnir, Cord blood red cell osmotic fragility: a comparison between preterm and full-term newborn infants, *Early Hum. Dev.* 72 (2003) 37–46, [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3782\(03\)00009-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3782(03)00009-4).
- T.P. Ferraz, M. Fiúza, M.L. dos Santos, L. Pontes de Carvalho, N. Soares, Comparison of six methods for the extraction of lipids from serum in terms of effectiveness and protein preservation, *J. Biochem. Biophys. Methods* 58 (2004) 187–193, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbbm.2003.10.008>.
- C. Bordier, Phase separation of integral membrane proteins in triton X-114 solution*, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 1604–1607, <http://www.jbc.org/content/256/4/1604.full.pdf>.
- C.E.M. Hollak, S. van Weely, M.H.J. van Oers, J.M.F.G. Aerts, Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease, *J. Clin. Invest.* 93 (1994) 1288–1292, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI117084>.
- P. Irún, P. Alfonso, S. Aznarez, P. Giraldo, M. Poci, Chitotriosidase variants in patients with Gaucher disease, Implications for Diagnosis and Therapeutic Monitoring, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.09.006>.
- R.G. Boot, M. Verhoek, M. De Fost, C.E.M. Hollak, M. Maas, B. Bleijlevens, M.J. Van Breemen, M. Van Meurs, L.A. Boven, J.D. Laman, M.T. Moran, T.M. Cox, J.M.F.G. Aerts, Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention, *Blood* 103 (2004) 33–40, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-05-1612.Reprints>.
- N. Lin, H. Zhang, W. Qiu, J. Ye, L. Han, Y. Wang, X. Gu, Determination of 7-ketocholesterol in plasma by LC-MS for rapid diagnosis of acid SMase-deficient Niemann-Pick disease, *J. Lipid Res.* 55 (2014) 338–343, <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.D044024>.
- L. Baila-Rueda, A. Cenarro, S. Barcelo-Batllo, M. Poci, E. Ros, F. Civeira, C. Nerin, C. Dome, Simultaneous determination of oxysterols, phytosterols and cholesterol precursors by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry in human serum, *Anal. Methods* 5 (2013) 2249–2257, <http://dx.doi.org/10.1039/C3AY26395A>.
- J. Cebolla, I. de Castro-Orós, P. Irún, P. Alfonso, L. López de Frutos, M. Andrade-Campos, M. Poci, P. Giraldo, Experience with 7-ketocholesterol and ccl18/parc as surrogate biomarkers in a series of Spanish Niemann-Pick disease type C patients, *Mol. Genet. Metab.* 114 (2015) S29.
- J. Hamilton, I. Jones, R. Srivastava, P. Galloway, A new method for the measurement of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor Lalstat 203, *Clin. Chim. Acta* 413 (2012) 1207–1210, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2012.03.019>.
- M. Zech, G. Nübling, F. Castrop, A. Jochim, E.C. Schulte, B. Mollenhauer, P. Lichtner, A. Peters, C. Gieger, T. Marquardt, M.T. Vanier, P. Latour, H. Klünemann, C. Trenkwalder, J. Diehl-Schmid, R. Pemeczyk, T. Meitinger, K. Oexle, B. Haslinger, S. Lorenzl, J. Winkelmann, Niemann-Pick C disease gene mutations and age-related neurodegenerative disorders, *PLoS One* 8 (2013) e82879, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0082879>.
- J. Strimemann, N. Belmatoug, F. Camou, C. Serratrice, R. Froissart, C. Caillaud, T. Levade, L. Astudillo, J. Serratrice, A. Brassier, C. Rose, T. Billette de Villemeur, M.G. Berger, A review of Gaucher disease pathophysiology, clinical presentation and treatments, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2) (2017), <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18020441>.
- S.M. Qadri, R. Bissinger, Z. Solh, P.-A. Oldenburg, S. Ahola, S. Forsstrom, et al., Eryptosis in health and disease: a paradigm shift towards understanding the (patho) physiological implications of programmed cell death of erythrocytes, *Blood Rev.* (6) (2017) 6494, <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2017.06.001>.
- P.A. Marks, A.B. Johnson, Relationship between the age of human erythrocytes and their osmotic resistance: a basis for separating young and old erythrocytes, *J. Clin. Invest.* 37 (1958) 1542–1548, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI103746>.
- P.W. Marks, Hematologic manifestations of liver disease, *Semin. Hematol.* 50 (2013) 216–221, <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminhematol.2013.06.003>.
- B. Donida, C.E.D. Jacques, C.P. Mescka, D.G.B. Rodrigues, D.P. Marchetti, G. Ribas, R. Giugliani, C.R. Vargas, Oxidative damage and redox in lysosomal storage disorders: biochemical markers, *Clin. Chim. Acta* 466 (2017) 46–53, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2017.01.007>.
- Z. Pataj, G. Liebisch, G. Schmitz, S. Matysik, Quantification of oxysterols in human plasma and red blood cells by liquid chromatography high-resolution tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1439 (2015) 82–88, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.015>.
- A.M. Zahran, K.I. Elsayh, S.E.M. El-Deek, M.A.H. El-Baz, Oxidative stress, trace elements, and circulating microparticles in patients with Gaucher disease before and after enzyme replacement therapy, *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 21 (2015) 58–65, <http://dx.doi.org/10.1177/1076029613489595>.



Web-based bioinformatics predictors: Recommendations to assess lysosomal cholesterol trafficking diseases related genes.

Laura López de Frutos^{a,b,*}, Jorge J. Cebolla^{a,c,d}, Pilar Irún^{a,c}, Ralf Köhler^{c,e}, Pilar Giraldo^{a,b,c}



^a Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), Unidad de Investigación Traslacional, Spain

^b Fundación para el Estudio y Terapéutica de la Enfermedad de Gaucher y Otras Lisosomales (FEETEG), Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Unidad de Investigación Traslacional, Spain

^d Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, University of Zaragoza, Spain

^e Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo (ARAID), Spain

ARTICLE INFO

Keywords

NPC1

NPC2

LIPA

Bioinformatic prediction tools

Lysosomal storage diseases

Cholesterol trafficking

ABSTRACT

Introduction: The growing number of genetic variants of unknown significance (VUS) and availability of several *in silico* prediction tools make difficult to choose one of them to evaluate potentially deleterious gene variants.

Materials and Methods: We used several programs and evaluated which software was best to predict the impact of genetic variants found in lysosomal storage diseases (LSD) caused by defects in cholesterol trafficking. We evaluated the sensitivity, specificity, accuracy, precision and Matthew's correlation coefficient of the most common software. **Results:** The results showed that for exonic variants, only MutPred1 reached 100% accuracy and generated the best predictions (sensitivity and accuracy = 1.00). Regarding intronic variants, SROOGLE or Human Splicing Finder (HSF) generated the best predictions (sensitivity = 1.00, and accuracy = 1.00).

Discussion: Next Generation Sequencing substantially increased the number of detected genetic variants, most of which were considered to be VUS, creating a need for accurate pathogenicity prediction. The importance of accurately predicting LSDs, with a majority of private mutations not previously reported, is the focus of the present study. **Conclusion:** The best prediction tool for the *NPC1*, *NPC2* and *LIPA* variants is MutPred1 for exonic regions and HSF and SROOGLE for intronic regions and splice sites.

1. Introduction

Lysosomal storage disorders (LSDs) are a group of rare inherited metabolic diseases that cause progressive worsening of health status due to accumulation of non-catalysed lipid metabolites inside lysosomes. Some LSDs are a consequence of impaired cholesterol trafficking either during the de-esterifying process or during intracellular trafficking, for instance, in lysosomal acid lipase deficiency (MIM#278000, LALD) or Niemann-Pick Type C disease (MIM#257220, NPC), respectively (Vanier 2015; Ramirez et al. 2011). These diseases arise from deleterious variants in the genes that encode the proteins that are involved in these processes: *LIPA* (MIM#613947) is the gene that causes LALD and *NPC1* (MIM#607623) and *NPC2* (MIM#601015) cause NPC disease (Vanier 2015).

One of the major difficulties for making an accurate diagnosis is the unknown or poorly predictable pathogenicity of newly found gene variants, which makes it difficult to decide on further costly and time-

consuming biological characterizations of the respective proteins. Databases provide information about many common variants that are found in the general population; when a variant was frequent on several ethnic healthy populations it is likely not harmful and its use to be well documented but typically, most of the pathogenic alleles are low frequency and less information can be found.

Over the last years, several classification algorithms are used to predict the pathogenicity of variants for protein function. Most of these tools evaluate the conservation status of each position on the aminoacidic chain, but nowadays a growing number of algorithms including 3D structure, protein-protein interactions and subcellular localization are being developed in order to evaluate how these features can be modifying the protein function (Capriotti et al. 2013; Disfani et al. 2012). Also, algorithms to analyse the impact of indels and non-coding variants are being developed (Folkman et al. 2015; Zhao et al. 2013).

* Corresponding author. Instituto de Investigación Sanitaria Aragón, Unidad de Investigación Traslacional, Spain.
E-mail address: llopezdefrutos.iit@gmail.com (L. López de Frutos).

These tools evaluate evolutionarily conserved sequences within species or the impact amino-acid variations but choosing the best prediction tool to achieve optimal results is still difficult for geneticists (Niroula and Vihinen 2016). Recommendations by both the American College of Medical Genetics (ACMG) and the European Society of Human Genetics (ESHG) include the use of prediction methods for clinical purposes, but the decision about which predictor still difficult (Niroula and Vihinen 2016).

There are only a few experimental studies for massive amounts of amino acid substitutions in single proteins, and for variations on proteins related with LSDs a new prediction algorithm is under development, but it do not include both above-mentioned LSD (Niroula and Vihinen 2016; Ou, Przybilla, and Whitley 2018). The purpose of the present study is therefore to evaluate several bioinformatics prediction tools for the aforementioned LSD genes and to identify the most accurate tool to estimate the pathogenicity of newly found genetic variants.

2. Material and methods

2.1. Datasets composition

Known variants from the *LIPA*, *NPC1* and *NPC2* genes were selected from the dbSNP database provided by the National Centre for Biotechnology Information (NCBI, <http://ncbi.nlm.nih.gov>). Only 104 of these variants were reported to be benign or have pathogenic clinical significance. The data were compared with the data provided by the Ensembl database (The European Bioinformatics Institute; <http://www.ensembl.org>). Finally, we obtained a dataset comprising 72 variants, for which the same clinical significance was available.

For this project, we excluded variants with likely or uncertain significance and selected those with clear clinical importance, provided from multiple submitters and without interpretation conflicts. All of the pathogenic variants have been reported in at least one previous article, and all of the benign variants showed a high frequency in the general population.

We assembled two groups of variants according to their genetic location (exonic or intronic region).

2.2 Selection of *in silico* predictors

To evaluate exonic variants, we used 14 procedures from a total of 11 different software programs, including a consensus classifier (PredictSNP) with two approaches, one approach based on the amino-acid sequence (PredictSNP1) (Bendl et al. 2014) and the approach based on the nucleotide sequence (PredictSNP2) (Bendl et al. 2016). The other procedures included: PROVEAN, which has genomic and protein approaches (Choi and Cham 2015); SIFT (Sim et al. 2012); FATHMM for coding (Inherited Diseases) and non-coding (MKL) variants (Shihab et al. 2015); Polyphen2 (Adzhubei, Jordan, and Sunyaev 2013); SNPs&GO and SNPs&GO3D (Capriotti et al. 2013); SNAP2 (Hecht, Bromberg, and Rost 2015); PMuT2016 (López-Ferrando et al. 2017); and both MutPred approaches (Li et al. 2009; Pejaver et al. 2017). Most of these programs uses an evolutionary conservation study to analyse the effect of the variant and they has been trained with the variants on the SwissVar database. Nowadays, 25 of the 37 analysed variants on this project has been included on the training database. Each software established its own cut-off value to obtain the highest sensitivity and specificity. More information about the selected software can be found on Supplementary Materials (Table 01S).

Subcellular localization and protein-protein interaction algorithms (Hum-mPLoc 3.0 and MoRF-pred) has been used to explore this features (Sharma et al. 2016; Zhou, Yang, and Shen 2016).

To evaluate intronic variants, 10 software programs were assessed: FATHMM for non-coding variants (FATHMM-MKL

(Shihab et al. 2015), the consensus classifier PredictSNP2 (Bendl et al. 2016), Splice Site Prediction by Neural Network (Reese et al. 1997), Human Splicing Finder (HSF) (Desmet et al. 2009), SROOGLE (Schwartz, Hall, and Ast 2009), FSPLICE, and SPL from softberry (www.softberry.com), the GENESCAN web server at MIT (Burge and Karlin 1997), NetGene2 server (Hebsgaard et al. 1996), and SplicePort (Dogan et al. 2007).

Four algorithms, PredictSNP2 (Bendl et al. 2016), MutPredSplice (Mort et al. 2014), GENESCAN web server at MIT (Burge and Karlin 1997) and Detecting disease-causing genetic variations (DDIG) (Zhao et al. 2013), has been used to analyse the predicted effect for frameshift variants.

All of the prediction tools used in this work were web-based, freeware, and easy to use, despite the existence of a big quantity of downloading prediction software, these are not included on the study, due to computing limitations. We used the default mode for the latest updates available in February 2018.

2.3 Statistical analysis

The accuracies of the prediction programs were evaluated by several measures: True-positives (TPs) were variants that were correctly predicted as harmful. True-negatives (TNs) were variants that were properly qualified as benign. The variants published as benign but detected as harmful by the prediction tools were termed False-positives (FP). False-negatives (FN) were predicted as benign by the software but considered to be harmful in NCBI and Ensembl databases.

The sensitivity, specificity, accuracy, precision, and Matthew's correlation coefficient (MCC; 1, 2, 3, 4 and 5, respectively) were calculated by one prediction program. Scores ranged from 0 to 1 for sensitivity, specificity, accuracy, and precision, while the MCC ranged from -1 to 1, where -1 indicated total disagreement between the predictions and observations and 1 indicated a perfect prediction.

$$\text{Sensitivity} = \frac{TP}{TP+FN} \quad (1)$$

$$\text{Specificity} = \frac{TN}{TN+FP} \quad (2)$$

$$\text{Accuracy} = \frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN} \quad (3)$$

$$\text{Precision} = \frac{TP}{TP+FP} \quad (4)$$

$$\text{MCC} = \frac{TP \cdot TN - FP \cdot FN}{\sqrt{(TP+FP)(TP+FN)(TN+FP)(TN+FN)}} \quad (5)$$

Receiver-operating curves (ROC) as well as the areas under curves (AUROC) were calculated using the free R software, version 3.4.0, and the packages RODBC and ROCR (R Core Team 2017; Ripley and Lapsley 2017; Sing et al. 2005).

The analysis of splicing software include a manually curated comparison between the results provided by the wild type and the variant sequences.

3. Results

A total of 37 exonic and 15 intronic variants were included in the present study. Variants in the 5' untranslated region were excluded from the present study and 17 frameshift mutations evaluated by two different predictors, but statistics and ROC curves were not made due to all of them are described as damaging variants. More information on the final dataset is available in the Supplementary Materials (Table 2S). Predictions were sorted as "harmful" or "benign" (Tables 1, 2 and 3). Each program calculated a numerical value categorized as "harmful" or "benign" according to the published cut-off (More information about cut-off measures for each predictor is available in Table 01S).

3.1 Exonic variants

For exonic variants, all of the approaches showed accuracy, sensitivity, precision, and specificity levels higher than 0.75. The lowest values for this group of variants were calculated with PredictSNP1 (sensitivity = 0.79, specificity = 0.67, accuracy = 0.78, precision = 0.96, and MCC = 0.29) while MutPred1 gave the highest score (1 for all parameters).

Table 1. Raw data from each predictor to each variant included in the exonic subset. The first row includes the predictor established cut-off for considering neutral or damaging variants.

		PROVEAN		FATHMM				SNPs & GO			MutPred			Predict	
		Genomic	Protein	SIFT	MKL	Inherited diseases	Polyphen 2	SNPs & GO	SNPs & GO 3D	SNAP2	PMuT 2016	2	1	SNP1	SNP2
Damaging cut-off		≤-2.5	≤-2.5	< 0.05	>0.5	<-1.5	>0.5	> 0.5	> 0.5	> 0	>0.5	>0.6	>0.5	text	>0.06
Gene	SNPs														
NPC1	rs28942108	-2,16	-2,16	0,06	0,99	-3,24	0,96	0,44	0,86	76,00	0,58	0,56	0,85	Neutral	1,00
NPC1	rs28942107	-3,60	-3,60	0,00	1,00	-3,64	1,00	0,86	0,81	94,00	0,77	0,59	0,87	Disease	1,00
NPC1	rs28942106	-8,64	-8,64	0,00	0,99	-2,99	1,00	0,88	0,86	81,00	0,85	0,89	0,90	Disease	1,00
NPC1	rs28942105	-4,80	-4,80	0,00	1,00	-2,87	1,00	0,76	0,95	93,00	0,81	0,65	0,94	Disease	1,00
NPC1	rs28940897	-2,84	-2,84	0,05	0,98	-3,31	0,08	0,77	0,62	85,00	0,65	0,60	0,83	Disease	0,02
NPC1	rs80358253	-5,40	-5,40	0,00	0,98	-4,22	1,00	0,87	0,96	82,00	0,87	0,92	0,90	Disease	1,00
NPC1	rs80358254	-3,86	-3,06	0,44	0,99	-3,25	0,79	0,34	0,44	-47,00	0,66	0,60	0,87	Disease	1,00
NPC1	rs80358257	-7,78	-7,78	0,01	1,00	-3,53	1,00	0,43	0,76	60,00	0,66	0,78	0,91	Disease	1,00
NPC1	rs80358258	-2,85	-2,85	0,01	1,00	-2,10	1,00	0,58	0,69	14,00	0,80	0,67	0,86	Disease	1,00
NPC1	rs80358259	-3,84	-3,84	0,00	0,90	-2,40	0,88	0,70	0,73	80,00	0,74	0,48	0,95	Disease	1,00
NPC1	rs120074130	-1,82	-1,82	0,12	1,00	-4,49	1,00	0,42	0,61	44,00	0,34	0,74	0,94	Neutral	1,00
NPC1	rs120074131	-3,50	-3,50	0,00	0,94	-3,17	1,00	0,72	0,83	96,00	0,89	0,86	0,97	Disease	1,00
NPC1	rs120074132	-3,25	-3,25	0,30	0,96	-3,33	1,00	0,48	0,87	87,00	0,66	0,51	0,82	Disease	1,00
NPC1	rs120074134	-3,98	-3,98	0,13	0,96	-2,69	0,97	0,41	0,59	69,00	0,61	0,32	0,88	Disease	0,13
NPC1	rs120074135	-1,02	-1,02	0,16	0,91	-3,32	0,01	0,10	0,24	47,00	0,30	0,50	0,80	Neutral	-1,00
NPC1	rs120074136	-10,97	-10,97	0,00	0,99	-5,13	1,00	0,84		28,00	0,81	0,97	0,97	Disease	1,00
NPC1	rs372030650	-5,48	-5,48	0,02	0,99	-3,36	0,43	0,52	0,48	16,00	0,74	0,50	0,85	Disease	0,82
NPC1	rs374526072	-3,84	-3,84	0,00	1,00	-2,03	1,00	0,84	0,81	79,00	0,87	0,88	0,90	Disease	1,00
NPC1	rs483352885	-6,76	-6,76	0,00	0,99	-2,43	0,94	0,69	0,52	42,00	0,67	0,75	0,58	Disease	0,16
NPC1	rs483352887	-7,00	-7,00	0,00	0,99	-3,10	0,99	0,53	0,82	50,00	0,86	0,75	0,65	Disease	1,00
NPC1	rs483352888	-5,00	-5,00	0,00	0,99	-3,96	0,99	0,61	0,63	61,00	0,73	0,67	0,69	Disease	1,00
NPC1	rs483352890	-5,52	-5,52	0,00	1,00	-3,82	0,94	0,30	0,70	58,00	0,62	0,56	0,64	Neutral	0,16
NPC1	rs483352891	-4,86	-4,86	0,00	0,98	-4,34	1,00	0,77	0,85	66,00	0,82	0,76	0,93	Disease	1,00
NPC1	rs730880963	-3,76	-3,76	0,01	1,00	-3,32	1,00	0,50	0,60	29,00	0,79	0,55	0,94	Disease	1,00
NPC1	rs483352886	-3,96	-3,96	0,01	0,99	-3,47	0,87	0,54	0,72	29,00	0,73	0,44	0,64	Disease	1,00
NPC1	rs13381670	-3,59	-3,60	0,20	0,99	-2,34	1,00	0,46		58,00	0,74	0,81	0,81	Disease	1,00
NPC1	rs61731969		-1,96	0,74	0,99	-2,46	1,00	0,13		24,00	0,26	0,39	0,53	Neutral	1,00
NPC2	rs11694	-2,58	-2,58	0,00	0,99	-2,64	1,00	0,21		76,00	0,42	0,52	0,89	Disease	1,00
NPC2	rs80358260	-10,82	-10,82	0,00	0,99	-7,51	1,00	0,82		87,00	0,80	0,93	0,99	Disease	1,00
NPC2	rs80358261		-2,20	0,91	0,99	-0,97	0,97	0,21		12,00	0,26	0,33	0,57	Neutral	0,64
NPC2	rs80358264	-7,99	-7,99	0,02	0,99	-4,01	1,00	0,56		64,00	0,73	0,60	0,97	Disease	1,00
NPC2	rs80358266	-1,36	-1,37	0,00	1,00	-2,39	0,98	0,05		44,00	0,69	0,89	0,94	Neutral	-1,00
NPC2	rs104894458	-6,60	-6,71		0,96	-0,92	1,00	0,86		97,00	0,93	0,96	0,97	Disease	1,00
NPC2	rs483352893	-7,45	-7,21		0,99	-2,54	1,00	0,75		89,00	0,92	0,91	0,99	Disease	1,00
LIPA	rs121965086	-2,88	-2,88	0,01	0,99	-2,38	0,98	0,22	0,16	83,00	0,58	0,43	0,22	Disease	1,00
LIPA	rs587778878	0,32	0,32	0,25	0,27	-1,94	0,00	0,07	0,06	-93,00	0,03	0,15	0,37	Neutral	-1,00
LIPA	rs1051338	-1,34	-1,21		0,97	-0,51	0,00	0,23		57,00	0,28	0,45	0,25	Neutral	-1,00

Table 2. Raw data from each predictor to each variant included in the intronic subset. The first row includes the predictor-established cut-off for considering neutral or damaging variants.

		FATHMM MKL	Predict SNP2	Splice Site Prediction by Neural Network	Human Splicing Finder	Sroogle	FSPICE	SPL	The GENSCAN Web Server at MIT	NetGene 2 Server	Splice Port
Damaging cut-off		>0.5	> 0.06								
Gene	SNPs										
NPC1	rs483352892	0,91292	-0,267	No changes	Site alteration	Site alteration	Site alteration	No changes	No peptide change	No changes	No changes
NPC1	rs797044431			Site alteration	Site alteration	Site alteration	Site alteration	No changes	Altered peptide	Site alteration	No changes
NPC1	rs72283949	0,99497	1	No changes	Site alteration	Site alteration	Site alteration	No changes	Altered peptide	No changes	No changes
NPC1	rs3745024	0,99375	1	No changes	Site alteration	Site alteration	Site alteration	Site alteration	Altered peptide	Site alteration	Site alteration
NPC1	rs6507717			No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	No peptide change	No changes	No changes
NPC1	rs55809701	0,29038	-0,4878	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	No peptide change	No changes	No changes

		FATHMM MKL	Predict SNP2	Splice Site Prediction by Neural Network	Human Splic- ing Finder	Sroogle	FSPLICE	SPL	The GENSCAN Web Server at MIT	NetGene 2 Server	Splice Port
<i>NPC1</i>	rs200103695	0,11242	-1	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	No peptide change	No changes	No changes
<i>NPC1</i>	rs2510344			No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	No peptide change	No changes	No changes
<i>NPC1</i>	rs6507720	0,10654	-1	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	No peptide change	Site alteration	No changes
<i>NPC2</i>	rs80358268	0,20017	-1	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	No peptide change	No changes	No changes
<i>NPC2</i>	rs879253740	0,16907	-1	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	No peptide change	Site alteration	No changes
<i>LIPA</i>	rs141302830	0,23717	-0,439	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	No peptide change	No changes	No changes
<i>LIPA</i>	rs1556478	0,10956	-1	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	No peptide change	No changes	No changes
<i>LIPA</i>	rs2297472			No changes	No changes	No changes	Site alteration	No changes	No peptide change	No changes	No changes
<i>LIPA</i>	rs3802656	0,25002	-0,4094	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	No peptide change	No changes	No changes

Table 3. Raw data from each predictor to each variant included in the frameshifts subset. The first row includes the predictor-established cut-off for considering neutral or damaging variants.

		Predict SNP2	MutPred Splice	The GENSCAN Web Server at MIT	DDIG
Damaging cut-off		> 0,06	> 0,06		>0,5
Gene	SNPs				
<i>NPC1</i>	rs398123284			Predicted peptide shorter	0,87
<i>NPC1</i>	rs483352879			Predicted peptide shorter	
<i>NPC1</i>	rs483352880			Predicted peptide shorter	0,81
<i>NPC1</i>	rs483352881			Predicted peptide shorter	
<i>NPC1</i>	rs483352883			Predicted peptide shorter	
<i>NPC1</i>	rs483352884			Predicted peptide shorter	0,87
<i>NPC1</i>	rs483352889	1,00	0,88	Predicted peptide shorter	0,87
<i>NPC1</i>	rs786200878			No peptide change	
<i>NPC1</i>	rs786200879			No peptide change	
<i>NPC2</i>	rs80358262	0,20	0,19	Predicted peptide shorter	0,68
<i>NPC2</i>	rs80358263	0,04	0,13	Sequence change	0,69
<i>NPC2</i>	rs80358267			Predicted peptide longer	
<i>NPC2</i>	rs104894457	-0,59	0,61	Predicted peptide shorter	0,6
<i>LIPA</i>	rs121965087	0,27	0,72	Predicted peptide change	0,72
<i>LIPA</i>	rs267607218	0,29	0,55	No peptide change	0,84
<i>LIPA</i>	rs780495201			Predicted peptide change	0,84
<i>LIPA</i>	rs797045094	0,30	0,7	No peptide change	0,77

FATHMM, used for non-coding variants, was found to be as sensitive as MutPred1, but moderately less specific, with a higher number of FP results (sensitivity = 1.00, specificity = 0.33, accuracy = 0.95, precision = 0.94 and MCC = 0.45). All statistic has been represented on Fig. 1.

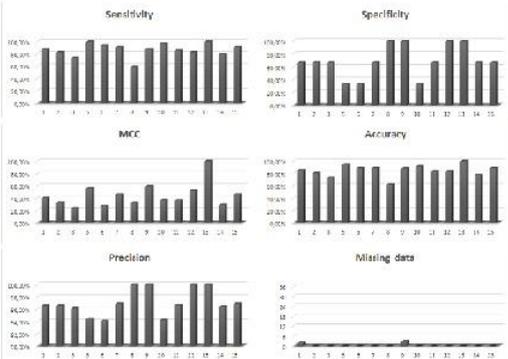


Fig. 1 Graphical representation of the sensitivity, specificity, MCC, accuracy, precision and missing data for the variants included in the exonic subset. All of the evaluated predictors showed good values for sensitivity, accuracy and precision (> 0.75), but in some cases, specificity and MCC did not reach values over 0.5. The used predictors are the following: (1) PROVEAN Genomics, (2) PROVEAN Proteins, (3) SIFT, (4) FATHMM-MKL, (5) FATHMM Inherited Diseases, (6) Polyphen2, (7) SNPs&GO, (8) SNPs&GO3D, (9) SNAP2, (10) PMuT2016, (11) MutPred2, (12) MutPred1, (13) PredictSNP1, (14) PredictSNP2.

The ROC curves were computed by each predictor, MutPred1 offered the highest values for the area under the curve (AUROC=1), followed by the MutPred2 (AUROC=0.906) (Fig. 2).

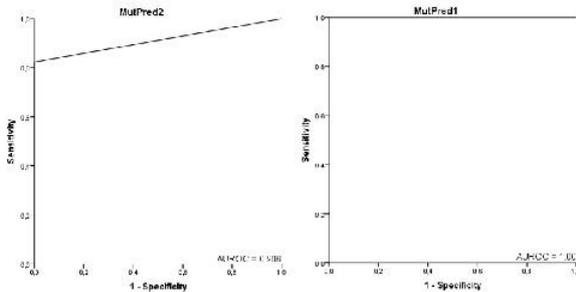


Fig. 2 Receiver-operating (ROC) for the best-evaluated predictors in the exonic group. MutPred1 obtains the best AUROC = 1.00 with a complete success on the analysed variants. MutPred 2 have an AUROC = 0.91

MoRF-pred and Hum-mPLoc were excluded of this analysis because none of the analysed variants are involved on protein-protein interactions or altered the protein localization. The MoRF algorithms do not shown any changes from wild type and variants sequences. According with Hum_mPLoc all variants for LIPA and NPC2, as well as the wild type proteins are located, with similar score, on the lysosome. NPC1 is a transmembrane protein, except for two damaging variants which do not obtain enough score to be located anywhere, maybe because of the higher degradation of the protein due to the variants. SNPs&GO3D were excluded because the inexistence of 3D structure for human NPC2 and LIPA proteins.

3.2 Intronic variants

Three predictors, FATHMM-MKL, HSF, and SROOGLE, gave the highest values for all measures (Fig. 3; sensitivity = 1.00, specificity = 1.00, accuracy = 1.00, precision = 1.00, and MCC = 1.00), but FATHMM-MKL was not able to evaluate insertion/deletion variants (normalized missing data = 0.19) and HSF and SROOGLE allowed us to study all of the variants (normalized missing data = 0.00). The ROC curves were calculated for each program, obtaining values for HSF and SROOGLE of AUROC=1.00 (Fig. 4).

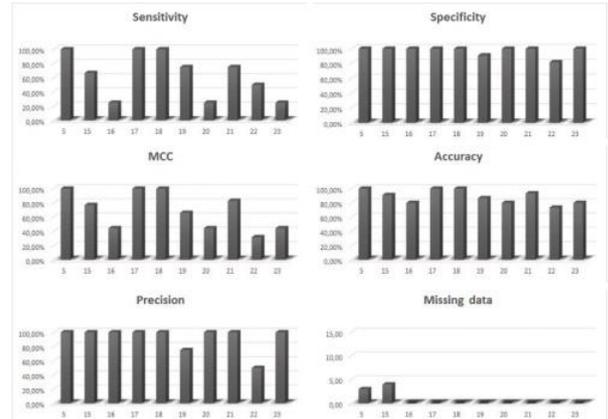


Fig. 3 Graphical representation of the sensitivity, specificity, MCC, accuracy and precision for the variants included in the intronic subset. Specificity values are sufficient for all predictors, with a lower value of 0.8, but sensitivity showed low values for several predictors (values lower than 0.3) The best predictors according to the equational analysis are easy to identify (FATHMM-MKL, HSF and SROOGLE). The used predictors are the following: (4) FATHMM-MKL, (14) PredictSNP2, (16) Splice Site Prediction by Neural Networks, (17) HSF, (18) SROOGLE, (19) FSPLICE, (20) SPL, (21) The GENSCAN web server at MIT, (22) NetGen2 server, (23) SplicePort.

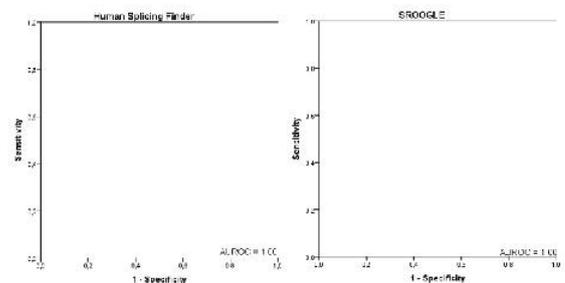


Fig. 4 Receiver-operating (ROC) for the best predictors in the intronic subset, with an AUROC = 1.00 for HSF and SROOGLE

3.3 Frameshift variants

ROC curves, specificity and MCC cannot be calculated due to the absence of confirmed neutral frameshift variants.

MutPred Splice and DDIG are the algorithms with best predictions (sensitivity = 1.00) but they do not allow to evaluate deletion. MutPred Splice is neither able to evaluate insertions (Fig. 5).

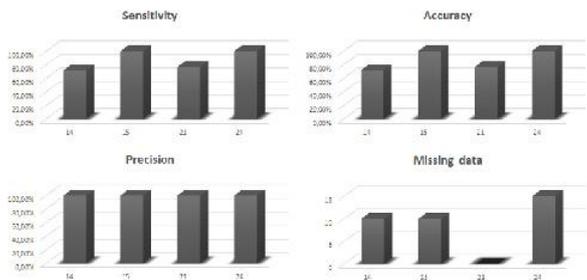


Fig. 5 Graphical representation of the sensitivity, accuracy, precision and missing data for the frameshift variants. The used predictors are the following: (14) PredictSNP2, (15) MutPred Splice, (21) The GENSCAN web server at MIT, (24) DDIG

In conclusion, the present study determined the most reliable prediction tools for the evaluation of variants involved in LSDs, particularly those caused by defective cholesterol processing inside the lysosome. For intronic regions, the most reliable programs were HSF and SROOGLE. FATHMM-MKL was also demonstrated to be a good prediction tool, but this program was only able to generate a prediction based on base pair changes, and insertions/deletions (INDELS) were not considered, while the other two predictors enabled the study of all mutations. HSF allowed virtual insertion of variations into a sequence

to analyse its potential pathogenicity. SROOGLE did not allow this type of analysis, but instead analysed both wild-type and the variant sequences to compare results. For exonic regions, MutPred1 and FATHMM-MKL were demonstrated to be the best prediction programs. However, MutPred1 was the slowest program used in the present study. By contrast, the other programs generated almost immediate results. The predictor SNPs&GO3D requires an available published protein structure, which in many cases, such as for NPC2 and LAL, is not available and approximations with other bovine structure are not reliable. As the final structure is one of the most important features for analysing the effect of missense changes, it is crucial use a good repository for protein structures, such as the Protein Data Bank from Research Collaboratory for Structural Bioinformatics. The frameshift variants do not have many softwares to evaluate them, but despite the limitations, DDIG seems to be the best option.

4. Discussion

The availability of public databases, such as dbSNP or Ensembl, which include clinical features, is important to assign an effect to the most common variants found in genetic analysis, but new variants are being described, which these databases may not provide information. The ClinVar database, the most frequently used database for identification of potentially pathogenic genetic variants, uses the clinical terms recommended by the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology (pathogenic, likely pathogenic, uncertain significance, likely benign and benign). This information is provided by the variant submitter and not curated by NCBI. This database provides clinical significance for the variants published in dbSNP and Ensembl, but several discrepancies were found between these databases.

The number of *in silico* prediction tools is rapidly growing, and the capabilities of each tool are unique because of the use of different algorithms and trainings. Thus, it is important to know which tool is optimal for the analysis of a gene of interest. Patients with disabling and progressive diseases, such as LSDs, and individuals with non-previously described variants may benefit from accurate prediction to refine their diagnosis and obtain genetic counselling. Because of this, new algorithms are being developed in order to improve this situation on LSDs (Ou, Przybilla, and Whitley 2018). Moreover, implementation of Next Generation Sequencing technologies has resulted in an overwhelming increment of new variants that are almost impossible to analyse through *in vivo* studies to evaluate their pathogenicity.

This work evaluates several easy-web-based prediction softwares to select the best one for the LALD and NP-C diseases to help physicians to understand the predicted effect of the described variants on their patients. Usually a cross-evaluation of more than one program is recommended, but the results obtained on this study shown that are not necessary due to the prediction success of MutPred1 and HSF on the evaluated diseases.

MutPred1 includes evolutionary information and the analysis of gain or loss functional and structural features classified on three groups: predicted protein structure and dynamics, predicted functional properties and evolutionary and amino acid sequence information. The dataset is composed by HGMD inherited disease-causing variants and damaging and polymorphic substitutions from Swiss-Prot database and the support vector machine classifier published by Joachims et al on 2005 is used to discriminate between variants with or without harmful effect (Li et al. 2009). It might be due to the importance that the algorithms gives to structural and functional features and for the type of used classifier that MutPred1 makes the best predictions for variants in the evaluated genes. HSF includes a Universal Mutation Database derived algorithm able to evaluate the strength of splicing sites and branch points. The dataset includes introns and exons of the complete human genome. Considering the consensus sequences for splicing sites and for branch points, they implemented new algorithms to maximize the difference between mutant and wild type sites (Desmet et al. 2009).

Maybe because of these algorithms and the inclusion of auxiliary splicing sequences it can be one of the best-tested splicing predictors.

Several studies have applied these statistics to study the usefulness of several predictors in general or for specific genes. In all cases, the results obtained for the common predictors are similar to those obtained in the present study. In a published report on *GLA* (Riera et al. 2015), another LSD that is not related to cholesterol trafficking, the *in silico* study values for SIFT and Polyphen2 showed similar sensitivity, accuracy and precision, but the specificity of these predictors compared that for our genes were lower than those for *GLA*. A recent report from Álvarez de la Campa et al. recommended combining several predictors to assess the best results for protein sequence variants (Álvarez et al. 2017), but we did not observe improvements using their recommended combinations against MutPred1. Finally, Ou L et al. generate a new algorithm to evaluate the impact of variants on LSDs but they do not include *NPC1* and *NPC2* (Ou, Przybilla, and Whitley 2018).

One limitation of bioinformatics prediction tools is their low capability for studying frameshift mutations and synonymous variants. Fortunately, several newer software programs use algorithms are able to evaluate the pathogenicity of INDEL variants, which are often responsible for frameshift mutations. Moreover, by analysing nucleotide sequences instead of amino acid sequences, advanced bioinformatics prediction tools help to identify synonymous variants that produce alternative splicing signals and are therefore potentially pathogenic, as reported for some *NPC1* synonymous variants. As is shown in our results, the availability of algorithms to evaluate frameshift is in crescendo, but is necessary to improve the analysis of INDEL to complete these results.

References

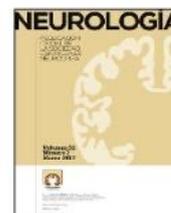
- Adzhubei, Ivan, Daniel M Jordan, and Shamil R Sunyaev. 2013. "Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2." *Curr Protoc Hum Genet*, Unit 7.20. doi:10.1002/0471142905.hg0720s76.
- Álvarez, Elena, De Campa, Natália Padilla, and Xavier De Cruz. 2017. "Development of Pathogenicity Predictors Specific for Variants That Do Not Comply with Clinical Guidelines for the Use of Computational Evidence." *BMC Genomics* 18 (Suppl 5): 1–14. doi:10.1186/s12864-017-3914-0.
- Bendl, Jaroslav, Miloš Musil, Jan Stourac, Jaroslav Zendlulka, Jiří Damborský, Jan Brezovský, and Paul P Gardner. 2016. "PredictSNP2: A Unified Platform for Accurately Evaluating SNP Effects by Exploiting the Different Characteristics of Variants in Distinct Genomic Regions." *PLoS Comput Biol* 12 (5). doi:10.1371/journal.pcbi.1004962.
- Bendl, Jaroslav, Jan Stourac, Ondrej Salanda, Antonin Pavelka, Eric D. Wieben, Jaroslav Zendlulka, Jan Brezovský, and Jiří Damborský. 2014. "PredictSNP: Robust and Accurate Consensus Classifier for Prediction of Disease-Related Mutations." Edited by Paul P. Gardner. *PLoS Computational Biology* 10 (1). Public Library of Science: e1003440. doi:10.1371/journal.pcbi.1003440.
- Burge, Chris, and Samuel Karlin. 1997. "Prediction of Complete Gene Structures in Human Genomic DNA." *Journal of Molecular Biology* 268 (1): 78–94. doi:10.1006/jmbo.1997.0951.
- Capriotti, Emidio, Remo Calabrese, Piero Fariselli, Pier Luigi Martelli, Russ B Altman, and Rita Casadio. 2013. "WS-SNPs&GO: A Web Server for Predicting the Deleterious Effect of Human Protein Variants Using Functional Annotation." *BMC Genomics* 14: S6. doi:10.1186/1471-2164-14-S3-S6.
- Choi, Yongwook, and Agens P Cham. 2015. "PROVEAN Web Server: A Tool to Predict the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels." *Bioinformatics* 31 (16): 2745–47.
- Desmet, François-Olivier, Dalil Hamroun, Marine Lalande, Gwenaëlle Colod-Bérout, Mireille Claustres, and Christophe Bérout. 2009. "Human Splicing Finder: An Online Bioinformatics Tool to Predict Splicing Signals." *Nucleic Acids Research* 37 (9). Oxford University Press: e67. doi:10.1093/nar/gkp215.
- Disfani, Fatemeh Miri, Wei-Lun Hsu, Marcin J. Mizianty, Christopher J. Oldfield, Bin Xue, A. Keith Dunker, Vladimir N. Uversky, and Lukasz Kurgan. 2012. "MoRFpred, a Computational Tool for Sequence-Based Prediction and Characterization of Short Disorder-to-Order Transitioning Binding Regions in Proteins." *Bioinformatics* 28 (12). Oxford University Press: i75–83. doi:10.1093/bioinformatics/bts209.
- Dogan, Rezarta Islamaj, Lise Getoor, W John Wilbur, and Stephen M Mount. 2007. "SplicePort—An Interactive Splice-Site Analysis Tool." *Nucleic Acids Research Web Server* 35: 285–91. doi:10.1093/nar/gkm407.
- Folkman, Lukas, Yuedong Yang, Zhixiu Li, Bela Stantic, Abdul Sattar, Matthew Mort, David N Cooper, Yunlong Liu, and Yaoqi Zhou. 2015. "DDIG-in: Detecting Disease-Causing Genetic Variations due to Frameshifting Indels and Nonsense Mutations Employing Sequence and Structural Properties at Nucleotide and Protein Levels." *Bioinformatics* 31 (10): 1599–1606. doi:10.1093/bioinformatics/btu862.
- Hebsgaard, Stefan M, Peter G Korning, Niels Tolstrup, Jacob Engelbrecht, Pierre Rouzé, and Soren Brunak. 1996. "Splice Site Prediction in Arabidopsis Thaliana Pre-mRNA by Combining Local and Global Sequence Information." *Nucleic Acids*

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC146109/pdf/243439.pdf>.
- Hecht, Maximilian, Yana Bromberg, and Burkhard Rost. 2015. "Better Prediction of Functional Effects for Sequence Variants." *BMC Genomics* 16 (Suppl 8): 51.
- Li, Biao, Vidhya G Krishnan, Matthew E Mort, Fuxiao Xin, Kishore K Kamati, David N Cooper, Sean D Mooney, and Predrag Radivojac. 2009. "Automated Inference of Molecular Mechanisms of Disease from Amino Acid Substitutions." *Bioinformatics* 25 (21): 2744–50.
- López-Ferrando, Víctor, Andrea Gazzo, Xavier De La Cruz, Modesto Orozco, and Josep Ll Gelipi. 2017. "PMut: A Web-Based Tool for the Annotation of Pathological Variants on Proteins, 2017 Update." *Nucleic Acids Research*.
- Mort, Matthew, Timothy Sterne-Weiler, Biao Li, Edward V Ball, David N Cooper, Predrag Radivojac, Jeremy R Sanford, and Sean D Mooney. 2014. "MutPred Splice: Machine Learning-Based Prediction of Exonic Variants That Disrupt Splicing." *Genome Biology* 15 (1). BioMed Central: R19. doi:10.1186/gb-2014-15-1-r19.
- Niroula, Ablishek, and Mauno Vihinen. 2016. "Variation Interpretation Predictors: Principles, Types, Performance, and Choice." *Human Mutation* 37 (6): 579–97. doi:10.1002/humu.22987.
- Ou, Li, Michael J Przybylla, and Chester B Whitley. 2018. "SAAMP 2.0: An Algorithm to Predict Genotype-Phenotype Correlation of Lysosomal Storage Diseases." *Clinical Genetics*, February. doi:10.1111/cge.13226.
- Pejaver, Vikas, Jorge Urresti, Jose Lugo-Martinez, Kymberleigh A. Pagel, Guan Ning Lin, Hyun-jun Nam, Matthew Mort, et al. 2017. "MutPred2: Inferring the Molecular and Phenotypic Impact of Amino Acid Variants." *bioRxiv*, May. Cold Spring Harbor Laboratory, 134981. doi:10.1101/134981.
- R Core Team. 2017. "R: A Language and Environment for Statistical Computing." Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>.
- Ramirez, Charina M, Benny Liu, Amal Aqil, Anna M Taylor, Joyce J Repa, Stephen D Turley, and M John. 2011. "Quantitative Role of LAL , NPC2 , and NPC1 in Lysosomal Cholesterol Processing Defined by Genetic and Pharmacological Manipulations." *Journal of Lipid Research* 52 (4): 688–98. doi:10.1194/jlr.M013789.
- Reese, Martin G., Frank H Eeckman, David Kulp, and David Haussler. 1997. "Improved Splice Site Detection in Genie." *Journal of Computational Biology* 4 (3): 311–23. doi:10.1089/cmb.1997.4.311.
- Riera, Casandra, Sergio Lois, Carmen Dom, Israel Fernandez-cadenas, Joan Montaner, Victor Rodri, and Xavier De Cruz. 2015. "Molecular Damage in Fabry Disease: Characterization and Prediction of Alpha-Galactosidase A Pathological Mutations." *Proteins* 83 (1): 91–104. doi:10.1002/prot.24708.
- Ripley, Brian, and Michael Lapsley. 2017. "RODBC: ODBC Database Access." <https://cran.r-project.org/package=RODBC>.
- Schwartz, Schraga, Eitan Hall, and Gil Ast. 2009. "SROOGLE: Webservice for Integrative, User-Friendly Visualization of Splicing Signals." *Nucleic Acids Research Web Server* 37: 189–92. doi:10.1093/nar/gkp320.
- Sharma, Ronesh, Shiu Kumar, Tatsuliko Tsunoda, Ashwini Patil, and Alok Sharma. 2016. "Predicting MoRFs in Protein Sequences Using HMM Profiles." *BMC Bioinformatics* 17 (Suppl 19:504): 252–58. doi:10.1186/s12859-016-1375-0.
- Shihab, Hashem A, Mark F Rogers, Julian Gough, Matthew Mort, David N Cooper, Ian N M Day, Tom R Gaunt, and Colin Campbell. 2015. "An Integrative Approach to Predicting the Functional Effects of Non-Coding and Coding Sequence Variation." *Bioinformatics* 31 (10): 1536–43.
- Sim, Ngak-Leng, Prateek Kumar, Jing Hu, Steven Henikoff, Georg Schneider, and Pauline C Ng. 2012. "SIFT Web Server: Predicting Effects of Amino Acid Substitutions on Proteins." *Nucleic Acids Research* 40 (Web Server issue). Oxford University Press: W452–7. doi:10.1093/nar/gks539.
- Sing, T, O Sander, N Beerenwinkel, and T Lengauer. 2005. "ROCR: Visualizing Classifier Performance in R." *Bioinformatics* 21 (20): 7881.
- Vanier, Marie T. 2015. "Complex Lipid Trafficking in Niemann-Pick Disease Type C." *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 187–99. doi:10.1007/s10545-014-9794-4.
- Zhao, Huiying, Yuedong Yang, Hai Lin, Xinjun Zhang, Matthew Mort, David N Cooper, Yunlong Liu, and Yaoqi Zhou. 2013. "DDIG-in: Discriminating between Disease-associated and Neutral Non-Frameshifting Micro-Indels." *Genome Biology* 14 (3). doi:10.1186/gb-2013-14-3-r23.
- Zhou, Hang, Yang Yang, and Hong-Bin Shen. 2016. "Hum-mPLoc 3.0: Prediction Enhancement of Human Protein Subcellular Localization through Modeling the Hidden Correlations of Gene Ontology and Functional Domain Features." *Bioinformatics* 33 (6): btw723. doi:10.1093/bioinformatics/btw



NEUROLOGÍA

www.elsevier.es/neurologia



CARTA AL EDITOR

Nueva variante asociada a enfermedad de Niemann-Pick tipo C: manifestaciones neurológicas y caracterización bioquímica, molecular y celular

New variant associated with Niemann-Pick disease type C: Neurological manifestations and biochemical, molecular, and cellular characterisation

Sr. Editor:

La enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC; MIM#257220 y MIM#607625) se debe a un error innato del metabolismo, de herencia autosómica recesiva, caracterizado por una alteración del tráfico intracelular de colesterol, lo que provoca una acumulación de múltiples metabolitos en el lisosoma y/o endosoma tardío^{1,2}. Los genes responsables son *NPC1* (MIM#607623) y *NPC2* (MIM#607625). *NPC1* engloba el 95% de los casos publicados, mientras que *NPC2* es el responsable de un 4%³.

El diagnóstico de la enfermedad de NPC es complejo dado la gran heterogeneidad clínica que presenta y la dificultad de las pruebas de laboratorio. La sintomatología se clasifica en 3 grandes bloques: visceral, neurológica y psiquiátrica, siendo las características más frecuentes la esplenomegalia, la parálisis de la mirada vertical y la cataplejía³. Basándose en las manifestaciones clínicas y con la finalidad de ayudar a orientar el diagnóstico se ha creado una herramienta de cribado que asigna una puntuación en función del riesgo de ser afectado de NPC (NPC índice de sospecha [NPC-SI]), y que sugiere la idoneidad de realizar más estudios para esclarecer el diagnóstico^{4,5}.

Presentamos el caso de una mujer de 26 años de etnia bereber con antecedentes de retraso mental y trastorno psicótico en tratamiento con olanzapina 5 mg que es remitida por movimientos anormales y alteración de la marcha desarrollados en el último año. En la exploración neurológica destacaba disartria, hipomimia facial, parálisis de la mirada vertical, bradicinesia global con mioclonias aisladas distales y marcha ligeramente atáxica sin braceo. La RM cerebral y DaTSCAN® no mostraron alteraciones relevantes. El estudio oftalmológico reveló una mancha rojo cereza en la mácula

de ambos ojos. Una ecografía abdominal mostró esplenomegalia de 13,8 cm. El test de cribado NPC-SI puntuaba 104 (percentil 64).

Para confirmar el diagnóstico de NPC se analizó la actividad plasmática de la quitotriosidasa⁶ y la concentración de la quimioquina CCL18/PARC⁷ y 7-cetocolesterol⁸⁻¹⁰ (7-CC) mediante métodos previamente descritos, obteniendo valores por encima del rango de referencia intralaboratorio (RRI) para los 3 biomarcadores.

La secuenciación de los genes *NPC1* y *NPC2* se realizó mediante el método de Sanger con pequeñas modificaciones respecto al protocolo publicado previamente por Zech et al., identificando 2 variantes en *NPC1*: p.Ile1061Thr previamente descrita por Yamamoto et al.¹¹, y p.Val856Ala, no descrita previamente.

El acúmulo de colesterol en fibroblastos del paciente fue analizado mediante tinción citoquímica por Filipin III¹² (Sigma-Aldrich, ES), observándose una positividad del 70% (fig. 1).

Para descartar otras enfermedades lisosomales de la misma ruta metabólica se analizó en lisado leucocitario⁹ citario, la actividad de la lipasa ácida lisosomal¹³ y de la esfingomielinasa¹⁴ obteniendo valores dentro del RRI.

Como la variante p.Val856Ala no está descrita y se localiza en un bucle rico en cisteínas que acumula aproximadamente un tercio de las variantes patogénicas descritas¹ se realizó un análisis bioinformático para la misma. Mediante Clustal Omega se realizó un análisis de conservación de la secuencia, comparándola con 30 especies, y se observó que se trataba de una región altamente conservada. Simultáneamente se utilizó la estructura de *NPC1* publicada por Gong et al. en 2016 en el Protein Data Bank (Cryo-EM structure of the full-length human *NPC1* at 4.4 angstrom; número de acceso PDB: 3JD8) y se modeló la variante patogénica con el programario libre Swiss-PdbViewer, observándose una disminución de las interacciones electrostáticas en la forma variante (fig. 2). Mediante el predictor de estabilidad DUET se observó una disminución en la estabilidad de la proteína que contenía la variante p.Val856Ala ($\Delta\Delta G$: -1.457 vs. $\Delta\Delta G$: 0 kcal/mol). Según las guías del Colegio Americano de Genética Médica¹⁵, esta variante pasaría a catalogarse como altamente probable de ser patogénica.

Con las evidencias presentadas en este trabajo, tanto a nivel clínico como bioquímico, molecular y celular, consideramos que se trata de un paciente de NPC por heterozigosis compuesta de la variante p.Ile1061Thr y una nueva

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2017.07.010>

0213-4853/© 2017 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cómo citar este artículo: López de Frutos L, et al. Nueva variante asociada a enfermedad de Niemann-Pick tipo C: manifestaciones neurológicas y caracterización bioquímica, molecular y celular. Neurología. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2017.07.010>

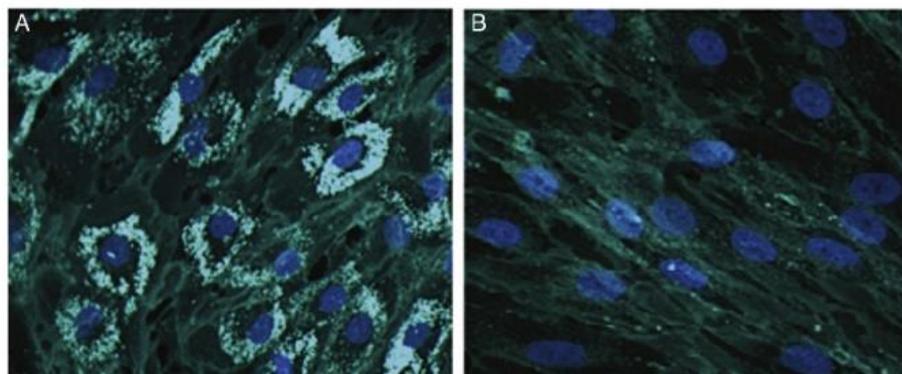


Figura 1 Tinción con Filipin III. Figuras representativas de la tinción del colesterol mediante Filipin III en fibroblastos de nuestro paciente (A) y de un control (B). Las células se cultivan en cubreobjetos y se mantienen durante 72 h en un medio libre de lipoproteínas antes de cambiarlas a un medio rico en lipoproteínas de baja densidad durante 24 h. Posteriormente se fijan y tiñen con el colorante Filipin III. Ampliación a $\times 200$

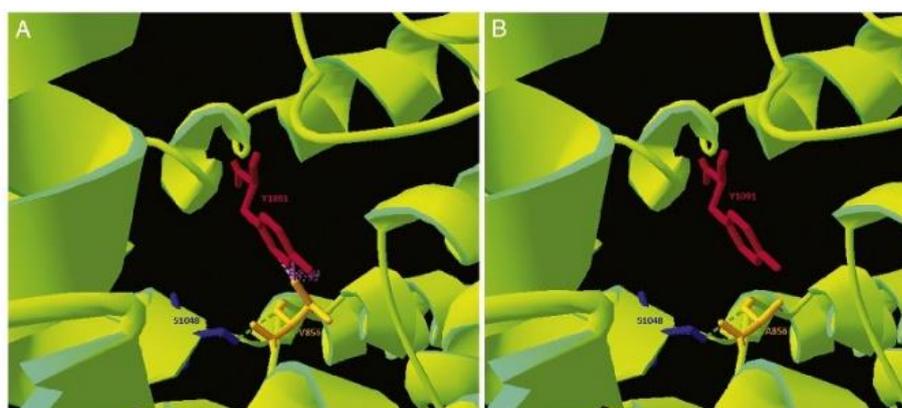


Figura 2 Alteraciones estructurales en la proteína NPC1. Interacciones entre los aminoácidos Ser1048, Tyr1091 y Val856 (A) o Ala856 (B). Figura realizada a partir de la secuencia 3JD8 (PDB) mediante el programa Swiss PdbViewer.

variante asociada a patogenicidad, no descrita hasta ahora, p.Val856Ala.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer su colaboración en este trabajo a María Teresa Sagrario Fustero, Clementina del Canto Pérez y Adolfo Mínguez-Castellanos por su ayuda en el diagnóstico clínico del paciente, a Jorge J. Cebolla, Pilar Irún y Carmen Domínguez por su inestimable colaboración en las pruebas de laboratorio.

Bibliografía

1. Vanier MT, Gissen P, Bauer P, Coll MJ, Burlina A, Hendriks CJ, et al. Diagnostic tests for Niemann-Pick disease type C (NP-C): A critical review. *Mol Genet Metab.* 2016;118:244–5254, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.06.004>

2. Lloyd-Evans E, Platt FM. Lipids on trial: The search for the offending metabolite in Niemann-Pick type C disease. *Traffic.* 2010;2:419–28, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01032.x>
3. Vanier MT. Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:16.
4. Hendriks CJ, Pineda M, Fahey M, Walterfang M, Stampfer M, Runz H, et al. The Niemann-Pick Disease Type C Suspicion Index: Development of a New Tool to Aid Diagnosis. *J Rare Disord Diagnosis Ther.* 2015;1:1.
5. Pineda M, Mengel E, Jahnová H, Héron B, Imrie J, Lourenço CM, et al. A Suspicion Index to aid screening of early-onset Niemann-Pick disease Type C (NP-C). *BMC Pediatr.* 2016;16:107, <http://dx.doi.org/10.1186/s12887-016-0641-7>
6. Hollak CEM, van Weely S, van Oers MHJ, Aerts JMFG. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest.* 1994;93:1288–92.
7. Boot RG, Verhoek M, Fost MDe, Hollak CEM, Maas M, Bleijlevens B, et al. Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: A novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood.* 2004;103:33–40, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-05-1612.Reprints>

Cómo citar este artículo: López de Frutos L, et al. Nueva variante asociada a enfermedad de Niemann-Pick tipo C: manifestaciones neurológicas y caracterización bioquímica, molecular y celular. *Neurología.* 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2017.07.010>

8. Lin N, Zhang H, Qiu W, Ye J, Han L, Wang Y, et al. Determination of 7-ketocholesterol in plasma by LC-MS for rapid diagnosis of acid SMase-deficient Niemann-Pick disease. *J Lipid Res.* 2014;55:338–43, <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.D044024>
 9. Baila-Rueda L, Cenarro A, Barcelo-Batllori S, Pocoví M, Ros E, Civeira F, et al. Simultaneous determination of oxysterols, phytosterols and cholesterol precursors by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry in human serum. *Anal methods.* 2013;5:2249–57, <http://dx.doi.org/10.1039/C3AY26395A>
 10. Cebolla J, de Castro-Orós I, Irún P, Alfonso P, López de Frutos L, Andrade-Campos M, et al. Experience with 7-ketocholesterol and ccl18/parc as surrogated biomarkers in a series of Spanish Niemann-Pick disease type C patients. *Mol Genet Metab.* 2015;114:S29.
 11. Yamamoto T, Ninomiya H, Matsumoto M, Ohta Y, Nanba E, Tsutsumi Y, et al. Genotype-phenotype relationship of NPC: A possible correlation between clinical onset and levels of NPC1 protein in isolated skin fibroblasts. *J Med Genet.* 2000;37:707–11.
 12. Vanier MT, Latour P. Laboratory diagnosis of Niemann-Pick disease type C: The filipin staining test. *Methods Cell Biol.* 2015;126:357–75.
 13. Hamilton J, Jones I, Srivastava R, Galloway P. A new method for the measurement of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor Lalstat 2. *Clin Chim Acta.* 2012;413:1207–10, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2012.03.019>
 14. Van Diggelen OP, Voznyi YV, Keulemans JLM, Schoonderwoerd K, Ledvinova J, Mengel E, et al. A new fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Niemann-Pick A/B, with specificity of natural sphingomyelinase substrate. *J Inher Metab Dis.* 2005;28:733–41, <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-005-0105-y>
 15. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17:405–24, <http://dx.doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- L. López de Frutos^{a,*}, J. Romero-Imbroda^b,
V. Rodríguez-Sureda^c y P. Giraldo^d
- ^a Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), Unidad de Investigación Traslacional, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, España
^b Servicio de Neurología, Hospital Comarcal de Melilla, Melilla, España
^c Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Centro de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular-Nanomedicina, Institut de Recerca Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona, España
^d Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Unidad de Investigación Traslacional, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, España
- * Autor para correspondencia.
 Correo electrónico: llopezdefrutos.uit@gmail.com
 (L. López de Frutos).

Cómo citar este artículo: López de Frutos L, et al. Nueva variante asociada a enfermedad de Niemann-Pick tipo C: manifestaciones neurológicas y caracterización bioquímica, molecular y celular. *Neurología.* 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2017.07.010>

