



**Pontificia Universidad Católica de Chile**  
Programa de Doctorado en Ciencias Médicas  
Dirección de Investigación y Doctorado  
Escuela de Medicina

**“Análisis y modulación de la vía de Catepsinas B y D en la  
fibrosis hepática en modelos *in vitro* e *in vivo* de la  
enfermedad de Niemann-Pick tipo C”**

por

**Juan Esteban Oyarzún Isamitt**

Tesis presentada a la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica  
de Chile como parte de los requisitos para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Médicas

Directora de Tesis: Dra. Silvana Zanlungo Matsuhiro

- 2019 -

Santiago, Chile

A los que siempre estuvieron conmigo  
A mis padres, hermanas, familia y amigos  
A los que ya no están, pero los siento conmigo siempre  
A Consuelo, por aparecer tantas veces en mi vida y no dejarme ir  
A Dios

## AGRADECIMIENTOS

Son tantas las personas a las que quisiera agradecer en este largo camino del doctorado, personas que me acompañaron y apoyaron, que rieron conmigo, que me escucharon y aconsejaron, que hicieron este camino más fácil.

En primer lugar agradecer a la Dra. Silvana Zanlungo, por creer en mí y darme la oportunidad y apoyo al trabajar en su laboratorio y en esta tesis doctoral. Por supuesto agradecer a todas las personas del laboratorio, cada una aportó en diversas etapas de mi formación, cabe destacar a Juan Castro, quien siempre hizo que el lab funcionara de la mejor manera, además de siempre solucionar mis problemas científicos y existenciales. A Mariana Acuña, quien siempre fue mi *gold standard* en el perfil de alumno y científico. A Pablo Contreras y Tamara Marín, por ser compañeros y ayudarme siempre que pudieron. A todos y cada uno de las personas que pasaron por el lab, muchas gracias, de todos algo aprendí.

Agradecer a las personas que trabajan en Gastroenterología, a Ludwig Amigo, por su simpatía y apoyo, incluso hasta en los mas descabellados experimentos. A Lorena Azocar y Verónica Quiñones, por enseñarme con su experiencia en Ciencias. A Margarita, por su saludo y preocupación cada mañana. A Don Manu, por su ayuda silenciosa, siempre procuró que nunca nos faltaran los materiales. A las tías del Aseo, en especial a la Sra. Isabel, por nuestras conversaciones de mañana, por siempre estar preocupada y hacer de Gastro un lugar limpio y agradable.

Agradecer a los miembros de la comisión, que me han apoyado en estos 4 años de tesis, aconsejándome, y apoyándome.

A mis padres, que estuvieron apoyándome, preocupados siempre que nunca me faltara nada. A mis hermanas, que me quieren y consienten y siguen haciéndolo como el pequeño hermanito que siempre seré para ellas. A la Rebe, por estar conmigo desde pequeño, siempre pendiente que fuera una gran persona con valores sólidos. A mi familia, que me enorgullece, que están en todas, la Tía Ana, la Anita, Aloncito y Fari. A mis amigos de la vida y la Universidad, siempre recordaré los buenos momentos, las risas, la vida antes de las responsabilidades, los consejos, las ayudas, la compañía y tantas cosas más. A los que se fueron físicamente, pero que llevo conmigo todos los días, Tío Lalo, Marcelito, Tío Jorge y Cujito un abrazo al cielo.

A Consuelo, por ser una persona que me enseñó que la vida va más allá de las paredes mentales que uno se pone. A una mujer que me dijo que uno tiene que luchar por lo que quiere, a ser sincero siempre, a ser bondadoso, a entregar sin esperar nada a cambio y a creer en uno mismo y en los demás. Gracias por creer en mí, por tu apoyo incondicional, preocupación, por tus consejos, paciencia, compañía, amistad y amor. Por tratar de hacer de mi un hombre mejor. Gracias!

A Dios por todo!

Muchas gracias a cada una de las personas que han estado en mi vida, todos ellos contribuyeron a hacer esto mucho más fácil. =)

Finalmente, agradezco a las fuentes de financiamiento para el desarrollo de esta tesis: los proyectos FONDECYT 1110310 y 1150186 de la Dra. Silvana Zanlungo además de la beca CONICYT Doctorado Nacional 2014-62960. Finalmente agradecer a CONICYT por las becas complementarias, de asistencia a eventos nacionales e internacionales así como también gastos operacionales.

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii-iv
ÍNDICE GENERAL	v-ix
ÍNDICE DE FIGURAS	ix-xii
ÍNDICE DE TABLAS	xii
<b>1. RESUMEN</b>	<b>1-2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3-14</b>
2.1 La enfermedad de Niemann-Pick tipo C	3
2.2 Mecanismos de daño celular en la enfermedad de NPC	4-8
2.3 Fibrosis hepática en la enfermedad de NPC	8-9
2.4 Catepsinas: características, función y regulación	9-12
2.5 Las catepsinas B y D como mediadoras del daño hepático y fibrosis en la enfermedad de NPC	12-15
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>15</b>
<b>4. OBJETIVOS GENERALES</b>	<b>16</b>
<b>5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>16</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>17</b>
6.1 Materiales	17
6.1.1 Materiales y reactivos técnicos	17

6.1.2 Materiales y medios para cultivo celular	17
6.1.3 Sistemas Comerciales	18
6.1.4 Anticuerpos	18
6.2 Metodología	19
6.2.1 Modelos farmacológicos <i>in vitro</i>	19
6.2.2 Modelos genéticos <i>in vitro</i>	19
6.2.3 Modelos <i>in vivo</i> murinos	19
6.2.4 Toma de muestras	20
6.2.5 Homogenizados de proteínas de cultivos celulares	20
6.2.6 Obtención de homogenizados totales de hígado	20
6.2.7 Análisis mediante westernblot de lisados celulares y/o homogenizados de hígado	21
6.2.8 Inmunofluorescencias indirectas de los cultivos celulares	22
6.2.9 Tinciones de Filipina y Hoescht	22
6.2.10 Transfecciones de células	23
6.2.11 Inhibición de la actividad de catepsinas B y D	23
6.2.12 PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)	24
6.2.13 Perfringolisina O (PFO)	24
6.2.14 Análisis de RNAseq	25

6.2.15 Cultivo primario células estrelladas	25
6.2.16 Análisis Estadístico	26
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>27</b>
<b>7.1 RESULTADOS OBJETIVO 1</b>	<b>27</b>
7.1.1 Aumento en la fibrosis hepática y la inflamación en ratones NPC	27
7.1.2 Aumento progresivo en los niveles de RNA mensajero de genes relacionados a daño, fibrosis e inflamación hepática y de catepsina D	29
7.1.3 Aumento en los niveles proteicos de catepsinas B y D en hígados de ratones NPC	32
<b>7.2 RESULTADOS OBJETIVO 2</b>	<b>35</b>
7.2.1 Aumento en los niveles proteicos de las catepsinas B y D en modelos celulares hepáticos NPC	35
<b>7.3 RESULTADOS OBJETIVO 3</b>	<b>38</b>
7.3.1 La inhibición de la actividad de la catepsina B reduce el fenotipo pro-fibrótico en modelos hepáticos <i>in vitro</i> NPC	38
7.3.2 La sobre-expresión de la catepsina B aumenta los marcadores pro-fibróticos en modelos <i>in vitro</i> NPC	39
7.3.3 La inhibición de la actividad de la catepsina D reduce el fenotipo pro-fibrótico en modelos <i>in vitro</i> NPC	40
7.3.4 La sobreexpresión de la catepsina D aumenta los marcadores pro-fibróticos en modelos <i>in vitro</i> NPC	43

<b>6. DISCUSIÓN Y RESULTADOS PRELIMINARES</b>	<b>48</b>
6.1 Catepsinas y la disfunción lisosomal en NPC	48
6.2 Inhibición de catepsinas B y D en la enfermedad de Niemann Pick tipo C	49
<b>6.3 Localización de las catepsinas B y D</b>	<b>50</b>
<b>6.4 Catepsinas B y D en el metabolismo de los lípidos</b>	<b>51</b>
6.5 Blancos de las catepsinas B y D	53
<b>6.6 Comunicación hepatocitos células estrelladas</b>	<b>53</b>
6.7 Resumen de resultados obtenidos	54
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>56</b>
<b>8. TRABAJO POR DESARROLLAR</b>	<b>58</b>
<b>9. REFERENCIAS</b>	<b>59</b>
<b>10. ANEXOS</b>	<b>70</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura1:	Modelo del eflujo del colesterol de los lisosomas mediado por las proteínas NPC1 y NPC2.	6
Figura 2:	Aumento en los niveles proteicos de colágeno 1A1 en hígados de ratones NPC.	28
Figura 3:	Aumento progresivo de células positivas para CD68 hepáticas en ratones NPC.	28
Figura 4:	Cambios globales en la expresión de genes en hígados de ratones NPC en comparación con los silvestres (WT) a las 6 y 7 semanas de edad.	29
Figura 5:	Expresión diferencial de genes en hígados de ratones NPC respecto a los silvestres (WT) a las 6 y 7 semanas de edad.	30
Figura 6:	Genes sobre-expresados en hígados de ratones NPC respecto a los silvestres (WT) a las 6 y 7 semanas de edad.	31
Figura 7:	Genes cuya expresión cambia en hígados de ratones NPC comparados con los silvestres (WT) analizados por PCR-tiempo real.	32
Figura 8:	Aumento en los niveles proteicos de catepsinas B y D en hígados de ratones NPC.	34
Figura 9:	Aumento en la actividad de catepsina D en hígados de animales NPC.	35
Figura 10:	Aumento en los niveles proteicos de catepsina D en un modelo farmacológico de hepatocitos <i>in vitro</i> NPC.	36

Figura 11:	Aumento en los niveles proteicos de catepsina B en modelos genéticos <i>in vitro</i> NPC.	37
Figura 12:	La inhibición de la actividad de catepsina B disminuye el factor pro-fibrótico CTGF en un modelo celular hepático farmacológico NPC.	39
Figura 13:	El aumento en los niveles proteicos de catepsina B aumenta la fibrosis.	40
Figura 14:	La inhibición de la actividad de catepsina D disminuye el fenotipo pro-fibrótico en un modelo farmacológico NPC hepático.	41
Figura 15:	La inhibición de la actividad de catepsina D disminuye el fenotipo pro-fibrótico en modelos farmacológico y genético NPC de células estrelladas hepáticas.	42
Figura 16:	La reducción en los niveles proteicos de catepsina D disminuye el factor pro-fibrótico CTGF en un modelo celular hepático NPC farmacológico.	43
Figura 17:	La modulación de los niveles de catepsina D influye en el fenotipo profibrótico en fibroblastos NPC humanos.	45
Figura 18:	Aumento en los niveles proteicos de catepsina D citoplasmática y su liberación extracelular en un modelo hepático farmacológico NPC	51
Figura 19:	I La inhibición de la actividad de catepsina B disminuye el número de lisosomas y la acumulación de colesterol en un modelo celular hepático farmacológico NPC.	52
Figura 20:	El tratamiento de células estrelladas con medios condicionados de hepatocitos tratados con U18 y con inhibidores de catepsinas B y D	54

reduce el potencial pro-fibrótico.

- Figura 21: Los ratones NPC tratados con el inhibidor de catepsina D presentan 55  
disminución en la fibrosis hepática.
- Figura 22: Representación esquemática del efecto de la inhibición de las 57  
catepsinas B y D en la enfermedad de NPC.

### **ÍNDICE DE TABLAS**

- Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para el análisis de los niveles de expresión 70  
génica de distintos genes en ratones WT y NPC.

## 1. RESUMEN

La enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC) es un desorden hereditario autosómico recesivo caracterizado por la acumulación de colesterol en los lisosomas. Esta enfermedad es causada por mutaciones en los genes que codifican para las proteínas NPC1 y NPC2, las cuales están implicadas en el eflujo del colesterol desde los lisosomas.

La deficiencia de NPC1 ó NPC2 lleva a una acumulación primaria de colesterol libre lisosomal y posteriormente el consecuente daño celular. Si bien no se conoce del todo los mecanismos subyacentes por los cuales el colesterol libre generaría el daño hepático en la enfermedad de NPC, se han postulado diversas opciones, entre los que destaca el estrés oxidativo, la disfunción en la dinámica de endosomas y lisosomas, así como también la disfunción en la autofagia lisosomal. El sistema nervioso central (SNC) es el más afectado en los pacientes NPC, los cuales padecen una rápida neurodegeneración progresiva a edad temprana. Otro órgano muy afectado en los pacientes NPC es el hígado, ya que muchos pacientes padecen de enfermedad hepática incluso llegando a falla hepática fulminante. Sin embargo, las causas que conllevan al daño hepático en NPC han sido poco estudiadas y dilucidadas.

En los hígados de pacientes NPC se ha reportado un aumento en el contenido de colesterol libre, fibrosis progresiva y apoptosis. Recientes reportes han postulado a las catepsinas B y D como potenciales candidatos en la vía que conecta la acumulación de colesterol libre con el daño hepático, particularmente con la fibrosis hepática. Considerando todos los antecedentes previos, se formuló la siguiente hipótesis: “Las vías de las catepsinas B y D contribuyen a la fibrosis hepática en la enfermedad de Niemann-Pick tipo C”. El objetivo general planteado fue: “Demostrar que las vías de las catepsinas B y D contribuyen a la fibrosis en modelos hepáticos *in vitro* e *in vivo* de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C”.

Los resultados de esta tesis muestran aumento en los niveles de catepsinas B y D, los que se correlacionaron con aumento en la fibrosis e inflamación en hígados de ratones NPC. Este aumento en la fibrosis también fue reproducido en los modelos hepáticos *in vitro* NPC. Interesantemente, la utilización de inhibidores de catepsinas B y D, CA-074 y pepstatina A, respectivamente, además de shRNA contra catepsina D, disminuyó el fenotipo pro-fibrótico en modelos celulares de hepatocitos y células estrelladas hepáticas NPC. Por otro lado, la sobreexpresión de catepsina B aumentó la fibrosis en los modelos *in vitro*.

Los resultados obtenidos nos llevan a la conclusión que las catepsinas B y D participan en la fibrosis hepática en NPC y proponemos su inhibición como una aproximación terapéutica para tratar el daño hepático en esta enfermedad.

## 2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Niemann Pick fue descrita por primera vez por el pediatra alemán Albert Niemann en 1914, en niños de origen judío (Askenazíes) (Niemann 1914). En 1927 el patólogo alemán Ludwig Pick describió las características histológicas de esta patología, diferenciándola histológicamente de otras enfermedades de depósito lisosomal, como la enfermedad de Gaucher (Pick 1926). Posteriormente, se determinó que la enfermedad de Niemann-Pick pertenece a la familia de enfermedades lisosomales (O'Brien, Bennett et al. 1975). Esta familia está compuesta por cerca 60 enfermedades y en conjunto presentan una incidencia en la población de 1 en 7700 nacimientos aproximadamente. Una característica que comparten estas enfermedades es la acumulación de distintos sustratos en los lisosomas (Hoffmann and Mayatepek 2005).

En 1961 la enfermedad de Niemann Pick se clasificó en cuatro formas clínicas (A, B, C y D), caracterizadas por la acumulación de esfingomielinina y colesterol en los lisosomas de las células, particularmente en las células del sistema retículo endotelial y el cerebro. En 1966 se descubrió la enzima lisosomal esfingomielinasa ácida, cuyo déficit produce los tipos A y B, con la consecuente acumulación lisosomal de esfingomielinina (Brady, Kanfer et al. 1966). Posteriormente, cerca de 30 años después, se determinó que la enfermedad de Niemann-Pick tipo C se debe a mutaciones en otros genes (Carstea, Morris et al. 1997, Naureckiene, Sleat et al. 2000).

En los tipos C y D, causados por mutaciones de los genes *NPC1* y/o *NPC2*, existe un defecto primario en la esterificación y el transporte intracelular del colesterol, el cual se acumula en su forma libre sin esterificar. El tipo D se ha considerado una variante alélica del tipo C, que cursa con manifestaciones clínicas similares. Este tipo de la enfermedad sólo se ha encontrado en la población francocanadiense del condado de Yarmouth, Nueva Escocia (Vanier 2013).

## **2.1 La enfermedad de Niemann-Pick tipo C**

La enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC) es un desorden hereditario autosómico recesivo caracterizado por la acumulación de colesterol en los lisosomas. Los pacientes que padecen la enfermedad de NPC presentan una rápida y progresiva neurodegeneración, retraso en el crecimiento y daño hepático. Debido a la severidad de los síntomas, los pacientes NPC fallecen a temprana edad (Patterson, Hendriksz et al. 2012). Cabe destacar, que en la actualidad no existe un tratamiento efectivo real para esta mortal enfermedad.

En los individuos afectados existe una gran variabilidad en la severidad de las manifestaciones clínicas, así como en la edad de aparición de los síntomas. Basándose en este último criterio, se puede clasificar la enfermedad de NPC en tres variantes clínicas:

i) Infantil: esta es la forma más agresiva de la enfermedad. Los pacientes presentan hepatoesplenomegalia y fallecen generalmente antes de los 5 años (da Silva, Vassella et al. 1975).

ii) Juvenil (o clásica): esta es la forma que se presenta en la mayoría de los casos. Los pacientes presentan deterioro neurológico progresivo y se evidencia un retraso en el desarrollo motor. Los principales síntomas son oftalmoplejía vertical supranuclear, disartria, distonía, ataxia progresiva y en el último período juvenil comienzan a aparecer problemas en la marcha, caídas, torpeza, cataplejía, y dificultades escolares. En algunos casos también existen trastornos psiquiátricos como demencia progresiva en etapas avanzadas de la enfermedad. Los síntomas aparecen en la edad pre-escolar y los pacientes viven habitualmente hasta la pre-adolescencia (Hagberg, Haltia et al. 1978).

iii) Adulta: esta es la forma menos frecuente de la enfermedad. Se manifiesta principalmente como demencias y los pacientes viven décadas (Vanier 2013).

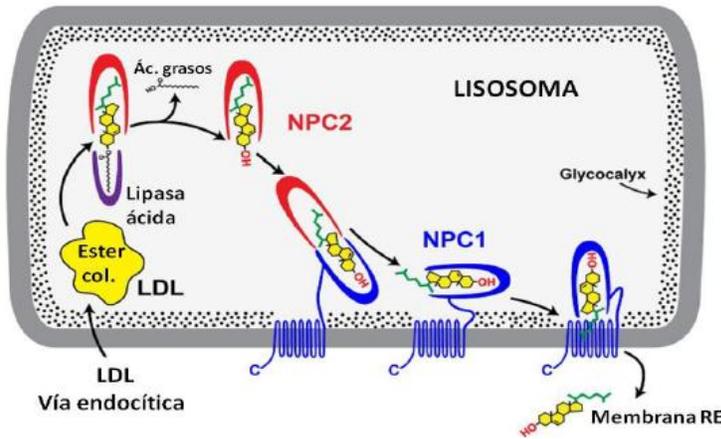
La enfermedad de NPC se produce por mutaciones en los genes que codifican para las proteínas NPC1 ó NPC2, ambas relacionadas con el eflujo de colesterol libre desde los

lisosomas. Como consecuencia de esto, se acumula colesterol libre y otros lípidos en los lisosomas generando el subsecuente daño celular. Si bien se ha postulado la participación de variados mecanismos en la patogenia de la enfermedad, aún no está del todo dilucidado cuáles son las vías de señalización que están específicamente afectadas.

## **2.2 Mecanismos de daño celular en la enfermedad de NPC**

Como se mencionó anteriormente, ambas proteínas NPC1 y NPC2, participan en la etapa final de la vía endocítica mediada por receptores permitiendo el eflujo de colesterol libre desde el lisosoma. En esta vía el colesterol transportado por LDL ingresa a la célula llegando al lisosoma, donde el colesterol éster es hidrolizado a colesterol libre mediante la lipasa ácida. En el modelo actualmente aceptado (Kwon, Abi-Mosleh et al. 2009), NPC2, una proteína lisosomal soluble, actuaría como una chaperona intra-lisosomal y transportaría al colesterol presentándose a NPC1, proteína de membrana lisosomal, la cual permitiría su paso a través de la membrana lisosomal, dejando al colesterol libre disponible en el citosol. En las células NPC, la deficiencia de cualquiera de las dos proteínas, NPC1 ó NPC2, generaría la acumulación del colesterol libre en el lisosoma (Figura 1) (Kwon, Abi-Mosleh et al. 2009), lo que conllevaría además a la acumulación secundaria de otros lípidos con afinidad por el colesterol, como por ejemplo esfingomielina, ceramida y esfingosina, entre otros (Fan, Sidhu et al. 2013). Se postula que la acumulación de colesterol libre *per se* generaría daño tisular. Esta idea está apoyada por trabajos realizados en ratones NPC (*Npc1<sup>-/-</sup>*), los cuales al ser tratados con ciclodextrina, un polímero que por sus características químicas es capaz de atrapar y sacar el colesterol libre desde las células, muestran una disminución del colesterol libre en los tejidos, lo que se correlaciona con una mejora en la función hepática y neuronal (Lopez, Terpack et al. 2014, Vite, Bagel et al. 2015). Apoyando también la idea de la toxicidad producida por la acumulación del colesterol libre, un estudio realizado en ratones NPC, muestra que los ratones al ser tratados con ezetimibe, un compuesto que inhibe la absorción intestinal de colesterol, generó una disminución del contenido de colesterol libre hepático, lo cual se

correlacionaría con una mejora en la función hepática en el modelo murino NPC (Beltroy, Liu et al. 2007).



**Figura 1: Modelo del eflujo del colesterol de los lisosomas mediado por las proteínas NPC1 y NPC2.**

El colesterol proveniente de la vía endocítica es hidrolizado en el lisosoma a colesterol libre, que es unido por NPC2 y entregado a NPC1. Esta última mediaría su salida desde el lisosoma hacia el retículo endoplásmico (RE), donde es redistribuido para requerimientos celulares (adaptado de Kwon y cols., 2009).

Si bien se desconoce como el colesterol libre por sí solo generaría el daño y muerte celular observados en la enfermedad, se han propuesto variados mecanismos. Entre los mecanismos propuestos, destaca que el aumento en los lípidos estaría correlacionado con el aumento del estrés oxidativo en modelos *in vitro*, animales de experimentación y pacientes (Ribas, Pires et al. 2012, Vazquez, Balboa et al. 2012, Copetti-Santos, Moraes et al. 2015). Del mismo modo, se ha postulado que el aumento de colesterol libre generaría disfunción mitocondrial y consecuentemente un aumento en el estrés oxidativo (Vazquez, Balboa et al. 2012). Además, se ha reportado en modelos neuronales *in vitro* e *in vivo* NPC, que posterior al aumento del estrés oxidativo, hay una activación de las vías de señalización pro-apoptóticas, mediadas por la vía c-Abl/p73 (Klein, Maldonado et al. 2011). Congruente con esta idea, se ha reportado que disminuyendo el estrés oxidativo mediante la utilización de un antioxidante como la vitamina E, se genera una disminución en la activación de estas vías pro-apoptóticas (c-abl/p73) (Marin, Contreras et al. 2014). Interesantemente, el uso de este antioxidante mejoró los problemas neurológicos en los ratones NPC estudiados (Marin, Contreras et al. 2014).

Otro mecanismo propuesto es que el aumento de colesterol libre en las membranas del sistema endosomal-lisosomal llevaría a perturbaciones en la dinámica de endosomas, lo

cual puede conllevar a un transporte deficiente de diversos compuestos y consecuente daño celular (Sobo, Le Blanc et al. 2007). La autofagia es un proceso celular conservado, esencial para la homeostasis celular e implicado en el recambio de proteínas dañadas, lípidos, carbohidratos y organelos (Elrick and Lieberman 2013). El flujo de autofagia es un proceso dinámico que implica la generación de autofagosomas, y su fusión con endosomas tardíos para formar anfisomas, que a su vez se fusionan con los lisosomas para formar autolisosomas (Fullgrabe, Klionsky et al. 2013, Loos, du Toit et al. 2014). La acumulación de autofagosomas se ha reportado en varios tejidos y células, entre los que destaca fibroblastos embrionarios de ratones deficientes en Npc1 (Sarkar, Carroll et al. 2013), neuronas cerebrales y células hepáticas de ratones deficientes en Npc1 (Pacheco, Kunkel et al. 2007), y fibroblastos humanos NPC1 (Tamura and Yui 2015). También se ha reportado una correlación entre la acumulación de colesterol y la desregulación en la autofagia, así como también con la apoptosis celular (Maetzel, Sarkar et al. 2014, Dai, Dulcey et al. 2017). Apoyando esta idea, la utilización de compuestos que mejoran la autofagia, como carbamazepina, incrementa la viabilidad de células hepáticas o neuronales NPC (Maetzel, Sarkar et al. 2014). Interesantemente, se ha reportado que en modelos de la enfermedad de Niemann-Pick tipo A, existe acumulación de autofagolisosomas, lípidos y alteración en la autofagia, lo cual podría conllevar a una posterior desestabilización y ruptura lisosomal, con la consecuente fuga de proteínas contenidas en este organelo, como por ejemplo la catepsina B (Gabande-Rodriguez, Boya et al. 2014), las que podrían estar provocando la apoptosis celular (Leist and Jaattela 2001). De manera similar, en la enfermedad de NPC se ha reportado alteraciones en el flujo autofágico en cerebelos de ratones NPC asociada a la pérdida neuronal (Ko, Milenkovic et al. 2005, Lee, Lee et al. 2014).

En los pacientes NPC las complicaciones aparecen a los primeros meses de edad, siendo los órganos principalmente afectados, el sistema nervioso central (SNC), el hígado y el bazo. En los pacientes es muy frecuente la aparición de hepatoesplenomegalia, y si bien en los primeros meses de edad no aparecen anormalidades neurológicas, después de este período comienza una rápida neurodegeneración. Esto se correlaciona con la pérdida de

habilidades motoras, la falta de interés frente a estímulos e hipotonía. Otro órgano afectado en la enfermedad es el pulmón, ya que los pacientes presentan daño pulmonar asociado a recurrentes infecciones respiratorias (Vanier 2013). En cuanto a la histología de estos órganos es frecuente encontrar infiltración de células espumosas. La muerte ocurre generalmente a edades muy tempranas, a menos de 1 año de vida (Vanier, 2013).

Si bien el daño al SNC es una de las principales afecciones en los pacientes NPC, y por ende de las más estudiadas, la enfermedad hepática es un punto muy relevante, ya que muchas veces esta puede conllevar a un severo daño hepático, empeorando así la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, el daño hepático en NPC ha sido muy poco estudiado y por lo tanto no se conocen en detalle los mecanismos que desencadenan la patogénesis hepática de esta fatal enfermedad.

### **2.3 Fibrosis hepática en la enfermedad de NPC**

La mayoría de los pacientes NPC presentan daño hepático considerable (Patterson, Hendriksz et al. 2012). NPC es reconocida como una causa relativamente común de enfermedad hepática en edades tempranas y se estima que aproximadamente la mitad de los pacientes NPC sufren de enfermedad hepática (Vanier 2013). Se ha reportado que en esta enfermedad se presenta una apoptosis progresiva, inflamación, estrés oxidativo y fibrosis en hígados de un modelo murino de la enfermedad (ratones  $Npc1^{-/-}$ ) (Rimkunas, Graham et al. 2008, Rimkunas, Graham et al. 2009, Vazquez, del Pozo et al. 2011). El fenotipo hepático común en la enfermedad se caracteriza por la acumulación de células de Kupffer cargadas con lípidos, secreción de citoquinas inflamatorias ( $TNF\alpha$ ) y aumento de la fibrosis hepática caracterizada por el aumento de marcadores profibróticos ( $TGF\beta$ ) y la activación de células estrelladas hepáticas (HSC, por sus siglas en inglés)(Rimkunas, Graham et al. 2009, Vanier 2013).

Es importante destacar que las HSC son las principales células involucradas en la fibrosis hepática, las que conducen a la acumulación de matriz extracelular, reclutamiento de células inflamatorias, incluso en casos crónicos de fibrosis, el desencadenamiento de la cascada de señalización de la apoptosis (Modol, Brice et al. 2015, de Oliveira da Silva, Ramos et al. 2017). Por otra parte, los hepatocitos participan activamente en la fibrosis por medio de la secreción del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), el que a su vez puede contribuir a la fibrosis hepática (Kodama, Takehara et al. 2011). Conectando con estas observaciones, los ratones que sobre-expresan CTGF en el hígado presentan un aumento en la apoptosis de los hepatocitos, además de fibrosis hepática (Kodama, Takehara et al. 2011). Interesantemente, experimentos en los cuales se adicionó TGF $\beta$  a cultivos primarios de HSC aisladas de ratones NPC presentaron aumentos en marcadores de fibrosis, en los que se destaca actina de musculo liso ( $\alpha$ -SMA) y colágenos I y III. Además, estas HSC presentaron aumento en el contenido de colesterol libre en sus lisosomas (Teratani, Tomita et al. 2012). Recientes investigaciones en ratones modelo de hígado graso no alcohólico, muestran que la inhibición de la actividad de la catepsina B y D reduce la inflamación característica en esta enfermedad (Houben, Oligschlaeger et al. 2017, Tang, Cao et al. 2018).

Si bien en la enfermedad de NPC existe un aumento en el contenido de colesterol libre en el hígado, no se ha dilucidado del todo como esta acumulación podría conllevar a la apoptosis y fibrosis hepática. Reportes recientes han postulado a las catepsinas B y D como potenciales candidatos en la vía que conecta el colesterol libre y el daño hepático, con la fibrosis hepática (Teratani, Tomita et al. 2012, Tomita, Teratani et al. 2014, Dominguez-Perez, Nuno-Lambarri et al. 2016).

## **2.4 Catepsinas: características, función y regulación**

Las catepsinas son una familia de proteasas que presentan normalmente una localización lisosomal, sin embargo, en algunos casos pueden ser secretadas y encontradas en el suero. Las catepsinas presentan una expresión ubicua en el organismo, además de tener actividad endo o exopeptidasa (Joyce, Baruch et al. 2004). Entre ellas destacan las catepsinas tipo serina (catepsina G), aspartato (Catepsinas D y E) y cisteína (Catepsinas B, C, H, F, K, L, O, S, V y W) catalíticas.

La catepsina D es sintetizada como una pro-enzima, así como otras proteasas lisosomales. Posteriormente, es destinada a los lisosomas por la vía del receptor de manosa 6 fosfato (Stoka, Turk et al. 2016). En los endosomas se realiza la escisión del precursor de 53 kDa, a una forma intermedia de 48 kDa. Finalmente, se produce el procesamiento de la forma intermedia generando 2 dominios, uno pesado de 34 kDa y uno liviano de 14 kDa, los cuales están unidos de manera no covalente (Zaidi, Maurer et al. 2008, Masson, Bach et al. 2010). En cuanto al procesamiento, se ha sugerido la participación de cisteína proteasas, estando involucradas las catepsinas B y L en el último paso (Laurent-Matha, Derocq et al. 2006).

En el caso de la catepsina B, esta presenta una gran similitud con la catepsina D en la síntesis y transporte a los endosomas. El procesamiento del precursor de 45 kDa origina una forma intermedia de 41kDa, esta forma intermedia es procesada hacia la forma activa madura de 29 kDa (Ishidoh and Kominami 2002). El procesamiento incluye el corte hacia el N-terminal y una escisión de 2 aminoácidos generando 2 cadenas, una pesada de 25 kDa y una liviana de 5 kDa, las cuales están unidas mediante un puente disulfuro (Roberts, Adjei et al. 1999).

En cuanto a la función de las catepsinas, se destaca su participación en el recambio proteico. Además de ello, estas peptidasas estarían involucradas en la regulación de otros

procesos como lo son: la presentación antigénica (Nakagawa, Roth et al. 1998), el crecimiento celular y homeostasis tisular (Saftig, Hetman et al. 1995, Koike, Shibata et al. 2003). Cabe destacar, que las catepsinas a pesar de ser proteasas lisosomales también pueden tener funciones fuera de este compartimento, como por ejemplo, en la ejecución de la muerte celular programada (Cirman, Oresic et al. 2004, Droga-Mazovec, Bojic et al. 2008), la degradación de matriz extracelular (Khalkhali-Ellis and Hendrix 2007) y en el crecimiento celular invasivo (Laurent-Matha, Maruani-Herrmann et al. 2005).

En relación a la regulación de la expresión de estas catepsinas, se ha reportado que el factor transcripcional TFEB regula la expresión de las catepsinas, incluidas las B y D (Feeney, Spanpanato et al. 2013). Cuando está activo TFEB, este trasloca al núcleo e induce la expresión de más de 50 genes, aumentando la biogénesis, exocitosis lisosomal además del flujo autofágico (Settembre and Ballabio 2011, Settembre, Di Malta et al. 2011, Sha, Rao et al. 2017, Nnah, Wang et al. 2019).

En cuanto a la regulación de la actividad de las catepsinas un factor importante es el pH. Estas proteasas se encuentran predominantemente activas y estables a un pH ácido, como es el encontrado en las vesículas endosomales, pero son relativamente inestables en un pH neutro, como lo es el del citoplasma y medio extracelular (Turk, Dolenc et al. 1994, Turk, Bieth et al. 1995, Almeida, Nantes et al. 2001). Recientes estudios han demostrado que estas proteasas en el citosol pueden ser muy activas, pero por un tiempo limitado permitiendo su actividad extralisosomal (Jordans, Jenko-Kokalj et al. 2009, Turk and Turk 2009). Sus sustratos citosólicos reportados son variados, incluyendo a proteínas como Bid y Bcl-2 durante la apoptosis (Cirman, Oresic et al. 2004, Droga-Mazovec, Bojic et al. 2008), algunas quimioquinas (Repnik, Starr et al. 2015), y proteínas de adhesión, entre otros (Sobotic, Vizovisek et al. 2015).

En cuanto a los factores que llevan a la activación de catepsinas, se han reportado varios, sin embargo los glicosoaminoglicanos (GAGs) y los sulfato dextranos son considerados los

activadores comunes más frecuentes que guían a la activación de las catepsinas (Rozman, Stojan et al. 1999, Beckman, Freeman et al. 2009). De manera más específica, para la catepsina D, se ha descrito que son potentes activadores el prosaposin (Gopalakrishnan, Grosch et al. 2004) e interesantemente algunos lípidos como la ceramida (Heinrich, Wickel et al. 1999) y la esfingomieline (Fischbeck, Leucht et al. 2011), lípidos que se encuentran aumentados en células NPC. En el caso de la catepsina B, la ceramida también se considera dentro de los activadores de esta proteasa (Taniguchi, Ogiso et al. 2015).

Dado el rol de las catepsinas en diversos procesos fisiológicos y patologías, se han tratado de diseñar diversos inhibidores de estas proteasas como blancos terapéuticos para algunas enfermedades. La pepstatina, es uno de los inhibidores más utilizados de las proteasas aspárticas, inhibiendo también a la catepsina D (Umezawa 1982). Sin embargo, en la actualidad no se ha encontrado un inhibidor específico para la catepsina D. Por otra parte, para catepsina B, se han diseñado algunos inhibidores específicos como el CA030, CA-074 y otros análogos (Murata, Miyashita et al. 1991, Towatari, Nikawa et al. 1991).

## **2.5 Las catepsinas B y D como mediadoras del daño hepático y fibrosis en la enfermedad de NPC**

En patologías hepáticas importantes se ha reportado un aumento de catepsinas, como por ejemplo, los pacientes con carcinoma hepatocelular y/o cirrosis presentan aumento en los niveles plasmáticos de catepsina B (Leto, Tumminello et al. 1997) y D (Leto, Tumminello et al. 1996). También se ha reportado un aumento en la actividad de la catepsina B en fibrosis experimental hepática (Yamamoto, Murawaki et al. 1992) y un aumento en los niveles plasmáticos de catepsina D en pacientes pediátricos con enfermedad hepática. Además, los niveles de catepsina D plasmáticos se proponen como marcador predictivo para la inflamación hepática en pacientes con esteatosis (Walenbergh, Houben et al. 2015).

Es importante destacar que en experimentos realizados en modelos murinos de colestasia, se ha descrito que la inactivación de catepsina B, por medio de la utilización de ratones *knockout* (KO) para esta proteasa o el inhibidor R-3032, atenúa la fibrosis, el daño hepático y la fibrogénesis (Canbay, Guicciardi et al. 2003). Por otra parte, se ha reportado que durante la activación de las HSC y fibrosis hepática aumentan muchas proteínas, entre las que destaca la catepsina D (Kristensen, Kawada et al. 2000). Estos antecedentes realzan la importancia de las catepsinas, en especial B y D en procesos de daño hepático, los que incluyen apoptosis, fibrosis e inflamación hepática.

Varias investigaciones han encontrado que las catepsinas pueden actuar sobre los mediadores de la apoptosis activándolos (Bid, Caspasa 1, etc) (Appelqvist, Johansson et al. 2012, de Castro, Bunt et al. 2016). Sin embargo, cómo es que estas enzimas lisosomales actúan en el citoplasma no está del todo descrito. Se ha reportado que la catepsina B puede translocar al citoplasma y núcleo, mecanismo descrito para la apoptosis hepática inducida por sales biliares (Roberts, Adjei et al. 1999). Este mismo fenómeno se ha evidenciado para la catepsina D frente a estrés oxidativo (Roberg and Ollinger 1998). Si bien en la enfermedad de NPC existe apoptosis celular hepática los niveles son bajos, siendo más característica la fibrosis en esta enfermedad. Por esta razón que en esta tesis nos centraremos principalmente en este proceso patológico.

Además, se ha reportado la participación de las catepsinas B y D en procesos inflamatorios en variadas patologías, entre las que destaca la participación de la catepsina B o D en polimiositis (Feng, Ni et al. 2013, Zhang, Fu et al. 2015), en trauma cerebral (Hook, Jacobsen et al. 2015), en la participación de la activación del inflammasoma NLRP3 (Chen, Li et al. 2015), pero más relevante para esta tesis es la participación de las catepsinas B y D en el proceso inflamatorio y metabolismo de los lípidos en el desarrollo de hígado graso no alcohólico (Houben, Oligschlaeger et al. 2017, Tang, Cao et al. 2018).

Se ha reportado en ratones modelos de la enfermedad de Niemann-Pick tipo B (NPB), aumento en las catepsinas B y D a nivel hepático (Moles, Tarrats et al. 2012). Además, la catepsina B tiene una correlación positiva entre sus niveles y el daño hepático en ratones NPB (Cluzeau, Watkins-Chow et al. 2012), ya que experimentos en los que se disminuyeron los niveles de catepsina B, se observa una reducción de marcadores profibróticos y proliferativos en las HSC (Moles, Tarrats et al. 2009). Apoyando lo anterior y dilucidando el mecanismo de cómo estas catepsinas estarían involucradas en la fibrosis, se ha reportado que la catepsina B podría estar regulando la diferenciación de fibroblastos de pulmón, en un contexto fibrótico, mediante la maduración de TGF $\beta$  (Kasabova, Joulin-Giet et al. 2014).

En cuanto a la enfermedad de NPC, se han observado un aumento en los niveles del ARN mensajero (ARNm) de catepsina D hepática a partir de la primera semana de vida en modelos murinos (Cluzeau, Watkins-Chow et al. 2012). También se ha descrito un aumento en los niveles de catepsina D sérica en pacientes NPC. En ratones NPC se observa un aumento progresivo en los niveles proteicos de la catepsina D en el hígado que se correlaciona con la edad de los ratones (Cluzeau, Watkins-Chow et al. 2012). Interesantemente, los niveles plasmáticos de catepsina D presentan una asociación positiva respecto al grado de severidad de la enfermedad de NPC en pacientes (Cluzeau, Watkins-Chow et al. 2012). Finalmente, cuando los ratones NPC son tratados con ciclodextrina se atenúa el daño observado, aumenta la supervivencia y se normalizan los niveles de catepsina B y D (Alam, Getz et al. 2014).

Es importante recalcar que la asociación entre las catepsinas y el daño en la enfermedad de NPC no sólo sería a nivel hepático, sino que también a nivel neuronal (Chung, Puthanveetil et al. 2016). Se ha reportado que los modelos murinos NPC presentan aumento de las catepsinas B y D en la fracción citosólica de homogenizados de hipocampo y cerebelo, asociándolas a la neurodegeneración en esta enfermedad (Amritraj, Peake et al. 2009). Los modelos celulares neuronales NPC también presentan aumento en estas

catepsinas y cuando es inhibida la actividad de estas enzimas el fenotipo NPC es atenuado (Amritraj, Peake et al. 2009, Amritraj, Wang et al. 2013).

Todos estos antecedentes, en particular: i) la asociación entre catepsinas B y D a las patologías hepáticas, específicamente a los procesos de fibrosis; ii) el aumento de catepsinas B y D en modelos hepáticos NPC; iii) la presencia de fibrosis en hígados de pacientes y ratones NPC y iv) la activación de las catepsinas B y D mediada por lípidos como la ceramida, los que se encuentran aumentados en NPC, sugieren la participación de las catepsinas B y D en el daño hepático de la enfermedad de NPC. En esta tesis se propone estudiar la participación de las catepsinas B y D en el procesos de fibrosis en modelos hepáticos de la enfermedad de NPC.

Adicionalmente, se exploró de manera global, cambios en la expresión de genes que participan en procesos de inflamación y fibrosis y su relación con la progresión de la enfermedad hepática en NPC.

Con esta tesis se espera contribuir a la comprensión de los mecanismos patogénicos y al diseño de estrategias terapéuticas para combatir la patología hepática de la mortal enfermedad de NPC.

### **3. HIPÓTESIS**

“Las vías de las catepsinas B y D contribuyen a la fibrosis hepática en la enfermedad de Niemann-Pick tipo C”.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Demostrar que las vías de las catepsinas B y D contribuyen a la fibrosis en modelos hepáticos *in vitro* e *in vivo* de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C.

#### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**1. Evaluarla progresión temporal de la fibrosis en la enfermedad hepática en NPC y su relación con cambios en la expresión global de genes y de las catepsinas B y D en el hígado del ratón Niemann-Pick tipo C**

- a. Analizar marcadores de fibrosis e inflamación en el hígado del ratón modelo NPC a diferentes edades.
- b. Analizar los niveles de ARNm de genes relacionados a daño, fibrosis y de las catepsinas B y D, de la proteínas y de la actividad de las catepsinas B y D en hígado y establecer si existe una correlación temporal con la fibrosis en el ratón modelo NPC.

**2. Analizar los niveles protéicos de las catepsinas B y D en modelos *in vitro* de hepatocitos y de células estrelladas hepáticas NPC.**

**3. Evaluar el efecto de la modulación de la actividad y niveles de las catepsinas B y D en sobre la fibrosis en modelos hepáticos *in vitro* e *in vivo* Niemann-Pick tipo C.**

- a. Aumentar o disminuir la actividad y/o niveles proteicos de catepsinas B y D en modelos *in vitro* de hepatocitos y células estrelladas hepáticas NPC y evaluar su efecto sobre la fibrosis celular.
- b. Disminuir la actividad de las catepsinas B y D en el hígado del ratón modelo NPC y evaluar su efecto sobre la fibrosis hepática.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Materiales

#### 6.1.1 Materiales y reactivos técnicos

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, USA): Tritón X-100, albúmina de suero de bovino (BSA), dodecilsulfato de sodio (SDS), Tween 20, NP-40, persulfato de amonio,  $\beta$ -mercaptoetanol, tetrametiletilendiamina (TEMED), bicarbonato de sodio, filipina, Hoescht, fluoruro de sodio (NaF) y ortovanadato de sodio.

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania): NaCl, Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ), HCl, metanol, sacarosa y los solventes de grado analítico.

Los siguientes reactivos de grado biología molecular se obtuvieron de Invitrogen Corporation (Carlsbad, USA): Tris, glicina, estándar de peso molecular de 100 pb DNA ladder, bench mark protein ladder preteñido y Taq polimerasa. La agarosa de grado biología molecular fue adquirida en Bio Whittaker Molecular Applications (Rockland, USA). La solución de Chomczynski-Fenol para la extracción de ARN se obtuvo de Winkler (Santiago, Chile). El líquido de montaje para inmunofluorescencia Fluoromount se obtuvo de Electron Microscopy Sciences (Washington, USA). El papel filtro N<sup>o</sup>2 se obtuvo en Whatman (Maidstone, Inglaterra), la membrana de nitrocelulosa para *westernblot* de BIORAD (Hercules, USA).

#### 6.1.2 Materiales y medios para cultivo celular

Los siguientes materiales para cultivo celular se obtuvieron de Orange Scientific (Braine-l'Alleud, Bélgica): frascos de 25 cm<sup>2</sup> y 75 cm<sup>2</sup>, placas de 20 mm, 60 mm y 100 mm, pipetas estériles desechables de 10 mL y rastrillos estériles desechables.

Los tubos cónicos de polipropileno de 15 mL y 50 mL se obtuvieron de Falcon (St. Louis, USA). Los filtros de 0,22  $\mu$ m se adquirieron de Millipore (Bedford, USA). Los siguientes reactivos se obtuvieron de Gibco Invitrogen (Carlsbad, CA): medio de cultivo Dulbecco's

Modified Eagle (DMEM), Opti-MEM, suero fetal bovino, tripsina-EDTA, glutamina, antibiótico-antimicótico, penicilina, estreptomycin y Lipofectamina 2000.

### **6.1.3 Sistemas Comerciales**

El sistema para la transcripción reversa *cDNA reverse transcription kit* y el sistema para q-PCR *Fast SYBR green mastermix* se obtuvieron de Applied Biosystems, life technologies (Carlsbad, USA). El sistema de quimioluminiscencia para visualizar la unión de los anticuerpos primarios a las muestras proteicas de un westernblot se obtuvo de Perkin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, USA). El sistema para medir la concentración de proteína *BCA Protein Assay Kit*, Pierce, Thermo Scientific (Waltham, USA)

### **6.1.4 Anticuerpos**

Los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano se obtuvieron de Upstate (Charlottesville, USA). Los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo y anti-IgG de ratón conjugados con Alexa Flúor-488 y Alexa Flúor-594 fueron obtenidos de Molecular Probes (Eugene, OR). Los anticuerpos primarios anti-CTGF, anti-GAPDH, anti-Catepsina-D y anti TGF $\beta$  fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology, Inc (Texas, USA). Los anticuerpos primarios anti-Lamp1 y anti-Catepsina-B fueron obtenidos de Cell Signaling Technology (Cambridge, MA, USA). El anticuerpo anti- $\epsilon$ -COP fue donado gentilmente por el Dr Monty Krieger; Massachusetts Institute of Technology (Cambridge, MA, USA).

## 6.2 Metodología

### 6.2.1 Modelos farmacológicos *in vitro*

Para los modelos celulares farmacológicos NPC se utilizó la droga U18666A (U18), la cual desencadena la acumulación de colesterol intracelular uniéndose a NPC1 (Lu, Liang et al. 2015). Esta droga ha sido ampliamente utilizada para inducir el fenotipo NPC en diferentes tipos celulares (Liscum and Faust 1989, Sparrow, Carter et al. 1999, Koh, Whiteman et al. 2006). Se trató una línea celular de hepatocitos, Hepa1-6 y una de células estrelladas hepáticas, LX-2, con dosis variadas de U18 (0,5-4 µg/ml) durante un tiempo total de 24 o 48 h.

### 6.2.2 Modelos genéticos *in vitro*

Se utilizaron hepatocitos y células estrelladas hepáticas de cultivo primario extraídas de ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> (NPC) y silvestre (WT) de 7 u 8 semanas de edad para algunos experimentos más específicos.

### 6.2.3 Modelo murino

Se utilizó el ratón modelo NPC: ratón *Npc1*<sup>-/-</sup> del *background* BALB/c ampliamente utilizado y caracterizado por el laboratorio de la Dra. Zanlungo (Loftus, Morris et al. 1997, Vazquez, del Pozo et al. 2011). Se considera metabólicamente estable hasta las 6 semanas de edad, a las 7 comienza a visualizarse la infiltración de macrófagos, y a las 8 semanas fibrosis hepática (Xie, Turley et al. 1999, Vazquez, del Pozo et al. 2011). Se analizaron ratones NPC y sus respectivos controles WT de 6, 7 y 9 semanas de edad. Resultados previos del laboratorio han mostrado que a estas edades ya hay signos de daño hepático (Vazquez, del Pozo et al. 2011).

#### **6.2.4 Toma de muestras**

A las 6, 7 y 9 semanas, los ratones fueron anestesiados por una inyección intraperitoneal de ketamina (80-100 mg/kg) y xilacina (5-10 mg/kg). El hígado fue seccionado en 3 partes: una parte (0,15g) se utilizó para realizar homogenizados de proteínas, una segunda porción se congeló para cortes en crióstato y el tejido remanente se utilizó para la extracción de RNA.

#### **6.2.5 Homogenizados de proteínas de cultivos celulares**

Luego de los tratamientos, se lavaron las placas con células 3 veces con PBS 1X para retirar residuos de medio de cultivo, manteniendo las placas en hielo (4°C aprox). Para lisar las células se utilizó la solución de tampón RIPA alto detergente (Tris-HCl 50 mM; pH 7,4, NaCl 150 mM, NP40 1%, Deoxicolato Sódico 0,5%, SDS 0,1%, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM) más inhibidores de proteasas (1 µg/µl Leupeptina, 1 µg/µl Pepstatina, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)) e inhibidores de fosfatasas (1 mM ortovanadato y 1 mM fluoruro de sodio). Se agregó directamente en cada placa cantidad suficiente de RIPA más inhibidores según el tamaño de la placa a utilizar manteniendo las placas en hielo. Luego, utilizando un rastrillo de células, se soltaron las células de la superficie de la placa y se juntó la suspensión de células obtenida en un tubo eppendorf de 1,5 mL. Posteriormente, se realizó suave pipeteo de cada muestra de células para favorecer la lisis celular. Posteriormente, después de 15 min, las muestras se centrifugaron a 21500 g por 20 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante obtenido y se cuantificó la cantidad de proteínas totales presentes por el método del ácido bicinconínico (BCA) utilizando un sistema comercial.

#### **6.2.6 Obtención de homogenizados totales de hígado**

Para la preparación de homogenizados totales de hígado se tomaron 0,15 g de tejido congelado y se le agregó 1,0 mL de tampón de homogenización (Tris 20 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; sacarosa 0,25 M; pH 7,2) con los inhibidores de proteasas (1 µg/µl Leupeptina, 1 µg/µl Pepstatina, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)) e inhibidores de fosfatasas (1 mM ortovanadato y 1 mM fluoruro de sodio). Se homogenizaron usando el homogenizador

Mixer-Mill. El homogenizado resultante se centrifugó a 3.000 g a 4°C por 10 min y el sobrenadante obtenido aislado es el homogenizado total.

### **6.2.7 Análisis mediante *westernblot* de lisados celulares y/o homogenizados de hígado**

Para el análisis de *westernblot* se utilizaron 50 µg de proteínas de lisado de células y/o homogenizados e hígado. Las muestras fueron sometidas a electroforesis denaturante en un gel al 10% o 12% de poliacrilamida - 0,1% dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) según el peso molecular de la proteína a analizar en tampón Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1% p/v a 100 V por 1,5-2 h y luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa en tampón Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, metanol 20% v/v a 450 mA por 2 h. Después de la transferencia, la membrana fue bloqueada con 20 mL de leche al 5% en PBS 1X suplementado con Tween 20 0,1% o 20 mL de BSA al 5% en TBS 1X suplementado con Tween 20 0,1% por 2 h en agitación. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario en la misma solución de bloqueo por toda la noche a 4°C en agitación. Para controlar la carga proteica de cada muestra, la membrana se cortó y se incubó con un anticuerpo anti  $\epsilon$ -cop, anti-tubulina, anti-GAPDH o anti-  $\alpha$ -actina. Al día siguiente, se procedió a lavar las membranas 3 veces con TBS ó PBS/Tween 20 0,1% por 10 min y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente BSA-5% en TBS/Tween 20 0,1% o leche 5% en PBS/Tween 20 0,1% por 2 h a temperatura ambiente. Todos los anticuerpos primarios fueron utilizados en una dilución de 1:1000, a excepción de anti  $\beta$ -actina-HRP 1:3000 (sc-1616 HRP), anti- $\epsilon$ -COP 1:4000. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón HRP o anti-IgG de conejo HRP se utilizaron en una dilución 1:3000, excepto para el anti  $\beta$ -actina-HRP, para el cual no se utiliza anticuerpo secundario por poseer HRP. La unión del complejo anticuerpo primario/anticuerpo secundario a las muestras proteicas fue visualizada usando el procedimiento de quimioluminiscencia (Perkin Elmer Life Sciences, Inc.) y expuestas mediante revelado digital a través del uso del programa Genesys utilizando el equipo G:BOXChemi XX9. Las señales detectadas en los ensayos de *westernblot* se cuantificaron mediante el programa ImageJ.

### **6.2.8 Inmunofluorescencias indirectas de los cultivos celulares**

Las células fueron sembradas en placas de cultivo con 24 pocillos que contenían cubreobjetos circulares de vidrio de 12mm, incubados anteriormente con poli-lisina por 2h y lavados, en una densidad de  $3 \times 10^4$  células por pocillo. Después de los tratamientos, las células fueron lavadas 3 veces con tampón fosfato salino (PBS) 1X, fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% sacarosa 4% en PBS 1X por 20 min, lavadas después 3 veces con PBS 1X por 5 min y lavadas por 5 min con glicina 0,1M. Luego de un lavado con PBS 1X, las células fueron permeabilizadas por 10 min con Tritón X-100 al 0,2% en PBS 1X. Después de 1 lavado con PBS por 5 min, las células fueron incubadas en albúmina de suero de bovino (BSA) al 10% en PBS 1X por 30 min a temperatura ambiente y posteriormente incubadas toda la noche en cámara húmeda a 4°C con los anticuerpos primarios (1:1000) en solución de BSA 3% en PBS 1X. Al día siguiente las células se lavaron 4 veces con BSA 3% en PBS 1X y entonces fueron incubadas con anticuerpos secundarios por 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda, protegida de la luz. Finalmente fueron lavadas 3 veces por 5 min con PBS 1x. En el caso que se quisiera visualizar núcleo, se procedió a realizar la tinción de Hoescht por 10 min y los cubreobjetos de vidrio fueron lavados nuevamente 3 veces por 5 min con PBS 1X y una vez con H<sub>2</sub>O 3X. Después de eliminar el exceso de líquido, se montaron con solución de montaje fluoromountG y se dejó polimerizar en oscuridad durante toda la noche. Todas las diluciones de los anticuerpos fueron 1:1000 y se prepararon en BSA 3% en PBS 1X. Los anticuerpos secundarios anti IgG de ratón y anti IgG de conejo conjugados con Alexa Flúor 488 (verde) y Alexa Flúor 594 (rojo) fueron utilizados en una dilución de 1:1000. Las imágenes de fluorescencia fueron capturadas con el microscopio Olympus BX51 y analizadas con el programa Image J.

### **6.2.9 Tinciones de Filipina y Hoescht**

Luego de los tratamientos se lavaron los pocillos 3 veces con PBS 1X por 5 min, se fijaron las células con PFA al 4% Sacarosa al 4% en PBS 1x por 30 min a temperatura ambiente y se lavaron nuevamente 3 veces con PBS por 5 min. Se inactivó el PFA con 1,5 mg/mL de Glicina en PBS 1x por 20 min y se incubó después con 25 µg/mL de Filipina en PBS 1x por

30 min en oscuridad. Posteriormente se lavaron los pocillos con PBS 1x 3 veces por 5 min, y se montaron con fluoromount G. Todo el procedimiento se realizó a temperatura ambiente.

Una vez realizadas las inmunofluorescencias indirectas, las células fueron incubadas con Hoescht (Sigma) a una concentración final de 0,05 µg/mL por 10 min en oscuridad y lavadas posteriormente antes del montaje.

#### **6.2.10 Transfecciones de células**

Las células Hepa1-6 fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5% más antibiótico-antimicótico (10.000 UI/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomycin y 25 µg/mL de antimicótico anfotericina B). Brevemente, las células Hepa1-6 se sembraron en placas de cultivo de 60 mm a una densidad de  $1,5 \times 10^6$  células por placa y luego de 24 h se realizó la transfección con Lipofectamina preparando, para cada placa, una dilución de 2 µg en 150 µL de medio Opti-MEM para cada plásmido empleado. En paralelo, se hizo una dilución de 6 µL de Lipofectamina en 150 µL de medio Opti-MEM, por cada placa. Después de incubar 5 min a temperatura ambiente se combinaron en una relación 1:1 en volumen y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, se agregaron los 300 µL de la mezcla Lipofectamina 2000-DNA a cada placa, que contenía 3 mL de medio completo (DMEM+5%SFB+antibiótico/antimicótico). Se incubó por 24 h a 37°C en atmósfera 5% CO<sub>2</sub> saturada de humedad. Luego de este período, se lavaron las placas una vez con PBS 1X y se realizaron los tratamientos con U18 en DMEM completo para inducir el fenotipo NPC.

#### **6.2.11 Inhibición de la actividad de catepsinas B y D**

Se utilizaron como inhibidores de la actividad de las catepsinas B y D a CA-074 (Sigma) (Woolbright, Ramachandran et al. 2012, Yan, Chen et al. 2013) y la pepstatina A (Sigma) (Pourahmad, Ross et al. 2001) respectivamente, en modelos *in vivo* e *in vitro* NPC.

### 6.2.12 PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)

El RNA total fue extraído siguiendo el protocolo descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Se tomaron 2µg de RNA y fueron tratados con DNAsa I (Invitrogen) y retro-transcrito a cDNA utilizando el método de los *random primers*(Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para cada reacción de PCR en tiempo real se utilizó 12,5 µL de Master Mix Sybr-green (Stratagene), 0,375 µL de Rox en una dilución 1:500 (Stratagene), 1 µL de partidor sentido 10 µM, 1 µL de partidor antisentido 10 µM y 9,125 µL de agua. Las secuencias de los partidores utilizados se encuentran en la Tabla 1. El termociclador para PCR en tiempo real utilizado fue el equipo Applied Biosystems modelo AB7500 (Foster City, CA), que fue gentilmente donado por la Fundación Humbolt al Departamento de Gastroeneterología de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. La expresión de genes en las células fue normalizada utilizando el gen PPIA (Peptidylprolylisomerase A). Los datos desde las reacciones de PCR fueron analizadas usando el modelo matemático descrito por Pfaffl (Pfaffl, Horgan et al. 2002).

### 6.2.13 Tinción de Perfringolisina O (PFO)

Se evaluó la acumulación de colesterol como una manera de corroborar los modelos. Esto se realizó mediante la tinción de perfringolisina O (PFO) (Kwiatkowska, Marszalek-Sadowska et al. 2014), en los modelos *in vitro*. Después de los tratamientos, las células fueron lavadas 3 veces con tampón fosfato salino (PBS) 1X, fijadas con para-formaldehído (PFA) al 4% sacarosa 4% en PBS 1X por 15min, lavadas después 3 veces con PBS 1X por 5 min y lavadas por 5 min con glicina 0,1M. Luego de un lavado con PBS 1X, las células fueron permeabilizadas por 10 min con Tritón X-100 al 0,05% en PBS 1X. Después de 1 lavado con PBS por 5 min, las células fueron incubadas en albúmina de suero de bovino (BSA) al 10% en PBS 1X por 30 min a temperatura ambiente y posteriormente incubadas durante 1 hora con GST-PFO (5µg/ml). Luego se agregó el anticuerpo anti-GST en PBS (1:200) toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Al día siguiente las células se lavaron 4 veces con BSA 3% en PBS 1X y entonces fueron incubadas con el anticuerpo secundario (Alexa 594 anti goat (1:2000)) por 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda,

protegida de la luz. Finalmente fueron lavadas 3 veces por 5 min con PBS 1x. Para visualizar núcleo, se procedió a realizar la tinción de Hoescht por 10 min y los cubreobjetos de vidrio fueron lavados nuevamente 3 veces por 5 min con PBS 1X y una vez con H<sub>2</sub>O 3X. Después de eliminar el exceso de líquido, se montaron con solución de montaje FluoromountG y se dejó polimerizar en oscuridad durante toda la noche.

#### **6.2.14 Análisis de RNAseq**

El ARN se purificó utilizando el kit de purificación de ARN Dynabeads® (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con el protocolo suministrado. El enriquecimiento en ARNm se evaluó utilizando el kit RNA 6000 Pico y el bioanalizador 2100 (Agilent Biotechnologies).

El ARNm se trató y se secuenció de acuerdo con los protocolos de los fabricantes de SOLiD Whole Transcriptome Analysis Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). En resumen, el ARNm se fragmentó utilizando RNasa III y se realizó la ligadura de la mezcla adaptadora y la transcripción inversa; las bibliotecas se seleccionaron por tamaño para los fragmentos entre 50 y 150 pb, se amplificaron por PCR en emulsión y se purificaron utilizando el sistema de fraccionamiento Ambion flashPAGE, (Thermo Fisher Scientific).

#### **6.2.15 Cultivo primario células estrelladas**

Se aislaron HSC de ratones. Brevemente, los ratones se anestesiaron por una inyección intraperitoneal de ketamina (80-100 mg/kg) y xilacina (5-10 mg/kg). Se procedió a canular el animal y perfundir con 30 mL del buffer salino Hanks1X (Sin calcio ni magnesio), posterior a ello se perfundieron 30 mL de solución la cual contenía pronasa al 0,2% y finalmente 30 mL de una solución con pronasa al 0,05% y colagenasa al 0,05%. Posterior a ello se retiró el hígado, y se dejó digerir en 20 mL de solución que contenía pronasa al 0,05% y colagenasa al 0,05% a 37° durante 30 minutos. Posterior a ello se homogenizó con pipeta, se pasó el homogenizado a través de un *Cell Strainer* de 70 µm y se centrifugó a 540 g durante 10 min. El precipitado obtenido se lavó 2 veces con PBS 1X y se centrifugó a 540 g durante 10 min. El precipitado se resuspendió y se generó una gradiente de percol al 35%. Se centrifugó a 950 g durante 30 min sin desaceleración. Se extrajo la fracción de

las HSC, las que se resuspendieron en DMEM. Se lavaron las células 2 veces en DMEM centrifugándolas a 540 g durante 6 min. Finalmente, se sembraron las células según la confluencia necesaria para cada experimento.

#### **6.2.16 Análisis Estadístico**

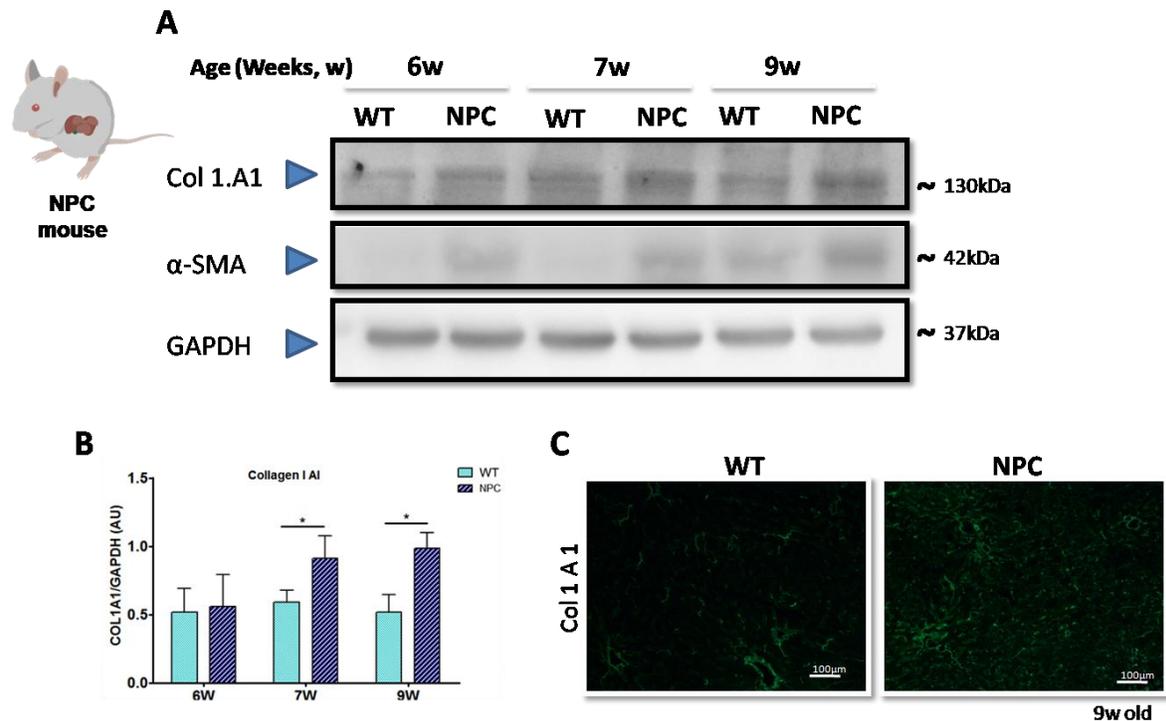
Los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (SD). Las diferencias observadas entre las medias de los parámetros determinados para todos los grupos fueron valoradas estadísticamente mediante la aplicación del test de ANOVA usando el programa de análisis estadístico Minitab (Minitab Inc, State College, Pennsylvania, USA) y aplicando un post test de Fisher. Una diferencia entre grupos experimentales se consideró estadísticamente significativa cuando el valor p fue menor de 0,05.

## 7. RESULTADOS

**7.1 RESULTADOS OBJETIVO 1:** Evaluarla progresión temporal de la fibrosis en la enfermedad hepática en NPC y su relación con cambios en la expresión global de genes y de las catepsinas B y D en el hígado del ratón Niemann-Pick tipo C.

### 7.1.1 Aumento en la fibrosis hepática y la inflamación en ratones NPC

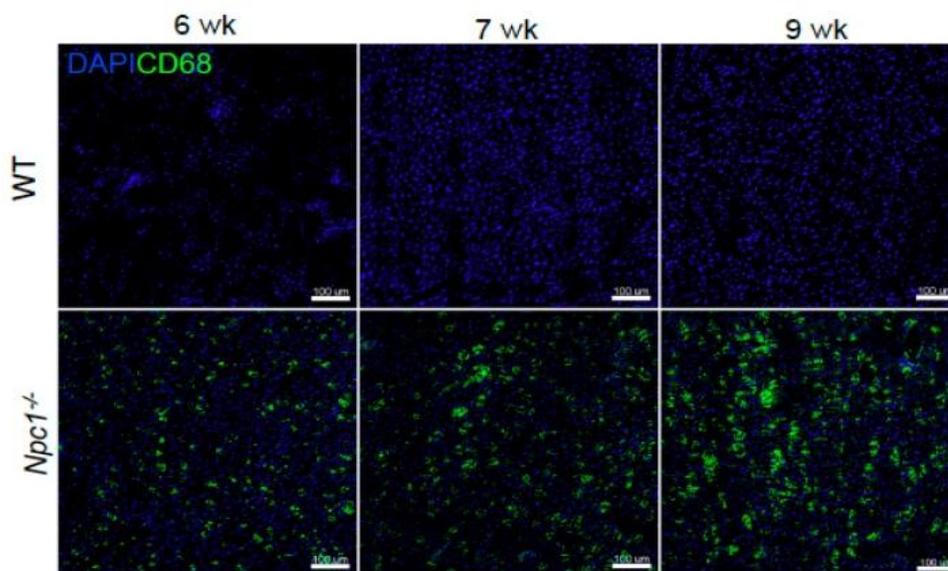
Como primera aproximación para la descripción del modelo hepático de ratón NPC, evaluamos la fibrosis hepática. Para ello, analizamos los niveles de las proteínas clásicamente involucradas en la fibrosis hepática, como lo son colágeno 1A1 y  $\alpha$ -SMA, en hígados de ratones NPC y WT. Interesantemente, se pudo observar que los hígados de ratones NPC presentaron aumento en estas proteínas a las 7 y 9 semanas de edad respecto a los animales WT (Fig. 2 A, B). Además, se realizó una inmunofluorescencia contra colágeno 1A1 para analizar la morfología y fibrosis hepática, pudiéndose observar un aumento en la marca de colágeno a las 9 semanas de edad en hígados de ratones NPC respecto a los ratones WT (Fig. 2 C).



**Figura 2: Aumento en los niveles proteicos de colágeno 1A1 en hígados de ratones NPC.**

(A) Westernblot contra colágeno 1A1,  $\alpha$ -SMA y GAPDH de homogenizados de hígado de ratones NPC y WT de 6, 7 y 9 semanas de edad (w). Las cuantificaciones son en unidades arbitrarias (AU) para estimar los niveles de colágeno 1A1 (B), utilizando como control de carga a la proteína GAPDH. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE (n = 3). Se realizó test estadístico de la prueba de t, los asteriscos (\*) representan diferencias estadísticamente significativas (p <0,05). Las barras de escala son de 100  $\mu$ m. (C) Inmunofluorescencia contra colágeno 1A1 en hígados de ratones NPC y WT de 9 semanas de edad.

Para analizar inflamación, evaluamos la marca positiva para CD68, un marcador de macrófagos inflamatorios. Se puede apreciar que a partir de las 6 semanas de edad hay un aumento en la marca de CD68 en el hígado de los ratones NPC en comparación a los animales controles, y que este aumento es progresivo en el tiempo (Fig. 3) (Klein, Oyarzun et al. 2018).

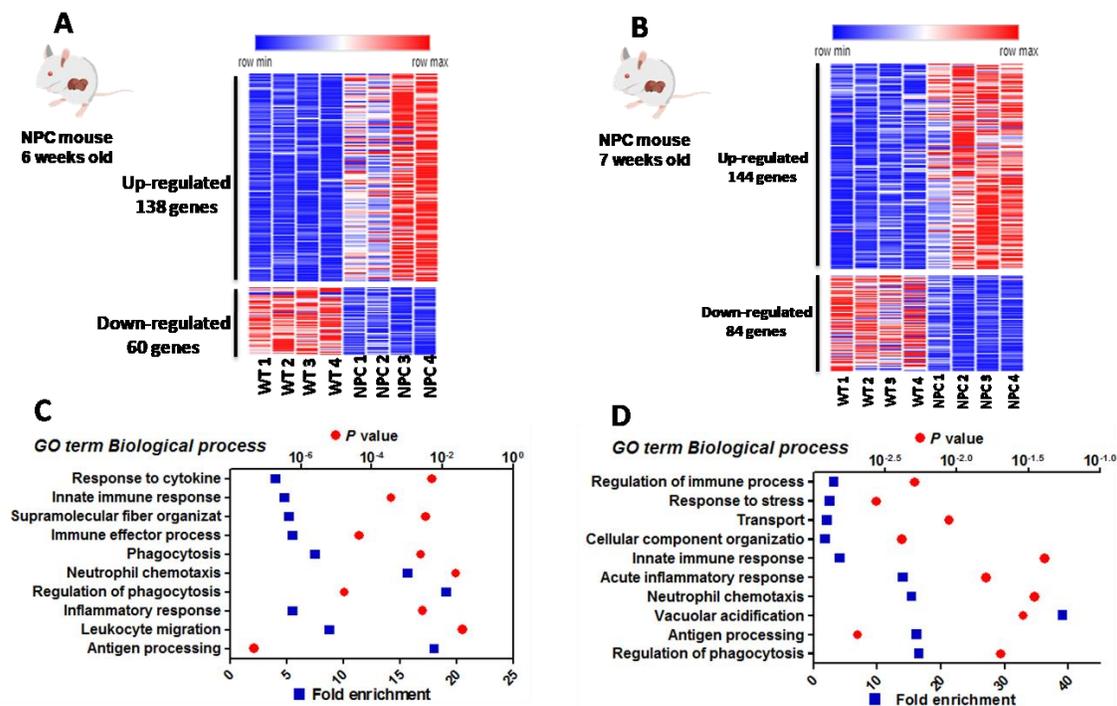


**Figura 3: Aumento progresivo de células positivas para CD68 hepáticas en ratones NPC.**

(A) Tinción con CD68 de hígados de ratones silvestres (WT) y *Npc1* de 6, 7 y 9 semanas de edad (wk). Las barras de escala son de 100  $\mu$ m.

### 7.1.2 Aumento progresivo en los niveles de RNA mensajero de genes relacionados a daño, fibrosis e inflamación hepática y de catepsina D

Para observar las diferencias génicas globales entre los ratones WT y NPC y completar la descripción del modelo hepático NPC, se realizó un análisis de RNAseq en hígados de ratones NPC y WT de 6 y 7 semanas de edad. Los resultados del RNAseq muestran cambios globales significativos en los niveles de ARNm de genes evaluados entre ratones NPC y ratones WT a las 6 y 7 semanas (Fig. 4 A-B). Al momento de analizar los procesos biológicos en los cuales estaban involucrados los genes, se encontró que los ARNm estaban relacionados a procesos inflamatorios, fibróticos, de daño tisular y lisosomales (Fig. 4 C-D).

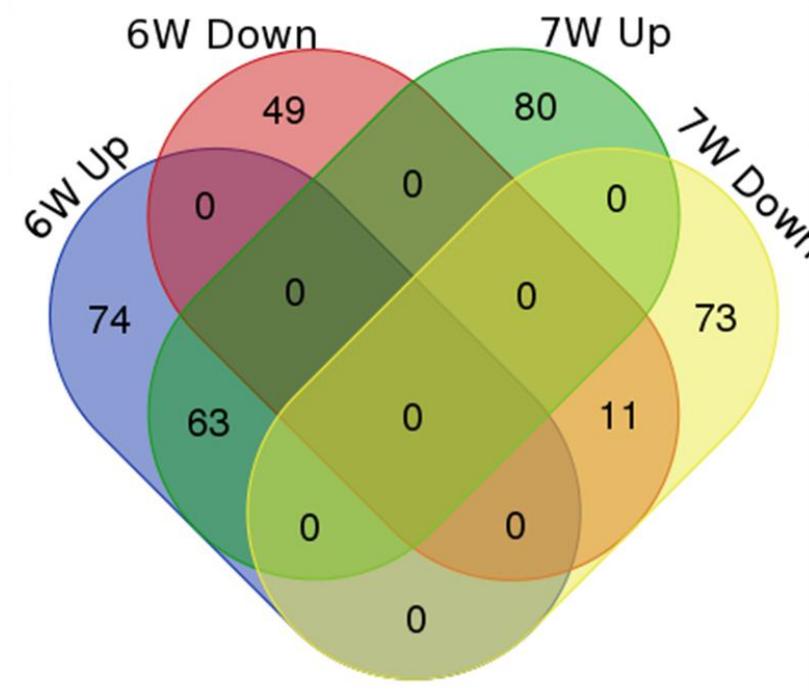
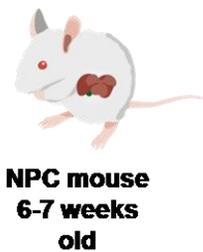


**Figura 4: Cambios globales en la expresión de genes en hígados de ratones NPC en comparación con los silvestres (WT) a las 6 y 7 semanas de edad.**

(A-B) El mapa de calor fue generado usando el Log2 de las veces de cambio del total de lecturas por muestra de hígado correspondiente a un ratón WT o NPC de 6 o 7 semanas de edad. Cada fila representa un gen y cada columna un ratón según su genotipo NPC o WT. (A) Se observa en la parte superior los 138 genes regulados hacia arriba y en la parte inferior los 60 genes regulados hacia abajo en ratones NPC respecto a ratones WT a las 6 semanas de edad. (B) Se observa que

144 genes son regulados hacia arriba y 84 genes son regulados hacia abajo en ratones NPC respecto a ratones WT las 7 semanas de edad. (C-D) Anotación funcional estadísticamente significativa (GOTERM "Biological process" BP, en FDR <0,02%) realizada a partir de los datos de RNAseq de ratones WT y NPC de 6 y 7 semanas de edad respectivamente.

Cuando se evaluó la expresión de genes compartida, se observó que los hígados de ratones NPC de 6 y 7 semanas de edad presentaron una disminución en la expresión de 11 genes respecto a los ratones WT (Fig. 5). Por otra parte, los ratones NPC presentaron 63 genes sobre-expresados compartidos en comparación a los ratones WT (Fig. 5), los cuales se encuentran descritos en la figura 5. Entre estos genes destacan los asociados a procesos inflamatorios como CD63, CD68 y Trem2, además de genes que codifican para proteínas lisosomales como catepsina D y S (Fig. 6). Si bien los niveles de catepsina B aumentan, estos cambios no fueron significativos en el RNAseq.



**Figura 5: Expresión diferencial de genes en hígados de ratones NPC respecto a los silvestres (WT) a las 6 y 7 semanas de edad.**

Dendrograma de Venn de genes sobre-expresados o con reducción en la expresión de ratones NPC respecto a los ratones WT de 6 y 7 semanas de edad respectivamente.

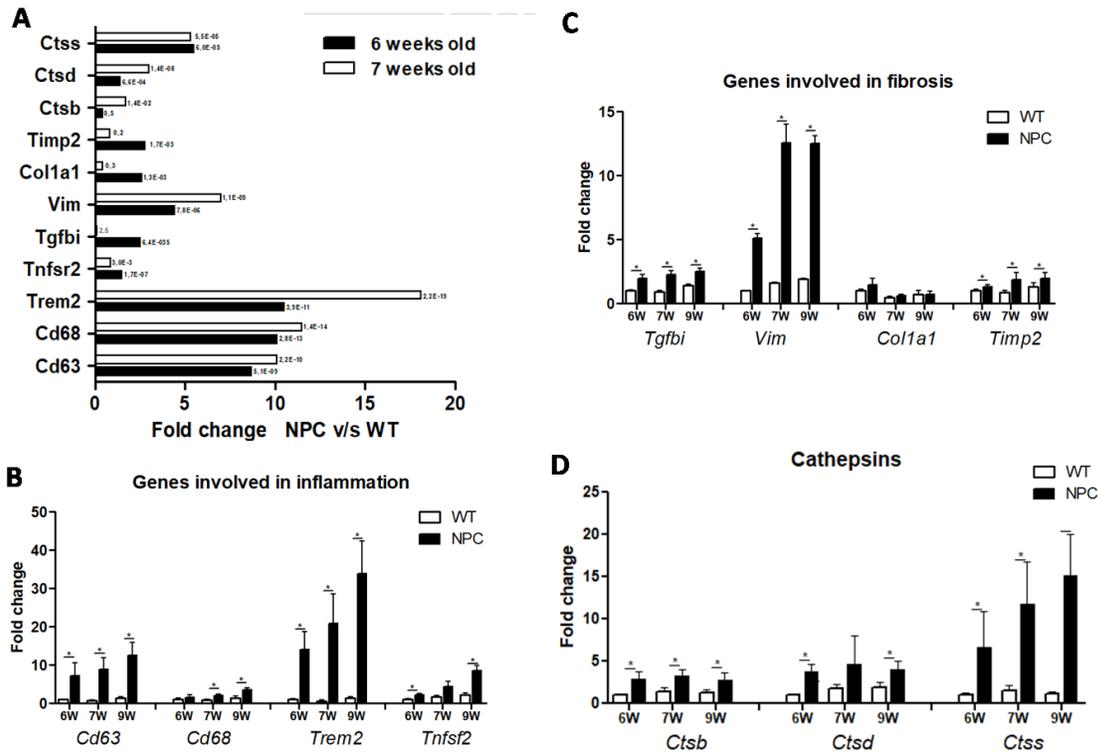
Gene	6 weeks old		7 weeks old		Gene	6 weeks old		7 weeks old	
	Fold change	Adjusted p-value	Fold change	Adjusted p-value		Fold change	Adjusted p-value	Fold change	Adjusted p-value
<b>AF251705</b>	3,7	9,9E-04	2,2	1,7E-02	<b>Igsf8</b>	1,7	9,1E-03	1,5	6,8E-03
<b>Adam8</b>	6,0	2,2E-05	10,5	1,1E-09	<b>Il10rb</b>	1,9	1,6E-02	2,4	2,2E-03
<b>Adcy3</b>	5,9	2,5E-06	3,6	1,3E-04	<b>Il18bp</b>	3,0	2,0E-03	2,4	3,6E-03
<b>Ano6</b>	1,4	2,2E-02	1,5	8,5E-03	<b>Iqgap1</b>	4,2	8,0E-05	1,5	2,8E-02
<b>Anxa2</b>	2,9	3,2E-04	3,3	7,1E-05	<b>Irgb2</b>	8,7	1,1E-08	5,0	1,3E-05
<b>Apobec1</b>	1,4	3,5E-02	4,0	8,0E-06	<b>Jun</b>	1,3	3,1E-02	1,6	1,4E-02
<b>Atf3</b>	6,8	2,1E-07	4,5	2,1E-05	<b>Laptn5</b>	9,0	3,4E-11	3,9	5,0E-06
<b>Basp1</b>	3,6	9,5E-05	4,9	2,8E-06	<b>Lgals1</b>	2,5	1,3E-03	3,3	8,6E-05
<b>C1qa</b>	3,8	7,8E-06	1,1	3,6E-02	<b>Lgals3</b>	13,3	1,8E-12	14,1	9,7E-14
<b>C1qb</b>	3,7	2,6E-05	2,1	2,6E-03	<b>Lgmn</b>	2,5	7,1E-05	2,3	6,8E-05
<b>C1qc</b>	5,0	3,1E-08	5,4	1,4E-09	<b>Lyz2</b>	7,8	3,8E-08	6,2	1,2E-06
<b>Capg</b>	9,3	2,4E-09	12,1	1,1E-12	<b>Pea15a</b>	2,3	2,3E-03	1,5	1,6E-02
<b>Cd63</b>	8,7	5,1E-09	10,1	2,2E-10	<b>Pianp</b>	4,3	9,2E-06	5,4	9,9E-08
<b>Cd68</b>	12,2	2,8E-13	11,5	1,4E-14	<b>Pkm</b>	1,5	2,7E-02	3,0	2,0E-04
<b>Cln6</b>	3,6	8,4E-04	2,7	2,6E-03	<b>Pld3</b>	2,3	1,7E-04	5,3	2,9E-10
<b>Cotl1</b>	5,3	8,9E-08	2,5	3,7E-04	<b>Plekha2</b>	1,3	2,1E-02	2,4	1,5E-04
<b>Crip1</b>	3,5	2,2E-04	5,0	3,1E-06	<b>Prtn3</b>	2,7	1,4E-02	3,0	6,0E-03
<b>Csrp1</b>	1,9	7,8E-03	1,3	2,5E-02	<b>Rhoc</b>	3,3	4,2E-05	2,3	3,7E-04
<b>Ctsd</b>	1,4	6,6E-04	3,0	1,4E-08	<b>Rilpl2</b>	1,4	2,2E-03	1,5	7,9E-04
<b>Ctss</b>	5,5	6,0E-05	5,3	5,5E-05	<b>Serpinb6a</b>	2,3	2,0E-02	2,0	1,9E-02
<b>Cyba</b>	7,8	8,8E-10	7,6	2,2E-10	<b>Sgk1</b>	1,8	4,0E-02	2,3	8,7E-03
<b>Emp3</b>	3,7	3,7E-04	3,9	1,6E-04	<b>Sirpa</b>	3,6	1,1E-09	5,1	2,9E-13
<b>Fcer1g</b>	6,1	3,1E-07	6,0	6,1E-08	<b>Slc11a1</b>	4,4	8,1E-05	2,3	3,6E-03
<b>Fcgr3</b>	2,2	1,6E-02	3,3	8,3E-04	<b>Slc13a3</b>	2,1	1,8E-03	1,3	1,7E-02
<b>Fxyd5</b>	3,8	3,9E-04	3,1	8,6E-04	<b>Slc15a3</b>	4,9	1,9E-05	5,0	3,6E-06
<b>Gadd45b</b>	4,5	8,1E-07	5,6	1,4E-08	<b>Spi1</b>	4,8	1,0E-05	4,0	2,5E-05
<b>Gngt2</b>	4,4	2,7E-04	2,4	9,9E-03	<b>Tagln2</b>	4,3	4,7E-06	2,0	2,3E-03
<b>Gpx3</b>	2,8	5,2E-03	7,6	3,7E-08	<b>Tmem86a</b>	3,1	8,0E-05	1,8	4,3E-03
<b>H2-Aa</b>	6,8	3,0E-08	1,6	2,1E-02	<b>Trem2</b>	10,5	3,9E-11	18,1	2,2E-19
<b>Hexa</b>	2,3	5,2E-07	1,9	6,2E-06	<b>Unc93b1</b>	1,4	8,3E-03	1,8	9,0E-04
<b>Ifi2712b</b>	4,1	9,4E-05	1,7	2,0E-02	<b>Vim</b>	4,4	7,8E-06	7,0	1,1E-09

Figura 6: Genes sobre-expresados en hígados de ratones NPC respecto a los silvestres (WT) a las 6 y 7 semanas de edad.

Análisis de RNAseq de RNAs mensajeros sobre-expresados en hígados de ratones NPC respecto a los ratones WT de 6 y 7 semanas de edad respectivamente.

Posteriormente al estudio de RNAseq, se seleccionó un grupo de genes que presentaron aumento en su expresión implicados en la fibrosis hepática (Tgfb1, Vim, Col1a1 y Timp2), inflamación (Cd63, Cd68, Trem2 y Tnfsf2) y genes lisosomales (CtsD y Ctss), incluyendo CtsB (Fig.7 A) para evaluar su expresión mediante qPCR. De forma congruente con los resultados obtenidos mediante el estudio de RNAseq, los genes Cd63, Cd68, Trem2, Tnfsf2 Tgfb1, Vim, Timp2 Ctsb, CtsD y CtsS presentaron un aumento en su expresión con magnitudes similares a las obtenidas por RNAseq (Fig.7 B-D).

Estos resultados, en su conjunto, son coherentes con el aumento de fibrosis y de inflamación en los hígados de los ratones NPC. Particularmente, se puede observar una buena correlación con el aumento progresivo de la expresión de genes relacionados a la inflamación y la marca de CD68.



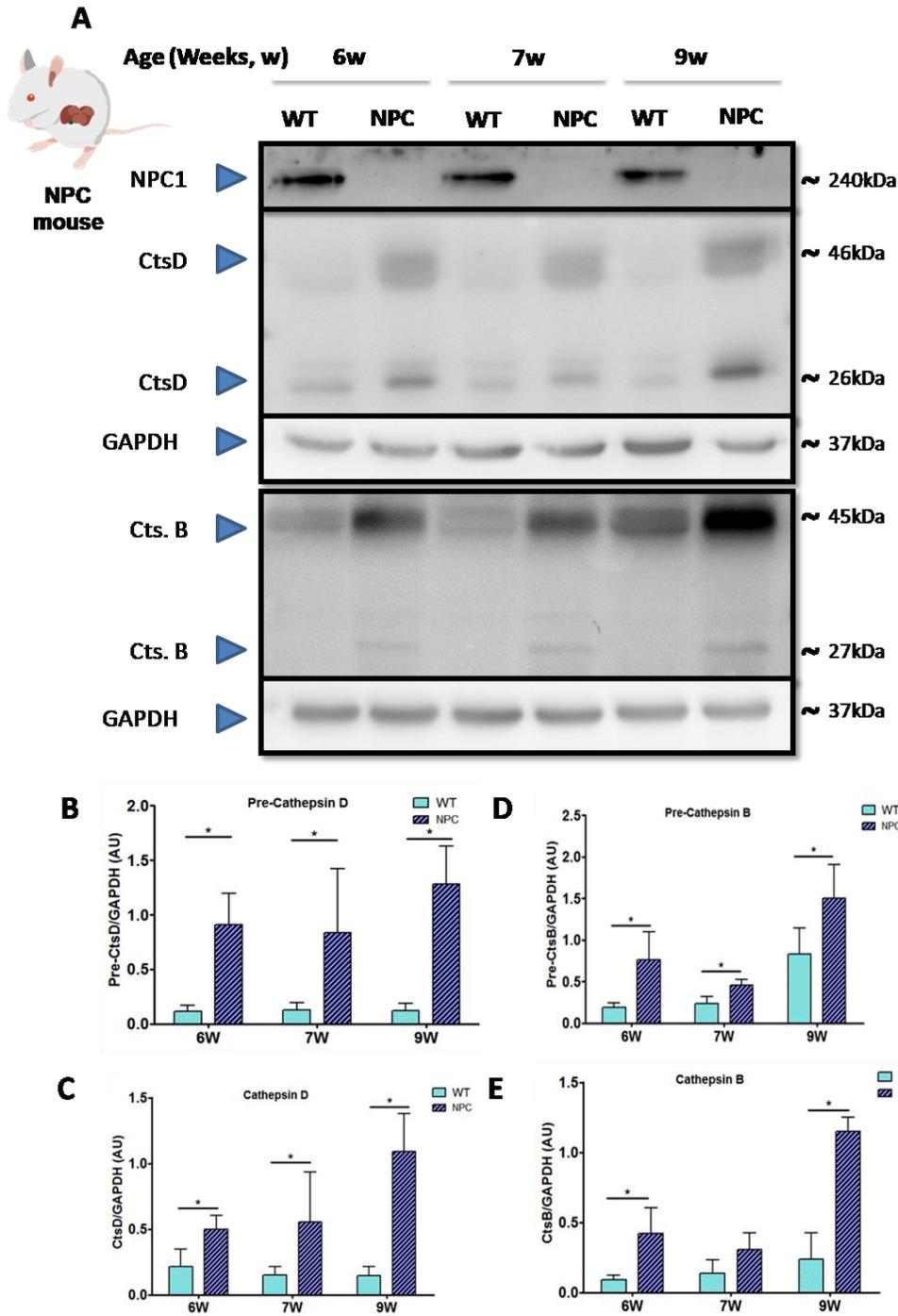
**Figura 7: Genes cuya expresión cambia en hígados de ratones NPC comparados con los silvestres (WT) analizados por PCR-tiempo real.**

(A) Veces de cambio y valor p correspondientes a diversos mRNAs de hígados de ratones NPC respecto a ratones WT de 6 y 7 semanas de edad obtenidos mediante RNAseq. (B-D) Corroboración mediante PCR-tiempo real de mRNAs de hígados de ratones NPC y WT de 6, 7 y 9 semanas de edad de genes involucrados en la inflamación (B), genes involucrados en la fibrosis (C) y catepsinas (D). La estadística fue realizada mediante el software REST.

### 7.1.3 Aumento en los niveles proteicos de catepsinas B y D en hígados de ratones NPC

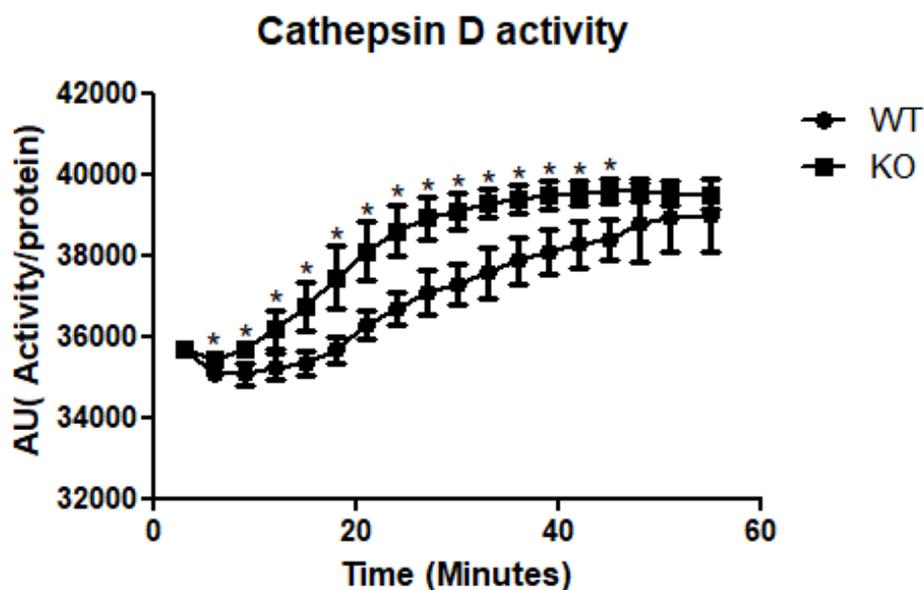
Como se observó mediante los estudios de RNAseq y qPCR que habían cambios en la expresión génica de catepsinas en los ratones NPC dependiente de la edad, se procedió a analizar los niveles proteicos de catepsinas B y D a nivel hepático en el modelo murino NPC. Es posible apreciar que en hígados de ratones NPC hubo un aumento en los niveles

proteicos totales (Pro-catepsina B y D y su forma activa) de catepsina B y D a partir de las 6 semanas de edad (Fig. 8A-E), que fue progresivo en el tiempo a las 6, 7 y 9 semanas de edad respecto a los ratones WT (Fig. 8 A-E). Este aumento se observa tanto en la forma inmadura (Fig. 8A, B, D) como la madura (Fig. 8A) de las catepsinas B y D. Interesantemente, el aumento en la forma activa de la catepsina D en el hígado NPC se correlacionó con el aumento en la actividad de esta proteasa lisosomal a las 9 semanas de edad (Fig. 9). Lamentablemente la medición de la actividad de catepsina B, no pudo ser estandarizada.



**Figura 8: Aumento en los niveles proteicos de catepsinas B y D en hígados de ratones NPC.**

(A-E) Westernblot contra las proteínas catepsina B, catepsina D y GAPDH de homogenizados de hígado de ratones NPC de 6, 7 y 9 semanas de edad (w). Las cuantificaciones son en unidades arbitrarias (AU) para estimar los niveles de catepsina D (B-C) y B (D-E), utilizando como control de carga a la proteína GAPDH. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE (n = 3). Se realizó test estadístico de la prueba de t, los asteriscos (\*) representan diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05).



**Figura 9: Aumento en la actividad de catepsina D en hígados de animales NPC.**

Evaluación de la actividad de catepsina D en hígados de ratones NPC de 9 semanas de edad. Las cuantificaciones son en unidades arbitrarias (AU). Los datos se expresan como media  $\pm$  DE (n = 3). Se realizó test estadístico de la prueba de t, los asteriscos (\*) representan diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05).

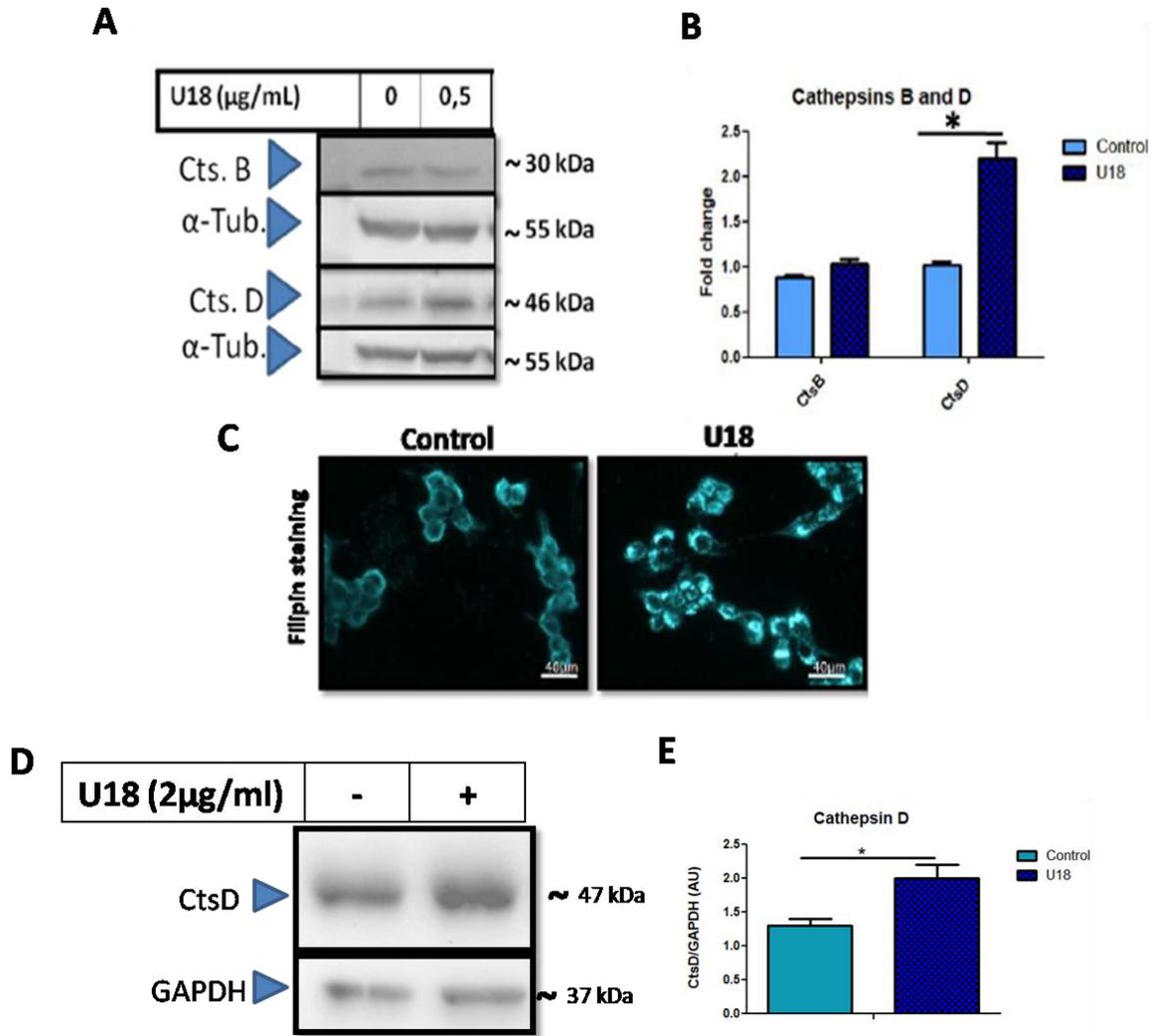
En el hígado del ratón NPC es posible ver aumentos en la inflamación, fibrosis y niveles de catepsinas B y D. Sin embargo es necesario poder evaluar que componentes celulares del hígado contribuye al proceso fibrótico, es por ello que se hace necesario explorar modelos celulares ya sean de hepatocitos o células estrelladas hepáticas, las cuales se han reportado entre las principales células involucradas en la fibrosis hepática.

## **7.2 RESULTADOS OBJETIVO 2: Analizar los niveles protéicos de las catepsinas B y D en modelos *in vitro* de hepatocitos y de células estrelladas hepáticas NPC**

### **7.2.1 Aumento en los niveles proteicos de las catepsinas B y D en modelos celulares hepáticos NPC**

Para evaluar la relevancia de las catepsinas B y D en el daño hepático en NPC se usaron también modelos celulares hepáticos de la enfermedad. Se utilizaron dos estrategias complementarias. Primero, una estrategia farmacológica, para lo cual se ensayaron distintas dosis de la droga U18 en células hepáticas Hepa1-6 y se evaluaron los niveles

proteicos de las catepsinas B y D. En este modelo farmacológico no se observaron cambios en los niveles proteicos de la catepsina B (Fig. 10 A-B), pero si en los de la catepsina D (Fig. 10 A-B). De manera de corroborar que el modelo farmacológico inducido por U18 producía el fenotipo NPC esperado, se evaluó la acumulación de colesterol a través de la tinción de filipina. Con esta tinción se observó un aumento en la acumulación de colesterol cuando las células fueron tratadas con U18. El patrón punteado fluorescente observado para la tinción de filipina es congruente con lo esperado, ya que sugiere una acumulación lisosomal de colesterol (Fig. 10 C). Posterior a ello se evaluaron los niveles de catepsina D en la línea celular de células estrelladas hepáticas, LX-2, donde fue posible observar aumentos en los niveles proteicos de catepsina D al momento de agregar el U18 (Fig. 10 D,E).

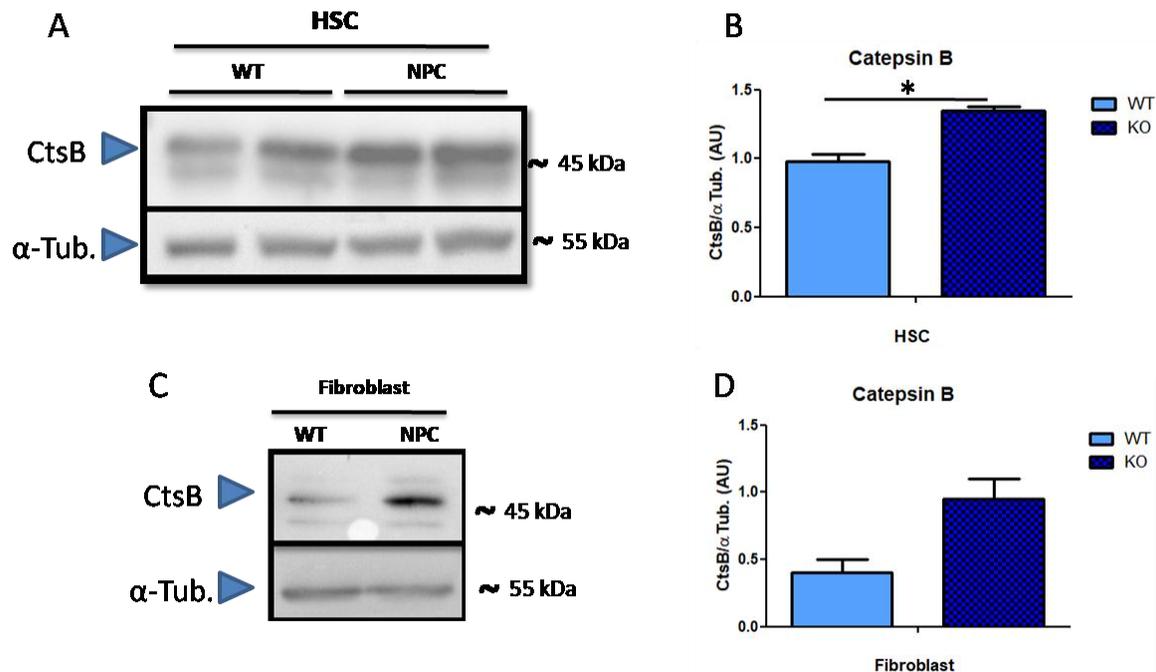


**Figura 10: Aumento en los niveles proteicos de catepsina D en un modelos farmacológicos de hepáticos *in vitro* NPC.**

(A) Westernblot contra catepsina B, catepsina D y  $\alpha$ -tubulina de extractos proteicos realizados a partir de células Hepa1-6 tratadas con diferentes dosis crecientes de U18 durante 24 h. Las cuantificaciones son en unidades arbitrarias (AU) para estimar los niveles de catepsina B y catepsina D (B) utilizando como control de carga a la proteína  $\alpha$ -tubulina. (C)Tinción de filipina de células Hepa1-6 tratadas con U18 durante 24 h. (D) Westernblot contra catepsina D y GAPDH de extractos proteicos realizados a partir de células Hepa1-6 tratadas con diferentes dosis crecientes de U18 durante 24 h. Las cuantificaciones son en unidades arbitrarias (AU) para estimar los niveles de catepsina D (E) utilizando como control de carga a la proteína GAPDH. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE (n = 3). Se realizó test estadístico de la prueba de t, los asteriscos (\*) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Las barras de escala son de 40  $\mu$ m.

Dado que no observamos aumento en los niveles de catepsina B en el modelo de células hepáticas NPC, se procedió a evaluar modelos genéticos. Para ello, se obtuvieron cultivos

primarios de células estrelladas hepáticas del ratón NPC con 5 días de activación *in vitro* o fibroblastos de ratones WT y NPC, en los que si se observó un aumento en los niveles de esta proteasa en las células NPC respecto a las células WT (Fig. 11 A-D).



**Figura 11: Aumento en los niveles proteicos de catepsina B en modelos genéticos *in vitro* NPC.**

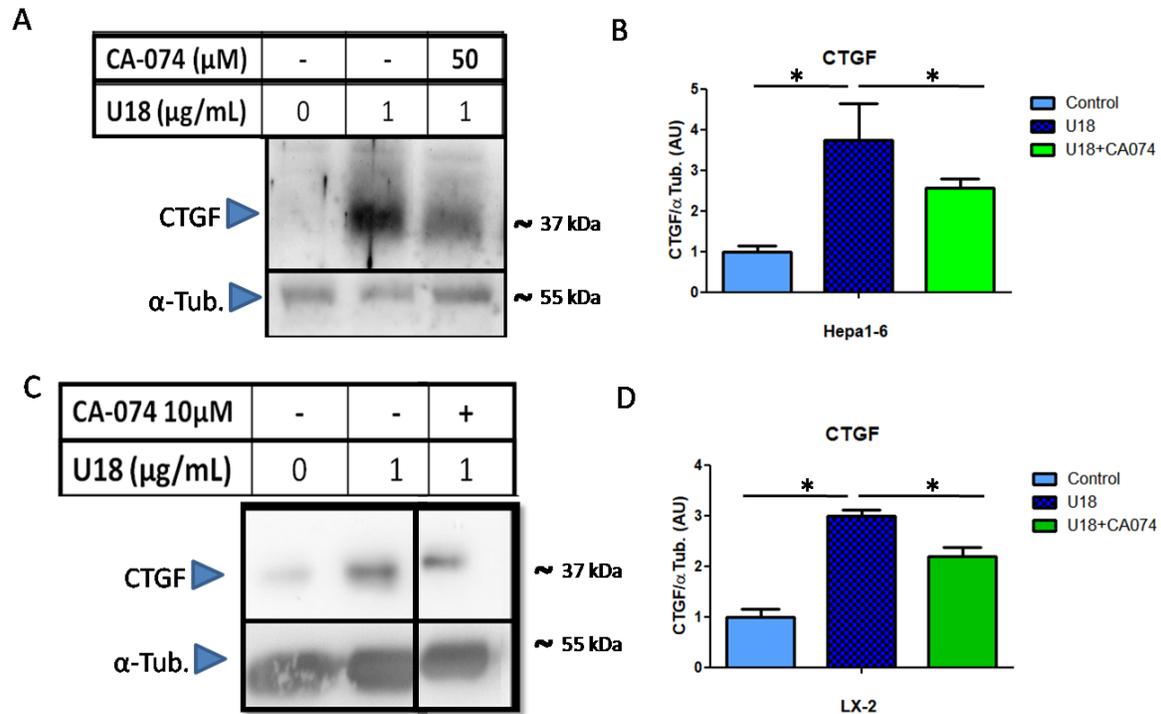
(A) Westernblot contra las proteínas catepsina B y  $\alpha$ -tubulina de extractos proteicos realizados a partir de cultivos primarios de células estrelladas hepáticas (HSC) de ratones NPC o WT con 5 días de activación. Las cuantificaciones son en unidades arbitrarias (AU) para estimar los niveles de catepsina B (B) utilizando como control de carga a la proteína  $\alpha$ -tubulina. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE (n = 3). Se realizó test estadístico de la prueba de t, los asteriscos (\*) representan diferencias estadísticamente significativas (p <0,05). (C) Westernblot contra las proteínas catepsina B y  $\alpha$ -tubulina de extractos proteicos realizados a partir de fibroblastos de ratón NPC o WT. Las cuantificaciones son en unidades arbitrarias (AU) para estimar los niveles de catepsina B (B) utilizando como control de carga a la proteína  $\alpha$ -tubulina. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE (n = 2).

Los modelos celulares de hepatocitos y células estrelladas hepáticas NPC, presentan aumentos en los niveles de catepsinas B y D, sin embargo un punto relevante a analizar es la importancia biológica de estas proteasas lisosomales en el proceso de fibrosis hepática, es por ello que se es necesaria la realización de experimentos de modulación de la actividad y niveles de las catepsinas B y D.

### **7.3 RESULTADOS OBJETIVO 3: Evaluar el efecto de la modulación de la actividad y niveles de las catepsinas B y D en sobre la fibrosis en modelos hepáticos *in vitro* e *in vivo* Niemann-Pick tipo C.**

#### **7.3.1 La inhibición de la actividad de la catepsina B reduce el fenotipo pro-fibrótico en modelos hepáticos *in vitro* NPC**

Un fenómeno observado en el hígado NPC es el aumento de la fibrosis hepática (Kelly, Portmann et al. 1993). Congruentemente, en el modelo farmacológico de hepatocitos NPC se observó un aumento en el factor pro-fibrótico CTGF al tratar con la droga U18 (Fig. 12). Para evaluar la importancia del aumento de catepsina B en la fibrosis hepática en NPC, se utilizó el inhibidor específico CA-074 en 2 modelos celulares farmacológicos NPC *in vitro*. Así es como, en cultivos primarios de hepatocitos WT tratados con la droga U18 (fenotipo NPC), se observó un aumento del factor pro-fibrótico CTGF. Interesantemente, el tratamiento con la droga CA-074 indujo una reducción en los niveles de CTGF en presencia de U18 (Fig. 12 A-B). Así mismo, en la línea celular de células estrelladas hepáticas LX-2 se observó un aumento en los niveles de CTGF al tratar con U18. Luego, el tratamiento con la droga CA-074 logró prevenir este fenotipo pro-fibrótico generando una disminución en los niveles de CTGF (Fig. 12 C-D).



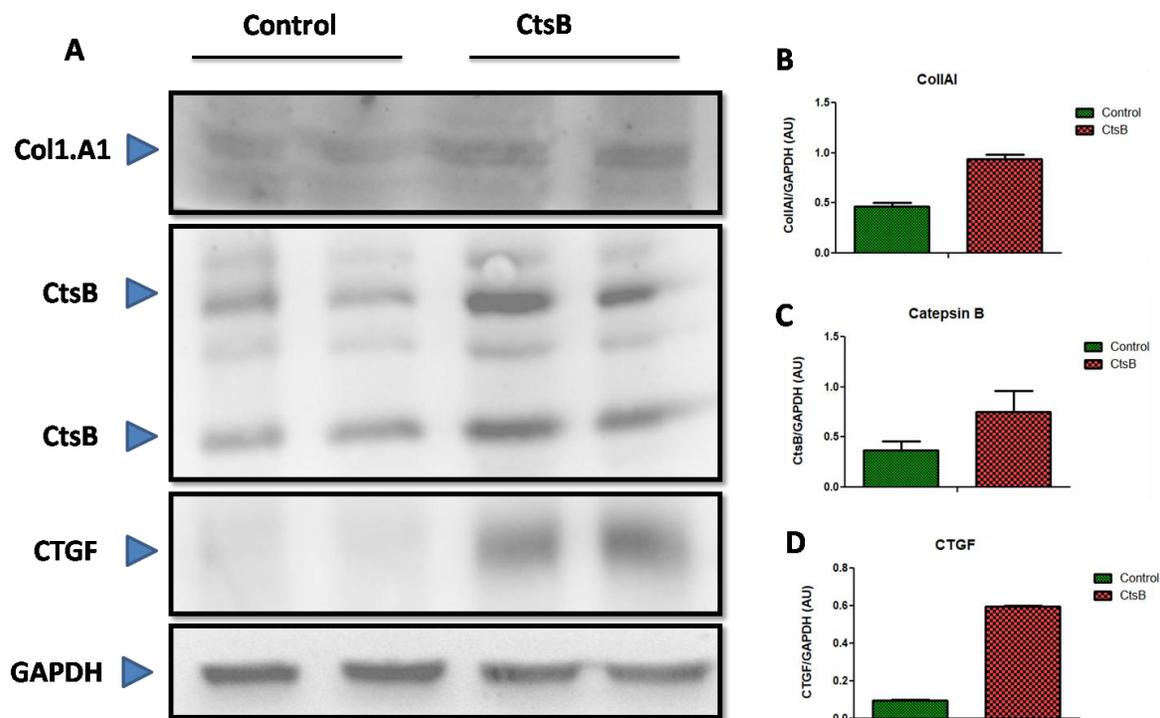
**Figura 12: La inhibición de la actividad de catepsina B disminuye el factor pro-fibrótico CTGF en un modelo celular hepático farmacológico NPC.**

(A) Westernblot contra las proteínas CTGF y  $\alpha$ -tubulina de extractos proteicos realizados a partir de cultivos primarios de hepatocitos WT tratados con U18 (1 $\mu\text{g/mL}$ ) durante 24 h, que algunos casos fueron previamente tratados con distintas dosis de CA-074 2 h antes del tratamiento con U18. (C) Westernblot contral las proteínas CTGF y  $\alpha$ -tubulina de extractos proteicos realizados a partir de cultivos primarios de la línea celular LX-2 tratada con diferentes dosis de U18 durante 24 h, que en algunos casos fueron previamente tratadas con CA-074 (10 $\mu\text{M}$ ) 2 h antes del tratamiento con U18. Esta imagen fue obtenida desde el mismo gel, de carriles no contiguos. Las cuantificaciones son en unidades arbitrarias (AU) para estimar los niveles de CTGF en Hepa1-6 (B) y LX-2 (D) utilizando como control de carga a la proteína  $\alpha$ -tubulina. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE (n = 3). Se realizó test estadístico de ANOVA de una vía, los asteriscos (\*) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

### 7.3.2 La sobre-expresión de la catepsina B aumenta los marcadores pro-fibróticos en modelos *in vitro* NPC.

Para evaluar el efecto de la sobre-expresión de la catepsina B en células hepáticas Hepa 1-6 se utilizó un plásmido que contenía el cDNA de la proteasa. La sobre-expresión de esta proteasa en las células generó un aumento en proteínas profibróticas (Colágeno y CTGF) (Fig.13). Si bien estos resultados fueron obtenidos con un número de replicas que no permite hacer análisis estadísticos, estos son congruentes con los obtenidos con la

inhibición de catepsina B, y apoyan fuertemente la participación de catepsina B en el daño hepático en NPC.

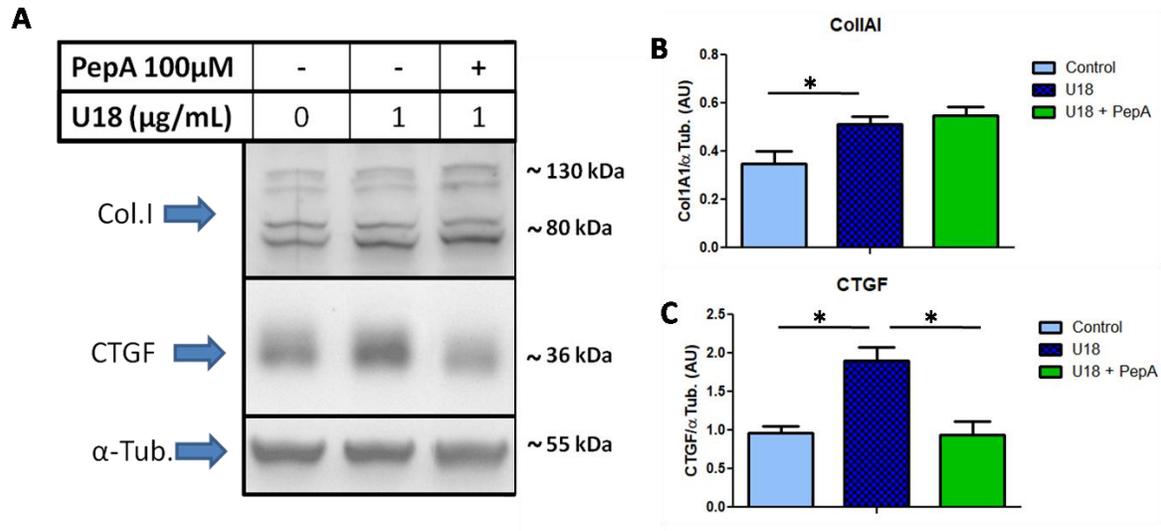


**Figura 13: El aumento en los niveles de catepsina B aumenta la fibrosis.**

(A) Westernblot contra las proteínas CTGF, colágeno 1A1, catepsina B y GAPDH de extractos proteicos realizados a partir de células Hepa1-6 transfectadas con un plásmido que contiene una catepsina B recombinante. Las cuantificaciones son en unidades arbitrarias (AU) para estimar los niveles de colágeno 1A1 (B), catepsina B (C) y CTGF (D) utilizando como control de carga a la proteína GAPDH. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE (n = 2).

### 7.3.3 La inhibición de la actividad de la catepsina D reduce el fenotipo pro-fibrótico en modelos *in vitro* NPC

Al modular la actividad de la otra proteasa en estudio, catepsina D, con pepstatina A, se observó un aumento en el colágeno IA y en el factor CTGF cuando las células Hepa 1-6 fueron tratadas con la droga U18 (Fig. 14). Para evaluar si el aumento en la catepsina D podría modular el fenotipo pro-fibrótico en modelos NPC *in vitro*, se utilizó el inhibidor de catepsina D, pepstatina A (Pourahmad et al., 2001). Interesantemente, se observó que pepstatina A fue capaz de prevenir el aumento de colágeno IA y CTGF en presencia de U18 (Fig. 14).

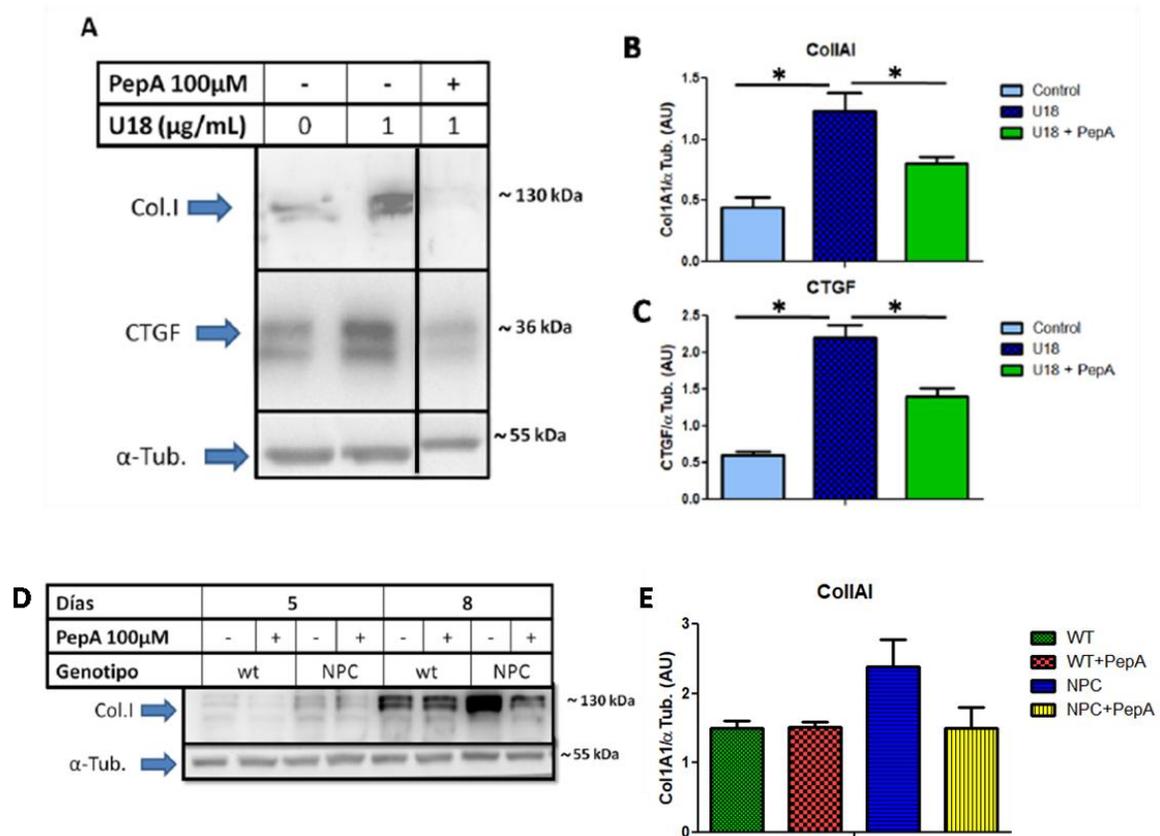


**Figura 14: La inhibición de la actividad de catepsina D disminuye el fenotipo pro-fibrótico en un modelo farmacológico NPC hepático.**

(A) Westernblot contra las proteínas colágeno 1A1, CTGF y  $\alpha$ -tubulina de extractos proteicos realizados a partir de células Hepa1-6 tratadas con dosis crecientes de U18 durante 24 h, que en ciertos casos fueron previamente tratadas con pepstatina A 100  $\mu$ M 2 h antes del tratamiento con U18 según corresponde. Las cuantificaciones son en unidades arbitrarias (AU) para estimar los niveles de Col1A1 (B) y CTGF (C) en Hepa1-6 utilizando como control de carga a la proteína  $\alpha$ -tubulina. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE (n = 3). Se realizó test estadístico de ANOVA de una vía, los asteriscos (\*) representan diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05).

Posterior a ello, se procedió a evaluar este fenómeno en un cultivo primario de células estrelladas hepáticas, un tipo celular fuertemente asociado a la fibrosis hepática (Teratani, Tomita et al. 2012). Entonces, se siguió el fenotipo pro-fibrótico por medio de la expresión de colágeno 1A1 y CTGF en los cultivos primarios tratados con U18. Fue posible apreciar un aumento en ambos marcadores pro-fibróticos de manera dosis dependiente de U18 (Fig. 15 A-C). Interesantemente, el tratamiento con pepstatina A previno el aumento de colágeno 1A1 y CTGF inducido por U18 (Fig. 15 A-C). Del mismo modo, cuando se evaluó el fenómeno en cultivos primarios de células estrelladas de ratones NPC, se pudo observar que las células estrelladas NPC se activan de manera autónoma al estar cultivadas *ex-vivo*, ya sea después de 5 u 8 días, incrementándose los niveles de colágeno IA respecto a las células estrelladas WT (Fig. 15 D). Además, cuando las HSC NPC fueron pre-tratadas con pepstatina A se pudo observar una reducción en los niveles de colágeno 1A1 respecto a las HSC WT (Fig. 15 D). Es importante recalcar que la pepstatina A, además de inhibir la

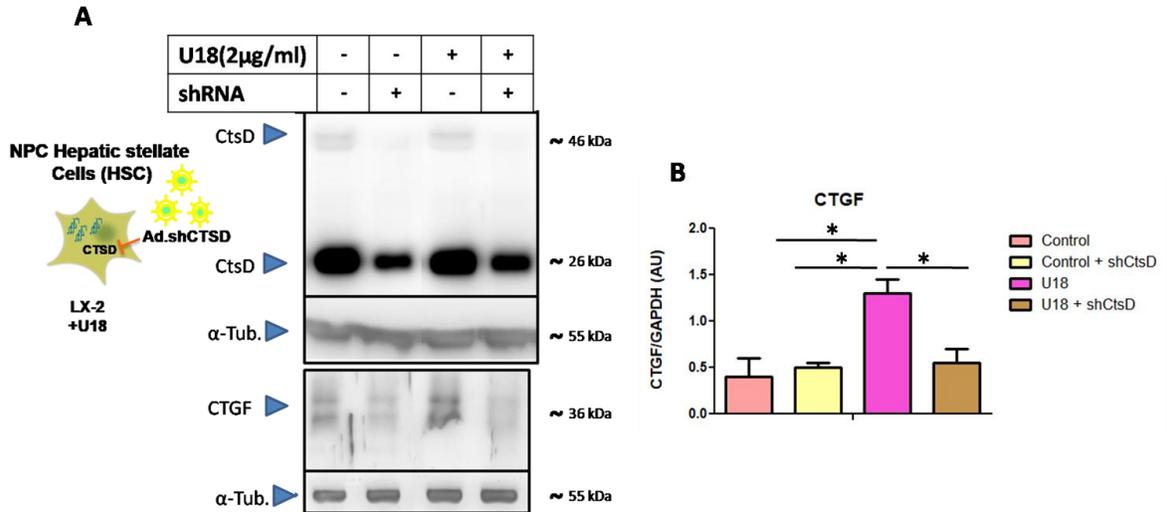
actividad de la catepsina D, inhibe a otras proteasas. Por esta razón, se procedió a utilizar un adenovirus que contiene un shRNA contra catepsina D en células LX2 y posterior a ello se agregó U18 para generar el fenotipo NPC. Interesantemente, las células infectadas con el adenovirus que contenía el shRNA contra catepsina D presentaron una disminución en los niveles de la proteína pro-fibrótica CTGF (Fig. 16), lo cual corrobora el resultado observado previamente.



**Figura 15: La inhibición de la actividad de catepsina D disminuye el fenotipo pro-fibrótico en modelos farmacológico y genético NPC de células estrelladas hepáticas.**

(A) Westernblot contralás proteínas colágeno 1A1, CTGF y  $\alpha$ -tubulina de extractos proteicos realizados a partir de células estrelladas hepáticas LX2 tratadas con dosis crecientes de U18 durante 24 h, que en algunos casos fueron previamente tratadas con pepstatina A 100  $\mu$ M 2 h antes del tratamiento con U18 según corresponde. Esta imagen fue obtenida desde el mismo gel, de carriles no contiguos. Las cuantificaciones son en unidades arbitrarias (AU) para estimar los niveles de Col1A1 (B) y CTGF (C) en LX-2 utilizando como control de carga a la proteína  $\alpha$ -tubulina. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE (n = 3). Se realizó test estadístico de ANOVA de una vía, los asteriscos (\*) representan diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05). (D) Westernblot contra colágeno 1A1 y  $\alpha$ -tubulina de extractos proteicos realizados a partir de cultivos primarios de células estrelladas hepáticas NPC y WT con 5 u 8 días de activación, las cuales fueron previamente tratadas con pepstatina A 100  $\mu$ M 24 h antes de ser cosechadas. Las cuantificaciones

son en unidades arbitrarias (AU) para estimar los niveles de Col1A1 (E) utilizando como control de carga a la proteína  $\alpha$ -tubulina. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE (n = 2).



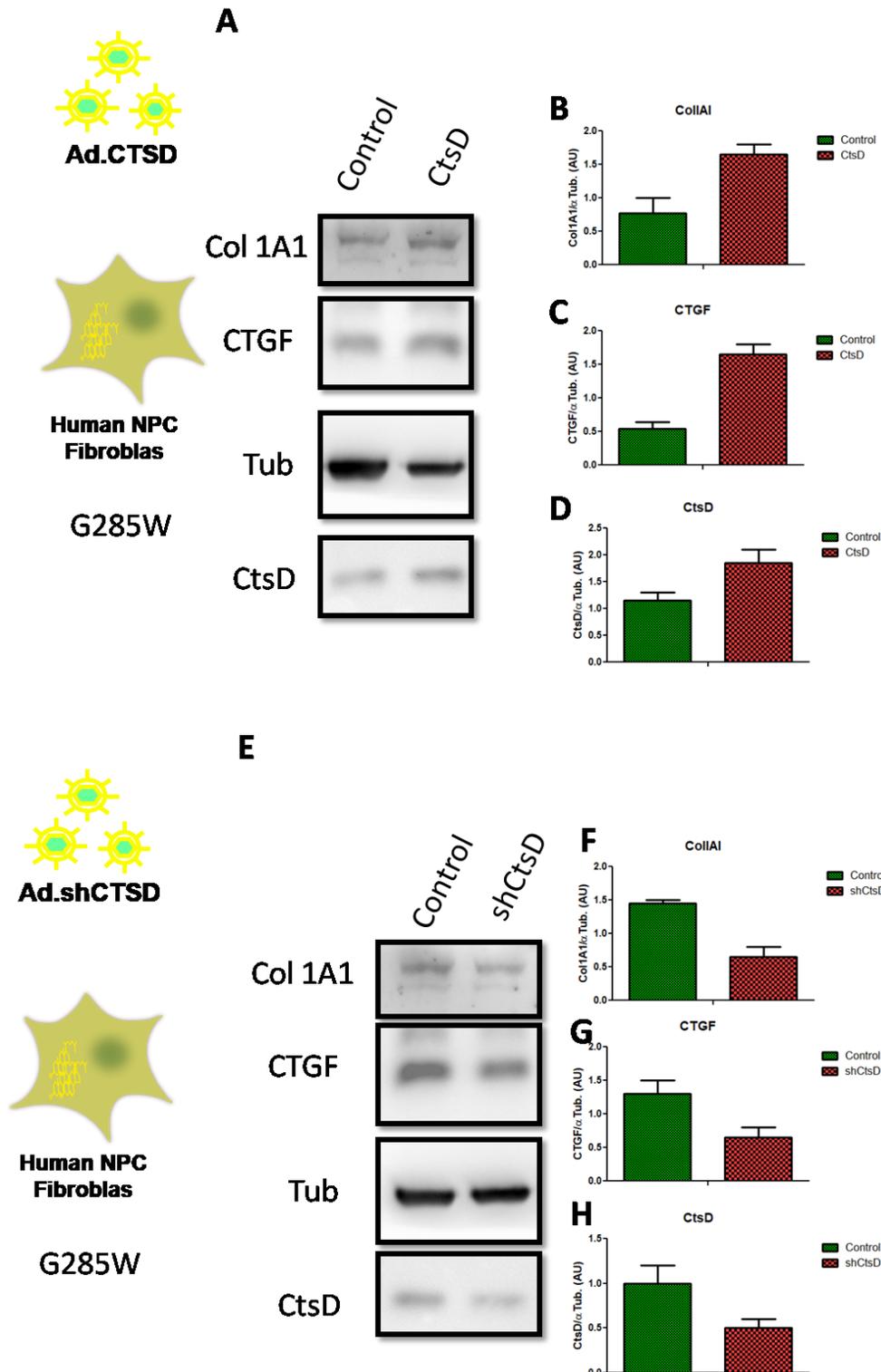
**Figura 16: La reducción en los niveles proteicos de catepsina D disminuye el factor pro-fibrótico CTGF en un modelo celular hepático NPC farmacológico.**

(A) Westernblot contral las proteínas CTGF, Catepsina D y  $\alpha$ -tubulina de extractos proteicos realizados a partir de células LX2 tratadas con U18 (1 $\mu$ g/mL) durante 24 h, las cuales fueron previamente infectadas con un adenovirus que contenía un shRNA contra catepsina D según corresponde. Las cuantificaciones son en unidades arbitrarias (AU) para estimar los niveles de CTGF (B) en LX-2 utilizando como control de carga a la proteína  $\alpha$ -tubulina. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE (n = 3). Se realizó test estadístico de ANOVA de una vía, los asteriscos (\*) representan diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05).

### 7.3.4 La sobreexpresión de la catepsina D aumenta los marcadores pro-fibróticos en modelos *in vitro* NPC.

Para corroborar el efecto pro-fibrótico de catepsina D se sobre-expresó la proteína con un adenovirus recombinante que contenía el cDNA de catepsina D en fibroblastos humanos NPC. Si bien se realizó el experimento 2 veces, se observó que el aumento de los niveles proteicos de catepsina D produjo un aumento en los niveles de colágeno y CTGF (Fig. 17 A-D) eran concordantes a los resultados obtenidos anteriormente. De forma inversa, la infección de los fibroblastos NPC con un adenovirus que contenía un shRNA contra

catepsina D, generó la disminución de la catepsina D, así como también de colágeno 1A1 y CTFG (Fig. 17 E-H).



**Figura 17: La modulación de los niveles de catepsina D influye en el fenotipo profibrótico en fibroblastos NPC humanos.**

(A) Westernblot contral las proteínas CTGF, colágeno 1A1, catepsina D y  $\alpha$ -tubulina de extractos proteicos realizados a partir de fibroblastos humanos NPC infectados con un adenovirus que contiene una catepsina B recombinante o adenovirus control (E1delta), según corresponde. Las

cuantificaciones son en unidades arbitrarias (AU) para estimar los niveles de Col1A1 (B), CTGF (C) y catepsina D (D) en fibroblastos utilizando como control de carga a la proteína  $\alpha$ -tubulina. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE (n =2). (E) Westernblot contra las proteínas CTGF, colágeno 1A1, catepsina D y  $\alpha$ -tubulina de extractos proteicos realizados a partir de fibroblastos humanos NPC infectados con un adenovirus que contiene un shRNA contra catepsina D o adenovirus control (E1delta) según corresponde. Las cuantificaciones son en unidades arbitrarias (AU) para estimar los niveles de Col1A1 (F), CTGF (G) y catepsina D (H) en fibroblastos utilizando como control de carga a la proteína  $\alpha$ -tubulina. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE (n =2).

## 6. DISCUSIÓN Y RESULTADOS PRELIMINARES

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran la participación de las catepsinas B y D en la fibrosis hepática de la enfermedad de NPC.

### 6.1 Catepsinas y la disfunción lisosomal en NPC.

Dentro de los resultados obtenidos en esta tesis se encuentra el perfil diferencial de genes expresados en hígados de ratones NPC obtenido por la técnica de RNAseq. Mediante análisis de ontología se encontró que los ARNm estaban relacionados con procesos inflamatorios, fibróticos, de daño tisular y lisosomales (Fig. 4). Entre los genes relacionados con procesos lisosomales, destacan las catepsinas B y D. Estas enzimas lisosomales están involucradas en los procesos fisiológicos de degradación y reciclaje de proteínas (Stoka, Turk et al. 2016). Estos aumentos en la expresión de los genes de catepsinas B y D se corroboraron con la medición de expresión proteica en diversos modelos celulares. De acuerdo a nuestros resultados y a lo descrito en la literatura, el aumento de estas proteasas tiene un efecto negativo en la progresión de la enfermedad.

Se ha reportado que las catepsinas B y D están involucradas en procesos patogénicos como la apoptosis celular y la fibrosis (Escisión de Bid y maduración de TGF $\beta$  respectivamente) (Canbay, Guicciardi et al. 2003, Moles, Tarrats et al. 2009, Turk and Turk 2009, de Castro, Bunt et al. 2016). Ambos procesos se encuentran aumentados en la enfermedad hepática NPC, además de contribuir al daño y disfunción hepática de las personas afectadas por esta mortal enfermedad (Vanier 2013).

La inhibición farmacológica de la actividad de estas proteasas disminuyó el fenotipo pro-fibrótico en modelos celulares *in vitro* de hepatocitos o células estrelladas hepáticas. Si bien este mecanismo no está actualmente del todo dilucidado, se propone que podría ser mediante la maduración de factores pro-fibróticos, como lo que ocurre en otros modelos de fibrosis. Así por ejemplo, la catepsina D contribuye a la maduración de TGF $\beta$  (Kasabova, Joulin-Giet et al. 2014), con la consecuente activación de la cascada de señalización río abajo que culmina en un aumento en la expresión de elementos de matriz extracelular.

## **6.2 Inhibición de catepsinas B y D en la enfermedad de Niemann Pick tipo C**

La enfermedad de NPC es una enfermedad que a la fecha no tiene cura, y se ha tratado de enfrentar esta patología de distintas maneras, ya sea abordando la inflamación, utilizando quelantes del colesterol, como la ciclodextrina, o con antioxidantes (Marin, Contreras et al. 2014, Tamura and Yui 2015).

La disminución de la actividad de catepsina D, utilizando Pepstatina A disminuyó el fenotipo pro-fibrótico. Es importante mencionar que si bien la Pepstatina A es un buen inhibidor de catepsina D, también puede inhibir otras proteasas lisosomales (Arodola and Soliman 2018). Por esta razón, corroboramos estos resultados por medio de la utilización de shRNA contra catepsina D, obteniendo los mismos resultados. Por su parte, la inhibición de catepsina B, utilizando CA-074, redujo el fenotipo pro-fibrótico. Corroborando la función biológica de las catepsinas B y D en un contexto NPC, los experimentos de sobreexpresión de estas generaron aumento en los marcadores pro-fibróticos.

Un punto relevante a mencionar es que en la enfermedad neurodegenerativa NPC se encuentran aumentadas las catepsinas. De esta manera, en experimentos donde se ha sobre-expresado la cistatina B, un inhibidor biológico de la catepsina B o la inhibición farmacológica de esta proteasa, se observa una mejoría en la función neuronal en modelos NPC (Chung, Puthanveetil et al. 2016). Por lo tanto, la utilización de inhibidores de las catepsinas B y D podrían tener utilidad ya sea en el hígado como el cerebro. Sin embargo, es necesario mejorar el paso por la barrera hematoencefálica de la Pepstatina A o el CA-074 (Towatari, Nikawa et al. 1991) o bien desarrollar otros inhibidores con mejor penetrancia en el cerebro.

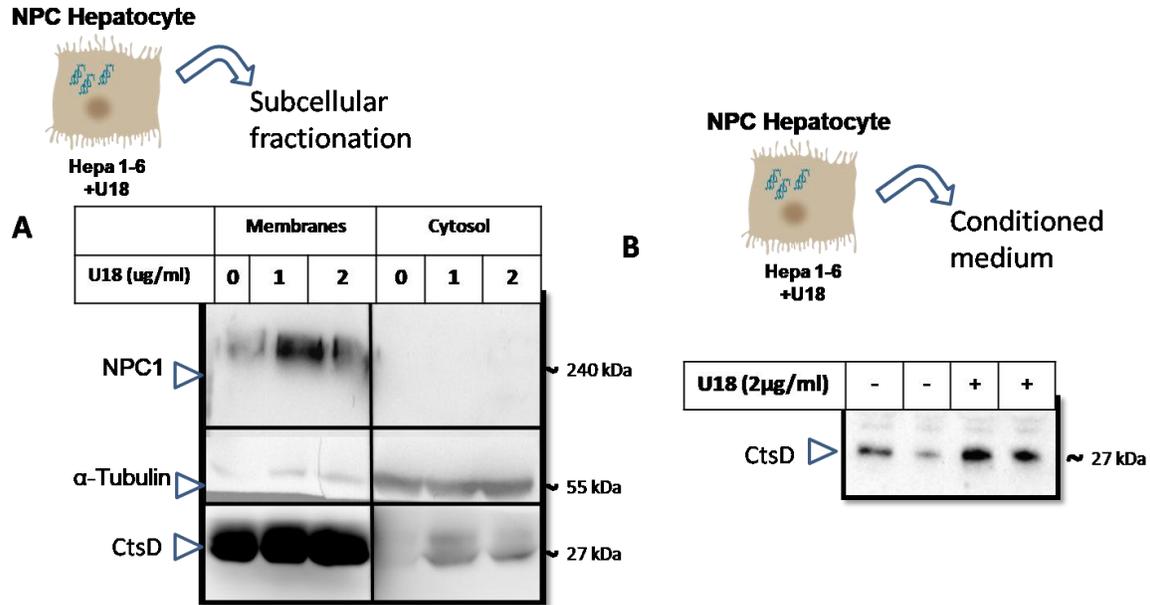
Los resultados obtenidos en esta tesis apoyan la idea de la utilización de inhibidores de las catepsinas B y D como potencial aproximación terapéutica para esta enfermedad, debido que reducen el proceso fibrótico hepático característico en esta enfermedad.

### 6.3 Localización de las catepsinas B y D

Un punto importante por evaluar es la localización de estas proteasas. Se ha descrito que las catepsinas pueden cambiar su localización, incluso saliendo del lisosoma al citoplasma, en variados procesos fisiológicos o patológicos. De esta manera, estas proteasas pueden mantener su actividad proteolítica, siendo capaces de poder escindir variados sustratos, entre los que destaca bcl-2, una proteína efectora de la apoptosis (Roberts, Adjei et al. 1999, Guicciardi, Deussing et al. 2000, Droga-Mazovec, Bojic et al. 2008). Resultados preliminares obtenidos durante esta tesis ha logrado encontrar mediante fraccionamiento subcelular, un aumento de catepsina D en la fracción citoplasmática de un modelo celular *in vitro* de un modelo farmacológico de hepatocitos NPC, lo cual a la fecha no había sido reportado (Fig. 18A). Este fenómeno ha sido reportado en la enfermedad de Niemann pick tipo B (Taniguchi, Ogiso et al. 2015), que comparte muchas similitudes con la enfermedad de NPC, ya que en ambas enfermedades los lisosomas acumulan lípidos, y consecuentemente se genera el daño tisular (Vanier 2013).

Debido a las grandes limitaciones experimentales del fraccionamiento subcelular (Suzuki, Bose et al. 2010, Baghirova, Hughes et al. 2015) sumado a el gran tamaño de los lisosomas en la enfermedad de NPC, que los hace más fáciles de romper (Torres, Balboa et al. 2017), es necesaria la complementación con otras herramientas para corroborar este resultado, como la utilización de un plásmido con catepsina D-pHluorin, el cual cambia de color según el pH donde se encuentre. Si este se fuga al citoplasma tendrá un color verde (Sankaranarayanan, De Angelis et al. 2000).

Un punto relevante a considerar es la secreción de las catepsinas, nosotros pudimos encontrar en experimentos preliminares un aumento de catepsina D en el medio extracelular (Fig. 18B). Este cambio de localización puede incrementar la fibrosis en los tejidos, de manera fisiológica se encuentran proteínas asociadas a la matriz extracelular, al generar un daño, el cual puede estar incrementado por la presencia de proteasas, como catepsinas B y D, estas proteínas salen de la matriz y activan las células estrelladas hepáticas, favoreciendo los procesos fibróticos (Munsterman, Kendall et al. 2018).



**Figura 18: Aumento en los niveles proteicos de catepsina D citoplasmática y su liberación extracelular en un modelo hepático farmacológico NPC.**

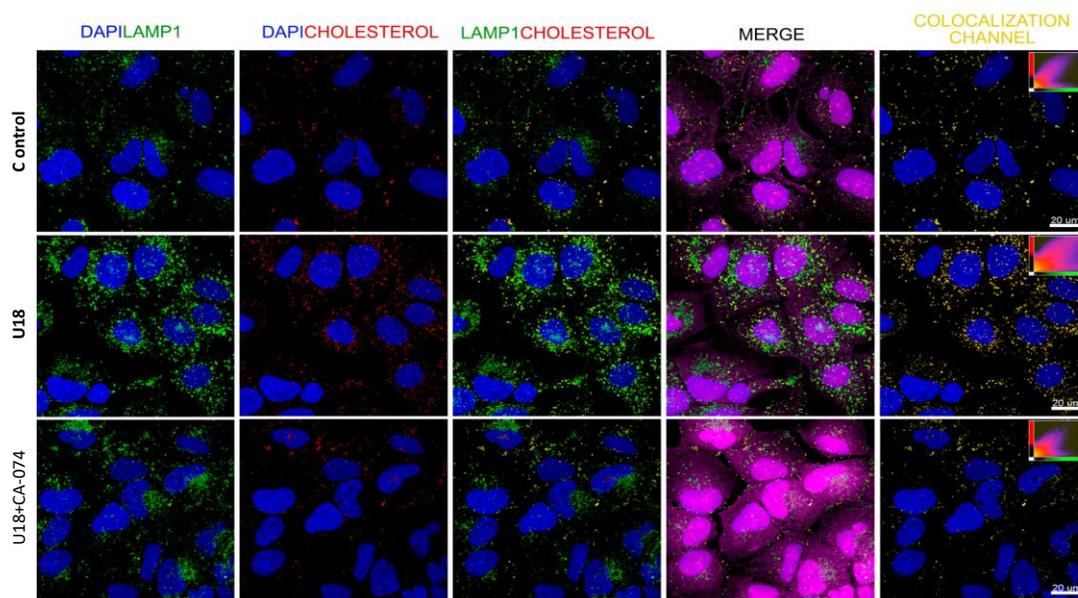
(A) Westernblot contral as proteínas catepsina D, NPC1 (como marcador lisosomal) y  $\alpha$ -tubulina (como marcador citoplasmático) de extractos proteicos realizados a partir de fracciones citoplasmáticas o enriquecidas en membranas de células Hepa1-6 tratadas con diferentes dosis de U18 durante 24 h. (B) Westernblot contra catepsina D y  $\alpha$ -tubulina de medios condicionados de células Hepa1-6 tratadas con U18 durante 24 h. Estos experimentos han sido realizados 2 veces obteniéndose resultados similares.

#### 6.4 Catepsinas B y D en el metabolismo de los lípidos

Un punto interesante a evaluar es si la disminución de la fibrosis vista en los modelos NPC cuando fueron tratadas con los inhibidores de la actividad de las catepsinas B y D, es causa directa, ya sea por lo mencionado anteriormente, de que procesan y maduran sustratos claves en la fibrosis. O ayudan a disminuir factores primarios en esta enfermedad, como lo la acumulación de colesterol. Interesantemente se ha reportado que la utilización de Pepstatina A en un modelo de ratón con esteatosis hepática. Donde la adición de la droga Pepstatina A reduce la acumulación lipídica en este modelo (Houben, Oligschlaeger et al. 2017). Nuestro grupo evaluando esta posible vía, trató un modelo celular hepático NPC con la droga CA074, un inhibidor específico de catepsina B, encontrando una disminución en la acumulación de colesterol (Fig. 19). Este hallazgo es de

gran importancia, ya que abre la puerta a la evaluación de diversas vías aun no dilucidadas que conecten el metabolismo del colesterol con las catepsinas, además del potencial terapéutico en otras enfermedades. Es por ello que resulta interesante poder evaluar:

- Evaluar genes del metabolismo del colesterol o de eflujo lisosomal en modelos celulares sometidos al inhibidor de catepsina B, para evaluar cual es el mecanismo por la cual esta droga disminuye la acumulación de colesterol en modelos celulares hepáticos NPC.
- Evaluar niveles de colesterol en animales NPC sometidos a los inhibidores de catepsina B y D.
- Evaluar si la inhibición de catepsinas B y D pueden servir para otras enfermedades hepáticas con mas prevalencia, como lo es el hígado graso no alcohólico, donde está presente la fibrosis y la acumulación lipídica.



**Figura 19: La inhibición de la actividad de catepsina B disminuye el número de lisosomas y la acumulación de colesterol en un modelo celular hepático farmacológico NPC.**

Inmunofluorescencia en células Hepa1-6 tratadas con U18 (1μg/mL) durante 24 h, las cuales en un caso fueron previamente tratadas con CA-074 2 h antes del tratamiento con U18. Se observa lamp1 en verde (488nm), colesterol (PFO) en rojo (594nm), Cell-Mask como marcador de membranas celulares (647nm) y DAPI en azul (360 nm) para ver núcleos. Estos experimentos han sido realizados 2 veces obteniéndose resultados similares.

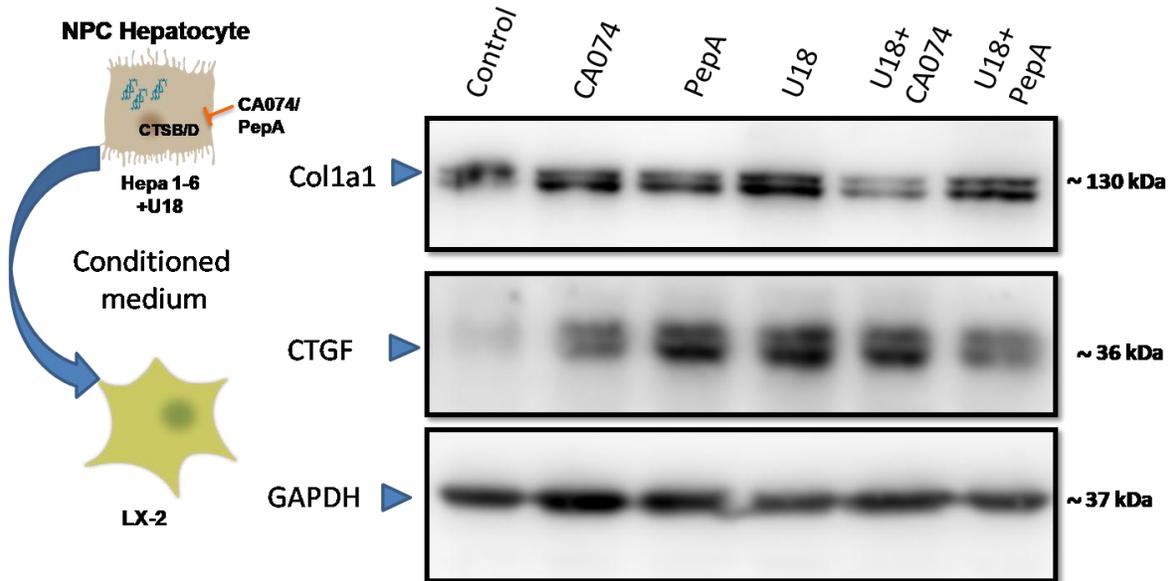
## **6.5 Blancos de las catepsinas B y D**

Dado los resultados obtenidos en esta tesis, nos interesa poder dilucidar cuales son los posibles blancos de estas catepsinas B y D en un contexto NPC. Hasta la fecha no se han descrito blancos de escisión de estas proteasas que puedan regular el metabolismo del colesterol y el proceso de fibrosis. Además, como estas catepsinas pueden cambiar su localización del lisosoma al citoplasma e incluso al medio extracelular (Zhao and Herrington 2016, Repnik, Borg Distefano et al. 2017), tienen muchas potenciales proteínas efectoras de la regulación de la fibrosis o metabolismo de los lípidos. Es por ello que en colaboración con el Dr. Dominic Winter (Universidad de Bonn, Alemania), se mandó a analizar por el método de espectrometría de masa, el perfil proteico de modelos celulares NPC tratados con inhibidores de las catepsinas B y D, de manera de poder tener una aproximación de cuáles serían los posibles blancos de las catepsinas B y D en un contexto NPC.

## **6.6 Comunicación hepatocitos células estrelladas**

En el hígado la comunicación celular es un proceso importante en procesos de daño y regeneración. Los hepatocitos pueden liberar sustancias que pueden activar las células estrelladas hepáticas vecinas, activándolas. Si este proceso se vuelve crónico se comienza a desarrollar la fibrosis hepática. Por estas razones, se evaluó la comunicación entre hepatocitos y células estrelladas hepáticas NPC. Para ello, se trató una línea celular de hepatocitos Hepa 1-6 con U18, además de CA-074 o pepstatina A para inhibir la actividad de las catepsinas B y D respectivamente y el medio condicionado obtenido, se utilizó para tratar la línea celular de HSC hepáticas LX2. Interesantemente, la inhibición de la catepsina B en hepatocitos co-tratados con U18 y CA-074 disminuyó el potencial pro-fibrótico en la línea de células estrelladas LX-2, representado a través de una disminución en los niveles de colágeno 1A1 (Fig. 20). En cambio, al inhibir la catepsina D con pepstatina A en co-tratamiento con U18, se observó una disminución del factor pro-fibrótico CTGF (Fig. 20). Estos resultados sugieren que existe comunicación celular entre hepatocitos y células

estrelladas en la que podría participar las mismas catepsinas secretadas al medio. Por estas razones a continuación se evaluó localización de estas catepsinas en células NPC y en el medio extracelular de células NPC.



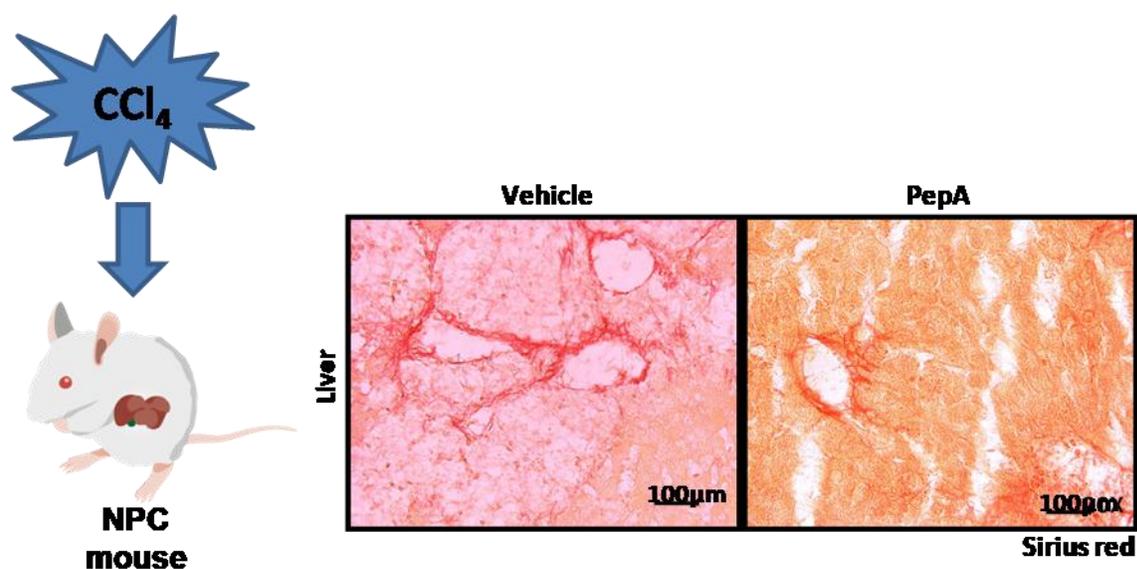
**Figura 20: El tratamiento de células estrelladas con medios condicionados de hepatocitos tratados con U18 y con inhibidores de catepsinas B y D reduce el potencial pro-fibrótico.**

(A-B) Westernblot contra CTGF, colágeno 1A1 y GAPDH de extractos proteicos realizados a partir de células LX-2 tratadas con medios condicionados de células Hepa1-6 tratadas con U18 (1 µg/mL) durante 24 h, las cuales fueron previamente tratadas con pepstatina A (100 µM) o CA-074 (50µM) 2 h antes del tratamiento con U18. Estos experimentos han sido realizados 2 veces obteniéndose resultados similares.

### 6.7 Resumen de resultados obtenidos

Los principales hallazgos encontrados en esta tesis son: i) la fibrosis se encuentra aumentada en modelos *in vitro* hepáticos NPC además de hígados de ratones NPC ii) Las catepsinas B y D se encuentran aumentadas en varios modelos hepáticos Niemann-Pick C, incluyendo modelos farmacológicos y genéticos de hepatocitos y células estrelladas y el hígado de ratones y iii) La inhibición de la actividad y/o disminución de los niveles de las catepsinas B o D disminuyen la fibrosis hepática en la enfermedad de NPC.

Finalmente, se evaluó de manera exploratoria la inhibición de la catepsina D in vivo, y en un contexto de daño hepático incrementado mediante la inyección de tetracloruro de carbono (Moles, Tarrats et al. 2012), los que además fueron tratados con una co-inyección con pepstatina A durante 4 semanas. Interesantemente, se observó una disminución en la fibrosis, evaluada por la acumulación de colágeno mediante rojo sirio en animales donde la actividad de la catepsina D había sido disminuida (Fig. 21).



**Figura 21: Los ratones NPC tratados con el inhibidor de catepsina D presentan disminución en la fibrosis hepática.**

Rojo sirio de hígados de animales NPC tratados con tetracloruro de carbono y co-inyección de peptatina A durante 4 semanas, 2 veces por semana. Las barras de escala son de 100  $\mu\text{m}$ . n=2.

## 7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran la participación de las catepsinas B y D en la enfermedad hepática en modelos *in vitro* e *in vivo* NPC (Fig. 22). En específico los resultados demuestran que:

1. Hay un aumento en los niveles proteicos de catepsina B y D en modelos hepáticos celulares y murinos NPC.
2. La inhibición de la actividad de la catepsina B por la droga CA-074 disminuye el fenotipo pro-fibrótico en los modelos celulares de hepatocitos y células estrelladas hepáticas NPC.
3. La inhibición de la actividad y niveles de catepsina D por la droga Pepstatina A disminuye el fenotipo pro-fibrótico en los modelos celulares de hepatocitos y células estrelladas hepáticas NPC.

Los resultados obtenidos podrían ser relevantes para considerar un tratamiento terapéutico de la enfermedad hepática de NPC con inhibidores de catepsinas B y D.

Sugerimos finalmente, la búsqueda de nuevas moléculas y mejoramiento de las terapias propuestas existentes o posible combinación de estas para así mejorar la calidad de vida de las personas afectadas por esta devastadora enfermedad.

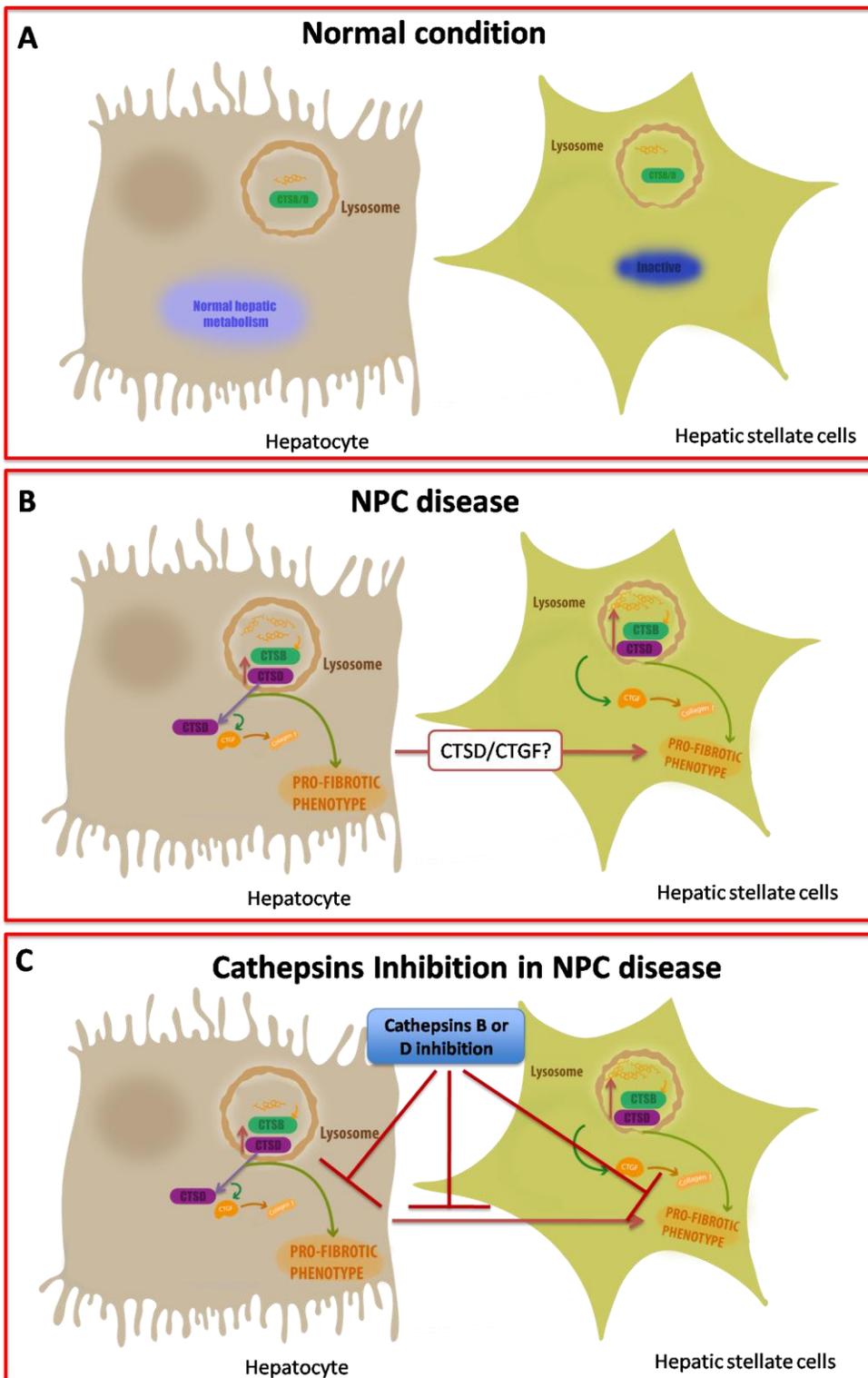


Figura 22: Representación esquemática del efecto de la inhibición de las catepsinas B y D en la enfermedad de NPC.

## 8. TRABAJO POR DESARROLLAR

En cuanto al trabajo futuro hay distintos aspectos que faltan por estudiar y que serían interesantes de analizar, como por ejemplo:

- Reconstruir posibles interacciones en la expresión génica con los datos obtenidos desde la técnica RNAseq.
- Inhibir la actividad y/o disminuir los niveles de catepsinas B y D en hepatocitos primarios NPC.
- Generar modelos genéticos con la ablación de las catepsinas B o D, ya sea con la utilización de la técnica CRISPR-CAS9 para evaluar la completa eliminación de estas proteínas y así someter estos modelos a modelos farmacológicos NPC, y así evaluar el fenotipo obtenido.
- Utilizar anticuerpos bloqueantes o someter los medios condicionados a separación por tamaño, para evaluar si el efecto anti-fibrótico observado en las células estrelladas hepáticas con la utilización de CA-074 o Pepstatina A en hepatocitos, esta otorgado por las mismas catepsinas liberadas al medio o por otras proteínas o moléculas señalizadoras.
- Evaluar la apoptosis celular al modular las catepsinas B y D en hepatocitos primarios, ya sean modelos genéticos o modelos farmacológicos NPC.
- Analizar los datos y reconstruir las interacciones proteicas obtenidas a partir de la técnica de espectrometría de masa de hepatocitos NPC.
- Analizar los posibles blancos de las catepsinas B y D a partir de los datos obtenidos por espectrometría de masa de hepatocitos NPC tratados con inhibidores de catepsinas B y D.

## 9. REFERENCIAS

- Alam, M. S., M. Getz, S. Yi, J. Kurkewich, I. Safeukui and K. Haldar (2014). "Plasma signature of neurological disease in the monogenetic disorder Niemann-Pick Type C." J Biol Chem **289**(12): 8051-8066.
- Almeida, P. C., I. L. Nantes, J. R. Chagas, C. C. Rizzi, A. Faljoni-Alario, E. Carmona, L. Juliano, H. B. Nader and I. L. Tersariol (2001). "Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation." J Biol Chem **276**(2): 944-951.
- Amritraj, A., K. Peake, A. Kodam, C. Salio, A. Merighi, J. E. Vance and S. Kar (2009). "Increased activity and altered subcellular distribution of lysosomal enzymes determine neuronal vulnerability in Niemann-Pick type C1-deficient mice." Am J Pathol **175**(6): 2540-2556.
- Amritraj, A., Y. Wang, T. J. Revett, D. Vergote, D. Westaway and S. Kar (2013). "Role of cathepsin D in U18666A-induced neuronal cell death: potential implication in Niemann-Pick type C disease pathogenesis." J Biol Chem **288**(5): 3136-3152.
- Appelqvist, H., A. C. Johansson, E. Linderöth, U. Johansson, B. Antonsson, R. Steinfeld, K. Kagedal and K. Ollinger (2012). "Lysosome-mediated apoptosis is associated with cathepsin D-specific processing of bid at Phe24, Trp48, and Phe183." Ann Clin Lab Sci **42**(3): 231-242.
- Arodola, O. A. and M. E. Soliman (2018). "Hybrid 2D/3D-quantitative structure-activity relationship and modeling studies perspectives of pepstatin A analogs as cathepsin D inhibitors." Future Med Chem **10**(1): 5-26.
- Baghirova, S., B. G. Hughes, M. J. Hendzel and R. Schulz (2015). "Sequential fractionation and isolation of subcellular proteins from tissue or cultured cells." MethodsX **2**: 440-445.
- Beckman, M., C. Freeman, C. R. Parish and D. H. Small (2009). "Activation of cathepsin D by glycosaminoglycans." FEBS J **276**(24): 7343-7352.
- Beltroy, E. P., B. Liu, J. M. Dietschy and S. D. Turley (2007). "Lysosomal unesterified cholesterol content correlates with liver cell death in murine Niemann-Pick type C disease." J Lipid Res **48**(4): 869-881.
- Brady, R. O., J. N. Kanfer, M. B. Mock and D. S. Fredrickson (1966). "The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease." Proc Natl Acad Sci U S A **55**(2): 366-369.
- Canbay, A., M. E. Guicciardi, H. Higuchi, A. Feldstein, S. F. Bronk, R. Rydzewski, M. Taniai and G. J. Gores (2003). "Cathepsin B inactivation attenuates hepatic injury and fibrosis during cholestasis." J Clin Invest **112**(2): 152-159.
- Carstea, E. D., 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, 3rd, K. Ohno, M. Zeigler, R. Carmi, J. Sokol, D. Markie, R. R. O'Neill, O. P. van Diggelen, M. Elleder, M. C. Patterson, R. O. Brady, M. T. Vanier, P. G. Pentchev and D. A. Tagle (1997). "Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis." Science **277**(5323): 228-231.

Cirman, T., K. Oresic, G. D. Mazovec, V. Turk, J. C. Reed, R. M. Myers, G. S. Salvesen and B. Turk (2004). "Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins." J Biol Chem **279**(5): 3578-3587.

Cluzeau, C. V., D. E. Watkins-Chow, R. Fu, B. Borate, N. Yanjanin, M. K. Dail, C. D. Davidson, S. U. Walkley, D. S. Ory, C. A. Wassif, W. J. Pavan and F. D. Porter (2012). "Microarray expression analysis and identification of serum biomarkers for Niemann-Pick disease, type C1." Hum Mol Genet **21**(16): 3632-3646.

Copetti-Santos, D., V. Moraes, D. F. Weiler, A. S. de Mello, S. Machado Fde, J. P. Marinho, C. Siebert, J. Kolling, C. Funchal, A. T. Wyse and J. C. Coelho (2015). "U18666A Treatment Results in Cholesterol Accumulation, Reduced Na(+), K(+)-ATPase Activity, and Increased Oxidative Stress in Rat Cortical Astrocytes." Lipids **50**(10): 937-944.

Chen, Y., X. Li, K. M. Boini, A. L. Pitzer, E. Gulbins, Y. Zhang and P. L. Li (2015). "Endothelial Nlrp3 inflammasome activation associated with lysosomal destabilization during coronary arteritis." Biochim Biophys Acta **1853**(2): 396-408.

Chung, C., P. Puthanveetil, D. S. Ory and A. P. Lieberman (2016). "Genetic and pharmacological evidence implicates cathepsins in Niemann-Pick C cerebellar degeneration." Hum Mol Genet **25**(7): 1434-1446.

da Silva, V., F. Vassella, A. Bischoff, M. Spycher, U. N. Wiesmann and N. Herschkowitz (1975). "Niemann-Pick's disease. Clinical, biochemical and ultrastructural findings in a case of the infantile form." J Neurol **211**(1): 61-68.

Dai, S., A. E. Dulcey, X. Hu, C. A. Wassif, F. D. Porter, C. P. Austin, D. S. Ory, J. Marugan and W. Zheng (2017). "Methyl-beta-cyclodextrin restores impaired autophagy flux in Niemann-Pick C1-deficient cells through activation of AMPK." Autophagy **13**(8): 1435-1451.

de Castro, M. A., G. Bunt and F. S. Wouters (2016). "Cathepsin B launches an apoptotic exit effort upon cell death-associated disruption of lysosomes." Cell Death Discov **2**: 16012.

de Oliveira da Silva, B., L. F. Ramos and K. C. M. Moraes (2017). "Molecular interplays in hepatic stellate cells: apoptosis, senescence, and phenotype reversion as cellular connections that modulate liver fibrosis." Cell Biol Int **41**(9): 946-959.

Dominguez-Perez, M., N. Nuno-Lambarri, D. Clavijo-Cornejo, A. Luna-Lopez, V. Souza, L. Bucio, R. U. Miranda, L. Munoz, L. E. Gomez-Quiroz, S. Uribe-Carvajal and M. C. Gutierrez-Ruiz (2016). "Hepatocyte Growth Factor Reduces Free Cholesterol-Mediated Lipotoxicity in Primary Hepatocytes by Countering Oxidative Stress." Oxid Med Cell Longev **2016**: 7960386.

Droga-Mazovec, G., L. Bojic, A. Petelin, S. Ivanova, R. Romih, U. Repnik, G. S. Salvesen, V. Stoka, V. Turk and B. Turk (2008). "Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues." J Biol Chem **283**(27): 19140-19150.

Elrick, M. J. and A. P. Lieberman (2013). "Autophagic dysfunction in a lysosomal storage disorder due to impaired proteolysis." Autophagy **9**(2): 234-235.

Fan, M., R. Sidhu, H. Fujiwara, B. Tortelli, J. Zhang, C. Davidson, S. U. Walkley, J. H. Bagel, C. Vite, N. M. Yanjanin, F. D. Porter, J. E. Schaffer and D. S. Ory (2013). "Identification of

Niemann-Pick C1 disease biomarkers through sphingolipid profiling." *J Lipid Res* **54**(10): 2800-2814.

Feeney, E. J., C. Spampanato, R. Puertollano, A. Ballabio, G. Parenti and N. Raben (2013). "What else is in store for autophagy? Exocytosis of autolysosomes as a mechanism of TFEB-mediated cellular clearance in Pompe disease." *Autophagy* **9**(7): 1117-1118.

Feng, Y., L. Ni and Q. Wang (2013). "Administration of cathepsin B inhibitor CA-074Me reduces inflammation and apoptosis in polymyositis." *J Dermatol Sci* **72**(2): 158-167.

Fischbeck, A., K. Leucht, I. Frey-Wagner, S. Bentz, T. Pesch, S. Kellermeier, M. Krebs, M. Fried, G. Rogler, M. Hausmann and H. U. Humpf (2011). "Sphingomyelin induces cathepsin D-mediated apoptosis in intestinal epithelial cells and increases inflammation in DSS colitis." *Gut* **60**(1): 55-65.

Fullgrabe, J., D. J. Klionsky and B. Joseph (2013). "Histone post-translational modifications regulate autophagy flux and outcome." *Autophagy* **9**(10): 1621-1623.

Gabande-Rodriguez, E., P. Boya, V. Labrador, C. G. Dotti and M. D. Ledesma (2014). "High sphingomyelin levels induce lysosomal damage and autophagy dysfunction in Niemann Pick disease type A." *Cell Death Differ* **21**(6): 864-875.

Gopalakrishnan, M. M., H. W. Grosch, S. Locatelli-Hoops, N. Werth, E. Smolenova, M. Nettersheim, K. Sandhoff and A. Hasilik (2004). "Purified recombinant human prosaposin forms oligomers that bind procathepsin D and affect its autoactivation." *Biochem J* **383**(Pt. 3): 507-515.

Guicciardi, M. E., J. Deussing, H. Miyoshi, S. F. Bronk, P. A. Svingen, C. Peters, S. H. Kaufmann and G. J. Gores (2000). "Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c." *J Clin Invest* **106**(9): 1127-1137.

Hagberg, B., M. Haltia, P. Sourander, L. Svennerholm, M. T. Vanier and C. G. Ljunggren (1978). "Neurovisceral storage disorder simulating Niemann-Pick disease. A new form of oligosaccharidosis?" *Neuropadiatrie* **9**(1): 59-73.

Heinrich, M., M. Wickel, W. Schneider-Brachert, C. Sandberg, J. Gahr, R. Schwandner, T. Weber, P. Saftig, C. Peters, J. Brunner, M. Kronke and S. Schutze (1999). "Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide." *EMBO J* **18**(19): 5252-5263.

Hoffmann, B. and E. Mayatepek (2005). "Neurological manifestations in lysosomal storage disorders - from pathology to first therapeutic possibilities." *Neuropediatrics* **36**(5): 285-289.

Hook, G., J. S. Jacobsen, K. Grabstein, M. Kindy and V. Hook (2015). "Cathepsin B is a New Drug Target for Traumatic Brain Injury Therapeutics: Evidence for E64d as a Promising Lead Drug Candidate." *Front Neurol* **6**: 178.

Houben, T., Y. Oligschlaeger, T. Hendrikx, A. V. Bitorina, S. M. A. Walenbergh, P. J. van Gorp, M. J. J. Gijbels, S. Friedrichs, J. Plat, F. G. Schaap, D. Lutjohann, M. H. Hofker and R. Shiri-Sverdlov (2017). "Cathepsin D regulates lipid metabolism in murine steatohepatitis." *Sci Rep* **7**(1): 3494.

Ishidoh, K. and E. Kominami (2002). "Processing and activation of lysosomal proteinases." *Biol Chem* **383**(12): 1827-1831.

Jordans, S., S. Jenko-Kokalj, N. M. Kuhl, S. Tedelind, W. Sendt, D. Bromme, D. Turk and K. Brix (2009). "Monitoring compartment-specific substrate cleavage by cathepsins B, K, L, and S at physiological pH and redox conditions." *BMC Biochem* **10**: 23.

Joyce, J. A., A. Baruch, K. Chehade, N. Meyer-Morse, E. Giraud, F. Y. Tsai, D. C. Greenbaum, J. H. Hager, M. Bogyo and D. Hanahan (2004). "Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis." *Cancer Cell* **5**(5): 443-453.

Kasabova, M., A. Joulin-Giet, F. Lecaille, B. F. Gilmore, S. Marchand-Adam, A. Saidi and G. Lalmanach (2014). "Regulation of TGF-beta1-driven differentiation of human lung fibroblasts: emerging roles of cathepsin B and cystatin C." *J Biol Chem* **289**(23): 16239-16251.

Kelly, D. A., B. Portmann, A. P. Mowat, S. Sherlock and B. D. Lake (1993). "Niemann-Pick disease type C: diagnosis and outcome in children, with particular reference to liver disease." *J Pediatr* **123**(2): 242-247.

Khalkhali-Ellis, Z. and M. J. Hendrix (2007). "Elucidating the function of secreted maspin: inhibiting cathepsin D-mediated matrix degradation." *Cancer Res* **67**(8): 3535-3539.

Klein, A., C. Maldonado, L. M. Vargas, M. Gonzalez, F. Robledo, K. Perez de Arce, F. J. Munoz, C. Hetz, A. R. Alvarez and S. Zanlungo (2011). "Oxidative stress activates the c-Abl/p73 proapoptotic pathway in Niemann-Pick type C neurons." *Neurobiol Dis* **41**(1): 209-218.

Klein, A. D., J. E. Oyarzun, C. Cortez and S. Zanlungo (2018). "Gadolinium Chloride Rescues Niemann(-)Pick Type C Liver Damage." *Int J Mol Sci* **19**(11).

Ko, D. C., L. Milenkovic, S. M. Beier, H. Manuel, J. Buchanan and M. P. Scott (2005). "Cell-autonomous death of cerebellar purkinje neurons with autophagy in Niemann-Pick type C disease." *PLoS Genet* **1**(1): 81-95.

Kodama, T., T. Takehara, H. Hikita, S. Shimizu, M. Shigekawa, H. Tsunematsu, W. Li, T. Miyagi, A. Hosui, T. Tatsumi, H. Ishida, T. Kanto, N. Hiramatsu, S. Kubota, M. Takigawa, Y. Tomimaru, A. Tomokuni, H. Nagano, Y. Doki, M. Mori and N. Hayashi (2011). "Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice." *J Clin Invest* **121**(8): 3343-3356.

Koh, C. H., M. Whiteman, Q. X. Li, B. Halliwell, A. M. Jenner, B. S. Wong, K. M. Laughton, M. Wenk, C. L. Masters, P. M. Beart, O. Bernard and N. S. Cheung (2006). "Chronic exposure to U18666A is associated with oxidative stress in cultured murine cortical neurons." *J Neurochem* **98**(4): 1278-1289.

Koike, M., M. Shibata, Y. Ohsawa, H. Nakanishi, T. Koga, S. Kametaka, S. Waguri, T. Momoi, E. Kominami, C. Peters, K. Figura, P. Saftig and Y. Uchiyama (2003). "Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice." *Mol Cell Neurosci* **22**(2): 146-161.

Kristensen, D. B., N. Kawada, K. Imamura, Y. Miyamoto, C. Tateno, S. Seki, T. Kuroki and K. Yoshizato (2000). "Proteome analysis of rat hepatic stellate cells." *Hepatology* **32**(2): 268-277.

Kwiatkowska, K., E. Marszalek-Sadowska, G. Traczyk, P. Koprowski, M. Musielak, A. Lugowska, M. Kulma, A. Grzelczyk and A. Sobota (2014). "Visualization of cholesterol

deposits in lysosomes of Niemann-Pick type C fibroblasts using recombinant perfringolysin O." Orphanet J Rare Dis **9**: 64.

Kwon, H. J., L. Abi-Mosleh, M. L. Wang, J. Deisenhofer, J. L. Goldstein, M. S. Brown and R. E. Infante (2009). "Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol." Cell **137**(7): 1213-1224.

Laurent-Matha, V., D. Derocq, C. Prebois, N. Katunuma and E. Liaudet-Coopman (2006). "Processing of human cathepsin D is independent of its catalytic function and auto-activation: involvement of cathepsins L and B." J Biochem **139**(3): 363-371.

Laurent-Matha, V., S. Maruani-Herrmann, C. Prebois, M. Beaujouin, M. Glondu, A. Noel, M. L. Alvarez-Gonzalez, S. Blacher, P. Coopman, S. Baghdiguian, C. Gilles, J. Loncarek, G. Freiss, F. Vignon and E. Liaudet-Coopman (2005). "Catalytically inactive human cathepsin D triggers fibroblast invasive growth." J Cell Biol **168**(3): 489-499.

Lee, H., J. K. Lee, M. H. Park, Y. R. Hong, H. H. Marti, H. Kim, Y. Okada, M. Otsu, E. J. Seo, J. H. Park, J. H. Bae, N. Okino, X. He, E. H. Schuchman, J. S. Bae and H. K. Jin (2014).

"Pathological roles of the VEGF/SphK pathway in Niemann-Pick type C neurons." Nat Commun **5**: 5514.

Leist, M. and M. Jaattela (2001). "Triggering of apoptosis by cathepsins." Cell Death Differ **8**(4): 324-326.

Leto, G., F. M. Tumminello, G. Pizzolanti, G. Montalto, M. Soresi and N. Gebbia (1997). "Lysosomal cathepsins B and L and Stefin A blood levels in patients with hepatocellular carcinoma and/or liver cirrhosis: potential clinical implications." Oncology **54**(1): 79-83.

Leto, G., F. M. Tumminello, G. Pizzolanti, G. Montalto, M. Soresi, I. Ruggeri and N. Gebbia (1996). "Cathepsin D serum mass concentrations in patients with hepatocellular carcinoma and/or liver cirrhosis." Eur J Clin Chem Clin Biochem **34**(7): 555-560.

Liscum, L. and J. R. Faust (1989). "The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one." J Biol Chem **264**(20): 11796-11806.

Loftus, S. K., J. A. Morris, E. D. Carstea, J. Z. Gu, C. Cummings, A. Brown, J. Ellison, K. Ohno, M. A. Rosenfeld, D. A. Tagle, P. G. Pentchev and W. J. Pavan (1997). "Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene." Science **277**(5323): 232-235.

Loos, B., A. du Toit and J. H. Hofmeyr (2014). "Defining and measuring autophagosome flux-concept and reality." Autophagy **10**(11): 2087-2096.

Lopez, A. M., S. J. Terpack, K. S. Posey, B. Liu, C. M. Ramirez and S. D. Turley (2014). "Systemic administration of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin to symptomatic Npc1-deficient mice slows cholesterol sequestration in the major organs and improves liver function." Clin Exp Pharmacol Physiol **41**(10): 780-787.

Lu, F., Q. Liang, L. Abi-Mosleh, A. Das, J. K. De Brabander, J. L. Goldstein and M. S. Brown (2015). "Identification of NPC1 as the target of U18666A, an inhibitor of lysosomal cholesterol export and Ebola infection." Elife **4**.

Maetzel, D., S. Sarkar, H. Wang, L. Abi-Mosleh, P. Xu, A. W. Cheng, Q. Gao, M. Mitalipova and R. Jaenisch (2014). "Genetic and chemical correction of cholesterol accumulation and impaired autophagy in hepatic and neural cells derived from Niemann-Pick Type C patient-specific iPS cells." Stem Cell Reports **2**(6): 866-880.

Marin, T., P. Contreras, J. F. Castro, D. Chamorro, E. Balboa, M. Bosch-Morato, F. J. Munoz, A. R. Alvarez and S. Zanlungo (2014). "Vitamin E dietary supplementation improves neurological symptoms and decreases c-Abl/p73 activation in Niemann-Pick C mice." Nutrients **6**(8): 3000-3017.

Masson, O., A. S. Bach, D. Derocq, C. Prebois, V. Laurent-Matha, S. Patingre and E. Liaudet-Coopman (2010). "Pathophysiological functions of cathepsin D: Targeting its catalytic activity versus its protein binding activity?" Biochimie **92**(11): 1635-1643.

Modol, T., N. Brice, M. Ruiz de Galarreta, A. Garcia Garzon, M. J. Iraburu, J. J. Martinez-Irujo and M. J. Lopez-Zabalza (2015). "Fibronectin peptides as potential regulators of hepatic fibrosis through apoptosis of hepatic stellate cells." J Cell Physiol **230**(3): 546-553.

Moles, A., N. Tarrats, J. C. Fernandez-Checa and M. Mari (2009). "Cathepsins B and D drive hepatic stellate cell proliferation and promote their fibrogenic potential." Hepatology **49**(4): 1297-1307.

Moles, A., N. Tarrats, J. C. Fernandez-Checa and M. Mari (2012). "Cathepsin B overexpression due to acid sphingomyelinase ablation promotes liver fibrosis in Niemann-Pick disease." J Biol Chem **287**(2): 1178-1188.

Munsterman, I. D., T. J. Kendall, N. Khelil, M. Popa, R. Lomme, J. P. H. Drenth and E. Tjwa (2018). "Extracellular matrix components indicate remodelling activity in different fibrosis stages of human non-alcoholic fatty liver disease." Histopathology **73**(4): 612-621.

Murata, M., S. Miyashita, C. Yokoo, M. Tamai, K. Hanada, K. Hatayama, T. Towatari, T. Nikawa and N. Katunuma (1991). "Novel epoxysuccinyl peptides. Selective inhibitors of cathepsin B, in vitro." FEBS Lett **280**(2): 307-310.

Nakagawa, T., W. Roth, P. Wong, A. Nelson, A. Farr, J. Deussing, J. A. Villadangos, H. Ploegh, C. Peters and A. Y. Rudensky (1998). "Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus." Science **280**(5362): 450-453.

Naureckiene, S., D. E. Sleat, H. Lackland, A. Fensom, M. T. Vanier, R. Wattiaux, M. Jadot and P. Lobel (2000). "Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease." Science **290**(5500): 2298-2301.

Niemann, A. (1914). "Niemann: Ein unbekanntes Krankheitsbild, Jahrbuch für Kinderheilkunde." 1-10.

Nnah, I. C., B. Wang, C. Saqcena, G. F. Weber, E. M. Bonder, D. Bagley, R. De Cegli, G. Napolitano, D. L. Medina, A. Ballabio and R. Dobrowolski (2019). "TFEB-driven endocytosis coordinates MTORC1 signaling and autophagy." Autophagy **15**(1): 151-164.

O'Brien, J. S., J. Bennett, M. L. Veath and D. Paa (1975). "Lysosomal storage disorders. Diagnosis by ultrastructural examination of skin biopsy specimens." Arch Neurol **32**(9): 592-599.

Pacheco, C. D., R. Kunkel and A. P. Lieberman (2007). "Autophagy in Niemann-Pick C disease is dependent upon Beclin-1 and responsive to lipid trafficking defects." Hum Mol Genet **16**(12): 1495-1503.

Patterson, M. C., C. J. Hendriksz, M. Walterfang, F. Sedel, M. T. Vanier and F. Wijburg (2012). "Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update." Mol Genet Metab **106**(3): 330-344.

Pfaffl, M. W., G. W. Horgan and L. Dempfle (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Res **30**(9): e36.

Pick, L. (1926). "Der Morbus Gaucher und die ihm ähnlichen Krankheiten (die lipoidzellige Splenohepatomegalie Typus Niemann und die diabetische Lipoidzellenhypoplasie der Milz)." Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde: 519-627.

Pourahmad, J., S. Ross and P. J. O'Brien (2001). "Lysosomal involvement in hepatocyte cytotoxicity induced by Cu(2+) but not Cd(2+)." Free Radic Biol Med **30**(1): 89-97.

Repnik, U., M. Borg Distefano, M. T. Speth, M. Y. W. Ng, C. Progida, B. Hoflack, J. Gruenberg and G. Griffiths (2017). "L-leucyl-L-leucine methyl ester does not release cysteine cathepsins to the cytosol but inactivates them in transiently permeabilized lysosomes." J Cell Sci **130**(18): 3124-3140.

Repnik, U., A. E. Starr, C. M. Overall and B. Turk (2015). "Cysteine Cathepsins Activate ELR Chemokines and Inactivate Non-ELR Chemokines." J Biol Chem **290**(22): 13800-13811.

Ribas, G. S., R. Pires, J. C. Coelho, D. Rodrigues, C. P. Mescka, C. S. Vanzin, G. B. Biancini, G. Negretto, C. A. Wayhs, M. Wajner and C. R. Vargas (2012). "Oxidative stress in Niemann-Pick type C patients: a protective role of N-butyl-deoxynojirimycin therapy." Int J Dev Neurosci **30**(6): 439-444.

Rimkunas, V. M., M. J. Graham, R. M. Crooke and L. Liscum (2008). "In vivo antisense oligonucleotide reduction of NPC1 expression as a novel mouse model for Niemann Pick type C- associated liver disease." Hepatology **47**(5): 1504-1512.

Rimkunas, V. M., M. J. Graham, R. M. Crooke and L. Liscum (2009). "TNF- $\alpha$  plays a role in hepatocyte apoptosis in Niemann-Pick type C liver disease." J Lipid Res **50**(2): 327-333.

Roberg, K. and K. Ollinger (1998). "Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuing apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes." Am J Pathol **152**(5): 1151-1156.

Roberts, L. R., P. N. Adjei and G. J. Gores (1999). "Cathepsins as effector proteases in hepatocyte apoptosis." Cell Biochem Biophys **30**(1): 71-88.

Rozman, J., J. Stojan, R. Kuhelj, V. Turk and B. Turk (1999). "Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin B is a bimolecular process." FEBS Lett **459**(3): 358-362.

Saftig, P., M. Hetman, W. Schmahl, K. Weber, L. Heine, H. Mossmann, A. Koster, B. Hess, M. Evers, K. von Figura and et al. (1995). "Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells." EMBO J **14**(15): 3599-3608.

Sankaranarayanan, S., D. De Angelis, J. E. Rothman and T. A. Ryan (2000). "The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity." Biophys J **79**(4): 2199-2208.

Sarkar, S., B. Carroll, Y. Buganim, D. Maetzel, A. H. Ng, J. P. Cassidy, M. A. Cohen, S. Chakraborty, H. Wang, E. Spooner, H. Ploegh, J. Gsponer, V. I. Korolchuk and R. Jaenisch (2013). "Impaired autophagy in the lipid-storage disorder Niemann-Pick type C1 disease." Cell Rep **5**(5): 1302-1315.

Settembre, C. and A. Ballabio (2011). "TFEB regulates autophagy: an integrated coordination of cellular degradation and recycling processes." Autophagy **7**(11): 1379-1381.

Settembre, C., C. Di Malta, V. A. Polito, M. Garcia Arencibia, F. Vetrini, S. Erdin, S. U. Erdin, T. Huynh, D. Medina, P. Colella, M. Sardiello, D. C. Rubinsztein and A. Ballabio (2011). "TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis." *Science* **332**(6036): 1429-1433.

Sha, Y., L. Rao, C. Settembre, A. Ballabio and N. T. Eissa (2017). "STUB1 regulates TFEB-induced autophagy-lysosome pathway." *EMBO J* **36**(17): 2544-2552.

Sobo, K., I. Le Blanc, P. P. Luyet, M. Fivaz, C. Ferguson, R. G. Parton, J. Gruenberg and F. G. van der Goot (2007). "Late endosomal cholesterol accumulation leads to impaired intra-endosomal trafficking." *PLoS One* **2**(9): e851.

Sobotic, B., M. Vizovisek, R. Vidmar, P. Van Damme, V. Gocheva, J. A. Joyce, K. Gevaert, V. Turk, B. Turk and M. Fonovic (2015). "Proteomic Identification of Cysteine Cathepsin Substrates Shed from the Surface of Cancer Cells." *Mol Cell Proteomics* **14**(8): 2213-2228.

Sparrow, S. M., J. M. Carter, N. D. Ridgway, H. W. Cook and D. M. Byers (1999). "U18666A inhibits intracellular cholesterol transport and neurotransmitter release in human neuroblastoma cells." *Neurochem Res* **24**(1): 69-77.

Stoka, V., V. Turk and B. Turk (2016). "Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration." *Ageing Res Rev.*

Suzuki, K., P. Bose, R. Y. Leong-Quong, D. J. Fujita and K. Riabowol (2010). "REAP: A two minute cell fractionation method." *BMC Res Notes* **3**: 294.

Tamura, A. and N. Yui (2015). "beta-Cyclodextrin-threaded biocleavable polyrotaxanes ameliorate impaired autophagic flux in Niemann-Pick type C disease." *J Biol Chem* **290**(15): 9442-9454.

Tang, Y., G. Cao, X. Min, T. Wang, S. Sun, X. Du and W. Zhang (2018). "Cathepsin B inhibition ameliorates the non-alcoholic steatohepatitis through suppressing caspase-1 activation." *J Physiol Biochem* **74**(4): 503-510.

Taniguchi, M., H. Ogiso, T. Takeuchi, K. Kitatani, H. Umehara and T. Okazaki (2015). "Lysosomal ceramide generated by acid sphingomyelinase triggers cytosolic cathepsin B-mediated degradation of X-linked inhibitor of apoptosis protein in natural killer/T lymphoma cell apoptosis." *Cell Death Dis* **6**: e1717.

Teratani, T., K. Tomita, T. Suzuki, T. Oshikawa, H. Yokoyama, K. Shimamura, S. Tominaga, S. Hiroi, R. Irie, Y. Okada, C. Kurihara, H. Ebinuma, H. Saito, R. Hokari, K. Sugiyama, T. Kanai, S. Miura and T. Hibi (2012). "A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells." *Gastroenterology* **142**(1): 152-164 e110.

Tomita, K., T. Teratani, T. Suzuki, M. Shimizu, H. Sato, K. Narimatsu, Y. Okada, C. Kurihara, R. Irie, H. Yokoyama, K. Shimamura, S. Usui, H. Ebinuma, H. Saito, C. Watanabe, S. Komoto, A. Kawaguchi, S. Nagao, K. Sugiyama, R. Hokari, T. Kanai, S. Miura and T. Hibi (2014). "Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice." *Hepatology* **59**(1): 154-169.

Torres, S., E. Balboa, S. Zanlungo, C. Enrich, C. Garcia-Ruiz and J. C. Fernandez-Checa (2017). "Lysosomal and Mitochondrial Liaisons in Niemann-Pick Disease." *Front Physiol* **8**: 982.

Towatari, T., T. Nikawa, M. Murata, C. Yokoo, M. Tamai, K. Hanada and N. Katunuma (1991). "Novel epoxysuccinyl peptides. A selective inhibitor of cathepsin B, in vivo." *FEBS Lett* **280**(2): 311-315.

Turk, B., J. G. Bieth, I. Bjork, I. Dolenc, D. Turk, N. Cimerman, J. Kos, A. Colic, V. Stoka and V. Turk (1995). "Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins." Biol Chem Hoppe Seyler **376**(4): 225-230.

Turk, B., I. Dolenc, E. Zerovnik, D. Turk, F. Gubensek and V. Turk (1994). "Human cathepsin B is a metastable enzyme stabilized by specific ionic interactions associated with the active site." Biochemistry **33**(49): 14800-14806.

Turk, B. and V. Turk (2009). "Lysosomes as "suicide bags" in cell death: myth or reality?" J Biol Chem **284**(33): 21783-21787.

Umezawa, H. (1982). "Low-molecular-weight enzyme inhibitors of microbial origin." Annu Rev Microbiol **36**: 75-99.

Vanier, M. T. (2013). "Niemann-Pick diseases." Handb Clin Neurol **113**: 1717-1721.

Vazquez, M. C., E. Balboa, A. R. Alvarez and S. Zanlungo (2012). "Oxidative stress: a pathogenic mechanism for Niemann-Pick type C disease." Oxid Med Cell Longev **2012**: 205713.

Vazquez, M. C., T. del Pozo, F. A. Robledo, G. Carrasco, L. Pavez, F. Olivares, M. Gonzalez and S. Zanlungo (2011). "Alteration of gene expression profile in Niemann-Pick type C mice correlates with tissue damage and oxidative stress." PLoS One **6**(12): e28777.

Vite, C. H., J. H. Bagel, G. P. Swain, M. Prociuk, T. U. Sikora, V. M. Stein, P. O'Donnell, T. Ruane, S. Ward, A. Crooks, S. Li, E. Mauldin, S. Stellar, M. De Meulder, M. L. Kao, D. S. Ory, C. Davidson, M. T. Vanier and S. U. Walkley (2015). "Intracisternal cyclodextrin prevents cerebellar dysfunction and Purkinje cell death in feline Niemann-Pick type C1 disease." Sci Transl Med **7**(276): 276ra226.

Walenbergh, S. M., T. Houben, T. Hendriks, M. L. Jeurissen, P. J. van Gorp, A. C. Vreugdenhil, M. P. Adriaanse, W. A. Buurman, M. H. Hofker, A. Mosca, P. J. Lindsey, A. Alisi, D. Liccardo, N. Panera, G. H. Koek, V. Nobili and R. Shiri-Sverdlov (2015). "Plasma cathepsin D levels: a novel tool to predict pediatric hepatic inflammation." Am J Gastroenterol **110**(3): 462-470.

Woolbright, B. L., A. Ramachandran, M. R. McGill, H. M. Yan, M. L. Bajt, M. R. Sharpe, J. J. Lemasters and H. Jaeschke (2012). "Lysosomal instability and cathepsin B release during acetaminophen hepatotoxicity." Basic Clin Pharmacol Toxicol **111**(6): 417-425.

Xie, C., S. D. Turley, P. G. Pentchev and J. M. Dietschy (1999). "Cholesterol balance and metabolism in mice with loss of function of Niemann-Pick C protein." Am J Physiol **276**(2 Pt 1): E336-344.

Yamamoto, H., Y. Murawaki and H. Kawasaki (1992). "Collagenolytic cathepsin B and L activity in experimental fibrotic liver and human liver." Res Commun Chem Pathol Pharmacol **76**(1): 95-112.

Yan, B. Z., L. Y. Chen, L. Kang, X. R. Wang, M. R. Bi, W. Wang and B. S. Yang (2013). "Hepatoprotective effects of cathepsin B inhibitor on acute hepatic failure induced by lipopolysaccharide/D-galactosamine in mice." Hepatobiliary Pancreat Dis Int **12**(1): 80-86.

Zaidi, N., A. Maurer, S. Nieke and H. Kalbacher (2008). "Cathepsin D: a cellular roadmap." Biochem Biophys Res Commun **376**(1): 5-9.

Zhang, L., X. H. Fu, Y. Yu, R. H. Shui, C. Li, H. Y. Zeng, Y. L. Qiao, L. Y. Ni and Q. Wang (2015). "Treatment with CA-074Me, a Cathepsin B inhibitor, reduces lung interstitial inflammation and fibrosis in a rat model of polymyositis." *Lab Invest* **95**(1): 65-77.

Zhao, C. F. and D. M. Herrington (2016). "The function of cathepsins B, D, and X in atherosclerosis." *Am J Cardiovasc Dis* **6**(4): 163-170.

## 10. ANEXOS

Gen	Partidor 1	Partidor 2
<b>PPAR-gama</b>	GCAGAGACAAATGTGCTTCG	TCTGGGGTCAGAGGAAGAGA
<b>CD68</b>	AAGGGGGCTCTTGGGAACTA	AAGCCCTCTTTAAGCCCCAC
<b>TREM2</b>	CTGCTGATCACAGCCCTGTCCAA	CCCCCAGTGCTTCAAGGCATCA
<b>LIFR</b>	CATCTGGTCCTGCGAGCCTA	AGCCACAGCCACTGGGATGA
<b>PRTN3</b>	ACGGTGGTCACCTTCCTATG	GAATGCCATTGCAGATCAAG
<b>TGF-b1</b>	CGATCGCTACCCGGCGTTCC	GGTTTGTGGCTCCCGAGGGC
<b>Vimentin</b>	CCCTGAACCTGAGAGAACTAAC	CTCTGGTCTCAACCGTCTTAATC
<b>Colagen I a1</b>	GGTATGCTTGATCTGTATCTGC	AGTCCAGTTCTTCATTGCATT
<b>CD36</b>	ATTGTACCTGGGAGTTGGCG	CAGCCAGGACTGCACCAATA
<b>Abcg5</b>	GGAGAACATTGAAAGAGCAC	GTTACTCGCCTCAGCAG
<b>CTSD</b>	CTGAGTGGCTTCATGGGAAT	CCTGACAGTGGAGAAGGAGC
<b>CTSB</b>	AAATCAGGAGTATACAAGCATGA	GCCCAGGGATGCGGATGG
<b>CTSS</b>	ACCTACCAAGTGGGCATGAACGAT	TCGGGAAATTCTCAGAGCACCCAT

**Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para el análisis de los niveles de expresión génica de distintos genes en ratones WT y NPC.**