



Fundació

La Marató de TV3

20^è SIMPOSIUM

Enfermedades neurodegenerativas



IDENTIFICACIÓN DE FIRMAS BIOLÓGICAS ESPECÍFICAS A PARTIR DE MUESTRAS DE PLASMA PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA DEMENCIA CON CUERPOS DE LEWY

Katrin Beyer

Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

1. Resumen del proyecto

1.1 INTRODUCCIÓN

La demencia con cuerpos de Lewy (DCL) es, después de la enfermedad de Alzheimer (EA), el segundo tipo más común de demencia degenerativa, representando el 20-30% de los casos de demencia. Es una enfermedad muy heterogénea y compleja, y pertenece junto con la enfermedad de Parkinson (EP) al grupo de las enfermedades con cuerpos de Lewy, que se caracterizan por la presencia de inclusiones positivas de alfa-sinucleína en el cerebro.

La DCL muestra un solapamiento neuropatológico y clínico con la EA que dificulta el diagnóstico preciso y el manejo correcto de la DCL. Los síntomas psiquiátricos no son fácilmente identificables y la presencia de deterioro cognitivo o síntomas motores puede llevar a un diagnóstico erróneo de EA o EP. El diagnóstico correcto de la DCL es de suma importancia, ya que esta condición se caracteriza por un curso clínico agresivo y una alta mortalidad general. La neurodegeneración irreversible característica comienza mucho antes de que los síntomas clínicos de la DCL o la EA se evidencien, dificultando así los tratamientos efectivos. Por lo tanto, la identificación temprana de los pacientes es un objetivo importante en la investigación de las demencias degenerativas.

Muestras de sangre periférica incluyen diferentes fuentes de material biológico para el descubrimiento de biomarcadores. De estas, las plaquetas se caracterizan por su contenido de varios neurotransmisores, sus transportadores y receptores, y adicionalmente por una ruta completa de miRNA. Otra fuente de material biológico procedente de sangre son las vesículas extracelulares, incluidos los exosomas. Estos últimos se consideran cada vez más una fuente valiosa de información originada en las células. Los exosomas son vesículas derivadas de endosomas de tamaño nanométrico secretadas por muchos tipos celulares y se encuentran en la mayoría de los fluidos corporales. Los exosomas contienen material citoplasmático específico de la célula de origen, incluidos ácidos nucleicos (en especial pequeñas especies de RNA y miRNA), proteínas y metabolitos, convirtiéndolos en atractivos para el descubrimiento de biomarcadores.

1.2 OBJETIVOS

1. Recoger muestras de sangre de pacientes con DCL y EA, e individuos controles, aislando DNA, plaquetas y vesículas extracelulares.
2. Realizar el análisis genético, incluido análisis mutacional y de expresión, del gen GBA como factor de mayor riesgo de la DCL.
3. Determinar mediante análisis de transcriptoma completo los cambios específicos en la expresión de mRNA y miRNA en plaquetas y vesículas extracelulares de DCL, EA y controles.
4. Determinar los cambios en la expresión del proteoma completo en plaquetas y vesículas extracelulares de DCL, EA y controles.
5. Analizar los niveles de expresión de los mRNA y miRNAs que presentan cambios de expresión específicos en plaquetas o en vesículas extracelulares asociados a la DCL.
6. Establecer una firma biológica de mRNA/miRNA específica para distinguir pacientes con DCL de pacientes con EA y controles.

1.3 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio prospectivo transversal de pacientes con DCL y EA diagnosticados en dos hospitales terciarios en el área metropolitana de Barcelona controlados por sujetos de control en el mismo rango de edad: extracción de DNA, plaquetas, vesículas extracelulares, RNA y análisis de expresión de miRNA.

Muestras y sujetos. El diagnóstico clínico de pacientes con DCL y EA se realizó en el Departamento de Neurología de los hospitales Germans Trias i Pujol (Badalona) y Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat). Los mismos departamentos reclutaron sujetos controles emparejados por edad y género. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado, previamente aprobado por el Comité de Ética del Hospital Germans Trias i Pujol.

Obtención de la muestra. Se recogieron 10 ml de sangre: 1) en tubos de citrato de sodio para minimizar la activación de las plaquetas y 2) en tubos EDTA (ambos: BD Vacutainer). La extracción de DNA y plaquetas se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos estándar. La **extracción de las vesículas extracelulares** de sangre se realizó enriqueciendo el sobrenadante después de obtener plaquetas mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Las fracciones que contenían vesículas extracelulares se controlaron por citometría de flujo detectando la expresión de

marcadores asociados a vesículas (CD9 y CD81). La **extracción de RNA/miRNA de plaquetas y vesículas extracelulares** se llevó a cabo con el *kit* de aislamiento de miRNA mirVana™ basado en filtros de fibra de vidrio (GFF). Mediante este método se aisló el RNA total, incluyendo RNA de tamaño mayor de 200 nucleótidos (fracción de mRNA) así como de tamaño pequeño de hasta 10 nucleótidos (fracción de RNA pequeños). El **perfil de expresión de miRNA de plaquetas y vesículas extracelulares** se analizó con el *kit* TruSeq, basado en la ligación directa a dos adaptadores en cada molécula de RNA y una reacción posterior de RT para la obtención de cDNA. El cDNA fue amplificado por PCR y secuenciado en un sistema MiSeq (*Illumina*). **Transcripción inversa y análisis de expresión de mRNA/miRNA por qPCR:** los biomarcadores potenciales de mRNA se validaron mediante PCR a tiempo real y los biomarcadores potenciales de miRNA mediante el uso de un panel de expresión de miRNA prediseñado utilizando la tecnología LNA. En ambos casos los cambios de expresión relativos fueron evaluados por el método $\Delta\Delta Ct$. **Análisis de datos de expresión de mRNA/miRNA:** el análisis de datos terciarios se realizó aplicando un flujo de trabajo estándar para este tipo de datos, consistente en: (i) control de calidad de las secuencias obtenidas para descartar secuencias de baja calidad, (ii) alineación de las secuencias restantes contra el genoma de referencia, (iii) recuento de los mRNA conocidos y también cualquier nueva variante de corte y empalme (*splicing*), uniones de exones u otras variantes disponibles, (iv) cuantificación de la expresión diferencial entre los diferentes grupos de estudio, y (v) realización del análisis de importancia biológica de los elementos hallados al verificar el enriquecimiento en las bases de datos de anotaciones y luego en diferentes bases de datos (GO, KEGG, etc.) para facilitar la interpretación de los resultados. **Establecimiento de la firma biológica:** independientemente de la metodología utilizada, los valores de *p* ajustados menores de 0,05 representaban un cambio de expresión significativo. El cambio significativo en la expresión de al menos un mRNA o miRNA constantemente presente en todas las muestras analizadas en el presente estudio fue aceptado como un marcador.

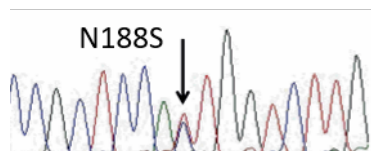
Basados en los biomarcadores seleccionados se construyó y validó una firma predictiva, mediante la validación cruzada 5x seleccionando el mejor modelo predictivo y las mejores características incluidas. La validación cruzada de todo el proceso permitió evitar el sesgo de selección, garantizando así las estimaciones no sesgadas de

precisión predictiva que aseguran la reproducibilidad de la firma derivada en nuevos conjuntos de datos independientes.

A lo largo de los tres años de duración del proyecto, solo pudimos proponer qué miRNA podrían constituir el perfil final de biomarcadores para el diagnóstico temprano y diferencial de DLB. Los estudios de validación definitivos se llevarán a cabo a partir de ahora.

2. Resultados

2.1 Las mutaciones en el gen de la glucocerebrosidasa precipitan el inicio de la demencia con cuerpos de Lewy y prevalecen en hombres.



En este estudio se analizaron secuencias de mRNA de GBA en una cohorte neuropatológica que incluía muestras de cerebro de 50 DCL, 44 EP y 34 controles y en

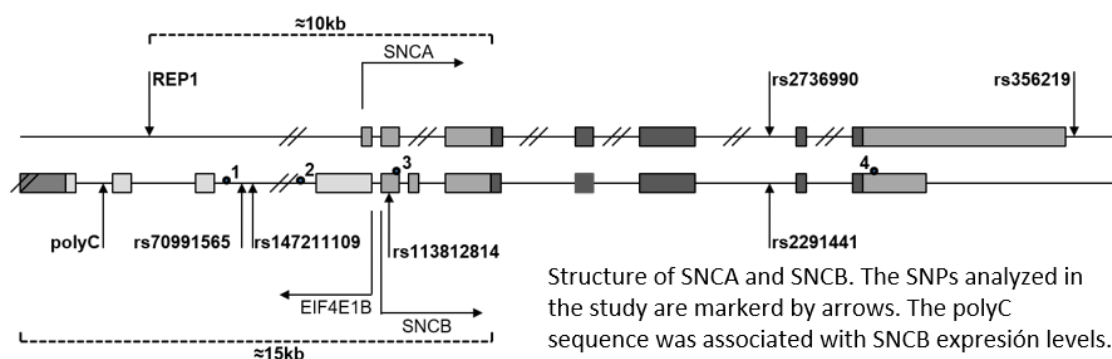
una cohorte clínica de 47 pacientes con DCL y 131 individuos no afectados. Se identificaron 6 mutaciones distintas de GBA en 16 pacientes con sobrerrepresentación relevante en cerebros con DCL pura (35,7%, $p = 0,001$). La mutación más común fue E326K, que estaba marcadamente asociada con la DCL pura y con la EP con demencia. Además se comprobó que E326K no era un polimorfismo común en nuestra población. Los análisis de correlación con los datos clínicos revelaron que las mutaciones de GBA se asocian con un inicio de la DCL más temprano (64,7 vs. 72,4, $p = 0,014$) y están presentes principalmente en hombres (90% en portadores de mutación *versus* 52,5% en portadores sin mutación, $p = 0,021$). **Conclusiones:** nuestros resultados muestran que las mutaciones de GBA confieren riesgo para el desarrollo de la DCL también en la población española. Se asocian con una edad más temprana de inicio y son más frecuentes en los pacientes masculinos.

2.2 Las mutaciones en el gen de la glucocerebrosidasa se acumulan en el trastorno del comportamiento del sueño REM idiopático (TCSR). Todos los exones codificantes de GBA de 69 pacientes con TCSR confirmados por polisomnografía y 84 controles emparejados fueron secuenciados por el método de Sanger. Como resultado, se identificaron 7 mutaciones (E326K, L444P, A446T, A318K, R329C, T369M, N370S) en 8 pacientes (11,6%) con IRBD y en un control (1,2%) ($p = 0,026$).

GBA-variant	cDNA change	aa change	MAF	SNP
A318G	c.1070C>G	p.A357G	n/a	n/a
E326K	c.1093G>A	p.E365K	0.011	rs2230288
R329C	c.1102C>T	p.R368C	1.22 e-5	rs374306700
T369M	c.1223C>T	p.T408M	0.0061	rs75548401
N370S	c.1226A>G	p.N409S	0.0022	rs76763715
N392N	c.1303A>G	p.N431N	2.52 e-5	rs777049786
L444P	c.1448T>C	p.L483P	0.0013	rs421016
A446T	c.1453G>A	p.A485T	2.53 e-5	rs759859002

Después de un seguimiento medio de $8,9 \pm 3,8$ años a partir del diagnóstico de TCSR, 5 sujetos con mutaciones de GBA desarrollaron una enfermedad con cuerpos de Lewy (3 DCL y 2 EP) y 3 permanecieron libres de enfermedad. El riesgo de desarrollar una enfermedad con cuerpos de Lewy fue similar en sujetos con TCSR con mutaciones de GBA que en aquellos sin mutaciones (prueba de *log rank*, $p = 0,935$). En conclusión, en TCSR, las mutaciones de GBA son: 1) frecuentes, 2) asociadas con EP y DCL inminentes, pero 3) no son indicativas de un riesgo a corto plazo de enfermedad con cuerpos de Lewy tras diagnóstico de TCSR. Los pacientes con TCSR portadores de mutaciones de GBA podrían estudiarse con intervenciones modificadoras de la enfermedad con el fin de restablecer la vía metabólica de GBA.

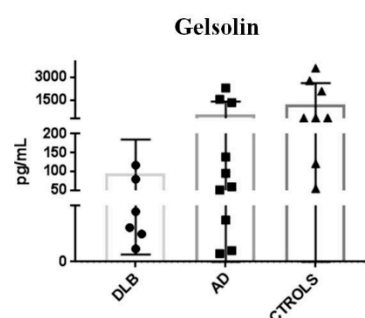
2.3 La longitud de INDEL y haplotipos en el gen de la beta-sinucleína pueden ser una clave para diferenciar la demencia con cuerpos de Lewy. En este estudio nos propusimos analizar la distribución de genotipos de SNP potencialmente funcionales en los genes de alfa- y beta-sinucleína (SNCA y SNCB), realizar análisis de haplotipos para SNCB e identificar variaciones de inserción y eliminación funcional (INDEL) dentro de la región reguladora de SNCB, que podrían ser responsables de los niveles drásticamente disminuidos de SNCB encontrados en DCL pura. Por lo tanto, se genotiparon muestras cerebrales de EA, DCL, EP y controles sanos para 2 SNP en SNCA y 4 en SNCB. Además se analizaron 4 variaciones INDEL en sentido ascendente de SNCB, se determinaron los niveles de expresión de SNCB y se correlacionaron las longitudes de INDEL con los niveles de expresión.



Después de aplicar los tests estadísticos ANOVA y ji cuadrado y el método delta-delta Ct, se identificaron genotipos de SNCA y SNCB específicos que segregaban con la DCL o con la EP. Además, se identificaron tres variaciones de INDEL en el promotor de SNCB. Las longitudes de sus alelos estaban asociadas con los niveles de expresión de SNCB. Los alelos INDEL asociados con una baja expresión de SNCB estaban acumulados en DCL pura. Finalmente, se identificaron haplotipos en SNCB específicos para la DCL. En resumen, este estudio demostró que el enriquecimiento diferencial de genotipos en SNCA y SNCB contribuye al desarrollo de EP o DCL, y que los genotipos asociados con una baja expresión de SNCB se acumulan en DCL.

2.4 Caracterización del perfil proteómico de exosomas derivados de plasma de pacientes con DCL.

Se identificaron 220 proteínas diferentes mediante el uso de dos métodos de tratamiento de muestra antes del análisis: 1) digestión en solución con LysC y tripsina y 2) digestión con tripsina en gel. La comparación de ambos métodos proteómicos sugiere que la digestión en gel es un método más sensible. Además, se encontraron niveles disminuidos de gelsolina y butirilcolinesterasa en DCL en comparación con los controles. La validación adicional por ELISA, donde además se incluyó un grupo de pacientes con EA, reafirmó que los niveles de gelsolina están disminuidos en exosomas de plasma de DCL en comparación con controles y EA. La detección de la gelsolina como biomarcador putativo en plasma mediante un ensayo ELISA convencional se debe explorar más en futuros estudios.



2.5 Perfiles de miRNA de vesículas extracelulares derivadas de plasma

difieren entre la enfermedad de Alzheimer y la

demencia con cuerpos de Lewy. En este estudio se

aislaron y caracterizaron los miRNA de las vesículas

extracelulares derivadas de plasma de pacientes con DCL y

EA, y de controles sanos de la misma edad. Los resultados revelaron un conjunto de 5 miRNA (miR-21-5p, let-7i-5p, miR-126-3p, miR-451a y miR-26a-5p) significativamente disminuidos en muestras de EA respecto a pacientes con DCL y controles; y un grupo de 4 miRNA (miR-24-3p, miR-183-5p, miR-143-3p y miR-423-5p) sobreexpresados en EA en comparación con DCL y controles. Las curvas ROC obtenidas para los miR-21-5p, let-7i-5p, miR-126-3p y miR-451 con AUC de aproximadamente 0,9 demostraron que estos miRNA podrían ser posibles biomarcadores para distinguir la DCL de la EA, y que podrían formar parte de la firma biológica a identificar en este proyecto. Aunque se requiere la validación de estos resultados en cohortes mayores, nuestros datos sugieren que el contenido de miRNA de las vesículas extracelulares derivadas de plasma puede reflejar la patogénesis de trastornos neurodegenerativos.

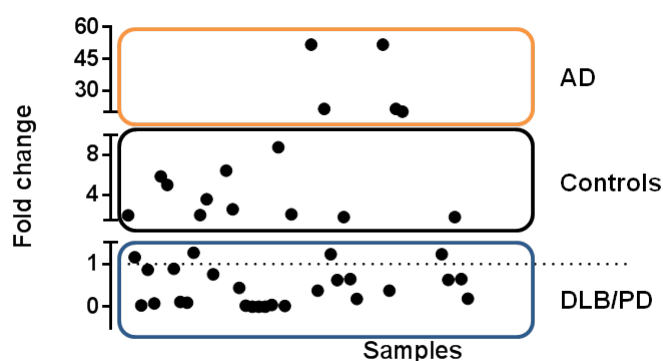
2.6 Los niveles de hsa-miR-150-5p derivado de plaquetas discriminan entre las sinucleinopatías y la enfermedad de Alzheimer.

Este estudio se realizó en dos fases, una fase de descubrimiento y una fase de validación. Para asegurar un material de origen válido, el pellet rico en plaquetas se caracterizó por citometría de flujo y pudo descartarse la contaminación con leucocitos. Durante la fase de descubrimiento, se analizó el transcriptoma de miRNA completo de plaquetas mediante NGS en 22 pacientes con DCL y 24 controles, identificándose 22 miRNA como posibles biomarcadores. Tras un **primer estudio de validación** incluyendo 14 DCL y 15 controles, 12 miRNA cumplieron con los criterios para ser investigados en estudios adicionales.

Se llevaron a cabo dos estudios de validación posteriores, incluido un estudio ciego final:

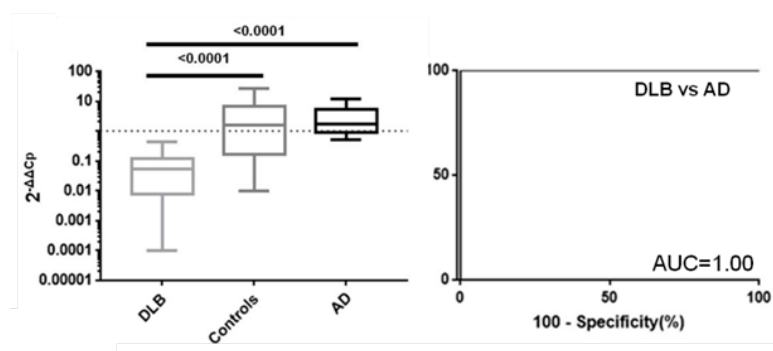
- **Segundo estudio independiente:** DCL (n = 12), EA (n = 10), controles (n = 10)
- **Estudio ciego:** DCL (n = 18), EA (n = 6), EP (n = 5), controles (n = 14)

El estudio ciego demostró que la expresión del miRNA con las mayores propiedades de discriminación, el miR-150-5p, podía definirse en tres niveles: expresión baja,



intermedia y alta (figura de la izquierda, arriba). Un total de 5 de las 6 muestras de EA se ubicaron dentro del grupo de expresión alta y 10 de las 14 muestras de control dentro del grupo de expresión intermedia. Todas las muestras de DCL y EP se agruparon como muestras de expresión baja. Los

análisis de curva ROC revelaron que el miR-150-5p diferencia la DCL de la EA con una especificidad y sensibilidad muy altas (figura de la izquierda, inferior).



Estos datos sugieren que el panel de miRNA puede ser un biomarcador para el diagnóstico diferencial de la DCL *versus* la EA. Estos miRNA podrían ser una herramienta útil para la práctica clínica, por un lado, y

para ser utilizada a la hora de incluir pacientes en ensayos clínicos, por otro.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Uno de los resultados principales del proyecto es de elevada relevancia clínica, ya que hemos identificado un biomarcador periférico para distinguir entre la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) y la enfermedad de Alzheimer (EA). Este biomarcador se ha caracterizado en tres estudios independientes, el inicial y dos de validación, y es de sensibilidad y especificidad superiores al 95%. Los hallazgos se han patentado (EP18382540.5; fecha de la solicitud: 19/07/2018) y se espera poder validarlos en estudios de prueba de concepto a lo largo de este año. La meta final es poder ofrecer una herramienta para el diagnóstico diferencial de la DCL que sea utilizada en la práctica clínica.

El biomarcador identificado gracias a este proyecto es el primer biomarcador molecular para el diagnóstico diferencial de la DCL, y si bien habíamos identificado un

biomarcador para la identificación de uno de los subgrupos de la misma, este es válido para la identificación de todos los pacientes.

La DCL es, después de la EA, la segunda causa más frecuente de las demencias. Debido al solapamiento neuropatológico de ambas enfermedades, el diagnóstico clínico de la DCL es muy difícil y hasta un 80% de los pacientes recibe un diagnóstico erróneo, siendo en realidad en la mayoría de los casos de EA. El tratamiento que reciben los pacientes mal diagnosticados corresponde al de la EA, y por dicha razón se causan reacciones adversas en el 50% de los mismos. En este contexto, el hallazgo del biomarcador representa un avance importante para garantizar un diagnóstico correcto de la DCL y evitar tratamientos erróneos, mejorando considerablemente la calidad de vida de los pacientes con DCL y también de sus familiares y cuidadores. Su utilización en la práctica clínica contribuirá a disminuir gastos del sistema de salud.

Otro punto muy importante a tener en cuenta es que la aplicación de nuestro biomarcador, además contribuirá directamente a la mejora del desarrollo de fármacos para el tratamiento de la EA, así como de la DCL. Muchos de los ensayos clínicos recientes han fracasado, ya que el reclutamiento de grupos de pacientes homogéneos no siempre está garantizado. Con nuestro marcador pretendemos ofrecer una herramienta que permite identificar a todos los pacientes con DCL erróneamente clasificados como EA y así contribuir a la ejecución exitosa de ensayos clínicos relacionados con EA o DCL.

4. Bibliografía científica generada

4.1 PUBLICACIONES

1. Gámez-Valero A, Prada-Dacasa P, Santos C, Adame-Castillo C, Campdelacreu J, Reñé R, Gascón-Bayarri J, Ispuerto L, Álvarez R, Ariza A, Beyer K.

GBA Mutations Are Associated With Earlier Onset and Male Sex in Dementia With Lewy Bodies. **Mov Disord.** **2016**, 31, 1066-70; doi: 10.1002/mds.26593. **IF: 6.01,**

Quartil: 1

2. Gámez-Valero A, Monguió-Tortajada M, Carreras-Planella L, Franquesa MI, Beyer K, Borràs FE.

Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents.

Sci Rep. 2016, 6, 33641; doi: 10.1038/srep33641. **IF: 5.228, Quartil: 1**

3. Gámez-Valero A, Beyer K.

Alternative splicing of alpha- and beta-synuclein genes plays differential roles in synucleinopathies.

Genes 2018, 9, 63; doi:10.3390/genes9020063. **IF: 3.600, Quartil: 1**

4. Gámez-Valero A, Iranzo A, Serradell M, Vilas D, Santamaria J, Gaig C, Álvarez R, Ariza A, Tolosa E, Beyer K.

Glucocerebrosidase gene variants are accumulated in idiopathic REM sleep behavior disorder.

Parkinsonism Relat Dis 2018, 50:94-98;
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.02.034>.

IF: 4.721, Quartil: 1

5. Gámez-Valero A, Canet-Pons J, Urbizu A, Anillo A, Santos C, Ariza A, Beyer K.

INDEL length and haplotypes in the b-synuclein gene: A key to differentiate dementia with Lewy bodies?

JAD 2018, 65:207-219; doi: 10.3233/JAD-180074. **IF: 3.731, Quartil: 2**

Dos manuscritos adicionales se han enviado para su publicación:

6. Gámez-Valero A, Campdelacreu J, Vilas D, Ispuerto L, Reñé R, Álvarez R, Armengol MP, Borràs FE, Beyer K.

microRNA profiles from plasma-derived Extracellular Vesicles differ between Alzheimer's disease and Dementia with Lewy bodies.

Enviat a: *Journal of Extracellular Vesicles*

7. Gámez-Valero A, Campdelacreu J, Reñé R, Beyer K, Borràs FE.

Comprehensive proteomic profiling of plasma-derived EVs from dementia patients points to gelsolin as differential biomarker.

Un tercer manuscrito se remitirá tras incrementarse el número de muestras:

8. Gámez-Valero A, Campdelacreu J, Vilas D, Ispuerto L, Gascón-Bayarri J, Reñé R, Álvarez R, Armengol MP, Borràs FE, Beyer K.

Can opposite platelet-derived hsa-miR-150-5p expression levels distinguish between dementia with Lewy bodies and Alzheimer disease?

4.2 CONGRESOS

1. Gámez-Valero A, Borràs FE, Beyer K.

MicroRNA signature from plasma-derived EVs for Lewy body dementia as promising non-invasive biomarker source.

7th Annual Meeting of the International Society for Extracellular vesicles; Barcelona (Spain), May **2018: PÓSTER**

2. Gámez-Valero A, Borràs FE, Beyer K.

Specific platelet microRNA signature for Dementia with Lewy bodies as promising biomarker.

Molecular Neurodegeneration Course Wellcome Genome Campus; Hinxton-Cambridge (UK), January **2018: PÓSTER**

3. Gámez-Valero A, Borràs FE, Beyer K.

Specific platelet microRNA signature for Dementia with Lewy bodies as promising biomarker.

Brain Disorders Conference; Madrid (Spain), November **2017: ORAL**

4. Gámez-Valero A, Carreras L, Monguió-Tortajada M, La Franquesa M, Beyer K, Borràs FE.

Isolation and characterization of Extracellular Vesicles isolated by SEC, PEG and PROSPR: A Comparative Study.

International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) Congress, Rotterdam (Netherlands), May **2016: PÓSTER**

5. Gámez-Valero A, Pérez-Roca L, Canet Pons J, Campdelacreu J, Reñé R, Ispuerto L, Katrin Beyer.

Beta-synuclein genotypes indicate increased risk to develop Lewy body pathology in the brain.

Genomics of Brain disorders Conference. Wellcome Genome Campus; Hinxton-Cambridge (UK), April **2016: PÓSTER**

6. Gámez-Valero A, Adame C, Beyer K.

Glucocerebrosidase Gene in Lewy Body Diseases.

16th Congress Spanish Society Neuroscience, Granada (Spain), September **2015: PÓSTER.**