

VESÍCULAS EXTRACELULARES Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN LA CLÍNICA DE LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Rocío Pérez González (perez_roc@isabial.es)

ISABIAL

RESUMEN

Las **vesículas extracelulares (EVs)** son nanopartículas secretadas por la mayoría de las células, constituidas por una bicapa lipídica que contienen proteínas, lípidos y ácidos nucleicos específicos de las células de origen [1]. Las diversas especies de vesículas extracelulares difieren en su origen (exosomas y microvesículas) y tipo celular (neuronal, astrogial, microglial u oligodendroglial), contemplándose varios tipos de EVs que pueden tener diferentes funciones [2]. Las EVs constituyen un material clave en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas ya que en neuronas con patología endosomal contribuyen a reducir la acumulación de material tóxico intracelular [3], transportan proteínas con tendencia a agregarse de manera patológica [4], y tienen la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica [5] alcanzando la periferia desde donde pueden aisladas y proporcionar información sobre el estado fisiopatológico de las células cerebrales.

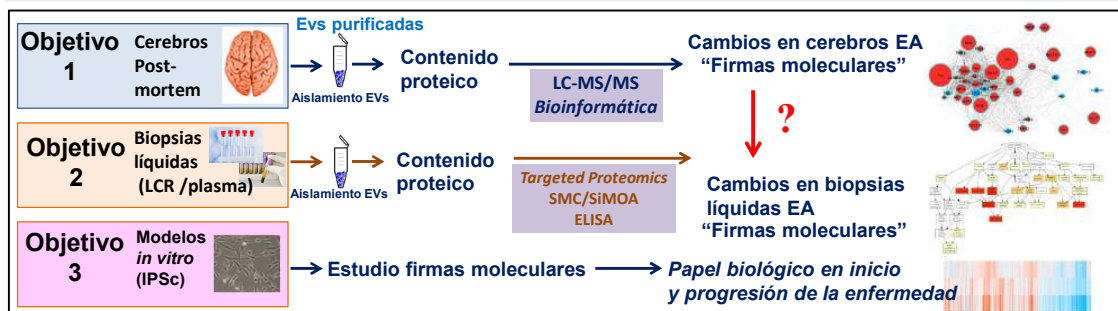
Partiendo de la **hipótesis central** de que los niveles de EVs y/o su contenido en el cerebro difieren entre pacientes de una enfermedad neurodegenerativa concreta y controles, el estudio de diferentes subtipos de EVs en cerebros *post-mortem* de pacientes permitirá la identificación de firmas específicas de la enfermedad. Estas firmas pueden encontrarse también en EVs presentes en líquido cefalorraquídeo (LCR) y en el torrente sanguíneo y actuar como marcadores subrogados de patología cerebral.

La identificación de firmas moleculares en EVs presentes en la periferia permitirá la mejora del diagnóstico y pronóstico de las enfermedades que cursan con neurodegeneración, así como el desarrollo de estrategias donde las EVs sean el material utilizado para evaluar la eficacia de las intervenciones terapéuticas (ensayos clínicos).

Referencias:

[1] van Niel, G., D'Angelo, G. & Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 213–228, doi:10.1038/nrm.2017.125 (2018). Shi, M., Sheng, L., Stewart, T., Zabetian, C. P. & Zhang, J. [2] New windows into the brain: Central nervous system-derived extracellular vesicles in blood. *Prog Neurobiol* 175, 96–106, doi:10.1016/j.pneurobio.2019.01.005 (2019). [3] Mathews, P. M. & Levy, E. Exosome Production Is Key to Neuronal Endosomal Pathway Integrity in Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci* 13, 1347, doi:10.3389/fnins.2019.01347 (2019). [4] Coleman, B. M. & Hill, A. F. Extracellular vesicles—Their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases. *Semin Cell Dev Biol* 40, 89–96, doi:10.1016/j.semcdb.2015.06.004 (2016). [5] Matsumoto, J., Stewart, T., Banks, W. A. & Zhang, J. The Transport Mechanism of Extracellular Vesicles at the Blood-Brain Barrier. *Curr Pharm Des* 23, 6206–6214 (2017).

PROYECTO AT A GLANCE: EVs EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)



APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL APLICABLE A OTRAS ENFERMEDADES QUE CURSAN CON NEURODEGENERACIÓN!

MÉTODOS

- Aislamiento de EVs de tejido cerebral congelado post-mortem (Fig. 1), líquido cefalorraquídeo (LCR, Fig. 2) y sangre (incluyendo inmunoprecipitación con marcadores específicos de células cerebrales)
- Análisis de proteínas para la identificación de firmas moleculares del estado de la enfermedad mediante LC-MS/MS (*shotgun proteomics*), proteómica dirigida, Western Blot, ELISA, ELISA digital (SiMOA)
- Correlación de niveles de expresión firmas moleculares con indicadores clínicos, neuropsicológicos y de neuroimagen (para facilitar diagnóstico, pronóstico y seguimiento en ensayos clínicos)
- Estudios funcionales *in vitro* (IPSc) para el estudio del papel biológico de las firmas moleculares identificadas

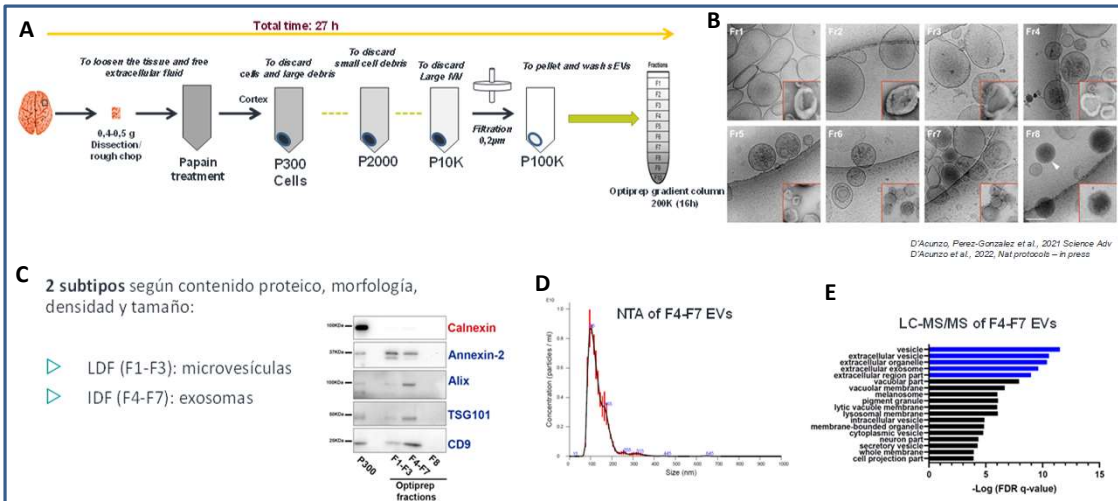


Figura 1. Aislamiento de EVs de tejido cerebral congelado post-mortem. A) Esquema del método basado en ultracentrifugación diferencial y purificación de alta resolución en gradiente de iodixanol. B) Imágenes de crió-EM mostrando vesículas intactas del tamaño esperado y limpias de restos celulares. Barra de calibración = 100 nm. C) Western blot análisis revela la presencia de dos tipos de EVs: microvesículas en las fracciones más ligeras (F1-F3) y exosomas en las fracciones más densas (F4-F7). D) Análisis de tamaño de partículas (NTA) mostrando que la mayoría de las vesículas tienen un tamaño medio de 100 nm de diámetro. Análisis "gene ontology" de los datos LC-MS/MS revelan la presencia de proteínas específicas de EVs en las preparaciones cerebrales.

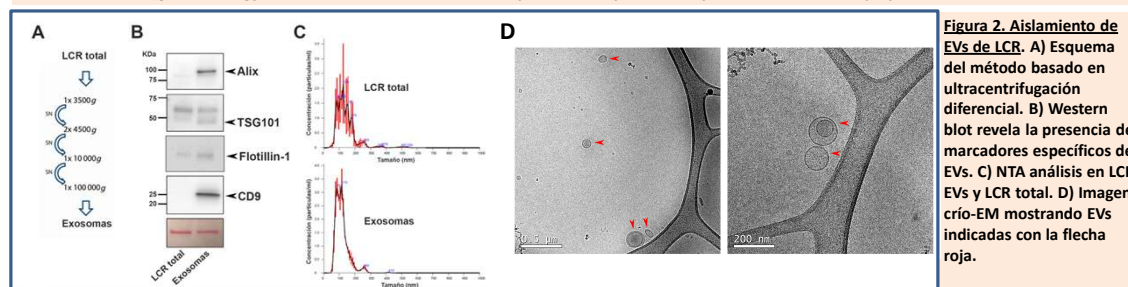


Figura 2. Aislamiento de EVs de LCR. A) Esquema del método basado en ultracentrifugación diferencial. B) Western blot revela la presencia de marcadores específicos de EVs. C) NTA análisis en LCR EVs y LCR total. D) Imagen crió-EM mostrando EVs indicadas con la flecha roja.