

|

UNIDAD DE EPIGENÉTICA

BIOPANEL EPIGENÉTICO

BIOPANEL EPIGENÉTICO

OBJETO

Analizar los niveles de metilación global del ADN, la expresión de distintos genes relacionados con procesos neurodegenerativos y la actividad de la enzima Sirtuina.

MÉTODO

Obtención del ADN a partir de leucocitos mediante purificación con columnas QIAamp DNA Blood Mini (QIAGEN). Cuantificación del ADN por espectrofotometría, en un Biofotómetro, a través de la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 260nm. Detección y cuantificación de los niveles de metilación global del ADN mediante el test colorimétrico MethylFlash Global DNA Methylation (5-mC) easy ELISA (EpiGentek).

Obtención del ARNm a partir de leucocitos mediante purificación con columnas miRNeasy Mini Kit (QIAGEN). Cuantificación del ARN por espectrofotometría, en un Biofotómetro, a través de la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 260nm. Retrotranscripción del ARN a ADNc con el kit High Capacity cDNA Detection (Life Technology). Amplificación mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de expresión de *BDNF*, *APOE*, *PICALM*, *OPRK1*, *LRRK2*, *ABCA7*, *PSEN1*, *SNCA*, *NRG1*, *MAPT* y *NTRK2* empleando la expresión de *GAPDH* como gen normalizador. Para ello se emplean sondas Taqman y TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied BioSystems), y la amplificación tiene lugar en un termociclador Step One Plus (Applied BioSystems). Análisis de resultados con el StepOne Software v2.2.2.

Obtención de proteínas nucleares a partir de leucocitos mediante extracción con el kit EpiQUICK Nuclear Extraction Kit (Epigentek). Cuantificación de la concentración de proteína mediante el método Bradford. Cuantificación de la actividad Sirtuina mediante el kit colorimétrico Epigenase Universal SIRT Assay kit (Epigentek).

RESULTADO METILACIÓN GLOBAL DEL ADN



Código	Nivel de metilación	% 5mC
230202	Hipometilación Moderada	2.81%

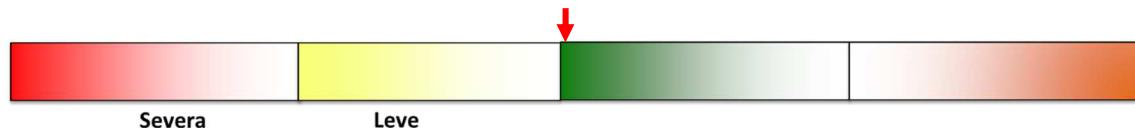
RESULTADO ACTIVIDAD SIRTUÍNA



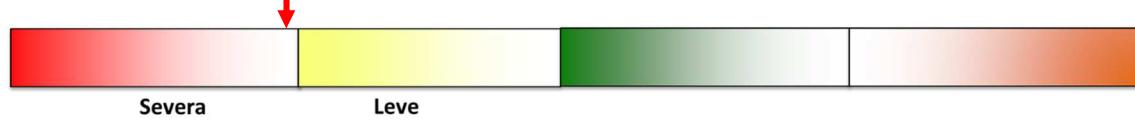
Código	Nivel de actividad	Valor de actividad
230202	Actividad Normal	0.108

RESULTADO EXPRESIÓN GÉNICA

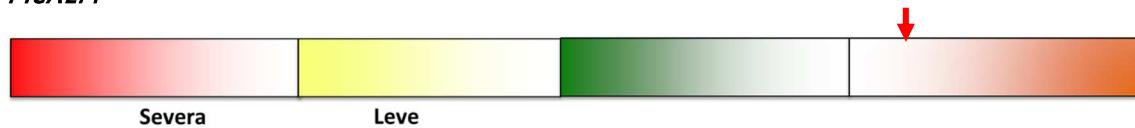
BDNF



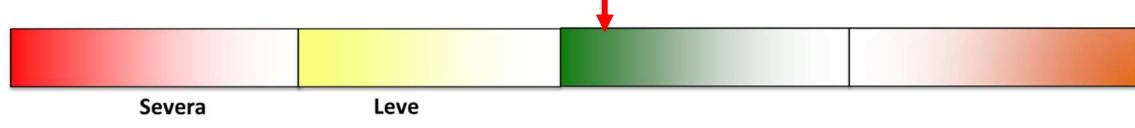
APOE



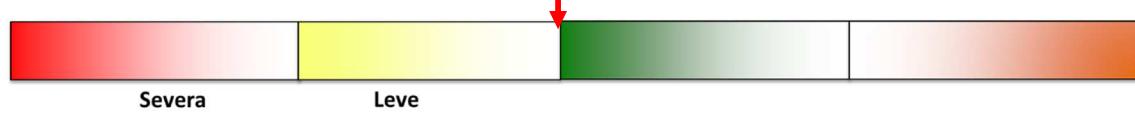
PICALM



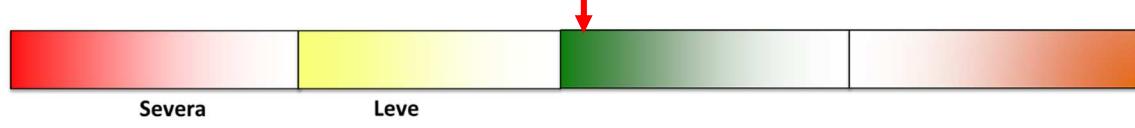
OPRK1

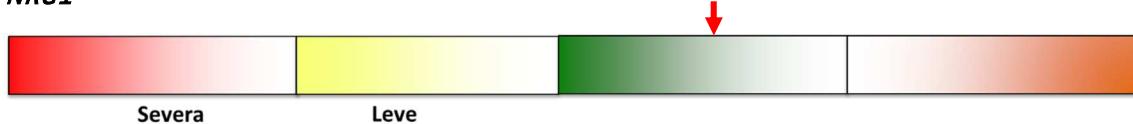
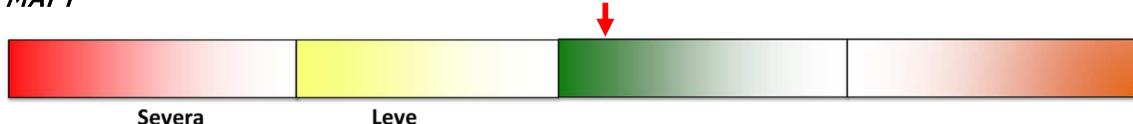
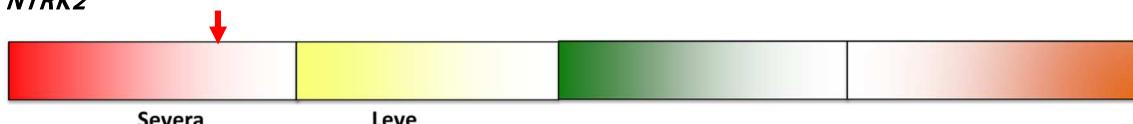
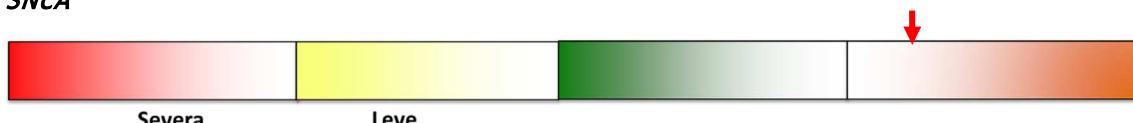
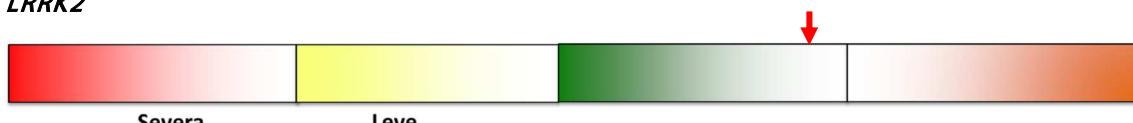


ABCA7



PSEN1



NRG1

MAPT

NTRK2

SNCA

LRRK2


GEN	EXPRESIÓN	Ct	GEN	EXPRESIÓN	Ct	GEN	EXPRESIÓN	CT
BDNF	NORMAL	31.96	ABCA7	BAJA	35.03	NTRK2	BAJA	37.63
APOE	BAJA	39.7	PSEN1	NORMAL	32.25	SNCA	ALTA	28.79
PICALM	ALTA	28.66	NRG1	NORMAL	34.91	LRRK2	NORMAL	29.1
OPRK1	NORMAL	44.16	MAPT	NORMAL	38.679			

CONCLUSIÓN

El perfil de metilación del ADN del paciente muestra un estado de hipometilación moderada. La expresión génica de *APOE*, *PICALM*, *ABCA7*, *NTRK2* y *SNCA* está alterada y la actividad de la enzima Sirtuina es normal. El paciente debe hacer seguimiento estricto de un plan terapéutico personalizado.



Médico solicitante:
Dr. RAMÓN CACABELOS GARCÍA
Col. 7699

Elaborado por:
Dra. Olaia Martínez Iglesias
Dpto. Epigenética Médica
Col. 20745-x
Fecha: 24/02/2025

RECOMENDACIONES

- Control y ajuste de medicamentos en curso.
- Análisis de sangre y normalización de parámetros alterados.
- Intervención terapéutica personalizada.
- Repetir el estudio a los 3 meses para monitorizar la respuesta a los tratamientos y pautas prescritos por su médico.

ANÁLISIS EPIGENÉTICO

La epigenética es la rama de la medicina que se encarga de estudiar cómo distintos factores externos y ambientales modifican la expresión de los genes, es la disciplina que conecta el ambiente con nuestra genética y permite explicar, por ejemplo, cómo dos gemelos genéticamente idénticos pueden desarrollar distintas patologías. El estilo de vida, los hábitos alimenticios, el estado de ánimo o el consumo de medicamentos provocan modificaciones químicas o estructurales en los genes que alteran su función, y provocan el inicio de procesos patológicos que a menudo no pueden detectarse con métodos clásicos de genética, bioquímica o imagen. Dichas alteraciones se utilizan como "biomarcadores epigenéticos" para el diagnóstico de enfermedades. Los biomarcadores más reconocidos son las alteraciones en el nivel de metilación del ADN. Altos niveles de metilación (hipermetilación) o niveles significativamente bajos (hipometilación) se relacionan con multitud de procesos patológicos. A pesar de que estas modificaciones en los genes son tejido-específicas, en muchas ocasiones, el deterioro celular o los procesos fisiológicos defectuosos promueven la liberación de ADN procedente de células dañadas o muertas a los fluidos periféricos, de manera que pueden detectarse de manera diferida en plasma sanguíneo, orina o saliva, lo que resulta mucho más factible para la práctica clínica rutinaria. Por tanto, el análisis del ADN libre circulante en fracción rica en linfocitos y plaquetas (buffy coat) ha recibido gran atención con fines diagnósticos.

ANÁLISIS DE LA METILACIÓN GLOBAL DEL ADN

Existen diversas modificaciones epigenéticas, si bien la mejor caracterizada es la metilación del ADN. La prueba epigenética metilación global del ADN en biopsia líquida consiste en el análisis de los niveles de metilación global en el ADN obtenido de muestras de linfocitos y plaquetas del paciente. Este porcentaje de metilación global es un biomarcador que ayuda al profesional médico en el diagnóstico y seguimiento de diversas enfermedades.

La metilación del ADN consiste en la adición covalente de un grupo metilo en el ADN convirtiendo la citosina en 5-metilcitosina. La 5-mC es una de las principales marcas epigenéticas que controla la expresión génica. El kit empleado para la determinación de la metilación global de ADN es robusto, sensible y presenta una gran especificidad en el reconocimiento de 5-mC frente a las citosinas no metiladas. Además, no reacciona con otras marcas epigenéticas como la hidroximetilación.

Potencialmente, la metilación global de ADN puede verse alterada en cualquier patología humana, lo cual la convierte en un excelente biomarcador epigenético para monitorizar la eficacia de cualquier intervención terapéutica.

La hipometilación del ADN desempeña un papel crucial en la neurodegeneración al influir en la expresión génica y contribuir a la patogénesis de enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson y otros trastornos neurodegenerativos. La reducción de los niveles globales de metilación en pacientes con enfermedades neurodegenerativas y la regulación a la baja del ARNm DNMT3a enfatizan aún más la importancia de la hipometilación del ADN como posible biomarcador diagnóstico de estas enfermedades.

ACTIVIDAD SIRTUÍNA

Las sirtuinas son desacetilasas de histona NAD-dependientes y desempeñan un papel fundamental en la regulación epigenética. Estas enzimas permiten la respuesta a situaciones de estrés oxidativo y retrasan los procesos de envejecimiento. Además, las Sirtuinas mejoran la memoria y capacidad intelectual. Su expresión y actividad se encuentra disminuida en personas con distintas patologías de carácter neurodegenerativo, tales como la enfermedad de Alzheimer o el Parkinson, entre otras. Además, también se observan niveles menores de Sirtuina en la sangre periférica de pacientes con desórdenes neurodegenerativos.

La prueba epigenética Actividad Sirtuina en biopsia líquida consiste en el análisis de los niveles de actividad enzimática de las sirtuinas en muestras de linfocitos y plaquetas del paciente. Estos niveles de actividad constituyen un biomarcador que ayuda al profesional médico en el diagnóstico y seguimiento de diversas enfermedades que afectan al sistema nervioso.

EXPRESIÓN GÉNICA

La prueba epigenética Expresión Génica en biopsia líquida consiste en el análisis de los niveles de expresión de ARNm de 11 genes fundamentales en enfermedades Neurodegenerativas en muestras de linfocitos y plaquetas del paciente. Estos niveles de expresión constituyen un biomarcador que ayuda al profesional médico en el diagnóstico y seguimiento de diversas enfermedades que afectan al sistema nervioso. Los genes analizados son los siguientes:

- BDNF (Factor neurotrófico derivado del cerebro) es la neurotrofina mejor estudiada y desarrolla un papel fundamental en la homeostasis del cerebro, manteniendo el correcto funcionamiento neuronal. Su expresión se encuentra reducida en personas con distintas patologías del sistema nervioso tales como la depresión, el autismo, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Alzheimer, entre otras. La expresión de *BDNF* no sólo se encuentra disminuida en el cerebro de personas con este tipo de desórdenes, sino que también se observan niveles menores de *BDNF* en la sangre periférica de pacientes con enfermedad de Alzheimer o Parkinson.
- APOE (Apolipoproteína E) es una proteína multifuncional que desempeña un papel principal en el metabolismo lipídico. Tanto la expresión como los polimorfismos genéticos de *APOE* están conectados con enfermedades neurológicas o neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, ictus y otras enfermedades del sistema nervioso y vascular.
- PICALM (Proteína de ensamblaje de clatrina de unión a fosfatidilinositol) desempeña un papel fundamental en la endocitosis mediada por clatrina, importante en procesos como la internalización de receptores celulares, la transmisión sináptica o la eliminación de células apoptóticas. Se ha descrito su asociación con diversas patologías neurodegenerativas como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer, donde se han detectado mayores niveles de expresión de este gen en pacientes con dicha patología.

- OPRK1 (Receptor de opioides K) desempeña un papel fundamental en las funciones cognitivas y de aprendizaje. Se ha descrito la hipermetilación del promotor de *OPRK1* y la consecuente reducción de su expresión en pacientes con la enfermedad de Alzheimer.
- ABCA7 (Casete de unión a ATP, subfamilia A, miembro 7) participa en la salida de lípidos de las células a las partículas de lipoproteínas y regula el procesamiento, secreción y eliminación de APP (proteína precursora amiloidea). La metilación de distintos sitios CpG de *ABCA7* condicionan la correcta expresión de este gen modificando así el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.
- PSEN (Presenilina) juega un papel fundamental en la digestión del péptido β - amiloide ($A\beta$). La presencia de mutaciones en este gen son la principal causa de la enfermedad de Alzheimer hereditaria. Esto es debido a que conllevan la pérdida de función del gen, bien originada por una mutación o por una disminución en su expresión, produciendo de esta forma una digestión incompleta de $A\beta$ que contribuiría a una mayor vulnerabilidad cerebral, explicando de este modo la sintomatología temprana de la forma hereditaria de la enfermedad de Alzheimer.
- NRG1 (Neurregulina 1) juega un papel clave en la función cognitiva y a la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer. Recientemente se ha descrito que la expresión de *NRG1* se encuentra disminuida en buffy coat de pacientes con distintos tipos de demencia, así como en pacientes con enfermedad de Parkinson.
- MAPT (Proteína Tau asociada a microtúbulos) es fundamental en los procesos de ensamblaje y la estabilización de los microtúbulos, los cuales ayudan a las células a mantener su forma, contribuyen al proceso de división celular y son esenciales para el transporte de materiales dentro de las células. Las mutaciones del gen *MAPT* se han asociado con mayor riesgo de desarrollar trastornos neurodegenerativos como la enfermedad Alzheimer y Parkinson. Además, la expresión de *MAPT* disminuye en pacientes con enfermedad de Alzheimer y aumenta en pacientes con enfermedad de Parkinson.
- NTRK2 (receptor neurotrófico tirosina quinasa 2) interviene en diversos procesos, como la vía de señalización del BDNF (receptor del factor neurotrófico derivado del cerebro), el desarrollo del sistema nervioso y la señalización transináptica, modulando la transmisión sináptica. También es clave en varios procesos, como la neurogénesis, la propagación del potencial de acción neuronal y la regulación positiva de la fosforilación de peptidil-serina. Existe una correlación entre la presencia de distintos polimorfismos genéticos en *NTRK2* y la enfermedad de Alzheimer.
- SNCA (alfa sinucleína) contribuye a la formación de fibras de amiloide beta y proteína Tau, dos proteínas claves en la enfermedad de Alzheimer, sugiriendo el papel clave de la toxicidad causada por SNCA en los procesos neurodegenerativos. En pacientes con enfermedad de Parkinson esta proteína se acumula en grupos llamados cuerpos de Lewy, característicos de esta enfermedad.
- LRRK2 (quinasa repetida rica en leucina 2) está presente en la sinapsis y se asocia y/o fosforila a muchas otras proteínas implicadas en la endocitosis y el tráfico de vesículas. Distintas mutaciones en este gen se asocian con la enfermedad de Parkinson, tanto en su forma familiar como idiopática.

REFERENCIAS

- Martínez-Iglesias, O.; Naidoo, V.; Carril, J.C.; Seoane, S.; Cacabelos, N.; Cacabelos, R. Gene Expression Profiling as a Novel Diagnostic Tool for Neurodegenerative Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24.
- Martínez-Iglesias O, Naidoo V, Cacabelos N, Cacabelos R. Epigenetic Biomarkers as Diagnostic Tools for Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci.* 2021; ;23:13.
- Martínez-Iglesias O, Carrera I, Carril JC, Fernández-Nova L, Cacabelos N, Cacabelos R. DNA Methylation in Neurodegenerative and Cerebrovascular Disorders. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 23;21(6):2220.
- Martínez-Iglesias O, Naidoo V, Corzo L, Pego R, Seoane S, Rodríguez S, Alcaraz M, Muñiz A, Cacabelos N, Cacabelos R. DNA Methylation as a Biomarker for Monitoring Disease Outcome in Patients with Hypovitaminosis and Neurological Disorders. *Genes (Basel).* 2023 Jan 30;14(2):365.
- Cacabelos R, Tellado I and Cacabelos P. The epigenetic machinery in the life cycle and pharmacogenetics. In: Cacabelos R, editor. *Pharmacogenetics.* London: Academic Press/Elsevier; 2019; 1-100.
- Cacabelos R. Pathogenetics: the role of epigenetic biomarkers in disease pathogenesis. In: Cacabelos R, editor. *Pharmacogenetics.* London: Academic Press/Elsevier; 2019; 139-189.
- Cacabelos R, Carril JC, Sanmartin A and Cacabelos P. Pharmacogenetic processors: epigenetic drugs, drug resistance, toxicogenetics, and nutriogenetics. In: Cacabelos R, editor. *Pharmacogenetics.* London: Academic Press/Elsevier; 2019; 191-424.
- Cacabelos R. Epigenetics and pharmacogenetics of neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders In: Cacabelos R, editor. *Pharmacogenetics.* London: Academic Press/Elsevier; 2019; 609-704.
- Cacabelos R, Cacabelos P and Carril JC. Epigenetics and pharmacogenetics of age-related neurodegenerative disorders In: Cacabelos R, editor. *Pharmacogenetics.* London: Academic Press/Elsevier; 2019; 903-950.
- Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat. Rev. Genet.*; 2005; 6:597-610.
- Lehmann-Werman R, Neiman D, Zemmour H, Moss J, Magenheimer J, Vaknin-Dembinsky A, et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016; 113(13):E1826-1834.
- Mittra I, Nair NK, Mishra PK. Nucleic acids in circulation: are they harmful to the host? *J. Biosci.*;2012; 37(2):301-312.
- Di Francesco A, B, Falconi A, Micioni Di Bonaventura MV, Karimi M, Mari D, et al. Global changes in DNA methylation in Alzheimer's disease peripheral blood mononuclear cells. *Brain Behav Immun.*; 2015; 45:139-144.
- Fransquet P, Lacaze P, Saffery R, McNeil J, Woods R and Ryan J. Blood DNA methylation as a potential biomarker of dementia: A systematic review. *Alzheimers Dement.* 2018 Jan; 14(1): 81-103.
- Giacobbo B.L, Doorduin J, Klein H.C, Dierckx R.A, Bromberg E, de Vries E.F. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Mol Neurobiol.* 2019; 56(5):3295-3312.
- Chen S.D, Wu C.L, Hwang W.C, Yang D.I. More Insight into BDNF Neurodegeneration: Anti-Apoptosis, Anti-Oxidation, and Suppression of Autophagy. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(3):545.
- D'Amato L.C, Speranza L, Volpicelli F. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological functions and therapeutic potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020; 21, 7777.
- Zeeni N, Haidar E.A., Azar A, Ghannem A et al. The combinatory effects of diet and exercise on BDNF expression. *The FASEB J.* 2017; 31:150.8.
- Siang Ng T.K, Ho C, Tam W, Kua E, Ho R. Decreased serum Brain-Derived Neurotrophic factor (BDNF) levels in patients with Alzheimer's disease (AD): A systematic review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(2):257.
- Jiang L, Zhang H, Wang C, Ming F, Shi X, Yang M. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in parkinson's disease: a meta-analysis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biology Psychiatry.* Elsevier. 2019; Vol 88:168-174.
- Cacabelos R, Carril J.C, Cacabelos N, Kazantsev A.G, Vostrov A.V, Corzo L, Cacabelos P, Goldgaber D. Sirtuins in Alzheimer's Disease: SIRT2-Related genophenotypes and implications for pharmacogenetics. *Int J Mol Sci.* 2019; 20:1249.
- Li X, Feng Y, Wang X.X, Truong D, Wu Y.C. The critical role of SIRT1 in Parkinson's disease: mechanism and therapeutic considerations. *Aging and Disease.* 2020; 11:1608:1622.
- Graboeska W, Sikora E, Bielak-Zmijewska A. Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process. *Biogerontology.* 2017; 18:447-476.
- Outeiro T.F, Donmez G. SIRT1 and SIRT2: emerging targets in neurodegeneration. *EMBO Mol Medicine.* 2013; 5:344-352.
- Yin Y; Wang Z. ApoE and Neurodegenerative Diseases and Aging. *Adv Exp Med Biol.*; 2018, 1086:77-92.
- Kumon H; Yoshino Y.; Fanahashi Y.; Mori H.; Uena M. et al. PICALM mRNA expresión in the blood of patients with neurodegenerative diseases and geriatric depression. *J Alzheimers Dis.*; 2021; 79:1055-1062.
- Ji H.; Wang Y.; Liu G.; Xu X.; Sai D. et al. OPRK1 promoter hypermethylation increases the risk of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2015, 606:24-29.
- De Roeck A, Van Broeckhoven C, Sleegers K. The role of ABCA7 in Alzheimer's disease: evidence from genomics, transcriptomics and methylomics. *Acta Neuropathol.* 2019, 138:201-220.
- De Strooper B. Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Rep.* 2007;8:141-6.
- Cailliet-Boudin M.-L, Buée L, Sergeant N, Lefebvre B. Regulation of human MAPT gene expression. *Mol. Neurodegener.* 2015;10:28.
- Tobin J.E., Latourelle J.C., Lew M.-F., Klein C., Suchowersky O., Shill H.A., Golbe L.I., Mark M.H., Growdon J.H., Wooten G.F. Haplotypes and gene expression implicate the MAPT region for Parkinson disease: The GenePD Study. *Neurology.* 2008;71:28-34.
- Chen, Z., Simmons, M.S., Perry, R.T., Wiener, H.W., Harrell, L.E. and Go, R.C.P. (2008), Genetic Association of Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor Type 2 (*NTRK2*) With Alzheimer's Disease. *Am. J. Med. Genet.*, 147B: 363-369.
- Wong YC, Krainc D. α -synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2017 23:1-13.
- Stefanis L. α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 2:a009399.
- Tsika, E., Moore, D.J. Mechanisms of LRRK2-Mediated Neurodegeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2012, 12: 251–260.