

EXOGAG, el nuevo método de aislamiento de Vesículas Extracelulares y Glicoproteínas, que desenmascara biomarcadores y un nuevo mecanismo molecular en enfermedad renal.

M. Vizoso González¹; S. Bravo López²; O. Lamas González¹; C. Vázquez³; M. Fidalgo³; C. Díaz Rodríguez³; MA. García González^{1,4}
martavizoso@unizg.es¹; Nephrology Laboratory, IDIS²; Proteomic Platform, IDIS³; Nephrology Service, CHUS⁴; Genomic Medicine Foundation Group, Santiago de Compostela (SPAIN)

INTRODUCCIÓN

Los glicosaminoglicanos (GAGs) son grandes polisacáridos que interactúan mediante enlaces glicosídicos con proteínas y lípidos, formando la matriz extracelular; o con proteínas secretadas, como la uromodulina. La glicosilación está alterada en diferentes patologías, como las enfermedades renales. Los GAGs también están presentes en las vesículas extracelulares (VEs), estructuras nanométricas delimitadas por una bicapa lipídica que las células liberan y cuya carga (RNA/miRNA, DNA y proteínas) es esencial en la comunicación intercelular. Nuestro grupo ha desarrollado un método para el aislamiento de GAG sulfatados, glicoproteínas y VEs en cualquier muestra biológica, llamado ExoGAG® (Nexotech), que nos ha llevado a identificar y caracterizar nuevos mecanismos de señalización, y a identificar nuevos biomarcadores de pronóstico/diagnóstico, por ejemplo, en la enfermedad renal poliquística (PKD).

MATERIAL Y MÉTODOS

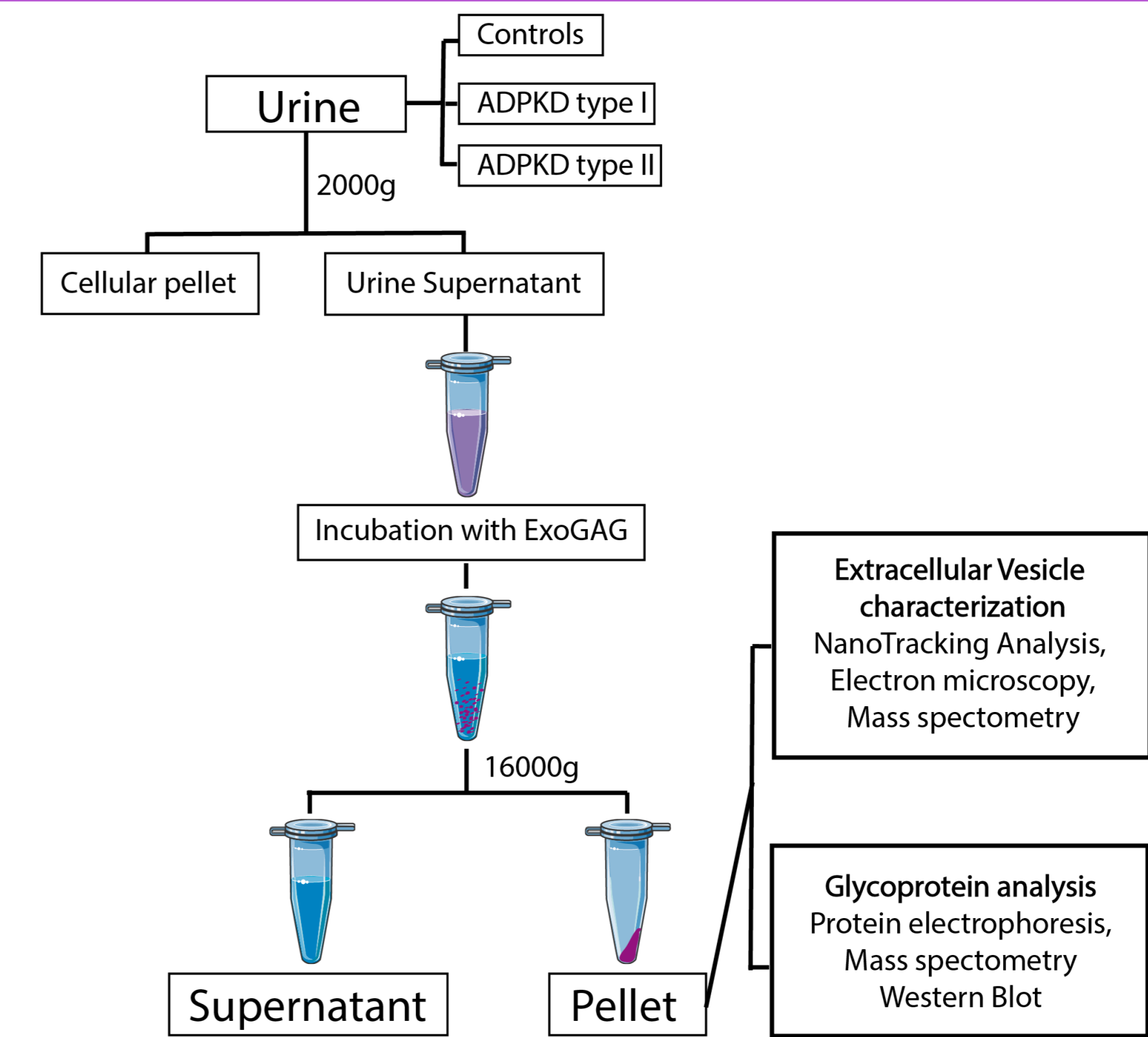


Figura 1. Representación esquemática del flujo de trabajo con ExoGAG.

RESULTADOS

Caracterización de las Vesículas Extracelulares del complejo GAG-glicoproteínas-VEs

Microscopía Electrónica de Transmisión

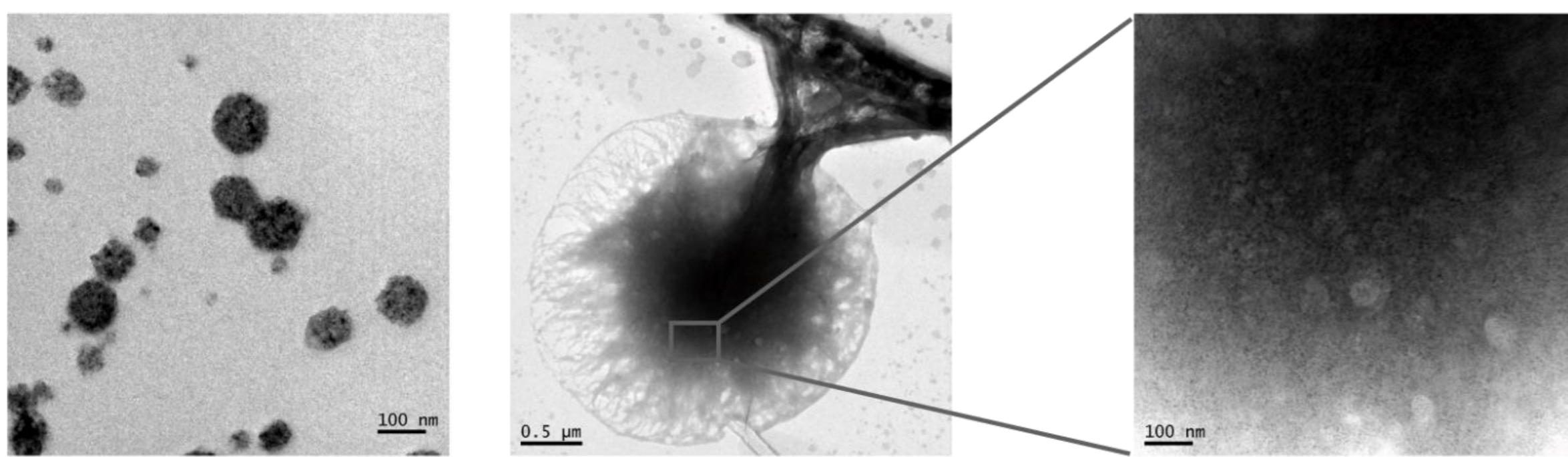


Figura 2. Imágenes de TEM del complejo GAG-glicoproteína-VEs, donde se encuentran Vesículas de manera individual y formando un complejo de las mismas.

NanoTracking Analysis®

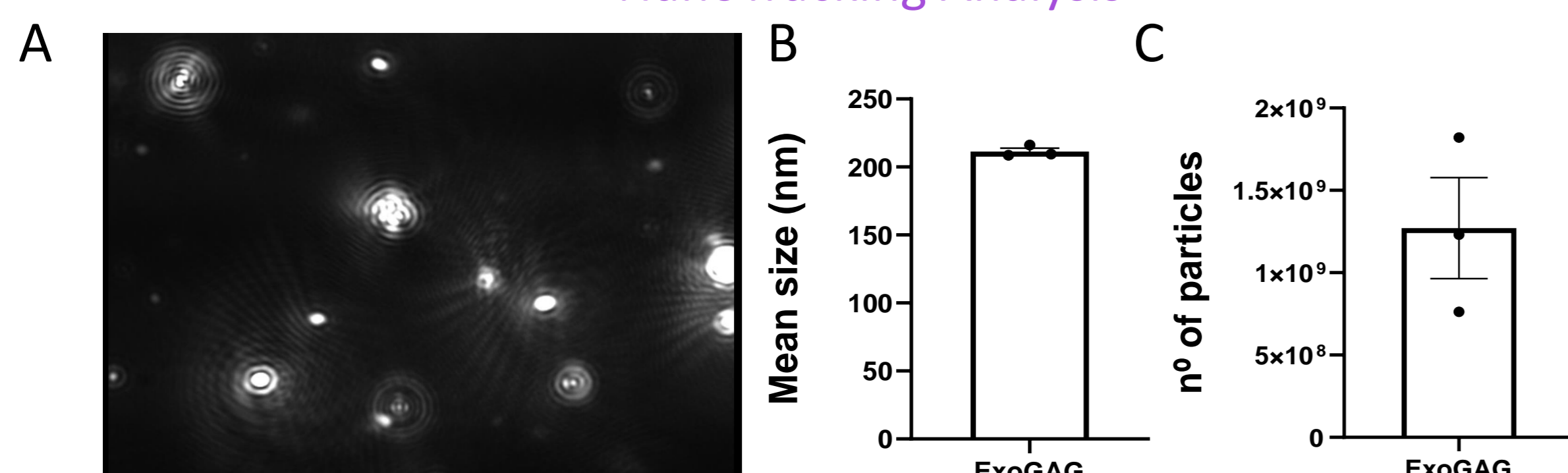


Figura 3. NTA de las VEs aisladas por ExoGAG. A. Captura del video de las partículas. B y C. Tamaño medio (210nm) y número de partículas (10⁹) por 1mL de pellet.

Exoview®

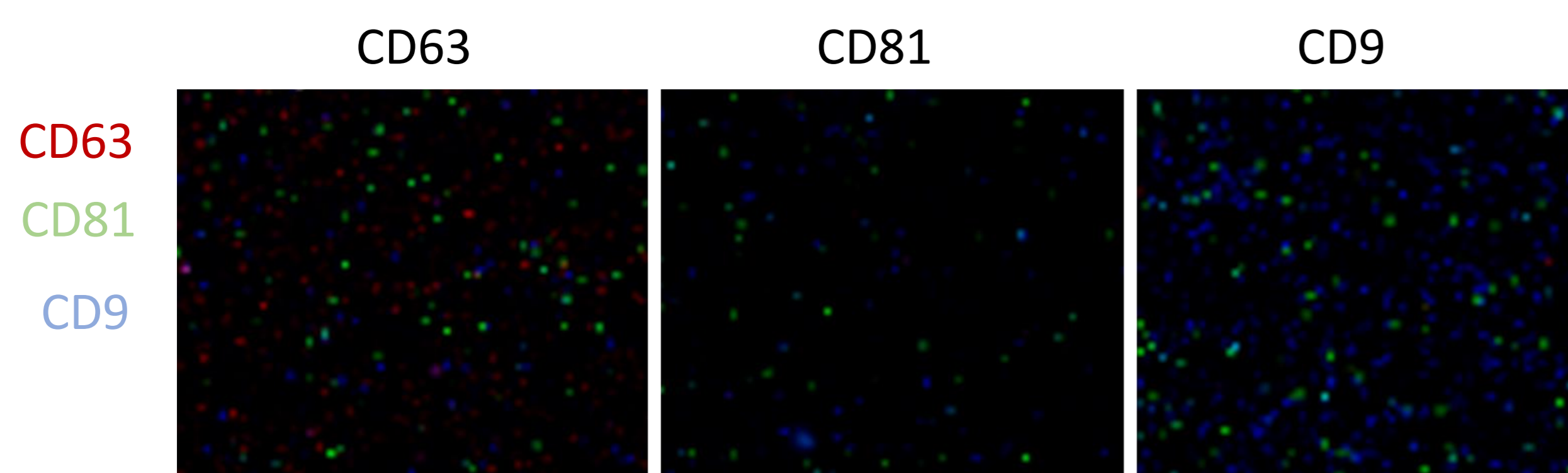


Figura 4. Análisis mediante Exoview® para la captura y marcaje de las Tetraspaninas (CD63, CD81 y CD9). Esto demuestra que hay vesículas positivas para estas Tetraspaninas, con único, doble y triple marcaje positivo

Mass spectrometry sequencing

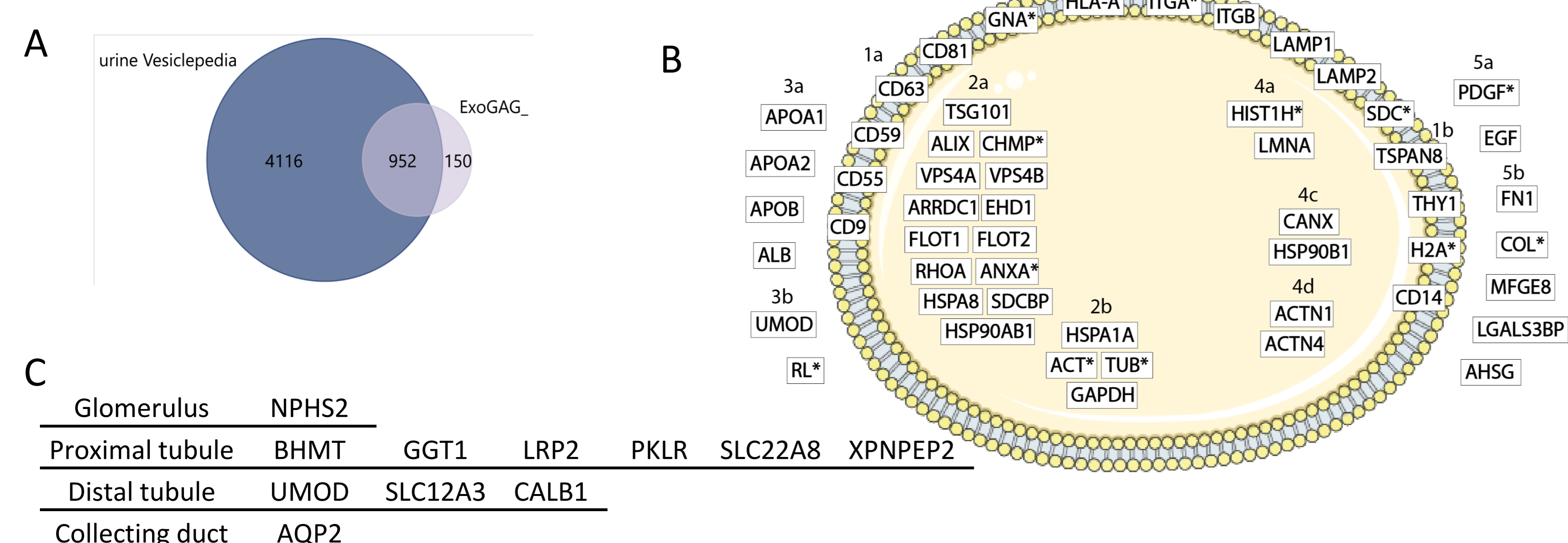


Figura 5. Caracterización proteica por espectrometría de masas. A. Más del 85% del proteoma de ExoGAG se comparte con la Vesiclepedia de orina (FUNRICH). B. Representación esquemática de los marcadores de EVs según la guía MISEV2018. C. Marcadores de segmentos específicos de la nefrona identificados, mostrando que podemos aislar vesículas de cada parte de la nefrona; según el proteoma específico del riñón del Human Protein Atlas.

Análisis de las Glicoproteínas del complejo GAG-glicoproteínas-VEs

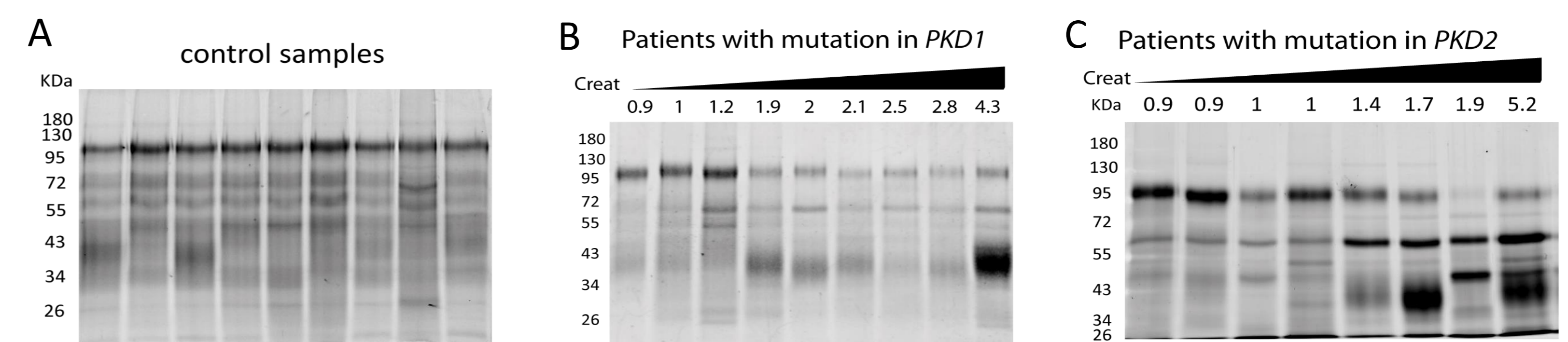


Figura 7. Se observa un patrón constante en población control (A), aunque este perfil se ve alterado con la presencia de una patología (B y C). Este cambio depende de la función renal, siendo más extremo en los estadios más severos (niveles de creatinina, CREAT). Esta variación en el perfil es característica de la enfermedad, como se puede observar entre los pacientes con mutación en PKD1 (B) y PKD2 (C), donde aparece un cambio más pronunciado. La secuenciación de estas bandas alteradas nos llevó a la identificación de nuevos biomarcadores que pueden anticiparse a los actuales.

Validación por Western blot

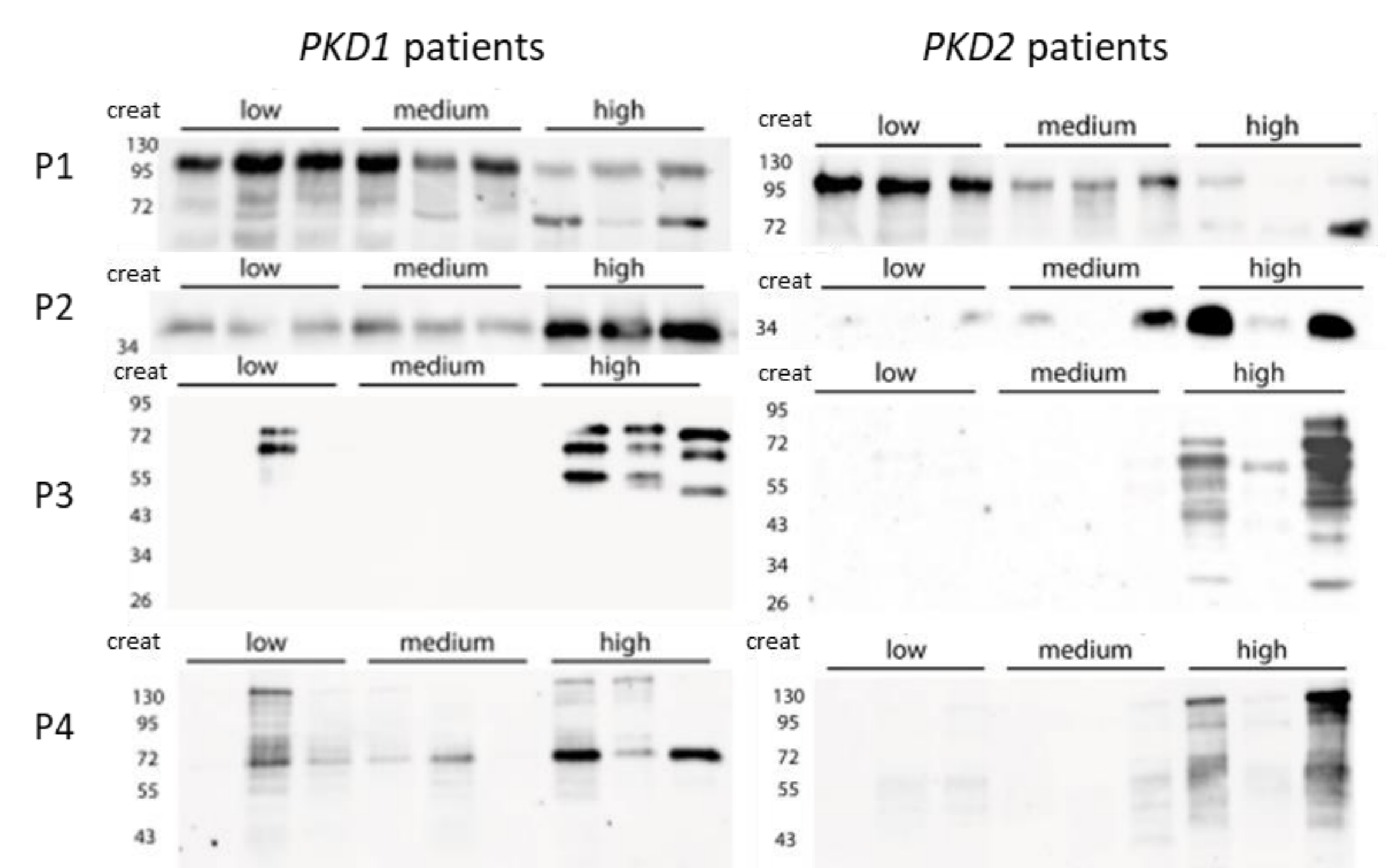


Figura 8. Validación de los posibles biomarcadores en pacientes con mutación en PKD1 y PKD2 por Western Blot. Los marcadores protegidos 1 (P1), 2 (P2), 3 (P3) y 4 (P4) muestran diferencias en abundancia a lo largo de la enfermedad, incluso con diferencias entre los pacientes PKD1 y PKD2.

CONCLUSIONES

- ✓ ExoGAG nos ha permitido identificar biomarcadores de pronóstico/diagnóstico de enfermedades renales, basados en el perfil glicoproteico y vesicular.
- ✓ Asimismo, identificamos nuevos mecanismos de señalización de la nefrona, lo que nos permite una mejor comprensión de la fisiopatología renal.
- ✓ Estos resultados demuestran el potencial como método de aislamiento de EVs para su uso en la investigación de nuevas vías de comunicación celular o mecanismos celulares.