
This is the **published version** of the master thesis:

Fernández Aixalà, Kilian; Canalias Reverter, Francesca , dir.; Beyer, Katrin , dir. ¿Los cambios en la función de las plaquetas contribuyen al desarrollo de la demencia con cuerpos de Lewy?. 2025. 31 pag. (Màster Universitari en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina)

This version is available at <https://ddd.uab.cat/record/320184>

under the terms of the  license

¿Los cambios en la función de las plaquetas contribuyen al desarrollo de la demencia con cuerpos de Lewy?

Instituto de Investigación Germans Trias i Pujol (IGTP):
Genómica y Transcriptómica de las Sinucleinopatías (GTS)

Alumno: Kilian Fernández Aixalà

Tutor/a de prácticas del IGTP: Katrin Beyer

Tutor/a de prácticas UAB: Francesca Canalias

Resumen

Dementia with Lewy bodies (DLB) is a neurodegenerative disorder that shares clinical features with Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD), making differential diagnosis challenging. This study analyzes the expression of genes related to synaptic function and platelet activation in both the temporal cortex and platelets, with relevance to DLB.

The genes SRC, GNB5, CYBB, CD9, DGKE, and P2RY12 were evaluated using qPCR, applying the $\Delta\Delta C_t$ method and statistical tests (Mann-Whitney). The results showed significant overexpression of GNB5 in the brains of DLB and PD cases, possibly as an adaptive response to synaptic dysfunction. SRC was overexpressed only in the brains of PD/PDD cases, but showed a significant increase in platelets across all pathological groups, especially in PD and DLB, suggesting possible compensatory peripheral regulation.

Additionally, P2RY12 and CYBB were exclusively expressed in the brains of DLB cases, indicating a characteristic neuroinflammatory profile. In platelets, CD9 showed elevated expression in PD and a trend toward increase in AD and DLB, while GNB5 and CYBB did not show significant alterations.

These findings support the hypothesis of differential regulation between brain and platelets in DLB and point to SRC as a potential peripheral biomarker. Further studies with larger sample sizes and expanded gene panels are recommended to strengthen these findings.

Listado de palabras abreviadas

AD: Alzheimer Disease; Enfermedad de Alzheimer

cDNA / ADNc: deoxyribonucleic complementary acid; ácido desoxirribonucleico complementario

APOE: Apolipoprotein E; apolipoproteína E

DAG: Directed Acyclic Graph; Diacilglicerol

DAT: Dopamine transporter; Transportador de dopamina

DEPC: diethyl pyrocarbonate; pirocarbonato de dietilo

DLB: Dementia with Lewy bodies; Demencia con cuerpos de Lewy

dNTPS: Deoxynucleotide Triphosphates; desoxinucleótidos trifosfato

cDLB: common dementia with Lewy bodies; Demencia con cuerpos de Lewy común

pDLB: pure dementia with Lewy bodies; Demencia con cuerpos de Lewy pura

GPCRs: G protein-coupled receptors; Receptores acoplados a la proteína G

GTS: Genómica y Transcriptómica de las Sinucleinopatías

IGF-1: Insulin-like Growth Factor 1

LB: Lewy body; Cuerpo de Lewy

mRNA / ARNm: Messenger ribonucleic acid; Ácido ribonucleico mensajero

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NMDA: N-methyl-D-aspartate receptor; receptor N-metil-D-aspartato

PD: Parkinson Disease; Enfermedad de Parkinson

PDD: Parkinson Disease dementia ; Enfermedad de Parkinson con demencia

PET : Positron emission tomography; Tomografía por emisión de positrones

PF4: Platelet factor 4 ;Factor plaquetario 4

PCR: Polymerase Chain Reaction; Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction; Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

PSG: Polysomnography; Polisomnografía

PTLs: Platelets; Plaquetas

RBD: REM sleep behavior disorder; Trastorno del comportamiento del sueño REM

ROS: Reactive Oxygen Species / Especies Reactivas del Oxígeno

SARS-CoV-2: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2; Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor; Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

α -syn: Alpha-synuclein; alfa-sinucleína

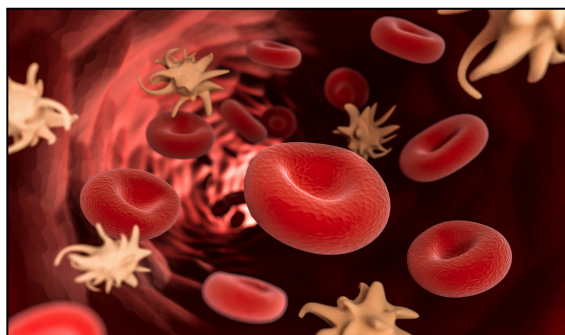


Figura 1. Representación visual de la actividad plaquetaria en el torrente sanguíneo.
Fuente: crc891.com/nacionales/hospital-san-juan-de-dios-requiere-donantes-de-plaquetas

Índice

1.	Introducción.....	6
1.1.	La demencia con cuerpos de Lewy: Definición y características clínicas	6
1.2.	Fisiopatología compartida y diferenciada con el Alzheimer y Parkinson	8
1.3.	Las plaquetas: concepto general y sus roles.....	9
1.4.	Evidencia emergente: plaquetas como vínculo funcional entre la sangre y el cerebro.....	12
1.4.1.	Activación plaquetaria y neuroinflamación.....	13
1.4.2.	Citoquinas plaquetarias y neurogénesis.....	13
1.5.	Estudios preliminares del grupo investigador: activación plaquetaria alterada en DLB.....	14
1.5.1.	Relación entre los genes seleccionados y la activación plaquetaria alterada en DLB.....	15
1.6.	Relevancia del perfil de expresión génica.....	17
2.	Hipótesis.....	18
3.	Objetivos.....	18
3.1.	Objetivos principales.....	18
3.2.	Objetivos específicos.....	18
4.	Metodología.....	19
4.1.	Selección de muestras.....	19
4.2.	Retrotranscripción y síntesis de ADNc.....	19
4.3.	Estandarización de PCR.....	20
4.4.	Análisis de datos: método $\Delta\Delta Ct$	22
4.5.	Análisis estadístico.....	22
5.	Resultados.....	22
5.1.	Análisis de expresión génica en cerebros.....	22
5.2.	Análisis de expresión génica en plaquetas (PLTs).....	25
6.	Discusión.....	26
6.1.	Expresión génica en tejido cerebral: especificidad regional y patológica	26
6.2.	Expresión génica en plaquetas: reflejo periférico de la neurodegeneración	27
6.3.	Implicaciones para la comprensión de la DLB y desarrollo de biomarcadores	28
7.	Conclusiones.....	28
8.	Bibliografía.....	29
9.	Anexos.....	31

1. Introducción

Para establecer un diagnóstico clínico válido, es fundamental, en primer lugar, identificar con precisión el tipo de patología que presenta el paciente. Un conocimiento temprano y exacto de la enfermedad permite orientar adecuadamente las decisiones terapéuticas, seleccionar el tratamiento más idóneo en función del estado clínico del individuo y optimizar así el pronóstico y la calidad de vida del paciente.

En este caso, la patología abordada en esta investigación es la demencia con cuerpos de Lewy (DLB), tratándose de la segunda demencia patológica con mayor mortalidad en el mundo. Aunque se desconozca su origen se han considerado, hasta el momento, diferentes factores de riesgo como la edad del paciente y la heredabilidad (Outeiro et al., 2019). Los pacientes que presentan esta enfermedad suelen presentar acumulaciones anormales de alfa-sinucleína, proteína relacionada en diferentes procesos sinápticos (McKeith et al., 2017).

Actualmente para saber si una paciente presenta esta enfermedad, se suele emplear la técnica de DatScan. Pero a pesar de los últimos avances científicos todavía no se tiene un consenso real de su diagnóstico diferencial (McKeith et al., 2017). Para poder establecerlo, se requiere urgentemente la identificación de biomarcadores específicos para así mejorar el diagnóstico de los pacientes y los respectivos tratamientos. Este desafío se enfrenta a múltiples limitaciones que dificultan la obtención de un diagnóstico diferencial preciso. Un ejemplo es el solapamiento sintomatológico que presenta la DLB con las enfermedades de Alzheimer (AD) y Parkinson (PD) (Outeiro et al., 2019).

Además, existen menos herramientas estandarizadas y recursos destinados a la comprensión de esta enfermedad en comparación con otros tipos de demencia, como el Alzheimer, que presenta una mayor prevalencia y, por lo tanto, mayor atención clínica e investigadora. De hecho, según la Organización Mundial de la salud (World Health Organization, 2024), la enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia, representando entre el 60 % y el 70 % de los casos a nivel mundial.

1.1.- La demencia con cuerpos de Lewy: Definición y características clínicas

Para comprender correctamente esta enfermedad (DLB), es necesario partir de una definición general de demencia. Según McKeith et al. (2017), la demencia se define como *"un deterioro cognitivo progresivo de magnitud suficiente como para interferir con*

las funciones sociales u ocupacionales normales, o con las actividades cotidianas habituales”.

Conociendo ya la definición general de demencia, resulta fundamental precisar la definición más actual y específica de la DLB, a fin de comprender sus particularidades clínicas y diagnósticas. La DLB se define como *“un trastorno neurodegenerativo asociado a la edad que provoca un deterioro cognitivo progresivo que interfiere con la vida normal y las actividades diarias”* (Outeiro et al., 2019).

La DLB representa uno de los principales subtipos de demencia neurodegenerativa y se caracteriza por una combinación de síntomas cognitivos, conductuales, motores y del sueño. Entre las manifestaciones clínicas más relevantes destacan:

- **Fluctuaciones cognitivas y de la atención:** episodios espontáneos de variación en el nivel de alerta, atención o coherencia del pensamiento, que se manifiestan clínicamente como cambios en el estado de conciencia, discurso incoherente o periodos de desconexión intermitente (McKeith et al., 2017).
- **Alucinaciones visuales recurrentes y complejas:** presentes en hasta un 80 % de los pacientes, suelen ser vívidas, bien formadas y percibidas como reales por el paciente (McKeith et al., 2017).
- **Parkinsonismo:** se observa la aparición de bradicinesia (lentitud anormal en el movimiento), generalmente acompañada de rigidez muscular, temblor en reposo o ambos, en ausencia de una causa secundaria evidente (McKeith et al., 2017).
- **Trastorno del comportamiento del sueño REM:** considerado un marcador precoz de la enfermedad, este trastorno se manifiesta por la pérdida de la atonía muscular durante el sueño REM, lo que permite la ejecución de los sueños mediante movimientos o vocalizaciones, a menudo violentas o abruptas (McKeith et al., 2017).

Estas características clínicas, cuando se presentan en combinación, permiten establecer el diagnóstico de probabilidad de DLB y diferenciarla de otros tipos de demencia, especialmente de la enfermedad de Alzheimer y el Parkinson. Es importante recalcar que en la actualidad persiste la dificultad de establecer un diagnóstico claro y

conciso de dicha enfermedad, a pesar de los últimos avances y aproximaciones dentro de la comunidad científica.

1.2.- Fisiopatología compartida y diferenciada con el Alzheimer y Parkinson

Las enfermedades neurodegenerativas tradicionalmente se han clasificado como entidades clínicas y patológicas bien definidas. Sin embargo, en las últimas décadas ha emergido un concepto fundamental que desafía esta visión: la superposición neuropatológica. Este fenómeno hace referencia a la coexistencia de características patológicas típicas de diferentes enfermedades dentro de un mismo individuo, lo que sugiere que los procesos neurodegenerativos no son completamente independientes y que comparten múltiples mecanismos fisiopatológicos (Outeiro et al., 2019).

En particular, la DLB, la AD y la PD forman parte de un espectro clínico y neuropatológico con solapamientos significativos. Estas enfermedades comparten la presencia de proteínas mal plegadas como α -sinucleína, tau y β -amiloide, aunque con patrones de distribución cerebral, mecanismos bioquímicos y síntomas clínicos que permiten diferenciarlas (Outeiro et al., 2019). De hecho, según datos recopilados del IGTP, la DLB es especialmente interesante porque parece ocupar un punto intermedio entre la AD y la PD, tanto en sus manifestaciones clínicas como en su perfil neuropatológico.

Cada vez más evidencia demuestra que muchos pacientes diagnosticados con una de estas enfermedades presentan hallazgos post-mortem característicos de otra. Por ejemplo, hasta el 60-70% de los casos de DLB presentan además patología de tipo Alzheimer, y es común encontrar cuerpos de Lewy en cerebros de pacientes con AD avanzada. Este grado de superposición complica el diagnóstico clínico y sugiere que los modelos actuales que dividen estrictamente las enfermedades neurodegenerativas podrían ser insuficientes para capturar la complejidad real del proceso (Outeiro et al., 2019).

Comprender estas zonas de convergencia es crucial no solo para mejorar la precisión diagnóstica, sino también para desarrollar terapias dirigidas que aborden los mecanismos patogénicos compartidos. Además, los avances en genética, como la identificación de loci comunes (por ejemplo, APOE ϵ 4 y GBA), y en biología molecular, incluyendo la propagación priónica de proteínas mal plegadas, refuerzan la idea de que

estas enfermedades pueden estar más interconectadas de lo que inicialmente se pensaba (Outeiro et al., 2019).

La fisiopatología de DLB, AD y PD se especifica con más detalle en la Tabla 1.

Tabla 1. Representación de la fisiopatología diferencial entre DLB (demencia con cuerpos de Lewy), AD (Alzheimer) y PD (Parkinson). Fuente: elaboración propia.

Enfermedad / Característica	Proteínas causantes principales	Afectación neuroquímica	Áreas del cerebro afectadas principales
Demencia con cuerpos de Lewy (DLB)	α -sinucleína (cuerpos de Lewy), tau y β -amiloide (en el 60- 70%)	Pérdida dopaminérgica (sustancia negra), alteraciones en vías lisosomales (GBA), neurotransmisores colinérgicos afectados	Neocorteza (capas V y VI), sistema límbico, sustancia negra (dopaminérgica), lóbulo temporal medial relativamente preservado
Enfermedad de Alzheimer (AD)	β -amiloide (placas), tau (ovillos neurofibrilares)	Disminución colinérgica marcada, alteraciones glutamatérgicas	Corteza cerebral generalizada, atrofia temporal medial significativa (hipocampo)
Enfermedad de Parkinson (PD)	α -sinucleína (cuerpos de Lewy del tronco cerebral)	Pérdida dopaminérgica marcada en sustancia negra, alteraciones en sistemas dopaminérgicos	Sustancia negra, núcleos basales, corteza menos afectada inicialmente

A partir de los datos bibliográficos obtenidos por Outeiro et al., 2019 (Tabla 1), se destacan por un lado que la DLB puede presentar patología mixta con depósitos de β -amiloide y ovillos neurofibrilares de tau, típicos en AD. También en DLB, la patología se suele presentar en regiones corticales como la neocorteza. En cambio, en PD se presenta la α -sinucleína localizada predominantemente en el tronco cerebral. Y, por otro lado, la DLB se caracteriza por presentar un déficit combinado, es decir, una disminución colinérgica y dopaminérgica.

1.3.- Las plaquetas: concepto general y sus roles

Antes de dar a conocer los diferentes roles que presentan las plaquetas en los procesos neurológicos y de los últimos descubrimientos científicos, hay que dar una definición exacta de lo que son y exponer algunas de sus características fisiológicas claves en esta investigación, como por ejemplo la presencia de ácidos nucleicos.

Las plaquetas se definen como “un trozo diminuto de célula en forma de disco que se encuentra en la sangre y el bazo. Las plaquetas son fragmentos de células muy

grandes de la médula ósea que se llaman megacariocitos. Ayudan a producir coágulos sanguíneos para hacer más lento el sangrado o frenarlo y para facilitar la cicatrización de las heridas” (National Cancer Institute, NIH).

Existen diversas problemáticas relacionadas con las plaquetas, ya sea por una cantidad insuficiente, excesiva o porque no funcionan correctamente. La medición de la cantidad de plaquetas en la sangre puede ser útil para diagnosticar ciertas enfermedades o trastornos. Por ejemplo, cuando hay una disminución en la cantidad de plaquetas se denomina como trombocitopenia, provocando el aumento del riesgo de hemorragias. Por el contrario, su exceso puede conducir a trastornos trombóticos (García, A., & Muñoz, M. (2001). Siendo objeto de interés, las plaquetas, como posibles biomarcadores para terapias existentes. Un ejemplo sería la determinación de un diagnóstico diferencial para la DLB.

A nivel morfológico, el análisis detallado de la estructura y las funciones de las plaquetas ha avanzado considerablemente gracias al desarrollo de técnicas como la microscopía electrónica y la inmunofluorescencia. Desde estos estudios, se ha identificado que las plaquetas presentan características morfológicas clave, entre las que destaca la ausencia de núcleo, ácido ribonucleico (mRNA), ribosomas, diversos gránulos (gránulos α , gránulos densos, lisosomas), entre otros (Haramati, S. (2023)).

Por otra parte, a nivel fisiológico las plaquetas son componentes esenciales en múltiples procesos fisiológicos más allá de su intervención en el proceso de coagulación. De hecho, según Panteleev et al. (2023), *An Insight into Recent Advances on Platelet Function in Health and Disease* (2023) discute los mecanismos y roles clave de las plaquetas en diferentes contextos fisiológicos y patológicos:

- **Hemostasia y coagulación:** Las plaquetas son fundamentales para detener el sangrado mediante la formación de un tapón hemostático en los sitios de daño vascular. Se adhieren a proteínas de la matriz extracelular, principalmente colágeno y factor von Willebrand, y se activan para formar agregados que sellan las heridas. Además, las plaquetas facilitan la coagulación al activar factores en la superficie celular y liberar microvesículas que contribuyen a la formación del coágulo.
- **Procesos de inflamación e inmunidad:** Durante la inflamación, las plaquetas interactúan con células del sistema inmunitario y con el endotelio activado, promoviendo la secreción de citoquinas y factores que modulan la respuesta

inflamatoria. También participan en la presentación de antígenos y pueden internalizar virus, como SARS-CoV-2, contribuyendo a la defensa inmunitaria y, potencialmente, a la diseminación viral.

- **Reparación tisular:** Las plaquetas apoyan la reparación de daños tisulares no solo mediante la formación del tapón hemostático sino también liberando factores de crecimiento y moléculas que promueven la proliferación y migración celular, facilitando la cicatrización y restauración del endotelio sin formar necesariamente agregados plaquetarios.
- **Remodelación vascular:** Además de reparar el daño, las plaquetas mantienen la homeostasis vascular regulando la permeabilidad endotelial y la integridad de las uniones intercelulares. Pueden liberar moléculas que inducen la reprogramación del endotelio, promoviendo el crecimiento vascular y la remodelación de los vasos. También participan en procesos de migración autónoma para proteger y regenerar la pared vascular, incluso durante infecciones como la COVID-19.

A continuación, se darán a conocer las primeras pinceladas sobre las relaciones existentes que presentan las plaquetas en relación a los procesos neurológicos. Para ello, se exponen las similitudes funcionales y moleculares que tienen con las neuronas (Tabla 2) Nurden et al. (2022).

Tabla 2. Similitudes funcionales y moleculares que tienen las plaquetas con las neuronas según el artículo científico Nurden et al. (2022). Fuente: Elaboración propia.

Característica	Plaquetas	Neuronas	Similitudes funcionales y moleculares
Núcleo	Carecen de núcleo	Presencia de núcleo	Ambos presentan organización intracelular especializada sin relación nuclear
Origen celular	Derivan de megacariocitos en la médula ósea	Derivan del ectodermo en el desarrollo embrional	Ambos se origina de células progenitoras especializadas
Función principal	Hemostasia, coagulación, inflamación, inmunidad	Transmisión de señales eléctricas y químicas	Ambos participan en la comunicación celular y la regulación funcional local
Secreción de neurotransmisores	Liberan moléculas como la serotonina y ADP	Liberan y sintetizan neurotransmisores como el glutamato, dopamina, etc	Ambos utilizan mecanismos similares de exocitosis dependiente de calcio para liberar

			vesículas que contienen moléculas señalizadoras.
Estructura	Discoides en sangre, sin prolongaciones	Cuerpo celular con dendritas y axones	Ambos poseen estructuras especializadas para la interacción con otras células
Comunicación intercelular	Interacción mediante secreción de factores y adhesión	Sinapsis eléctricas y químicas	Ambos realizan comunicación intercelular activa y altamente regulada
Expresión de receptores	Receptores de membrana para adhesión y activación	Receptores de neurotransmisores y canales iónicos	Ambos expresan receptores específicos que regulan su activación y función
Neuroinflamación	Modulan la respuesta inmune y liberan citocinas proinflamatorias	Involucradas en la señalización y respuesta inflamatoria en el SNC	Ambos participan en la modulación de procesos inflamatorios
Capacidad de regeneración	No se regeneran, sino se reemplazan	Regeneración limitada, especialmente en el SNC	Ambos presentan capacidades regenerativas limitadas y controladas.

Por lo tanto, al considerar todas estas similitudes y respaldado por investigaciones recientes, se ha identificado un papel emergente y relevante de las plaquetas en su interacción directa con el sistema neurológico. Estas participan activamente en procesos de neuroinflamación y en mecanismos de señalización celular.

1.4.- Evidencia emergente: plaquetas como vínculo funcional entre la sangre y el cerebro

Tradicionalmente, las plaquetas han sido reconocidas como elementos fundamentales en la hemostasia y la reparación vascular. No obstante, investigaciones recientes han ampliado de manera significativa su perfil funcional, evidenciando que las plaquetas participan activamente en procesos que trascienden la coagulación, entre ellos la modulación de la neuroinflamación, la regulación de la neurogénesis y la influencia directa sobre la plasticidad sináptica (Leiter & Walker, 2019). Estos hallazgos posicionan a las plaquetas como un vínculo funcional y dinámico entre la sangre y el cerebro, cuya actividad puede impactar tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

1.4.1. Activación plaquetaria y neuroinflamación

La activación plaquetaria no solo desencadena la cascada de coagulación, sino que también da lugar a la liberación de una serie de mediadores bioactivos que pueden atravesar la barrera hematoencefálica y modular la respuesta inmune cerebral. Estudios previos han demostrado que las plaquetas activadas liberan citoquinas proinflamatorias, factores activadores de microglía y micropartículas que amplifican la respuesta neuroinflamatoria, particularmente en escenarios donde la integridad de la barrera hematoencefálica se encuentra comprometida, como en la esclerosis múltiple y otros trastornos neurodegenerativos (Leiter & Walker, 2019).

Sin embargo, la activación plaquetaria no es exclusivamente patológica. Evidencia experimental reciente indica que, bajo estímulos fisiológicos como el ejercicio físico, las plaquetas son activadas de manera controlada y liberan factores que no solo no inducen inflamación, sino que contribuyen activamente a la creación de un microambiente cerebral más favorable para la neuroplasticidad y la regeneración neuronal (Dasgupta et al., 2023). Este doble rol resalta la complejidad de la participación plaquetaria en el sistema nervioso central, sugiriendo que su impacto neuroinflamatorio es altamente dependiente del contexto, del perfil de activación y del equilibrio entre señales pro y antiinflamatorias.

1.4.2. Citoquinas plaquetarias y neurogénesis

Las plaquetas, además de su función en la respuesta inmune y vascular, contienen en sus gránulos una variedad de citoquinas y factores de crecimiento que pueden influir directamente en la neurogénesis, especialmente en el hipocampo adulto. Entre ellos, el factor PF4 (platelet factor 4 o CXCL4) ha sido identificado como un mediador clave en la neurogénesis asociada al ejercicio. Dasgupta et al. (2023) demostraron que el aumento de PF4, derivado de la activación plaquetaria por ejercicio, estimula la proliferación de precursores neuronales y mejora la función cognitiva en ratones envejecidos.

Este estudio confirma que PF4 tiene un efecto neurogénico directo y que su administración periférica puede replicar los beneficios cerebrales del ejercicio sin necesidad de actividad física. Esto coincide con lo planteado por Leiter & Walker (2019), quienes sugirieron que las plaquetas actúan como vehículos de señales bioactivas capaces de modular la plasticidad sináptica y promover la diferenciación neuronal mediante la liberación de factores como VEGF, IGF-1 y serotonina.

En conjunto, estas evidencias respaldan la idea de que las plaquetas son un nexo funcional entre la periferia y el sistema nervioso central, favoreciendo la neurogénesis y la homeostasis cerebral en condiciones normales, o contribuyendo a procesos neuroinflamatorios en patologías. Este enfoque amplía la comprensión de las funciones plaquetarias y abre nuevas vías para terapias basadas en la modulación de sus productos bioactivos.

1.5. Estudios preliminares del grupo investigador: activación plaquetaria alterada en DLB

En nuestro grupo de investigación (Genómica y Transcriptómica de las Sinucleinopatías, GTS) estudiamos el papel de las plaquetas en la DLB, partiendo de la hipótesis de que podrían contribuir activamente a la enfermedad debido a sus similitudes bioquímicas con las neuronas. Nuestros estudios recientes muestran que la expresión de ARNm plaquetario asociado a procesos neurodegenerativos está alterada en pacientes con DLB, en comparación con controles sanos y pacientes con AD. Además, encontramos una regulación opuesta de genes relacionados con la función sináptica y la activación plaquetaria entre plaquetas y cerebro.

El uso de herramientas de análisis transcriptómico de alta precisión, como la plataforma Nanostring Neuropathology Panel, y la validación con paneles personalizados, han permitido consolidar la solidez de estos hallazgos.

Hay que destacar cuatro hallazgos más relevantes. (1) En plaquetas de pacientes con DLB se identificaron 174 genes regulados diferencialmente en comparación con controles, mientras que en AD sólo se detectaron 94 genes alterados en plaquetas. De estos genes, un mayor porcentaje se encontró sobreexpresado en DLB (55,5%) frente a AD (25,5%). (2) En el cerebro (corteza temporal), el número de genes alterados fue considerablemente menor (58 en DLB vs. 30 en AD), con un predominio de genes sobreexpresados en DLB. (3) Los genes con expresión alterada en plaquetas de DLB están principalmente involucrados en procesos de transmisión sináptica, señalización y activación plaquetaria, lo que sugiere un papel funcional relevante de las plaquetas en la progresión de la enfermedad. (4) Algunos de estos genes mostraron una expresión opuesta en las plaquetas y en el tejido cerebral de los mismos pacientes, lo que sugiere mecanismos de regulación aún no están completamente comprendidos.

En resumen, los estudios preliminares proporcionan evidencia de que la activación plaquetaria y la expresión de ARNm derivados de plaquetas están alteradas de manera específica en la DLB, diferenciándose tanto de los controles sanos como de la AD.

1.5.1.-Relación entre los genes seleccionados y la activación plaquetaria alterada en DLB

En relación con los resultados transcriptómicos obtenidos, se seleccionaron dos grupos de genes de especial interés por su relevancia funcional tanto en el cerebro como en las plaquetas:

- Genes implicados en la función sináptica y su relación plaquetaria (Tabla 3):

Tabla 3. Representación de los diferentes genes asociados a la función sináptica dentro de este estudio. Fuente: Elaboración propia.

Gen	Función Neuronal/ sináptica	Función Plaquetaria	Referencias
SRC	Regula la plasticidad sináptica y modula la actividad de receptores NMDA, participando en la remodelación de la sinapsis.	Regula la activación plaquetaria a través de cascadas de señalización intracelular. Es clave en la adhesión y agregación plaquetaria.	Ali & Salter, 2001; Couto & McCarty, 2014
GNAQ	Participa en señalización neuronal vía GPCR regulando la señalización intracelular que afecta a la neurotransmisión y desarrollo.	Media la señalización en respuesta a agonistas como trombina y ADP, regulando la activación y agregación plaquetaria.	González-González, García-González, & García-González, 2023
DGKE	Regula los niveles de diacilglicerol (DAG) en la sinapsis, modulando la señalización y excitabilidad neuronal.	Limita la señalización dependiente de DAG en plaquetas, regulando la activación y evitando la hiperactivación.	Koh et al., 2019
APP	Implicado en la formación, mantenimiento y reparación sináptica. Es precursor de péptidos beta-amiloide, asociados a la enfermedad de Alzheimer.	Altamente expresado en plaquetas. Participa en la liberación de gránulos y su procesamiento es similar al neuronal.	Haass & Selkoe, 2007
GNB5	Modula la actividad de canales iónicos y receptores sinápticos a través de la regulación de la señalización de proteínas G.	Participa en la transducción de señales plaquetarias, impactando la respuesta a agonistas y la activación.	Pandey et al., 2023

- Genes implicados en la activación/señalización plaquetaria (Tabla 4):

Tabla 4. Representación de los diferentes genes asociados en la activación y señalización plaquetaria dentro de este estudio. Fuente: Elaboración propia.

Gen	Función en plaquetas	Implicación en Señalización/Activación Plaquetaria	Función en cerebro	Referencias
EGF (Epidermal Growth Factor)	Factor de crecimiento liberado por plaquetas que promueve proliferación celular y reparación tisular.	Participa en la señalización paracrina tras la activación plaquetaria; modula la respuesta inflamatoria y la regeneración vascular.	Participa en la supervivencia neuronal, la neurogénesis y la plasticidad sináptica; esencial para la reparación y el desarrollo cerebral.	Oka & Orth, 1983; Zhou et al., 2025;
CD9	Tetraspanina altamente expresada en la membrana plaquetaria.	Facilita la agregación plaquetaria al interactuar con integrinas; esencial para la adhesión plaquetaria y formación de trombos.	Implicada en la migración y diferenciación celular en el cerebro; posible rol en la formación de sinapsis y comunicación intercelular.	Suárez et al., 2021.
GNAO1	Subunidad G alfa O implicada en la transmisión de señales GPCR.	Participa en la modulación de la señalización intracelular en respuesta a agonistas, regulando la activación plaquetaria.	Participa en la neurotransmisión inhibitoria, modulación de canales iónicos y regulación de la actividad sináptica; mutaciones asociadas a epilepsia.	Huin et al., 2020
P2RY12	Receptor purinérgico esencial para la agregación plaquetaria inducida por ADP.	Es el blanco de los antiagregantes plaquetarios como clopidogrel; su activación promueve la amplificación de la respuesta plaquetaria.	Expresado en microglía; participa en la vigilancia y migración microglial, así como en la respuesta a daño neuronal.	Hollopeter et al., 2001
CYBB (Cytochrome b-245 Beta Chain)	Subunidad del complejo NADPH oxidasa.	Implicado en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) tras activación plaquetaria, contribuyendo a la agregación y respuesta inflamatoria.	Participa en la producción de ROS en microglía y neuronas; implicado en procesos inflamatorios y neurodegenerativos.	Penton-Rol et al., 2022; He et al., 2024 ;Zhang, Liu, & Wang, 2024
PPT1 (Palmitoyl-Protein Thioesterase 1)	Enzima lisosomal implicada en el metabolismo de proteínas.	Participa en el reciclaje de proteínas y en la regulación del contenido de	Enzima esencial en la degradación de proteínas palmitoiladas; mutaciones causan	Müller & Tzoulis, 2022

		gránulos plaquetarios; potencial rol en la activación plaquetaria.	lipofuscinosis neuronal ceroida infantil (enfermedad neurodegenerativa).	
TNFRSF1B (Receptor del Factor de Necrosis Tumoral 2)	Receptor implicado en la respuesta inflamatoria y supervivencia celular.	Puede modular la activación plaquetaria en contextos inflamatorios mediante la señalización TNF-alfa.	Expresado en neuronas y células gliales; participa en la neuroprotección, supervivencia celular y regulación de la respuesta inflamatoria cerebral.	Faustman & Davis, 2010

1.6. Relevancia del perfil de expresión génica

Los resultados obtenidos sobre la expresión diferencial de genes relacionados con la función sináptica y la activación plaquetaria en la DLB ofrecen una oportunidad para profundizar en la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos relacionados a esta enfermedad, que hasta la fecha sigue siendo difícil de diagnosticar y tratar de manera precisa.

La identificación de un perfil de expresión plaquetaria distintivo en DLB, claramente diferenciado del observado en la AD, sugiere que las plaquetas no sólo reflejan cambios neurodegenerativos, sino que podrían participar activamente en el proceso patológico. Además, la regulación opuesta observada en plaquetas y cerebro para genes clave respalda la existencia de mecanismos aún no descubiertos que podrían tener implicaciones diagnósticas y terapéuticas.

Este perfil de expresión génica adquiere importancia por varias razones:

- **Potencial diagnóstico:** Los cambios de expresión detectados en plaquetas podrían ser utilizados como biomarcadores accesibles y mínimamente invasivos para mejorar el diagnóstico diferencial entre DLB y otras demencias, particularmente AD.
- **Valor pronóstico:** La evaluación de estos perfiles podría aportar información sobre la progresión de la enfermedad y la respuesta a tratamientos.
- **Nuevas dianas terapéuticas:** Los genes y vías alterados identificados abren nuevas posibilidades para investigar dianas terapéuticas que modulen la activación plaquetaria o interfieran en las cascadas de señalización asociadas.

2. Hipótesis

Se plantea que los perfiles de expresión de genes relacionados con la función sináptica y la activación/señalización plaquetaria en las plaquetas de pacientes con DLB presentan un patrón de expresión opuesto al observado en el tejido cerebral de estos mismos pacientes, lo que sugiere la existencia de mecanismos de regulación sistémicos diferenciados en la DLB.

Además, se espera que el perfil de expresión de genes sinápticos en plaquetas de pacientes con DLB sea significativamente distinto al de pacientes con enfermedad de PD y AD, lo que indicaría una posible especificidad de las alteraciones plaquetarias en la DLB dentro del espectro de las sinucleinopatías. Asimismo, se propone que los genes implicados en la activación y señalización plaquetaria muestran una sobreexpresión característica en las plaquetas de pacientes con DLB, reflejando un estado de activación asociado a la fisiopatología de la enfermedad. Se considera también que la expresión diferencial de ciertos genes seleccionados en plaquetas podría discriminar entre pacientes con DLB, AD, PD y controles, lo que aportaría valor diagnóstico. Por último, se plantea que los cambios de expresión de estos genes en plaquetas y cerebro presentan correlaciones inversas en DLB, lo que podría indicar un papel compensatorio o adaptativo de las plaquetas frente a la neurodegeneración. La integración de estos perfiles de expresión plaquetaria y cerebral permitiría identificar patrones moleculares específicos que diferencien a la DLB de otras enfermedades neurodegenerativas y contribuir al desarrollo de biomarcadores más precisos.

3. Objetivos

3.1.-*Objetivo principal*

Determinar los perfiles de expresión de ARNm involucrados tanto en la función sináptica como en la activación, señalización y agregación plaquetaria en muestras de plaquetas obtenidas de pacientes con enfermedades con cuerpos de Lewy (demencia con cuerpos de Lewy y enfermedad de Parkinson), en comparación con enfermedad de Alzheimer y sus respectivos controles; y comparar los perfiles de expresión de genes sinápticos en tejido cerebral (corteza temporal).

3.2.- *Objetivos específicos*

1. Estandarizar las PCRs de todos los genes seleccionados.

2. Estandarizar las qPCRs de todos los genes seleccionados en muestras de cerebro y optimizarlas para muestras de cerebro y de plaquetas.
3. Determinar los cambios de expresión de los genes seleccionados en muestras de cerebro.
4. Determinar los cambios de expresión de los genes seleccionados en muestras de plaquetas.
5. Establecer los perfiles de expresión de los genes seleccionados en cerebro y plaquetas, realizar análisis comparativos y establecer diferencias y similitudes entre los 4 grupos incluidos en el estudio y entre los diferentes tejidos.
6. Evaluar la idoneidad de los genes seleccionados como posible biomarcador periférico para la DLB.

4. Metodología

4.1.- Selección de muestras

Un total de 52 muestras de cerebro fueron obtenidas en el Banco de Tejidos Neurológicos del Hospital Clínic / Universidad de Barcelona. Fueron clasificadas en 6 grupos según el diagnóstico neuropatológico en conjunto con el diagnóstico clínico previo de los pacientes y se incluyeron 10 casos de AD, 9 de demencia con cuerpos de Lewy pura (pDLB), 8 de demencia con cuerpos de Lewy común (cDLB), 8 de Parkinson sin demencia (PD), 8 de Parkinson con demencia (PDD) y 9 controles (CTRL) (Anexo 1).

Las muestras de plaquetas fueron obtenidas de pacientes diagnosticados en los Servicios de Neurología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, del Hospital Universitario de Stavanger (Noruega) y de Hospital Universitario / Universidad Charles de Praga (República Checa) según los criterios diagnósticos correspondientes. Un total de 75 pacientes fue dividido en 4 grupos, 16 pacientes con AD, 22 con DLB, 21 con PD y 16 controles. Las características clínicas están resumidas en el anexo 2.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital y todos los participantes o sus tutores legales firmaron el consentimiento informado.

4.2.- Retrotranscripción y síntesis de ADNc

Todas las muestras de ARN utilizadas en este estudio fueron obtenidas anteriormente. Las muestras de ARN de cerebro se obtuvieron a partir de corteza temporal y los ARN

de plaquetas se extrajeron a partir de pellets de plaquetas. El ARN fue almacenado a -80°C hasta su utilización.

Las muestras de ARN fueron convertidas a ADNc mediante retrotranscripción, o transcripción inversa, ya que de este modo se obtiene la conformación químico-estructural más estable siguiendo el protocolo correspondiente:

1. Las muestras de ARN con concentración conocida se descongelaron en hielo.
2. En el caso de ARN de cerebro se utilizaban 2 ug y en el caso de plaquetas 200 ng de ARN para la retrotranscripción. El volumen de cada muestra se ajustaba a 32 ul con H₂O tratada con DEPC.
3. Las muestras se desnaturalizan durante 10 min a 65°C en un termobloque, fueron traspasadas rápidamente a hielo e incubadas durante 2 minutos.
4. Los 32 ul de ARN desnaturalizados se añadieron a tubos conteniendo Ready-to-go You-prime First-Strand Beads (Cytivia), se añadieron 1 ul de random primers y 5 ul de H₂O tratada con DEPC y se incubaba durante 1 min a temperatura ambiente.
5. Después de mezclar suavemente el contenido del tubo, se realizaba una incubación de 1 h a 37°C.
6. El ADNc obtenido se guardaba a -20°C hasta su utilización.

4.3.- Estandarización de PCR

Se estandarizaron y validaron las técnicas de PCR y qPCR para cuantificar la expresión de genes relacionados con la función sináptica y la activación plaquetaria. Se diseñaron primers específicos, cuya temperatura de anillamiento óptima se determinó mediante gradientes de PCR convencional (Anexo 3).

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 15 µL por tubo, utilizando Taq DNA Polymerase, concentraciones de primers y programas térmicos específicos para cada gen (Anexo 4). La mezcla de reacción típica, para 5 muestras, incluyó la preparación de la máster mix: H₂O (66 µl), buffer 10x6 (9 µl), dNTPs (1,8 µl), primer upper(1,8 µl), primer lower(1,8 µl), MgCl₂(3 µl) y Taq (0,6 µl). Y por otra parte, se colocaron 14µl de máster mix + 1 µl de muestra en diferentes eppendorfs.

El protocolo térmico general consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 4 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, anillamiento a la temperatura específica de cada gen por 30 segundos y extensión a 72

°C por 30 segundos, finalizando con una extensión de 4 minutos a 72 °C. La especificidad de la amplificación se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, verificando la presencia de productos únicos del tamaño esperado. Cabe destacar la importancia del uso del Orange (3 µl) en el proceso de elaboración del gel de agarosa, debido a que permite visualizar el ADN en el gel. Y por último, el uso del buffer SGTB (40 ml) para la electroforesis y elaboración del gel, y el uso del Sybr Safe (dependiendo del tamaño del gel; 1,2 µl) permitiendo la visualización post-PCR al exponer el gel a luz UV.

En la qPCR, se emplearon placas de 96 pozos y el equipo LightCycler 480 (Roche), con un volumen final de 15 µL por pozo. La mezcla de reacción incluyó (las concentraciones de los reactivos dependen del número de pozos utilizados):

- Agua libre de nucleasas (H₂O)
- Primer forward (upper)
- Primer reverse (lower)
- Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs)
- ADNc (muestra)

El uso del colorante SYBR Green permitió la detección en tiempo real de la amplificación al intercalarse en las cadenas dobles de ADN. Aunque este sistema presenta la limitación de detectar cualquier ADN de doble hebra, la especificidad se aseguró mediante análisis previos de PCR y la verificación de curvas de disociación (melting curves), donde se constató la presencia de un único pico de amplificación por producto.

Cada gen requirió la optimización individual de los parámetros de qPCR, incluyendo la temperatura de anillamiento, la concentración de primers, la cantidad de ADNc y el programa térmico (Anexo 4).

Como genes de referencia (housekeeping) se utilizaron β -actina para cerebro y RDX, SNRPD para plaquetas, seleccionados tras comprobar su posible estabilidad de expresión entre los grupos clínicos y tejidos analizados. Estos genes se emplearon para la normalización de la expresión relativa mediante el método $\Delta\Delta C_t$. Se incluyeron controles negativos en todas las placas de qPCR para descartar posibles contaminaciones.

A pesar de haber tratado los diferentes genes presentados en la Tabla 7 a lo largo de la investigación, cabe recalcar que debido a limitaciones de tiempo, solamente fue posible estandarizar y realizar análisis genéticos de los siguientes genes: SRC, CD9, GNB5, CYBB, DGKE y P2RY12.

4.4.- Análisis de datos: método $\Delta\Delta Ct$

El análisis de la expresión génica relativa se realizó principalmente mediante el método $\Delta\Delta Ct$, que permite comparar los niveles de expresión de los genes de interés en un grupo de interés frente a un grupo control. Para cada muestra, se calculó el ΔCt (Ct del gen de interés menos Ct del gen de referencia) y posteriormente el $\Delta\Delta Ct$, comparando cada grupo experimental con el grupo control. La expresión relativa se expresa como $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

La eficiencia de amplificación de cada par de primers se determinó mediante curvas estándar generadas a partir de diluciones seriadas del ADNc. En los casos donde la diferencia de eficiencia entre el gen de interés y el gen housekeeping fue superior a 0,1, se aplicó el método Pfaffl, que corrige las diferencias de eficiencia entre genes y proporciona una cuantificación más precisa.

4.5.-Análisis estadístico

El test de Mann-Whitney se aplicó para comparar la expresión génica entre dos grupos independientes, dado que los datos no presentaron una distribución normal y no cumplían con los supuestos de los test paramétricos. Este análisis es adecuado para evaluar diferencias en la distribución de los valores entre grupos sin requerir igualdad de varianzas ni normalidad. Además, es una herramienta robusta para estudios con tamaños de muestra reducidos y datos con alta variabilidad, como suele ocurrir en análisis de expresión génica.

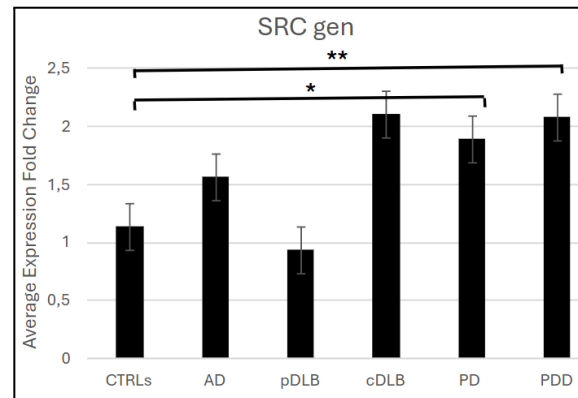
5. Resultados

5.1.- Análisis de expresión génica en cerebro

El análisis de expresión diferencial mediante qPCR (LightCycler 480) se realizó para evaluar la regulación de genes relacionados con la función sináptica y la señalización celular en muestras de tejido cerebral (corteza temporal) de los distintos grupos incluidos en el estudio. Los genes evaluados fueron SRC, CD9, P2RY12, CYBB, GNB5

y DGKE, utilizando β -actina como gen de referencia (housekeeping) para la normalización de los datos. Los diferentes análisis de expresión génica tanto en cerebro como en plaquetas compararon los diferentes grupos patológicos, gen por gen, en relación a los controles establecidos.

El análisis de expresión génica para SRC (Fig. 2) en muestras corteza temporal reveló un incremento significativo en los grupos patológicos PD (* $p=0,0464$;) y presentó una mayor significancia en el grupo PDD (* $p=0,0111$;;). En contraste, no se encontraron diferencias significativas en los grupos de AD ($p=0,156$) y pDLB ($p=0,757$).



En relación al grupo cDLB ($p=0,742$), a pesar de que el grupo cDLB presentó algunos valores individuales elevados, la mediana de expresión fue similar a la del grupo control (1.199 vs. 0.882), y el tamaño del efecto fue pequeño ($r=0.080$), lo que sugiere una desviación estándar alta.

Figura 2. Expresión relativa del gen SRC en corteza temporal de sujetos con AD, pDLB, cDLB, PD, PDD y controles. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Se aplicó Mann Whitney. Las diferencias significativas frente al grupo control se indican con asteriscos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Por otra parte, en el gen GNB5 (Fig. 3) presentó un aumento altamente significativas en los grupos patológicos cDLB (* $p < 0,001$,***) y PD (* $p < 0,001$,**). También se obtuvieron diferencias menos significativas en los grupos AD (* $p=0,0021$,**) y PDD (* $p=0,0024$,**). En contraste, no se encontraron diferencias significativas para el grupo patológico pDLB.

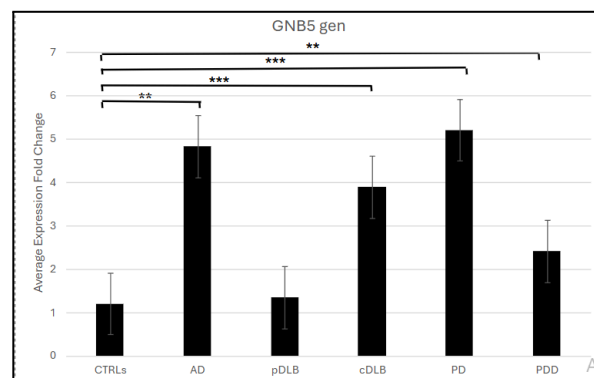
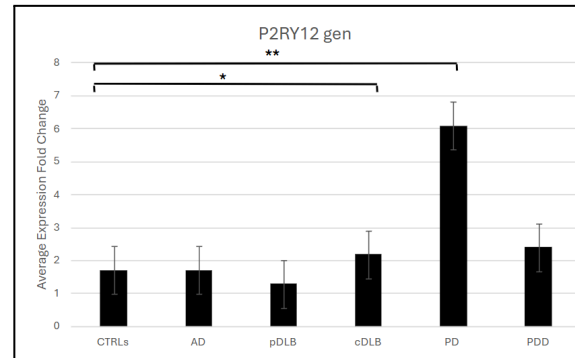


Figura 3. Expresión relativa del gen GNB5 en corteza temporal de sujetos con AD, pDLB, cDLB, PD, PDD y controles. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Se aplicó Mann Whitney. Las diferencias significativas frente al grupo control se indican con asteriscos: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Seguidamente, para el gen P2RY12 (Fig.4) solo puso por evidencia un leve incremento en las diferencias significativas del grupo cDLB (* $p=0,0111$;*). Por otra parte, hubo un

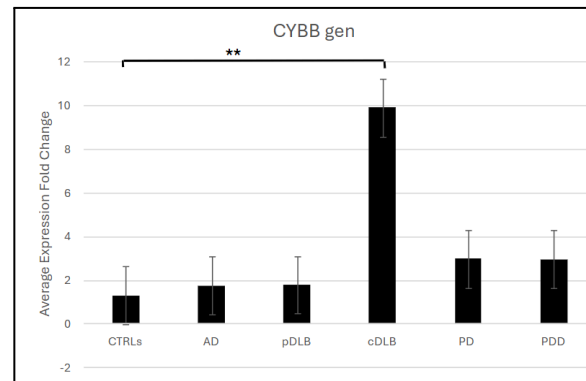
mayor incremento de expresividad en el grupo patológico PD (*p=0,0055;**). En contraste, no se encontraron diferencias significativas en los grupos AD, pDLB y PDD.

Figura 4. Expresión relativa del gen P2RY12 en corteza temporal de sujetos con AD, pDLB, cDLB, PD, PDD y controles. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Se aplicó Mann Whitney. Las diferencias significativas frente al grupo control se indican con asteriscos: *p < 0.05, **p < 0.01.

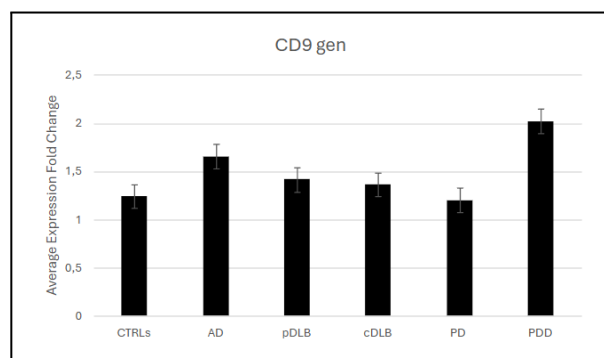
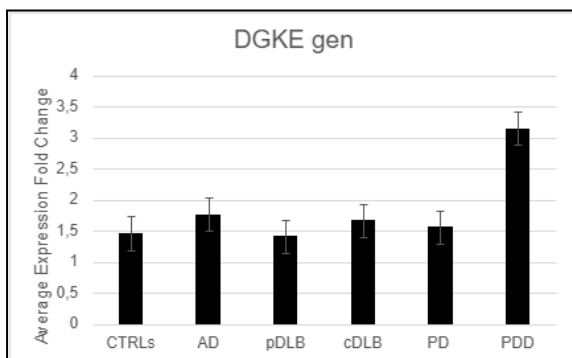


Para el gen CYBB (Fig.5) se reveló un incremento sustancial en las diferencias significativa para el grupo cDLB (*p=0,0078;**). Ahora bien, para el grupo PD se mostró una significación marginal (p=0,0592). En contraste, los grupos AD, pDLB y PDD no presentaron diferencias significativas en el experimento.

Figura 5. Expresión relativa del gen CYBB en corteza temporal de sujetos con AD, pDLB, cDLB, PD, PDD y controles. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Se aplicó Mann Whitney. Las diferencias significativas frente al grupo control se indican con asteriscos: **p < 0.01.



Por último, para el gen DGKE (Fig. 6) solamente se presentó una posible tendencia a la distinción significaba en el grupo PDD (p=0,0592). Y para el gen CD9 (Fig. 7) no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos.



Figuras 6 y 7. Expresión relativa de los genes DGKE y CD9 en tejido cerebral de sujetos con AD, pDLB, cDLB, PD, PDD y controles. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Se aplicó Mann Whitney.

5.2.- Análisis de expresión génica en plaquetas (PLTs)

El estudio de expresión génica en plaquetas se centró en los genes SRC, CD9, GNB5 y CYBB, con el objetivo de identificar posibles perfiles específicos de la DLB a nivel periférico y evaluar su potencial como biomarcadores accesibles.

Para la normalización de los resultados en plaquetas, se utilizaron dos genes housekeeping: RDX y SNRPD.

En relación a los análisis de expresión génica en plaquetas para el gen SRC (Fig.8) se reveló un incremento distintivo en comparación con el grupo control. Por una parte, el grupo PD (*p=0,0010;***) existen diferencias altamente significativas. Y en los grupos AD (*p=0,0021;***) y DLB (*p=0,0130;*) se obtuvieron diferencias menos significativas en contraste con el grupo PD.

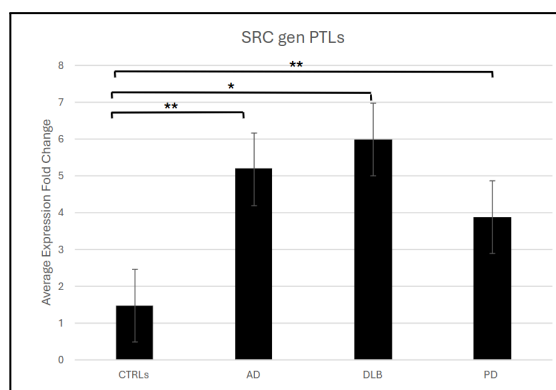


Figura 8. Expresión relativa del gen SRC en plaquetas de sujetos con AD, DLB, PD y controles. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Se aplicó Mann Whitney. Las diferencias significativas frente al grupo control se indican con asteriscos: *p < 0.05, **p < 0.01.

Seguidamente, en el gen CD9 (Fig. 9) se presentaron diferencias muy significativas en la patología PD (*p=0,0040;***) Por otra parte, se reveló que para los grupos AD (p=0,0500) y DLB (p=0,0590) la significancia sigue una tendencia a la distinción en comparación con el grupo control.

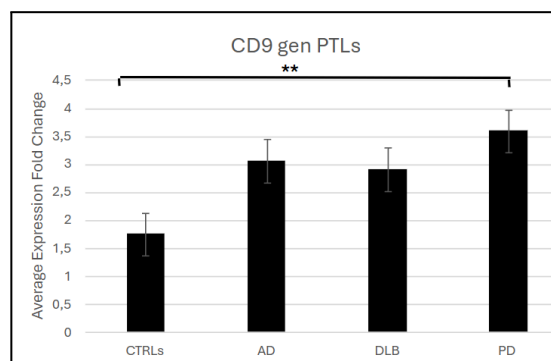
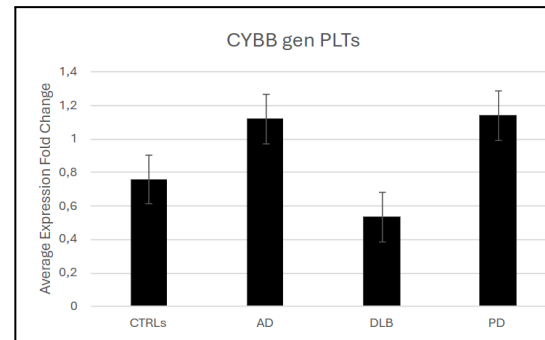
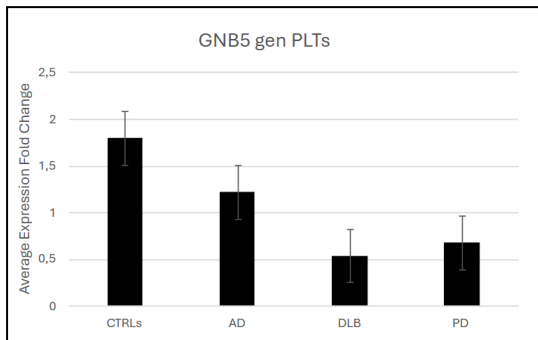


Figura 9. Expresión relativa del gen CD9 en plaquetas de sujetos con AD, DLB, PD y controles. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Se aplicó Mann Whitney. Las diferencias significativas frente al grupo control se indican con asteriscos: **p < 0.01.

Y por último, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos para los genes GNB5 (Fig. 10) y CYBB (Fig.11), aunque se observa una disminución en la expresividad del gen GNB5 en todos los grupos patológicos.



Figuras 10 y 11. Expresión relativa del gen GNB5 y CYBB en plaquetas de sujetos con AD, DLB, PD y controles. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Se aplicó Mann Whitney.

Los genes DGKE y P2RY12 no se han probado en plaquetas, siendo una de las limitaciones de la investigación.

6.-Discusión

En este estudio se analizaron los perfiles de expresión de genes relacionados con la función sináptica y la activación plaquetaria en muestras de corteza temporal y plaquetas de pacientes con enfermedades neurodegenerativas, centrándose especialmente en las enfermedades con cuerpos de Lewy (DLB y PD), y comparándolas con AD y controles. Los hallazgos obtenidos permiten explorar no solo la especificidad molecular de la DLB dentro del rango de las sinucleinopatías, sino también el posible papel adaptativo de las plaquetas como visión periférica de la neurodegeneración cerebral.

6.1.- Expresión génica en tejido cerebral: especificidad regional y patológica

Uno de los hallazgos más destacables fue la sobreexpresión significativa del gen GNB5 en la corteza temporal de los grupos cDLB y PD, así como en AD y PDD con menor significación. Esta alteración es común a varias enfermedades neurodegenerativas, pero en especial en cDLB y PD. Dado que GNB5 está implicado en la señalización sináptica y la modulación de la actividad neuronal, su aumento podría representar una respuesta adaptativa a la disfunción sináptica (Lodowski et al., 2003; Li et al., 2020).

En contraste, el gen SRC, una tirosina quinasa implicada en señalización celular y plasticidad sináptica, mostró una sobreexpresión significativa solo en PD y PDD, sin alteraciones relevantes en DLB (ni cDLB ni pDLB) ni AD. Este patrón sugiere que la activación de vías de señalización mediadas por SRC podría ser más característica de

los estadios motores de las sinucleinopatías que de las formas predominantemente cognitivas, como la DLB (Ali & Salter, 2001; Couto & McCarty, 2014)

Por otro lado, P2RY12 y CYBB, ambos relacionados con la activación microglial y el estrés oxidativo, se encontraron significativamente sobreexpresados exclusivamente en cDLB, lo que podría reflejar un entorno neuroinflamatorio más elevado de esta patología. En contraste, la falta de cambios en pDLB sugiere que este subtipo podría tener una respuesta inflamatoria más leve o distinta. A diferencia de cDLB, el subtipo pDLB no suele estar acompañado de otras alteraciones cerebrales adicionales, lo que podría explicar una menor activación de los mecanismos inmunitarios, como la respuesta microglial o el estrés oxidativo. Esto indica que la inflamación en la DLB no es uniforme, sino que puede variar según el subtipo, siendo más intensa en cDLB (Simpson & Oliver, 2020).

El gen DGKE mostró una tendencia a la significación únicamente en PDD, mientras que CD9 no presentó diferencias relevantes en tejido cerebral en ninguno de los grupos. Esto sugiere una implicación más periférica o limitada de estos genes en la fisiopatología.

6.2.- Expresión génica en plaquetas: reflejo periférico de la neurodegeneración

En plaquetas, los resultados ofrecieron una visión diferente, aunque complementaria. El gen SRC, a diferencia de su expresión en cerebro, presentó un incremento significativo en todos los grupos patológicos, especialmente en PD, seguido de AD y DLB.

Por otra parte, la sobreexpresión plaquetaria de SRC en DLB, ausente en su expresión cerebral, podría representar una respuesta adaptativa o incluso una marca molecular accesible para el diagnóstico periférico.

El gen CD9 reveló una sobreexpresión significativa en PD y una tendencia a la elevación en AD y DLB, lo cual sugiere una posible activación del compartimento plaquetario en patologías neurodegenerativas, aunque con menor especificidad para DLB (Perez-Hernandez et al, 2021). La ausencia de cambios significativos en GNB5 y CYBB en plaquetas contrasta claramente con sus alteraciones en la corteza temporal, mejorando nuevamente la idea de mecanismos reguladores entre el sistema nervioso central y periférico en estas enfermedades.

6.3.- Implicaciones para la comprensión de la DLB y desarrollo de biomarcadores

Los resultados presentados apoyan parcialmente las hipótesis planteadas. Por una parte, se evidencia una regulación diferencial entre cerebro y plaquetas en algunos genes clave, especialmente en DLB, lo cual apoya la idea de mecanismos adaptativos periféricos que podrían ser aprovechados como biomarcadores accesibles.

La recopilación de todos estos datos sugiere que las plaquetas, además de reflejar indirectamente alteraciones cerebrales, podrían estar activamente involucradas en procesos patológicos asociados con las sinucleinopatías, particularmente la DLB. En contraste, se requieren estudios con mayor tamaño muestral y la adición de más genes implicados en la activación plaquetaria para validar estos hallazgos y explorar su valor diagnóstico.

7.- Conclusiones

El diseño experimental fue adecuado y permitió una evaluación precisa de la expresión génica en tejido cerebral y plaquetas. Los genes analizados (SRC, CD9, GNB5, CYBB, DGKE y P2RY12) mostraron patrones de expresión diferenciados entre enfermedades neurodegenerativas, destacando alteraciones específicas en DLB.

Entre los hallazgos clave, se identificó la sobreexpresión de GNB5 en la corteza temporal de DLB y PD, indicando un posible papel adaptativo. SRC mostró un patrón opuesto entre cerebro y plaquetas, especialmente en DLB, reforzando su potencial como biomarcador periférico. Asimismo, P2RY12 y CYBB presentaron sobreexpresión exclusiva en la corteza de cDLB, evidenciando un fenotipo neuroinflamatorio característico.

El perfil de expresión en plaquetas de pacientes con DLB fue distinto al de PD, AD y controles, apoyando su especificidad dentro de las sinucleinopatías.

Las plaquetas pueden representar una fuente accesible para el estudio fisiopatológico y diagnóstico de la DLB.

Los resultados se tienen que validar en cohortes más amplias, ampliando el número de genes relevantes.

8. Bibliografía

- Ali, D. W., & Salter, M. W. (2001). NMDA receptor regulation by Src kinase signalling in excitatory synaptic transmission and plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), 336–342. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00216-6](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00216-6)[ncbi.nlm.nih.gov+3eschol-arship.org+3](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3eschol-arship.org+3)
- Bellini, G., Pellegrini, C., & Blandini, F. (2025). α -Synuclein in Parkinson's disease: From bench to bedside. *Medicinal Research Reviews*, 45(3), 1–25. <https://doi.org/10.1002/med.22091>
- Couto, C. A., & McCarty, O. J. (2014). Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood*, 124(13), 2013–2024. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-570492>
- Suárez et al (2021). CD9 inhibition reveals a functional connection of extracellular vesicle secretion with mitophagy in melanoma cells. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(7), e12082. <https://doi.org/10.1002/jev2.12082>
- Burnouf, T., & Walker, T. L. (2022). The multifaceted role of platelets in mediating brain function. *Blood*, 140(8), 815–827. <https://doi.org/10.1182/blood.2022015970>
- Huin, V. et al (2020). Expanding the phenotype of SCA19/22: Parkinsonism, cognitive impairment and epilepsy. *Neurology Genetics*, 6(6), e514. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000143>
- Simpson, D. S. A., & Oliver, P. L. (2020). ROS generation in microglia: Understanding oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease. *Antioxidants*, 9(8), 743. <https://doi.org/10.3390/antiox9080743>
- Ercan, H. et al (2025). Platelets mirror changes in the frontal lobe antioxidant system in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 21(4), 789–803. <https://doi.org/10.1002/alz.70117>
- Faustman, D., & Davis, M. (2010). TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(6), 482–493. <https://doi.org/10.1038/nrd3030>
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(2), 101–112. <https://doi.org/10.1038/nrm2101>
- Haramati, S. (2023). Platelet Physiology. En StatPearls. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557800/>
- He, Y., Li, D., Zhang, M., et al. (2024). Bioinformatic analysis reveals the relationship between macrophage infiltration and Cybb downregulation in hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia. *Scientific Reports*, 14, 20089. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-70877-7>
- Hollopeter, G. et al (2001). Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*, 409(6817), 202–207. <https://doi.org/10.1038/35051599>
- International Journal of Molecular Sciences. (2023). An insight into recent advances on platelet function in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24), 17291. <https://doi.org/10.3390/ijms242417291>
- González-González, L. O. et al, (2023). Association between GNAQ gene DNA methylation and clinical features of uveal melanoma. *Cellular and Molecular Biology*, 51(6), 712–719. <https://doi.org/10.20455/cmb.2023.01.0146>
- Koh, K. H., et al, (2019). Diacylglycerol kinase is a negative regulator of GNAQ signaling. *Blood Advances*, 3(7), 1154–1165. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018026053>

- Leiter, O. et al (2023). Platelet-derived exerkine CXCL4/platelet factor 4 rejuvenates hippocampal neurogenesis and restores cognitive function in aged mice. *Nature Communications*, 14(1), 4375. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39873-9>
- Leiter, O., & Walker, T. L. (2019). Platelets: The missing link between the blood and brain? *Progress in Neurobiology*, 183, 101695. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101695>
- Leiter, O., et al, (2019). Exercise-induced activated platelets increase adult hippocampal precursor proliferation and promote neuronal differentiation. *Stem Cell Reports*, 12(4), 667–679. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.02.009>
- McKeith, I. G. et al (2017). Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Fourth consensus report of the DLB Consortium. *Neurology*, 89(1), 88–100. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004058>
- Müller, J. S., & Tzoulis, C. (2022). Treatment of CLN1 disease with a blood-brain barrier penetrating enzyme replacement therapy. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 28, 100799. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2022.100799>
- National Cancer Institute. (s.f.). Plaqueta. En Diccionario de cáncer del NCI. Recuperado el 12 de junio de 2025, de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/plaqueta>
- Nedelec, T et al, (2023). A comparison between early presentation of dementia with Lewy bodies, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease: Evidence from routine primary care and UK Biobank data. *Annals of Neurology*, 94(2), 259–270. <https://doi.org/10.1002/ana.26670>
- Oka, Y. et al, (1983). Human plasma epidermal growth factor/beta-urogastrone is associated with blood platelets. **Journal of Clinical Investigation*,
- Outeiro, T. F. et al, (2019). Dementia with Lewy bodies: An update and outlook. *Molecular Neurodegeneration*, 14, Article 5. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0306-8>
- Pandey, M. et al,(2023). Specific regulation of mechanical nociception by Gβ5 involves GABA-B receptors. *JCI Insight*, 8(13), e134685. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.134685>
- Panteleev, M. A. et al,(2023). The ways of the virus: Interactions of platelets and red blood cells with SARS-CoV-2, and their potential pathophysiological significance in COVID-19. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24), 17291. <https://doi.org/10.3390/ijms242417291>
- Penton-Rol, G., Yang, K., Palenzuela-Gardón, D., et al. (2022). Efectos positivos de la ficocianobilina sobre la expresión génica en la excitotoxicidad inducida por glutamato: análisis mediante qPCR y PCA en modelos celulares y animales. *Heliyon*, 8(12), e09769. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09769>
- Perez-Hernandez, D. et al, (2021). Tetraspanins as potential modulators of glutamatergic synaptic function. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14, 801882. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.801882>
- Rabie, H., & Akhloufi, M. A. (2025). A review of machine learning and deep learning for Parkinson's disease detection. *Discover Artificial Intelligence*, 5, 24. <https://doi.org/10.1007/s44163-025-00241-9>
- World Health Organization. (2024, abril). Dementia. WHO fact sheet. Recuperado de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Zhang, Y. et al, (2024). The role of microRNA-34a in the regulation of neurodegenerative diseases. *Neurodegenerative Diseases Therapy*, 6(1), 45–58. <https://doi.org/10.2147/NDT.S504180>
- Zhou, Y., et al, (2025). Storage temperature affects platelet activation and degranulation. *Journal of Clinical Investigation*, 135(4), e11989061. <https://doi.org/10.1172/JCI11989061>

9.- Anexos

Anexo 1: Características de las muestras cerebrales por grupo de estudio

Grupo	Número de muestras (n)	Ratio Hombres/ Mujeres	Edad (promedio, rango)	Edad de comienzo (promedio, rango)
1. AD	10	4:6	79,4 (72-89)	70,2 (58 -81)
2. pDLB	9	6:3	77,5 (64-85)	68,6 (60-77)
3. cDLB	8	6:2	76,25 (72-80)	68,8 (62-75)
4. PD	8	4:4	82,37 (74-96)	65,0 (54-71)
5. PDD	8	3:5	75,0 (71-81)	53,75 (47-72)
6. Controles sanos	9	6:3	65,3 (49-78)	Sin datos

Anexo 2: Características de las muestras plaquetarias por grupo de estudio

Grupo	Número de muestras (n)	Ratio Hombres/ Mujeres	Edad (promedio, rango)	Edad de comienzo (promedio, rango)
1. Enfermedad de Alzheimer (AD)	16	4:12	69,6 (55-79)	73,5 (63-90)
2. Controles sanos	16	2:14	Sin datos	70,6 (57-81)
3. Enfermedad con cuerpos de Lewy (DLB)	22	15:7	71,7 (64-85)	77,5 (69-90)
4. Enfermedad de Parkinson (PD)	21	13:8	54,6 (20-75)	61,5 (44-76)

Anexo 3. Diseño de los primers para los genes de interés, sus respectivos tamaños de los productos de PCR y las temperaturas de anillamiento de cada uno respectivamente

Genes	Secuencias de primers	Tamaños de los productos de PCR (pb)	Temperatura de annealing (°C)
EGF	ex1U:TGA AGG TAC TCT CGC AGG AA ex2L:CTG GTG TCT CAG TGA TCA TG	152	59
SRC	ex5U:AGC GGC TCCA GAT TGT CACC ex7L:AGT CAGA GCG GTT ACTG CTC	178	63
GNAQ	ex1U:ATC ACA GAC GAG ATC GAG CG ex2L:ACC AAG CTG GTG TAT CAGA	186	59
CD9	ex2U:TGC TGT CCT TGC CAT TGG ACT ex3L:TCA TGA TGC TGG TGG GCTT	149	63

GNAO1	ex4U: AGT ATC AGC TCA ACG ACT CT ex5/6L:TCC ACT TCA GGC CTG TTT GAC	167	63
DGKE	ex2U: AAT GAC ACC AAG GTC CTG GA ex3L: ACA GTA CAT GAT GAG TGC ATG	163	59
TNFRSF1B	ex2U: ATG ACC AGA CAG CTC AGA TG ex3L:TGT GAG GAC AGC ACA TAC AC	116	63
P2RY12	ex1U:TCA GAA GAC AGG AGC TGC AGAA ex2L: ATG CCA CTC TGC AGG TTG CAAT	173	59
GNB5	ex2U: TCA TGA AGA CCA GAA GGA CC ex3/4L:CAC CAC AAA CAA GGA GCAC	144	59
CYBB	ex3U: ACT GCA TGC TGA TTC TCT TG ex4/5L:ATT GCA CTT CAC TCT GCAT	155	59
PPT1	ex1U: TGC CAT GGA CCT GCG CTT CT ex2/3L:GGA AGA CCC TGA TGG AGG AC	195	63

Anexo 4. Lista de los diferentes programas térmicos utilizados para cada gen y conocer así su temperatura de anillamiento

Genes	Programa térmico
EGF	95°C 4 min; 34 ciclos (95°C 30 s, 59 °C 30 s, 72°C 30 s); 72°C 4 min
SRC	95°C 4 min; 34 ciclos (95°C 30 s, 63 °C 30 s, 72°C 30 s); 72°C 4 min
GNAQ	95°C 4 min; 34 ciclos (95°C 30 s, 59 °C 30 s, 72°C 30 s); 72°C 4 min
CD9	95°C 4 min; 34 ciclos (95°C 30 s, 63 °C 30 s, 72°C 30 s); 72°C 4 min
GNAO1	95°C 4 min; 34 ciclos (95°C 30 s, 63 °C 30 s, 72°C 30 s); 72°C 4 min
DGKE	95°C 4 min; 34 ciclos (95°C 30 s, 59 °C 30 s, 72°C 30 s); 72°C 4 min
TNFR2	95°C 4 min; 34 ciclos (95°C 30 s, 63 °C 30 s, 72°C 30 s); 72°C 4 min
P2RY12	95°C 4 min; 34 ciclos (95°C 30 s, 59 °C 30 s, 72°C 30 s); 72°C 4 min
GNB5	95°C 4 min; 34 ciclos (95°C 30 s, 59 °C 30 s, 72°C 30 s); 72°C 4 min
CYBB	95°C 4 min; 34 ciclos (95°C 30 s, 59 °C 30 s, 72°C 30 s); 72°C 4 min
PPT1	95°C 4 min; 34 ciclos (95°C 30 s, 63 °C 30 s, 72°C 30 s); 72°C 4 min