

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES PLAQUETARIOS EN LA  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER”**

**GONZALO ANDRÉS FARÍAS GONTUPIL**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS MEDICAS**

**Director de Tesis: Prof. Dr. RICARDO B. MACCIONI**

**2011**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS**

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la  
Tesis de Doctorado en Ciencias Médicas presentada por el candidato**

**GONZALO ANDRÉS FARIÁS GONTUPIL**

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al  
Grado de Doctor en Ciencias Médicas en Examen de Defensa de Tesis rendido el día  
27 de enero de 2011**

**Prof. Dr. Ricardo B. Maccioni  
Director de Tesis.  
Laboratorio de Biología Celular Molecular y Neurociencias  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile**

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**Prof. Dr. Patricio Fuentes**

**Prof. Dr. Héctor Gatica**

**Prof. Dra. Rommy Von Bernhardt**

**Prof. Dr. Archibaldo Donoso  
Presidente Comisión de Examen**

## **DEDICATORIA**

*Esta tesis está dedicada a mi esposa Patricia sin cuyo apoyo y comprensión no hubiese sido posible completar este trabajo. Tu alegría y tu empuje me han permitido seguir adelante y me han motivado diariamente para superarme y dar lo mejor de mí, en lo personal y en lo profesional.*

*A mis padres y a mis hermanas Viviana y Javiera, quienes siempre han tenido fe en mis capacidades y han estado presentes en cada etapa de mi vida, en cada éxito y en cada traspie, entregándome su apoyo incondicional.*

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo plasmado en esta tesis no habría sido posible sin los valiosos aportes de múltiples profesionales, quienes han contribuido con su trabajo, conocimiento, ingenio y experiencia para permitir concretar los objetivos de este proyecto.

En primer lugar deseo agradecer al Profesor Dr. Ricardo Maccioni, quién me orientó en los momentos en que formulamos (y reformulamos) este proyecto. El Profesor Maccioni generosamente me facilitó los recursos de su laboratorio, me guió para cumplir los objetivos propuestos y me instó a desarrollar y potenciar mis habilidades como científico. Agradezco a Karen Neumann quien fue mi mentora al llegar al laboratorio. Karen, sin tu trabajo y ayuda, no hubiese sido posible concretar esta tesis.

A la Dra. Andrea Slachevsky, quien con su trabajo y empuje colaboró activamente en las actividades clínicas de esta investigación y con la ayuda de su equipo, entre quienes agradezco particularmente a Carlos y Marcela, colaboró con la evaluación cognitiva, reclutamiento y la toma de muestras de los participantes en el Servicio de Neurología del Hospital del Salvador.

A Patricio Pérez, mi amigo y compañero de trabajo en el laboratorio, con quien trabajamos para obtener el grueso de resultados que se exponen a continuación. Patricio, te deseo sólo éxito en todos tus proyectos presentes y futuros, tanto en lo académico como en lo familiar y personal.

A mis amigos y colaboradores en el laboratorio de Biología Celular, Molecular y Neurociencias; Leonardo Guzmán, Leonardo Navarrete, Inelia, José, Carlos y Alberto. Nuestras conversaciones han ayudado a mejorar esta tesis y vuestra presencia ha hecho muy alegre nuestro ambiente de trabajo y las actividades que hemos realizado tanto dentro, como fuera del laboratorio.

También quiero agradecer a nuestros vecinos en el Edificio Milenio, en particular a Cristina y Carola, quienes nos han acompañado en las actividades que hemos realizado como grupo de trabajo. También agradezco a Carlos, Margarita y Juan Carlos por su ayuda en las actividades del laboratorio.

Doy gracias especiales a los miembros de mi comisión, los Dres. Archivaldo Donoso, Rommy Von Bernhardt, Patricio Fuentes y Héctor Gatica, quienes con sus críticas y observaciones han contribuido en gran manera a mejorar los contenidos de esta tesis. A la Escuela de Postgrado de la Universidad de Chile por todo el apoyo que sus miembros me han entregado para completar las actividades de este programa de doctorado y al Programa de Investigación Domeyko en Salud.

Por último deseo agradecer muy especialmente a las personas que colaboraron desinteresadamente como voluntarios en el presente estudio y a los familiares que los acompañaron durante las evaluaciones y tomas de muestra requeridas. Es en primera instancia gracias a ustedes que la presente investigación ha sido posible.

## **INDICE**

Índice	pág 5
Resumen	pág 6
Abstract	pág 8
Antecedentes	pág 9
Biomarcadores en la Enfermedad de Alzheimer	pág 25
Hipótesis de trabajo	pág 38
Objetivos específicos	pág 39
Métodos	pág 40
Resultados	pág 52
Discusión	pág 83
Conclusiones	pág 91
Referencias	pág 92
Anexo 1: Abreviaturas utilizadas	pág 106
Anexo 2: Acta de aprobación del Comité de Ética de la investigación en seres humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile	pág 107
Anexo 3: Acta de aprobación del Comité de Ética Científico del Servicio de Salud Metropolitano Oriente	pág 111

## RESUMEN

-. **Antecedentes:** La enfermedad de Alzheimer (EA) corresponde a la forma más frecuente de demencia en la población mundial. Se ha postulado que los niveles del péptido precursor del amiloide (APP) en plaquetas pudiesen servir como marcador bioquímico en EA. Estudios preliminares de nuestro laboratorio han demostrado que la proteína tau también se encuentra presente en plaquetas. Los mismos estudios han demostrado que existen diversas fracciones de dicha proteína en plaquetas y han sugerido que las distintas fracciones de tau presentan alteraciones en pacientes con EA, que son independientes de la edad de los sujetos. La presente tesis tuvo como meta evaluar si las variaciones en la tau plaquetaria podrían constituir un biomarcador útil de EA.

-. **Métodos:** Se tomaron muestras de sangre venosa de 47 sujetos portadores de EA probable y 19 controles pareados por edad. Se aislaron las plaquetas y se realizaron estudios de inmunofluorescencia de tau en dichas células. Extractos de proteínas plaquetarias fueron estudiados mediante técnicas de electroforesis, inmunoprecipitación e inmunoblot con anticuerpos específicos para diversas formas de tau y contra APP. Se evaluaron las relaciones entre el estado cognitivo de los sujetos y los patrones electroforéticos de tau y APP.

-. **Resultados:** Se demostró la presencia de formas de tau plaquetaria con diverso patrón de migración en electroforesis. Las formas de tau de alto peso se encuentran en una significativa mayor proporción en pacientes con EA ( $p = 0,001$ ), existiendo una correlación entre la expresión de tau de alto peso molecular y el grado de deterioro cognitivo de los pacientes. Por otra parte, el análisis de APP plaquetario no mostró diferencias significativas entre pacientes y controles, ni tampoco una relación con la expresión de la tau plaquetaria.

-. **Conclusiones:** Hemos confirmado la presencia de proteína tau en plaquetas de sujetos controles y portadores de EA. El patrón electroforético de tau plaquetaria es compatible con la presencia de agregados de alto peso molecular y oligómeros de tau. Estas formas de alto peso de tau plaquetaria se encuentran significativamente aumentadas en relación a las formas monoméricas de tau en pacientes portadores de EA, existiendo una relación directa entre el grado de alteración del patrón electroforético de tau y el grado de deterioro cognitivo de los pacientes evaluados.

No se encontró una relación entre el patrón electroforético de APP en plaquetas y el estado cognitivo de los sujetos, así como tampoco se evidenció una relación significativa entre alteraciones en el metabolismo de APP y las formas de tau plaquetaria.

## ABSTRACT

**- Background:** Alzheimer's disease (AD) is the most important form of dementia in the world population. The expression of amyloid precursor peptide (APP) in platelets has been postulated as a reliable biochemical marker for AD. Preliminary research done in our laboratory has shown that tau protein is also present in platelets and there are several tau fractions that can be resolved in electrophoresis. It has been suggested that tau fractions are altered in AD patients in an age independent manner. The present thesis aims to evaluate platelets tau fractions as a suitable biomarker for AD.

**- Methods:** Peripheral blood samples were obtained from 47 AD patients and 19 control subjects. Platelets were isolated and the tau patterns evaluated by immunofluorescence. Platelets proteins were analyzed by electrophoresis, immunoprecipitation and immunoblot techniques with tau and APP specific antibodies. The relationships between cognitive performance and platelets tau and APP expression in blood samples of subjects incorporated into the study were evaluated.

**- Results:** Platelets tau electrophoretic pattern showed the presence of different tau fractions. A higher ratio of high molecular weight forms and oligomers of tau was found in AD patients, with a direct correlation between platelets tau pattern and cognitive impairment. On the other hand, the analysis of platelets APP failed to demonstrate differences between controls and AD patients.

**- Conclusions:** We have confirmed the presence of tau protein in platelets of AD and control subjects. The electrophoretic pattern of platelets tau is compatible with the presence of high molecular weight aggregated forms of tau, which are increased in relation to other forms of tau in AD patients. There is a direct relationship between degree of the alterations in tau forms ratio and the degree of cognitive impairment of the subjects. No relationship was found between platelets APP electrophoretic pattern and cognitive status, or between APP pattern and tau forms ratio.



## **ANTECEDENTES**

### **1. Estado del arte en el estudio de la Enfermedad de Alzheimer (EA)**

#### **1.1 Las demencias y la EA como problema de salud pública**

La EA corresponde a un desorden neurodegenerativo cerebral progresivo, siendo el mayor responsable de las demencias, en particular en el grupo de los adultos mayores. Las demencias en general tienen un gran impacto en la salud pública de todos los países por su gran prevalencia, que aumenta con el envejecimiento de las poblaciones y por el alto costo que implica su tratamiento y el cuidado general que requiere la persona portadora de demencia. Las demencias tienen una prevalencia de entre 1,6 y 6,4% en los mayores de 60 años y se estima que dicha prevalencia se incrementará en un 234% para el año 2040 (un 393% para América Latina) (Ferri *et al*, 2005). Este diagnóstico contribuye al 11,2% de los años de vida con discapacidad en la población de 60 y más años (World Health Organization, 2003). En Chile, según el Censo 2002 el grupo etario de 60 o más años representa el 11,4% de la población y se encuentra en aumento debido a factores sociales, económicos y culturales, estimándose que en Chile viven 178.000 personas con demencia actualmente (Behrens, 2007).

Se estima que 60,1% de las personas con demencia vivían en países en desarrollo en el 2001 y que esta cifra aumentará a 64,5% y 71,2% en el 2020 y 2040 respectivamente (Ferri *et al*, 2005). Por otro lado se considera que los criterios planteados por el DSM IV podrían subestimar la prevalencia de las demencias, en particular en los países en desarrollo (Llibre Rodriguez *et al*, 2008).

#### **1.2 El diagnóstico de la EA**

Auguste D fue una paciente de 51 años del doctor Alois Alzheimer, con historia de 5 años de deterioro cognitivo. Tras el fallecimiento de su paciente, Alzheimer describió la presencia de placas seniles, ovillos neurofibrilares (ONFs) y cambios arterioscleróticos en su tejido cerebral (Alzheimer, 1907). En la actualidad, a pesar de la importancia de la EA como principal causa de demencia neurodegenerativa y los avances actuales en el conocimiento de sus aspectos clínicos y fisiopatológicos; el diagnóstico de certeza de la

EA aún se basa en características histopatológicas similares a las descritas por Alzheimer (The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and The National Institute on Aging Working Group, 1998) (Figura 1).

Braak y Braak evaluaron la histopatología de la EA haciendo un seguimiento de la aparición de ONFs en distintas etapas de la enfermedad (Braak y Braak, 1991). Se ha encontrado una relación inversa entre el número de ONFs y la sobrevivencia de neuronas en el hipocampo, lo que sugiere que la pérdida neuronal está estrechamente relacionada a la aparición de los ONFs (Fukutani *et al*, 1995).

El diagnóstico clínico de la EA sólo nos permite hablar de una enfermedad “probable” o “posible” (McKhann *et al*, 1984) y tiene una sensibilidad de 93%, pero su especificidad se encuentra en alrededor de 55%, siendo más difícil en etapas tempranas y en presentaciones inusuales de la enfermedad; por lo que considerando las herramientas tecnológicas y el avance del conocimiento actual se ha creado la necesidad de desarrollar exámenes tanto bioquímicos como imagenológicos que apoyen el diagnóstico (Dubois *et al*, 2007; Wiltfang *et al*, 2007). A este respecto los criterios diagnósticos para la EA propuestos en 2007 (Dubois *et al*, 2007) enfatizan la utilidad de estos tipos de marcadores para la EA, los que permitirían el diagnóstico definitivo en base a la demostración de la presencia de mutaciones en alguno de los tres genes responsables de la enfermedad en forma autosómica dominante: El gen de la proteína precursora del amiloide (APP) en el cromosoma 21; presenilina 1 (cromosoma 14); y presenilina 2 (cromosoma 1).

**Figura 1:** Anatomopatología de la EA, a la izquierda se muestra tejido cerebral de un adulto mayor sin alteración cognitiva. A la derecha se observa la marcada atrofia, con surcos amplios y circunvoluciones pequeñas, frecuentes en la EA (Corey-Bloom, 2004).



### 1.3 Fisiopatología de la EA

Pese a los crecientes esfuerzos de investigación, no existe en la actualidad un tratamiento clínico o terapia que sea efectiva en relación a la cura de la EA. El enfoque terapéutico actual se basa en el uso de medicamentos anticolinesterásicos (rivastigmina, donepecilo, galantamina, otros) que actúan potenciando las sinapsis colinérgicas involucradas en funciones cognitivas, y por otra parte en el uso de memantina, una droga que bloquea parcialmente los receptores glutamatérgicos tipo NMDA. Ambas clases de drogas han demostrado utilidad parcial para mejorar algunos síntomas en las esferas cognitivas y de funcionalidad global. Sin embargo, la utilidad clínica real de estos medicamentos parece ser muy marginal (Raina *et al*, 2008). Por otro lado, no es menos cierto que la carencia de tratamientos efectivos para la EA, que actúen bloqueando los mecanismos causantes de la EA, se debe a nuestra falta de una adecuada comprensión respecto de la fisiopatología de esta enfermedad. Como se analiza mas abajo, los avances en las últimas tres décadas fueron magros debido a que el paradigma conceptual sobre la patogénesis de la EA fue algo sesgado.

Así una de las teorías más difundidas respecto a la fisiopatología de la EA es la que otorga un rol central al péptido beta amiloide (A $\beta$ ). En 1930, Divry logró teñir las placas seniles extracelulares utilizando rojo congo que se une a un componente llamado amiloide en base a sus propiedades fisicoquímicas semejantes a las de los polisacáridos. Posteriormente Glenner y sus colaboradores describieron que las placas seniles estaban compuestas de un péptido de 4 kDa de estructura hoja beta, llamado A $\beta$  (Glenner and Wong, 1984). Desde entonces, el rol de los depósitos de A $\beta$  en el cerebro como factor causante de la EA logró respaldo en la comunidad científica y contribuyó a la comprensión de la EA y a la generación de un marco teórico que respaldó la investigación respecto a la etiopatogenia, el desarrollo de métodos diagnósticos y creación algunas terapias específicas para la EA. En las formas familiares de la EA asociadas a mutaciones en APP o en las presenilinas PS1 y PS2, que afectan el procesamiento de APP por secretasas se encuentra una clara correlación entre los depósitos anómalos de amiloide y el desarrollo de EA. Sin embargo, el hecho de que agregados de A $\beta$  se encuentren presentes en cerebro de sujetos senescentes aún en ausencia de cualquier manifestación de demencia hace plantear que los depósitos de amiloide podrían ser sólo uno de múltiples factores que pueden estar involucrados en la EA (Alafuzoff *et al*, 1987; Arriagada *et al*, 1992). A pesar de la gran cantidad de información obtenida en modelos celulares y animales, los cuales apuntan al rol neurotóxico de los agregados de A $\beta$ , no todos los datos obtenidos en dichos modelos pueden ser directamente extrapolados a aplicaciones clínicas, ya sean diagnósticas o terapéuticas y, de hecho, muchas de las drogas anti-amiloide en etapas avanzadas de los ensayos clínicos han entregado resultados negativos y más bien se piensa que la contribución a la fisiopatología viene desde los oligómeros de amiloide y no las placas (Maccioni *et al*, 2010). Por otra parte, se cuenta con evidencia de que el grado de deterioro cognitivo en la EA se correlaciona mejor con la aparición de ONFs que con las placas seniles (Arriagada *et al*, 1992). El grupo de Kidd *et al* mostró a nivel de microscopía electrónica que los ONFs estaban formados por filamentos helicoidales pareados (PHFs) de 10 nm de diámetro (Kurt *et al*, 1997). A finales de los años '80 se describió que el componente principal de los PHFs correspondía a la proteína tau (Brion *et al*, 1986; Grundke-Iqbal *et al*, 1986; Grundke-Iqbal *et al*, 1988), confirmado en

estudios de Farias *et al* (1992), lo que dio las bases para considerar el rol que puede jugar esta proteína en la fisiopatología de la EA.

#### **1.4 El rol de los agregados de A**

El A $\beta$  se genera a partir de la proteólisis del APP por las enzimas  $\alpha$ ,  $\beta$ , o  $\gamma$ -secretasas. APP corresponde a una glicoproteína transmembrana que se expresa ubicuamente en varios tipos celulares. El N-terminal de APP se proyecta en el dominio extracelular de la proteína, o bien puede localizarse en el lumen de vesículas intracelulares, como las del retículo endoplásmico, el aparato de Golgi o endosomas intracelulares, mientras que el dominio intracitoplasmático de APP corresponde al carboxilo terminal y es precisamente en esta zona donde actúan las secretasas (Maccioni *et al*, 2001). La proteólisis de APP por las enzimas,  $\alpha$ -secretasa y  $\beta$ -secretasa da lugar a la producción de A $\beta$  (1-40) y también a la variante A $\beta$  (1-42), esta última con una mayor tendencia a autoagregarse; mientras que el procesamiento enzimático de APP por  $\gamma$ -secretasa da lugar a una vía no amiloidogénica. Se ha encontrado que los niveles de la enzima  $\beta$ -secretasa, así como su actividad se encuentran aumentados en pacientes con MCI (Zhong *et al*, 2007). En el contexto de la función neuronal, cuando las secretasas actúan se produce A $\beta$  y sAPP que corresponde al fragmento extracelular de APP. Si bien no se cuenta con completa claridad respecto a las funciones fisiológicas de APP, se ha sugerido una serie de roles que incluyen adhesión celular, neuroprotección, funciones tróficas en las células neuronales e inhibición de serina proteasas (por la presencia de un dominio homólogo a los inhibidores de serina proteasas tipo Kunitz) (Maccioni *et al*, 2001).

Información reciente sugiere que A $\beta$  pudiese cumplir roles fisiológicos como parte del sistema inmune innato, como un péptido de acción antimicrobial (Soscia *et al*). Numerosos recursos se han destinado al desarrollo de terapias enfocadas en inhibir la formación de agregados de beta amiloide (A $\beta$ ) sin tener adecuados resultados clínicos hasta ahora (Maccioni *et al*, 2010).

### **1.5 La proteína tau en el citoesqueleto neuronal**

El citoesqueleto de la neurona, al igual que en el resto de las células eucarióticas, es el responsable de la morfología celular neuronal, y está compuesto por microfilamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos (Maccioni y Cambiazo, 1995). En la neurona los microtúbulos son componentes esenciales responsables de la formación y mantenimiento de los axones, dendritas y contactos específicos de las neuronas, permitiendo el transporte axoplásmico de organelos vesículas desde y hacia el terminal axonal. Los microtúbulos están constituidos por las proteínas tubulinas, las que además interactúan con las Proteínas Asociadas a Microtúbulos (MAPs), las cuales contribuyen a dar dinamismo y estabilidad a los microtúbulos. Entre las cuales están: MAP1A, MAP1B, MAP2 y finalmente la proteína tau, que como ya lo hemos enunciado es de particular importancia en la patología de la EA (Maccioni *et al*, 2010). A diferencia de otras proteínas, la proteína tau es resistente a la temperatura y a condiciones ácidas, esto permite que se lleve a cabo el proceso de purificación, separándola de las MAPs y de otras proteínas termolábiles como la tubulina (Farias *et al*, 1992).

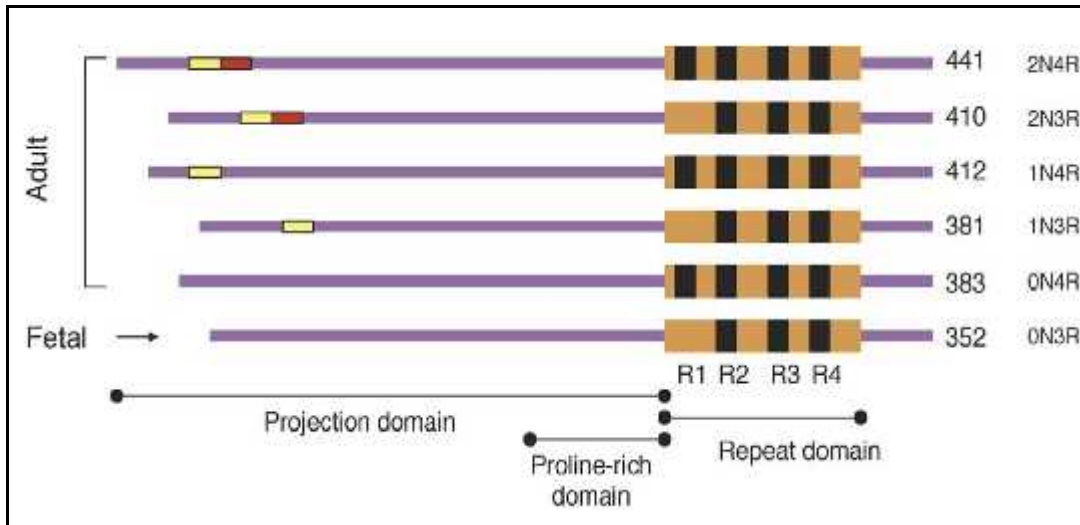
La proteína tau es importante en la mantención de la polaridad neuronal y en la estabilización de una arquitectura determinada en la neurona diferenciada. Además, se ha demostrado que la actividad de tau es clave para la morfogénesis de los conos de crecimiento en las neuronas cerebrales, en cuya estructura participan también redes locales de filamentos de actina y se ha planteado que tau tiene un papel determinante en promover el crecimiento axonal (Maccioni *et al*, 1995).

### **1.6 La proteína tau a nivel estructural y funcional**

La proteína tau es una proteína hidrofílica, no plegada en condiciones nativas y sin estructura secundaria ordenada aparente (Jeganathan *et al*, 2008). Tau está implicada en el ensamblaje y la estabilización de microtúbulos, aunque también cumple roles en la interacción con otros componentes del citoesqueleto (Maccioni *et al*, 2001). Tau ha sido identificada en varias especies animales tales como: *Caenorhabditis elegans* (Goedert *et al*, 1996; McDermott *et al*, 1996), *Drosophila* (Cambiazo *et al*, 1995; Irmlinger-Finger *et al*

*al*, 1990), pez dorado (Liu *et al*, 1997), roedores (Kosik and Finch, 1987; Lee *et al*, 1988), bovinos (Himmler, 1989; Lu *et al*, 1994), cabra (Nelson *et al*, 1996), primates (Holzer *et al*, 2004) y humano (Goedert *et al*, 1989a; Goedert *et al*, 1989b), estando localizada principalmente en neuronas, aunque en células no neuronales se han detectado trazas. En estados patológicos, tau puede expresarse en células de la glía (Chin y Goldman, 1996). También es posible encontrar ARNm y la proteína tau en varios tejidos periféricos como corazón, hígado, pulmón, músculo esquelético, páncreas, testículos, eritrocitos y fibroblastos (Gu *et al*, 1996; Murphy y Wallis, 1985; Vanier *et al*, 1998). La proteína tau es codificada por un gen único ubicado en el cromosoma 17 (17q21). El transcrito primario de tau contiene 16 exones, 3 de éstos (exón 4A, 6 y 8) no están presentes en el cerebro humano, porque son específicos de proteínas tau periféricas. El exón 4A se ha encontrado en tejidos periféricos de bovinos, humanos y roedores con un alto grado de homología. Sin embargo, el ARNm con los exones 6 y 8 no han sido encontrados en humanos. Por su parte, algunos transcritos con el exón 8 se han encontrado en cerebros de bovinos y monos Rhesus (Himmler, 1989; Nelson *et al*, 1996). Los exones 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 y 13 son exones constitutivos. Además, el exón 14 se encuentra en el ARNm pero no es traducido dentro de la proteína. En el Sistema Nervioso Central de los humanos hay 6 isoformas de la proteína tau dadas por el procesamiento alternativo de los exones 2, 3 y 10 que se expresan diferencialmente durante el desarrollo de subpoblaciones neuronales en 6 combinaciones diferentes (2-3-10-), (2+3-10-), (2+3+10-), (2-3-10+), (2+3-10+) y (2+3+10+) los cuales presentan puntos isoeléctricos que varían entre 6,85 a 9,46 y son específicos del cerebro humano adulto (Figura 2). El exón 3 nunca aparece independiente del exón 2 (Goedert *et al*, 1989a; Goedert *et al*, 1989b; Himmler *et al*, 1989). Las isoformas están constituidas por entre 352 y 441 aminoácidos, con pesos moleculares que varían entre 45-65 kDa, dependiendo de la forma molecular (Goedert *et al*, 1989a)

**Figura 2:** Isoformas de tau generadas por procesamiento alternativo del gen de la proteína tau localizado en el cromosoma 17. Se generan seis isoformas de tau humana (Froelich-Fabre y Bhat, 2004).



Las variantes de tau se diferencian por la presencia de 3 o 4 regiones repetidas en el extremo C-terminal codificadas por los exones 9 al 12 (Lee *et al*, 1989) y por la presencia o ausencia de 1 o 2 insertos, correspondientes a 29 ó 58 aminoácidos en el extremo N-terminal, codificadas por los exones 2 y 3 respectivamente. Una isoforma caracterizada por la ausencia de un inserto en el extremo N-terminal y la presencia de 3 secuencias repetidas en el extremo C-terminal está presente en etapas fetales, mientras que las otras isoformas son expresadas en la edad adulta (Goedert and Jakes, 1990; Kosik *et al*, 1989). Las dos secuencias de 29 aminoácidos codificadas por los exones 2 y 3 en el N-terminal son altamente ácidas y son seguidas de una región rica en prolina, éstas proporcionan diferentes longitudes a dicho extremo de la proteína, al cual se ha denominado dominio de proyección, debido a que sobresale de la superficie del microtúbulo, mediante lo cual puede interactuar con otros elementos del citoesqueleto, tales como filamentos de actina (Farias *et al*, 2002), y con la membrana plasmática (Hernandez *et al*, 2009).

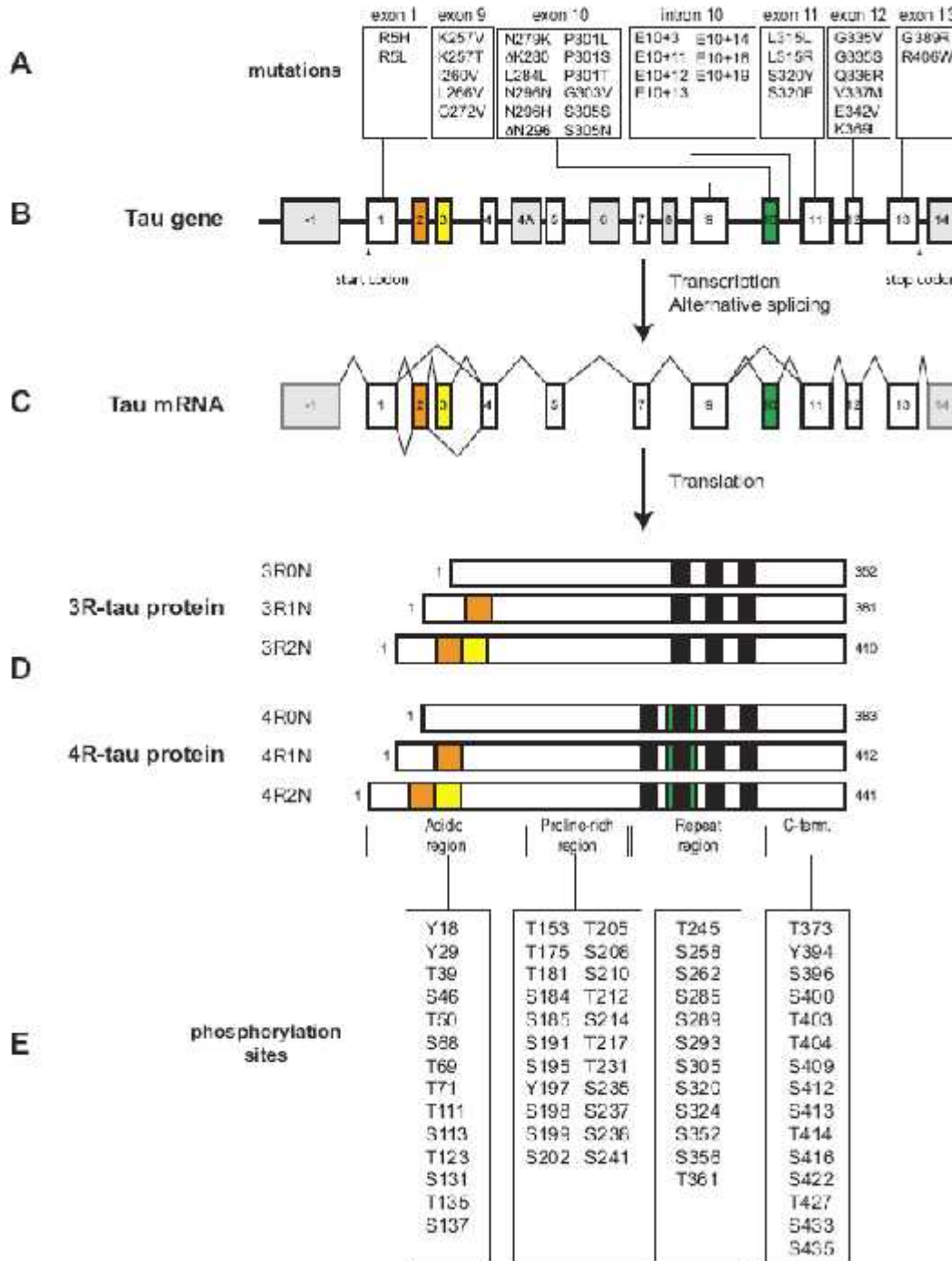
El extremo C-terminal de tau es conocido como el dominio de unión a microtúbulos y cuenta con tres o cuatro copias (tau 3R o tau 4R) de una repetición de 31 a 32 residuos



similares, pero no idénticos. Cada una de estas repeticiones puede ser dividida a su vez en una zona de 18 residuos que corresponde a la región mínima con capacidad de unirse a microtúbulos y en una secuencia menos conservada de 13 a 14 residuos, conocida como la región de inter-repeticiones (Sanchez *et al*, 2001). Las repeticiones de C-terminal se unen a microtúbulos y pueden promover su ensamblaje (Maccioni *et al*, 2001), mientras que la afinidad de tau es regulada por fosforilaciones, especialmente en motivos KXGS ubicados en estas repeticiones (Biernat *et al*, 1993).

Tanto la cantidad como la estructura de la proteína tau pueden afectar sus funciones de estabilización de microtúbulos y, eventualmente, desencadenar ciertos procesos patológicos. Como ya se ha señalado, las fosforilaciones de tau afectan su capacidad de unirse a microtúbulos, y de hecho, la proteína tau hiperfosforilada es el principal componente de los agregados proteicos anómalos que se encuentran en las neuronas de pacientes que portan los desordenes conocidos como taupatías. La Figura 3 muestra las múltiples variaciones que puede presentar la proteína tau. Además de las fosforilaciones, las modificaciones post-traduccionales de tau incluyen glicosilaciones, ubiquitinaciones, truncaciones, nitraciones, entre otras. El equilibrio entre fosforilación y defosforilación de tau origina cambios estructurales y conformacionales lo que regula la estabilidad del citoesqueleto y consecuentemente la morfología axonal. En la EA se producen fosforilaciones anómalas e irreversibles en algunos aminoácidos de la proteína tau: Ser202, Thr205, Ser235 y Ser404 (Alvarez *et al*, 1999), siendo estas reacciones catalizadas principalmente por dos proteínas quinasas: el sistema CDK5/P35 y GSK-3 . Los agregados que se encuentran en las taupatías son conocidos como ONFs, constituidos por PHFs, los cuales a su vez están constituidos por tau hiperfosforilada y modificada. La formación de PHFs a partir de moléculas de tau puede seguir distintos pasos que pueden incluir la fosforilación de tau, seguida por un cambio conformacional de la proteína y finalmente su agregación en polímeros anómalos dentro de la célula neuronal. La fosforilación de tau es un evento regulado en el desarrollo, siendo mayor en el feto y disminuyendo con la edad. Sin embargo, existe un gran incremento en la fosforilación de tau bajo condiciones patológicas.

**Figura 3:** Representación esquemática del gen de tau (B), las cajas blancas corresponden a exones constitutivos y las grises o coloreadas son aquellos exones con splicing alternativo. En (A) se observan diversas mutaciones descritas de tau. En (C) se muestra el mRNA que se traduce en las 6 isoformas de tau (D). En (E) se muestran los sitios descritos de fosforilación de la proteína (Gendron y Petrucelli, 2009).



## 1.7 Polímeros de proteína tau

Los ONFs son uno de los elementos principales presentes en la EA, así como en otras taupatías. Se cree que estos agregados de tau son tóxicos para las neuronas, ya sea por que actúan como una señal de daño o porque obstruyen alguna función celular. Los monómeros de tau pueden ensamblarse en PHFs semejantes a los encontrados en la EA y esta polimerización aumenta por la oxidación de grupos SH o por exposición de tau a polianiones como la heparina o poly-Glu (Barghorn y Mandelkow, 2002). Ya que tau carece de estructura secundaria ordenada, no está claro por qué debiera agregarse de manera específica, ni bajo qué principios estructurales ocurre el proceso de agregación, sin embargo, se sabe que la región de las secuencias repetidas (3R o 4R) forma el *core* de los PHFs y también promueve el ensamblaje de los PHFs *in vitro* (Wischik *et al*, 1988). Dos hexapéptidos al inicio de la segunda y tercera repetición son cruciales en el proceso de agregación de los PHFs (von Bergen *et al*, 2000), siendo capaces de iniciar la agregación de tau a PHFs con estructura hoja y, por lo tanto, representan el motivo mínimo de interacción tau-tau (Goux *et al*, 2004).

*In vitro*, tau puede agregarse por exposición a heparina en dos tipos de dímeros distintos (dímeros cisteína dependientes e independientes) y en oligómeros de mayor peso (Sahara *et al*, 2007). Estas estructuras pueden agregarse en intermediarios de los filamentos de tau en una solución llamada tau granular (Maeda *et al*, 2007). En base a esta información se ha propuesto un modelo de agregación de tau en diferentes pasos, en que la proteína sufre cambios conformacionales, dando lugar a la formación de ciertos *cores* de agregación, produciendo filamentos por un proceso de elongación o extensión (Congdon *et al*, 2008). La fosforilación de tau en residuos claves es el primer paso para la formación de dímeros u oligómeros (Sahara *et al*, 2008). Tras la fosforilación ocurren cambios conformacionales y truncaciones por caspasas (Mondragon-Rodriguez *et al*, 2008). }

Estudios recientes indican que tau puede autoagregarse *in vitro*, de manera tal que diversas variantes conformacionales de fibras de tau nativa pueden ser especificadas por conformaciones de un templado (Frost *et al*, 2009b). Además se ha descrito que el mal plegamiento de tau puede propagarse del medio extracelular al intracelular (Frost *et al*,

2009a), lo que está de acuerdo con el hallazgo de que existe la posibilidad de transmisión de tau agregada en forma semejante a los PHFs desde un modelo murino de taupatía (P301S) a un modelo murino que expresa tau humana (Clavaguera *et al*, 2009), lo que ha permitido sugerir la presencia de mecanismos tipo infeccioso en la patogénesis de las taupatías.

### **1.8 Rol patogénico de tau en la EA.**

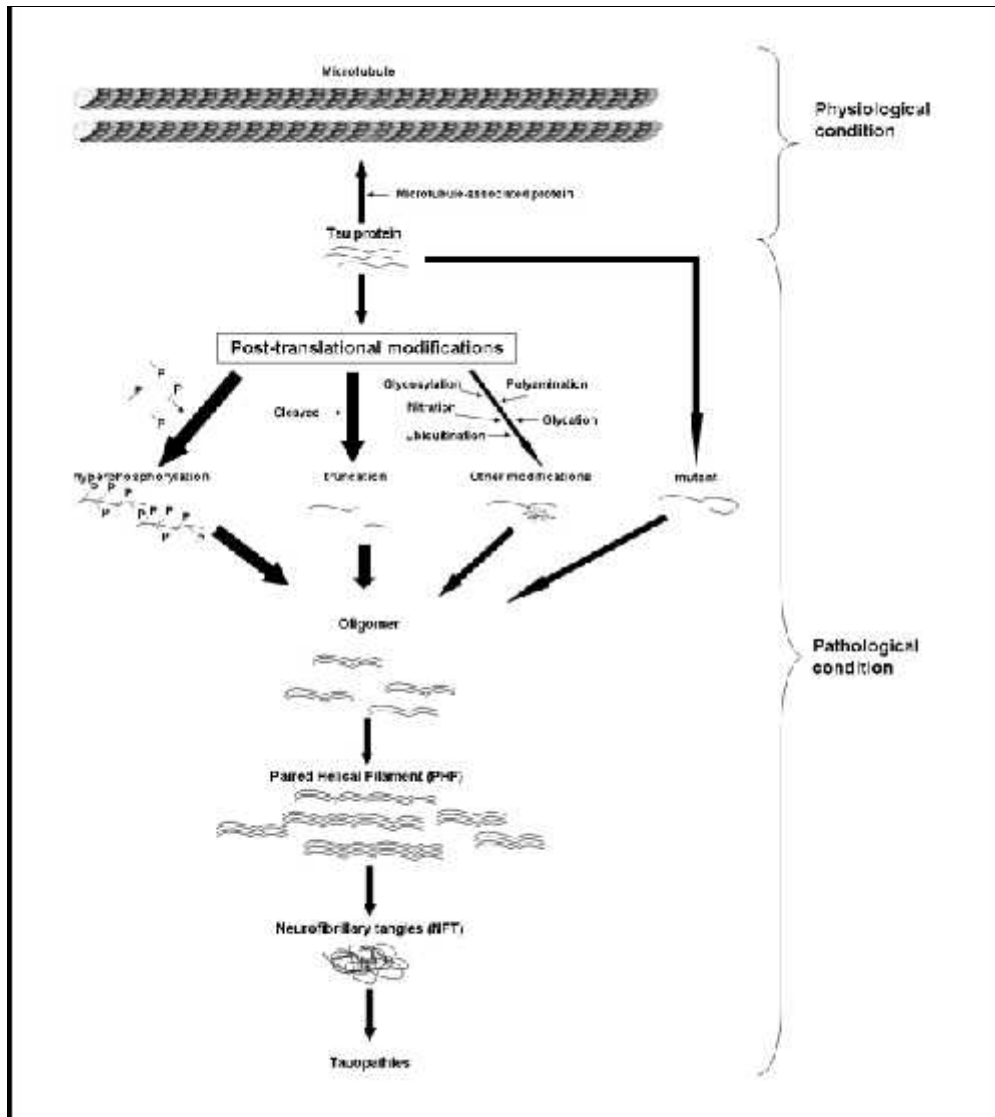
Las taupatías son un grupo de enfermedades neurodegenerativas que tienen en común la presencia de agregados intraneuronales de tau. La EA es ampliamente la taupatía más prevalente, pero también deben considerarse dentro de este grupo la Enfermedad de Pick, la Degeneración Corticobasal (DCB), la Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP), Demencia Frontotemporal-Parkinsonismo ligada al cromosoma 17 (DFTP-17) entre otras.

No se han encontrado mutaciones de tau directamente asociadas con el riesgo de presentar EA, sin embargo, existen más de 30 mutaciones de tau capaces de producir agregación de la proteína y desarrollo de otras taupatías, (van Swieten y Spillantini, 2007). Las características ultraestructurales de los PHFs son propias de cada taupatía, encontrándose diferencias en el tipo predominante de filamento (helicoidales en la EA, rectos en la en la PSP o ambos tipos en la DCB o la Enfermedad de Pick). Estas diferencias se originan en la heterogeneidad de las isoformas de tau que componen los agregados y/o en diferencias en como los monómeros de tau se empaquetan para formar un polímero (Ksiezak-Reding y Wall, 2005). Las diferencias en el contenido de isoformas de tau presentes en las diversas taupatías, así como variaciones en su grado de fosforilación permiten realizar una clasificación molecular de las taupatías en 5 tipos de acuerdo al patrón de migración de las formas de tau en electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGEs), de manera semejante a un “código de barras” específico para cada síndrome (Lee *et al*, 2001; Sergeant *et al*, 2005)

Si bien, se cuenta con abundante evidencia respecto del rol patogénico de tau modificada en las taupatías, la interrogante persiste respecto de la subpoblación de tau que resulta neurotóxica (ya sean monómeros y pequeños oligómeros o grandes agregados proteícos como son los ONFs). Se cuenta con datos que indican que la pérdida neuronal y el deterioro de memoria son concurrentes con la acumulación de especies solubles de tau y disociadas de los depósitos de ONFs en modelos murinos de EA (Yoshiyama *et al*, 2007). Así la pérdida de sinapsis y la activación microglial precede al desarrollo de ONFs en el modelo murino de taupatía P301S. Por otro lado, en un modelo murino que expresa proteína tau en forma represible, la supresión de tau mejora las funciones de memoria (Santacruz *et al*, 2005) y de manera similar, en un modelo que genera ONFs y placas seniles, la reducción inmunológica de la proteína tau soluble, pero no la de los ONFs o placas insolubles producen mejoría cognitiva. La reducción de A soluble y de tau, pero no la reducción de A en forma aislada, disminuye el deterioro cognitivo en el mismo modelo animal (Oddo *et al*, 2006).

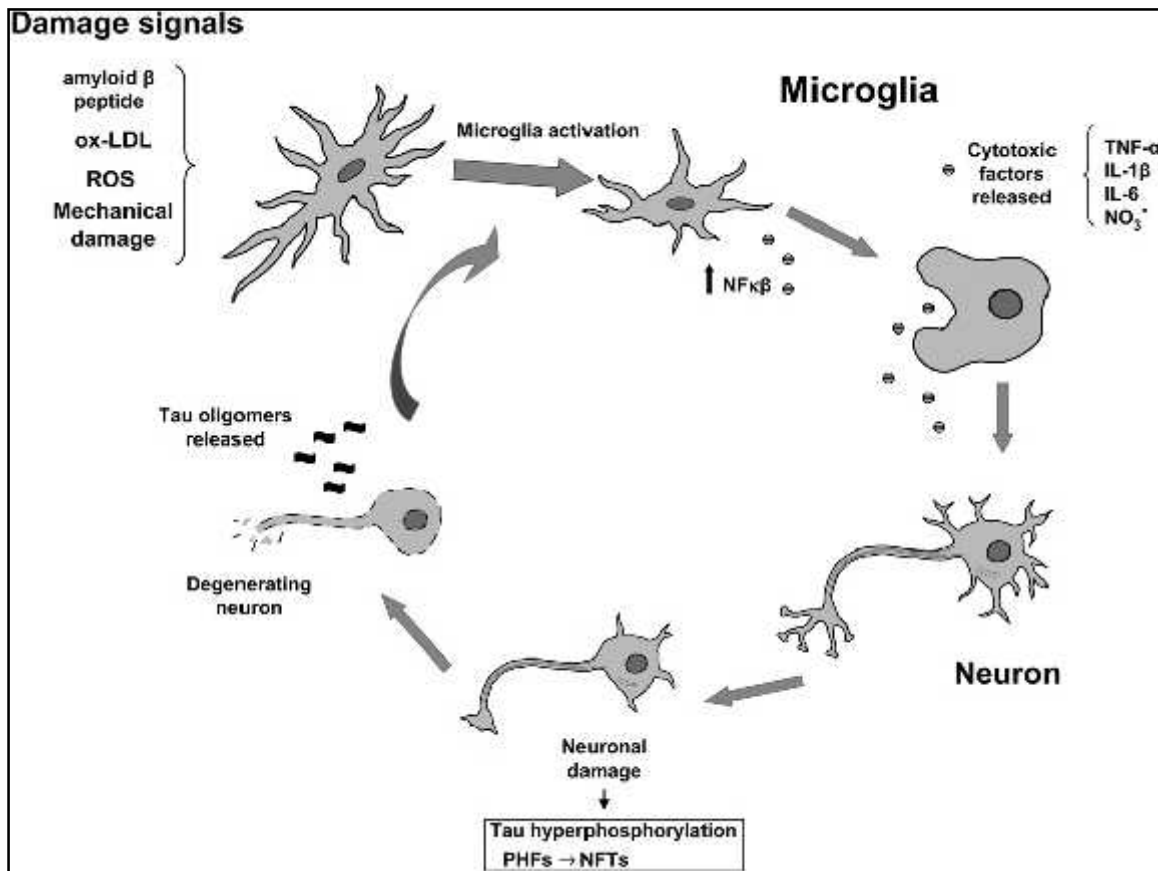
Además del grado de agregación, la actividad neurotóxica de tau depende de modificaciones postraduccionales de la proteína, las cuales incluyen su grado de fosforilación, truncación, glicosilación, glicación, nitración ubiquitinación y poliaminación. Actualmente se cuenta con evidencia de que las fosforilaciones de tau en sitios SP/TP son de gran importancia y de hecho cuando estas son bloqueadas se logra una importante reducción en la toxicidad de tau (Steinhilb *et al*, 2007). La Figura 4 esquematiza las modificaciones patogénicas que sufre tau en enfermedades neurodegenerativas.

**Figura 4: modificaciones postraduccionales y agregación anómala de tau.** En condiciones fisiológicas la principal función de tau como MAP es estabilizar los microtúbulos. Bajo condiciones patológicas, como ocurre en casos de mutaciones o modificaciones post traduccionales, tau se convierte en un estímulo tóxico. La forma de tau que es principalmente responsable de sus efectos neurotóxicos es aún tema de debate (Farías *et al, in press*).



Recientemente, hemos propuesto que uno de los mecanismos mediante los cuales tau puede ser neurotóxica es mediante la activación del sistema inmune innato (Morales *et al*, 2010b) (Figura 5). De acuerdo a esta hipótesis, distintas formas de tau son liberadas al intersticio desde neuronas que degeneran. Al ser liberada, tau induce la activación de células de la microglia, que a su vez producen y liberan citoquinas proinflamatorias que actúan en las neuronas para gatillar procesos neurodegenerativos que incluyen modificaciones de tau y muerte neuronal. Es este marco conceptual el que ha dado lugar a nuestra hipótesis de cambios en la neuroinmunomodulación como elemento central en la patogénesis de la EA (Morales *et al*, 2010a)

**Figura 5: Modelo de activación microglial por tau modificada.** La proteína tau que se libera desde neuronas en degeneración actúa como una señal para que células de la microglia se activen y liberen citoquinas que producen disfunción y daño neuronal (Maccioni *et al*, 2010).



Si bien, los agregados de tau son más fáciles de cuantificar que las lesiones neuríticas, el 85 a 90% de la patología relacionada a tau se encuentra en las neuritas distróficas, cuya relación con las manifestaciones clínicas de la EA y otras taupatías no ha sido estudiada (Mitchell *et al*, 2000). Por otro lado, se ha sugerido que neuronas con lesiones neurofibrilares pueden sobrevivir por largos períodos de tiempo. De hecho, las neuronas hipocampales pueden sobrevivir por décadas conteniendo ONFs (Morsch *et al*, 1999). Lo anterior ha apoyado la hipótesis de que los agregados de tau pueden no ser tóxicos en sí mismos y de hecho pueden proteger a las neuronas al secuestrar monómeros (formas alteradas de tau), que pueden estar aumentados en neuronas bajo condiciones patológicas (Hernandez y Avila, 2008) en una forma similar a lo que se ha propuesto para el caso de los agregados de huntingtina (Kuemmerle *et al*, 1999). Por estas razones, la pregunta respecto de si los agregados fibrilares de tau que se observan en las taupatías están directamente ligados a la patogenia o progreso de estas enfermedades es un tema que concita gran debate. Cabe destacar además que la hipótesis de tau como vía final común en la EA se correlaciona bien con las evidencias clínicas (Maccioni y Perry, 2009)

Agregados oligoméricos de tau han sido detectados en cerebros de pacientes con EA (Maeda *et al*, 2006), incluyendo especies con patrones de migración en PAGE concordantes dímeros de tau, los que parecen correlacionarse mejor con deterioro de memoria que los ONFs (Berger *et al*, 2007). Algunos pacientes con DFTP-17 presentan extensa neurodegeneración con alto nivel de fosforilación de tau, pero con una baja carga de ONFs, lo que ha dado soporte a la posibilidad de la existencia de agregados intermediarios de tau con características neurotóxicas en las taupatías humanas (Bird *et al*, 1999).



## 2. Biomarcadores en Enfermedad de Alzheimer

### 2.1 Necesidad de biomarcadores en la EA

Un biomarcador corresponde a un indicador de la presencia o extensión de una enfermedad que está asociado directamente a las manifestaciones clínicas y al pronóstico de la enfermedad. Los biomarcadores para deterioro cognitivo y demencia han sido un tema evaluado en los últimos años y se ha discutido el valor de una gran variedad de ellos (Maccioni *et al*, 2004). El informe de consenso de “The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer’s Association” y el “National Institute on Aging working group” relativo a marcadores moleculares y bioquímicos de la EA (1998) enumeró los criterios específicos y características que deben poseer los biomarcadores para la EA. En primer lugar, los biomarcadores deben ser precisos, confiables y económicos, a la vez que deben detectar una característica fundamental de la neuropatología. En segundo lugar, deben ser validados en casos confirmados neuropatológicamente. También éstos deberían ser extremadamente sensibles a los cambios en la enfermedad (sensibilidad >80%). Finalmente, la especificidad del biomarcador debería ser lo suficientemente alta para diferenciar entre la EA y otros desordenes neurodegenerativos. Basados en estos criterios, los científicos han podido eliminar muchas sustancias que carecen de importancia en la enfermedad y que no cumplen con el objetivo final que es el generar biomarcadores que contribuyan de manera significativa al diagnóstico de la EA (Mulder *et al*, 2000).

Numerosos grupos han hecho esfuerzos por descubrir estos biomarcadores. Se han estudiado marcadores en líquido cefalorraquídeo (LCR), como niveles de péptido beta amiloide, proteína tau total y tau fosforilada en diversos residuos (p-tau) (Maccioni *et al*, 2004). Entre éstos se ha reportado que el incremento de la variante hiperfosforilada de tau en LCR aumenta progresivamente con el deterioro cognitivo, encontrándose una estrecha correlación entre éstos (Maccioni *et al*, 2006), mientras que al analizar también los genotipos Apolipoproteína E (ApoE), se encuentra una asociación entre ApoE- $\epsilon$ 4 y mayor compromiso cognitivo en pacientes con MCI (Lavados *et al*, 2005). Recientemente se ha descrito que las variaciones del hierro redox activo en el LCR de

sujetos con EA constituirían un sensor apropiado para evaluar el deterioro cognitivo (Lavados *et al*, 2008).

La última revisión de los criterios diagnósticos de EA (criterios NINCDS-ADRDA) (Dubois *et al*, 2007) atribuye gran importancia al uso de biomarcadores, como elementos de apoyo al diagnóstico, considerando específicamente a la disminución de A $\beta$  (1-42) en LCR, el aumento de tau total o de p-tau en LCR y dejando lugar a la combinación de estos biomarcadores o a nuevos marcadores validables dentro de los nuevos criterios. Los estudios de imágenes pueden ser complementarios a la medición de biomarcadores. Schoonenboom *et al* (2008) encontró que la evaluación de atrofia del lóbulo temporal medial contribuye de forma independiente al diagnóstico de EA y que el estudio de biomarcadores en LCR es más sensible en el diagnóstico, particularmente en EA temprana, en ausencia de atrofia temporal medial. Por su parte (Fellgiebel *et al*, 2007) describe que al combinar FDG-PET con mediciones de p-tau en LCR, FDG resulta un mejor elemento predictivo de la conversión de MCI a demencia, mientras que p-tau es más sensible para mostrar deterioro cognitivo

Lamentablemente muchos de los biomarcadores descritos al momento requieren de la obtención de LCR, lo que implica la utilización de un procedimiento invasivo como la punción lumbar para obtener las muestras. Peskind *et al* (2005) abordaron este tema estudiando a 428 pacientes, en quienes se realizó punción lumbar utilizando la aguja espinal Sprotte de 24 g y extrayendo hasta 31 ml de LCR para estudio de biomarcadores. Evaluaron la presencia de ansiedad y cefalea en relación a la punción lumbar, encontrando una frecuencia de cualquier efecto adverso de 11,7%, con eventos clínicamente significativos en 3,97% y presencia de cefalea severa post punción lumbar en 0,93%. Cabe destacar que los pacientes portadores de EA o MCI (67 sujetos) presentaron una menor frecuencia de dolor post punción lumbar que el resto de los sujetos (1,1% de cefalea leve y 0% de efectos adversos clínicamente significativos). Por su parte Maccioni *et al* (2006) obtuvieron muestras de LCR en 93 pacientes mediante punción lumbar con agujas de 20 o 22 g y extrayendo aproximadamente 5 ml de LCR, con lo que reportan cefalea en menos de 5% de los pacientes (desde leve malestar a

cefalea severa). Como se analiza mas abajo, estos últimos estudios permitieron correlacionar de manera cuantificable los cambios en los niveles de tau hiperfosforilada en el LCR con el nivel de progreso en el deterioro cognitivo de la cohorte de pacientes de dicho estudio longitudinal, evidencias que permitieron la utilización de esta herramienta como un biomarcador en casos de pacientes en riesgo de EA (Lavados *et al*, 2005; Maccioni *et al*, 2006).

Como alternativa a los estudios en LCR se ha estudiado biomarcadores en sangre y orina, lo que ha incluido el análisis de diversos compuestos en el plasma como son las distintas fracciones de A $\beta$  y el estudio de formas de la proteína precursora de amiloide (APP) en plaquetas (Borroni *et al*, 2006)

## **2.2 Marcadores en LCR**

El LCR se encuentra en íntimo contacto con el tejido nervioso, realizando un importante intercambio de diversas sustancias al intersticio neural. No es de extrañar, por tanto, que el LCR sea considerado como un sensor fiable de los procesos que ocurren dentro del encéfalo como son los que ocurren en la EA. Así se ha estudiado los niveles y modificaciones de diversas proteínas y sustancias implicadas en la patogenia de la EA, intentando validar su rol como biomarcadores.

**2.2.1 Proteína beta amiloide:** Los niveles de la fracción A $\beta$  (1-42) regularmente se encuentran disminuidos a menos de un 50% de su valor normal en el LCR de pacientes con EA, lo que presenta una sensibilidad de 78% y una especificidad de 81-83% para el diagnóstico de EA (Wiltfang *et al*, 2007). Se ha observado que niveles bajos de A $\beta$  (1-42) pueden predecir la aparición de deterioro cognitivo en mujeres mayores sin demencia (Gustafson *et al*, 2007). Por su parte la fracción A $\beta$  (1-40) es el constituyente mayoritario del A $\beta$  total del LCR. Se ha planteado que la relación A $\beta$  (1-42) / A $\beta$  (1-40) tiene una mejor correlación con los niveles de p-tau y que sería un mejor marcador que A $\beta$  (1-42) aislado (Wiltfang *et al*, 2007).

**2.2.2 Tau y tau fosforilada:** Tau fosforilada en treonina 181 (p-tau 181) permite diferenciar a sujetos con EA de sujetos controles y con demencia con cuerpos de Lewy, siendo un mejor marcador de EA que A $\beta$  (1-42) y tau total (Vanderstichele *et al*, 2006). Los estudios de Maccioni *et al* (2006) demuestran incrementos de tau hiperfosforilada en sujetos con EA, en tanto solo la subpoblación de los sujetos con MCI con mayor nivel de deterioro mostraban incrementos en esta variante anómala de tau. Los niveles de A $\beta$  (1-42) en tanto disminuyeron en el LCR de sujetos con EA. Los niveles de tau en LCR permiten diferenciar los pacientes con MCI que progresarán a demencia de aquellos con cuadros depresivos (Schonknecht *et al*, 2007). Andersson *et al* (2007) describe un aumento de p-tau en los pacientes con severo compromiso de memoria, que sólo es significativo en aquellos que progresan a EA, sin encontrar cambios en tau total ni en A $\beta$  (1-42). En contraposición a estos resultados Zetterberg *et al* (2007) y Blennow *et al* (2007) describen la estabilidad de tau total, p-tau 181 y A $\beta$  (1-42) en LCR en una observación a 2 años y 6 meses respectivamente, mientras que Bouwman *et al* (2007) describe que A $\beta$  (1-42), así como tau total (pero no p-tau 181) aumentan con el paso del tiempo en el LCR de una cohorte de pacientes de una clínica de memoria, independientemente de su diagnóstico. En dicho estudio no se observó cambios en los niveles de p-tau 181 y se planteó que estos biomarcadores no serían útiles para evaluar la progresión de la enfermedad. Al analizar los niveles de p-tau 231, se ha sugerido un punto de corte de 27,32 pg/ml en LCR, con lo que se logra predecir la conversión de MCI a EA con una sensibilidad de 66,7-100% y una especificidad de 66,7-77,8% (Ewers *et al*, 2007).

Debe considerarse que el consumo de estatinas puede alterar los niveles de p-tau en LCR, sin alterar A $\beta$  (1-42) ni tau total (Riekse *et al*, 2006). Los niveles de p-tau en LCR también podrían tener un lugar en la monitorización de la respuesta a tratamiento. Así Degerman Gunnarsson *et al* (2007) estudió un grupo de 11 pacientes tratados con memantina por un año encontrando una disminución de p-tau en LCR, sin encontrar cambios en tau total o A $\beta$  (1-42).

Un meta-análisis (Diniz *et al*, 2008) mostró que A $\beta$  (1-42), tau total y p-tau son útiles para predecir la evolución de MCI a EA. El genotipo ApoE-4 pudiese relacionarse a los niveles de expresión de biomarcadores en LCR. Andersson *et al* (2007) encontró una mayor expresión de tau total y p-tau y una disminución de A $\beta$  (1-42) en pacientes con compromiso severo de la memoria episódica y ApoE-4 (+). Por su parte, Engelborghs *et al* (2007) realizó un estudio en muestras provenientes de 50 pacientes con EA confirmada por autopsia sin encontrar relación entre A $\beta$  (1-42), tau total y p-tau 181 con genotipo ApoE-4 o con la carga de placas u ovillos neurofibrilares. Otro estudio reciente tampoco encontró relación entre patología neurofibrilar y niveles de p-tau 181, pero si la encuentra con p-tau 231 (Buerger *et al*, 2007).

Cabe mencionar la importancia de las condiciones de almacenamiento de las muestras; así, las muestras para estudio de tau total y p-tau pueden mantenerse a temperatura ambiente hasta 24 horas, mientras que las muestras de LCR para estudio de A $\beta$ -42 deben congelarse en forma inmediata (Kaiser *et al*, 2007).

### **2.3 Biomarcadores periféricos.**

Uno de los biomarcadores periféricos más usados corresponde a la medición de fracciones de A $\beta$  en el plasma. Sin embargo, debe considerarse que los cambios en la concentración de AB (1-40) son poco específicos para EA y se relacionan con la edad (Luchsinger *et al*, 2007). Por otro lado cuando se evalúa los niveles de AB (1-42), se encuentra que de manera aislada distan de ser un buen marcador de EA y se considera que su aumento sería un evento inicial en esta patología, por lo que se ha propuesto la necesidad de asociar otros marcadores como la atrofia del lóbulo temporal medial y niveles de homocisteína (Blasko *et al*, 2008). También se ha planeado que existiría una relación entre marcadores del metabolismo del ácido fólico y vitamina B12 con el desarrollo de demencia. Numerosos grupos se han enfocado en demostrar esta relación, presentando hasta el momento resultados contradictorios (Irizarry *et al*, 2005; Isobe *et al*, 2005; Koseoglu and Karaman, 2007; Serot *et al*, 2005; Seshadri *et al*, 2002).

### **2.3.1 Polimorfismo de ApoE.**

ApoE es una proteína plasmática que está involucrada en el transporte del colesterol. En el SNC, la ApoE está implicada en el crecimiento y reparación del sistema nervioso durante el desarrollo y después de un daño (Lambert *et al*, 2004). El gen de la ApoE se localiza en el cromosoma 19 y presenta 3 alelos: 2, 3, 4. El alelo 4 está asociado con un mayor riesgo de presentar EA, encontrándose este alelo entre 40 al 50% en todos los pacientes con la EA (Farrer *et al*, 1997). Sin embargo, se considera que ApoE serviría más como un factor de riesgo de la EA que como un biomarcador (Mayeux *et al*, 1998). Rojo *et al* (2006) han revisado la relación que existe entre alteraciones en la homeostasis de los lípidos y la etiopatogénesis de la EA

### **2.3.2 Marcadores inflamatorios**

Las moléculas proinflamatorias son potenciales marcadores periféricos de EA, sin embargo, los resultados al estudiarlas han sido inconstantes. En los pacientes con EA se ha descrito elevación en los niveles de CD40 soluble plasmático, así como una disminución de TGF- $\beta$  1, mientras que evaluaciones de niveles de IL-1, IL-2, IL-6 y TNF  $\alpha$  han producido resultados contradictorios (Rojo *et al*, 2008)

### **2.3.3 Alteraciones de la proteína p53**

Se ha descrito la existencia de alteraciones en el plegamiento terciario de la proteína p53 que pueden ser reconocidas con anticuerpos específicos en los fibroblastos de pacientes con EA (Uberti *et al*, 2006). Esta proteína alterada presenta alteraciones en su unión a DNA y actividad transcripcional. Las mismas alteraciones de p53 fueron encontradas en pacientes con EA al analizar células mononucleares de la sangre periférica mediante técnicas de inmunoprecipitación y citofluorimetría (Uberti *et al*, 2008). Se ha informado que esta metodología de biomarcadores para la EA tendría una sensibilidad de 90% y una especificidad del 77% (Lanni *et al*, 2008)

### **2.3.4 Péptido precursor de amiloide en plaquetas**

El APP es una proteína transmembrana con 3 isoformas derivadas del splicing alternativo del mismo mRNA. Mediante clivaje proteolítico, APP genera A $\beta$  que es el mayor

componente de las placas seniles. Por lo anterior, APP pudiese ser un biomarcador útil en la EA. Las plaquetas contienen más del 95% del APP circulante, conteniendo toda la maquinaria necesaria para el metabolismo de APP y se piensa que pueden tener un correlato bioquímico con los procesos patogénicos de la EA (Zainaghi *et al*, 2007). Además, se ha encontrado que la exposición de plaquetas a A $\beta$  y otras proteínas mal plegadas es capaz de inducir la activación y agregación plaquetaria. (Herczenik *et al*, 2007).

El 10% del APP presente en plaquetas corresponde a la proteína en su forma completa y el 90% restante a formas solubles, trucas en su segmento carboxilo. Este APP soluble se almacena junto a A $\beta$  en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas. Los estudios que han evaluado al APP plaquetario como marcador de EA se han dedicado a estudiar la relación entre los distintos fragmentos de APP presentes en las plaquetas y que pueden ser reconocidas mediante técnicas de *immunoblot*.

En la EA se ha descrito la reducción de la relación de formas de APP (130 kDa/110 kDa) que se relaciona con la severidad y progresión de la enfermedad (Borroni *et al*, 2006) (Figura 6). Presenta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de EA con un rango que va del 80 al 95% (Borroni *et al*, 2006; Padovani *et al*, 2002). La disminución de la relación entre las formas de APP es un evento temprano en la evolución de la EA y se ha descrito que la sensibilidad y especificidad de este biomarcador para detectar la conversión de deterioro cognitivo leve en EA es de 83% y 71% a dos años respectivamente (Borroni *et al*, 2003; Borroni *et al*, 2006).

Este método no es cuantitativo y es probable que debido a diferencias en los múltiples pasos del procesamiento de la muestra, la magnitud numérica del ratio de APP varíe en distintos estudios y, por lo tanto, se requiere una muestra estándar. Zainaghi *et al* (2007) han descrito que existe un cambio significativo en el patrón de APP en plaquetas en pacientes con EA, pero no así en pacientes con MCI y que existe una correlación positiva entre el ratio de APP y el desempeño de los sujetos en evaluaciones cognitivas. Por su parte, Liu *et al* (2007) describen que la relación de formas de APP en plaquetas se

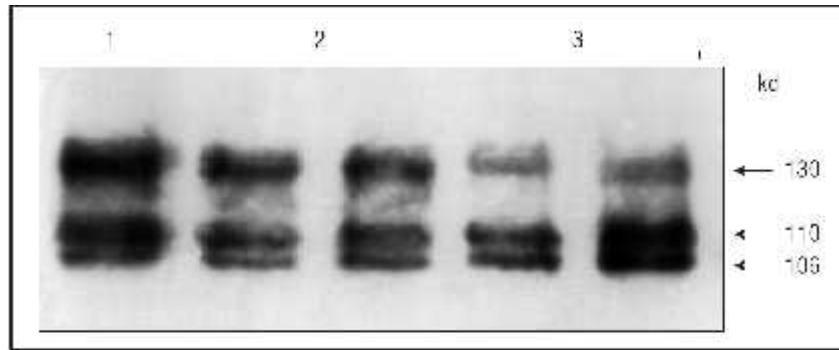
correlaciona con el estado cognitivo de los pacientes y podría ser un predictor de declinación cognitiva en pacientes con EA.

En cuanto a la utilidad de este biomarcador para la monitorización de la respuesta a tratamiento, Liu *et al* (2005) encontró en un grupo de 39 pacientes con EA que la administración del inhibidor de colinesterasa galantamina por 12 semanas era capaz de producir un aumento en la relación entre formas de alto peso molecular y bajo peso molecular de APP, al mismo tiempo que producía una mejoría significativa en evaluaciones cognitivas. Estos resultados no eran modificados por la condición de portador APOE- $\epsilon$ 4. Una respuesta semejante con mejoría de la relación entre las formas de APP se ha observado con el uso de donepezilo (Borroni *et al*, 2001).

La razón de la reducción en el radio de las formas de APP en EA no está clara, aunque se ha postulado que se debe a un cambio en la relación de las actividades de las enzimas  $\alpha$ -secretasa (vía no amiloidogénica) y  $\gamma$ -secretasa (vía amiloidogénica). El efecto de los inhibidores de colinesterasa sobre el metabolismo de APP plaquetario dependería de cambios en el balance de actividad  $\alpha$  y  $\gamma$ -secretasa (Zimmermann *et al*, 2005). También se ha sugerido que los cambios en los radios de APP se relacionan a cambios en la fluidez de la membrana plasmática de las plaquetas.



**Figura 6:** Alteraciones en la relación entre las formas de 130 kDa y las de 106-110 kDa en pacientes con EA. Los *immunoblots* de homogenados de plaquetas se realizaron con el anticuerpo 22C11 específico para APP. En 1) se muestra un sujeto control, en 2) pacientes con demencia no EA y en 3) pacientes con EA en quienes se aprecia una notoria reducción de la señal de APP en 130 kDa, respecto a las formas de 106-110 kDa (Di Luca *et al*, 1998)

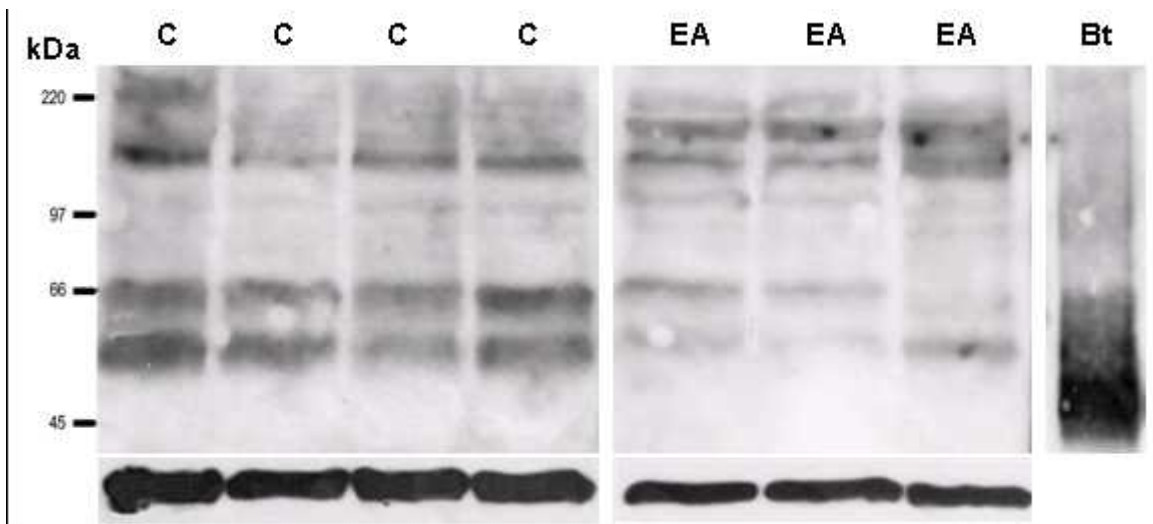


### 2.3.5 Proteína tau en plaquetas

La proteína tau es un importante MAP en los axones y cumple roles fisiológicos críticos en la estabilización de de los microtúbulos y la inducción de su ensamblaje (Maccioni *et al*, 1995). Como ya se ha descrito, bajo condiciones patológicas tau puede sufrir modificaciones post-traduccionales y es capaz de autoagregarse. Considerando la evidencia que sugiere que las células de la sangre periférica y en particular las plaquetas pueden ser un adecuado referente de los procesos fisiopatológicos que ocurren en el encéfalo de pacientes con EA, en nuestro Laboratorio de Biología Celular Molecular y Neurociencias, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, a cargo del Profesor Dr. Ricardo Maccioni, se decidió analizar las plaquetas de pacientes con EA evaluando si estas expresaban la proteína tau (información que no se encuentra disponible en la literatura científica). Estudios iniciales con anticuerpos que reconocen la proteína tau mostraron la presencia de esta proteína en *immunoblots* de extractos de plaquetas obtenidas desde sangre venosa periférica tanto en pacientes con EA como en sujetos sanos jóvenes (18 a 25 años). En estos mismos estudios llama la atención la presencia de bandas inmunorreactivas de tau que migran en pesos moleculares mucho mayores de lo esperado para tau en electroforesis en condiciones desnaturalantes y reductoras (SDS-

PAGE). A estas bandas de tau de alto peso las hemos llamado HMW-tau para diferenciarlas de la tau del peso correspondiente al monómero (cerca a 60 kDa), a la que operacionalmente nombraremos L-tau (o light tau). Los primeros resultados indican que las fracciones HMW-tau se encuentran aumentadas respecto de L-tau en pacientes portadores de EA, al menos al comparar estos sujetos con controles jóvenes (Figura 7).

**Figura 7:** *Inmunoblot* representativo de extracto de plaquetas en sujetos controles jóvenes (C) y pacientes con EA (EA). Se utilizó el anticuerpo tau-5 que reconoce tau total. A la derecha se aprecia un control con tau purificada a partir de cerebro bovino (Bt) y en los recuadros inferiores se muestra  $\beta$ -actina como control de carga. Se observa que las bandas de peso mayor a 70 kDa (HMW-tau) son proporcionalmente mayores en los sujetos con EA que en los controles.

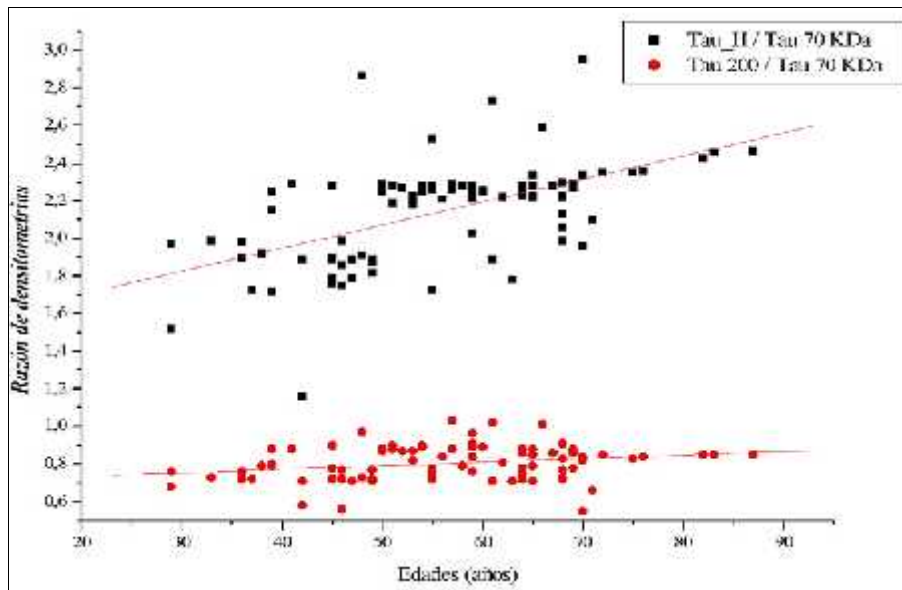


### 2.3.6 Proteína tau plaquetaria y envejecimiento

Con el fin de evaluar si los cambios en la proporción de HMW-tau y L-tau se relacionan a la EA, o más bien, son un fenómeno relacionado con la edad, hemos realizado una evaluación de los niveles y cambios en las distintas formas de tau en sujetos de distintas edades y sin antecedentes de alteración cognitiva. Este análisis se realizó colaboración con Patricio Pérez, tesista de Química y Farmacia de la Universidad Arturo Prat; en forma paralela a los estudios incluidos en la presente tesis (Pérez *et al*, 2009).

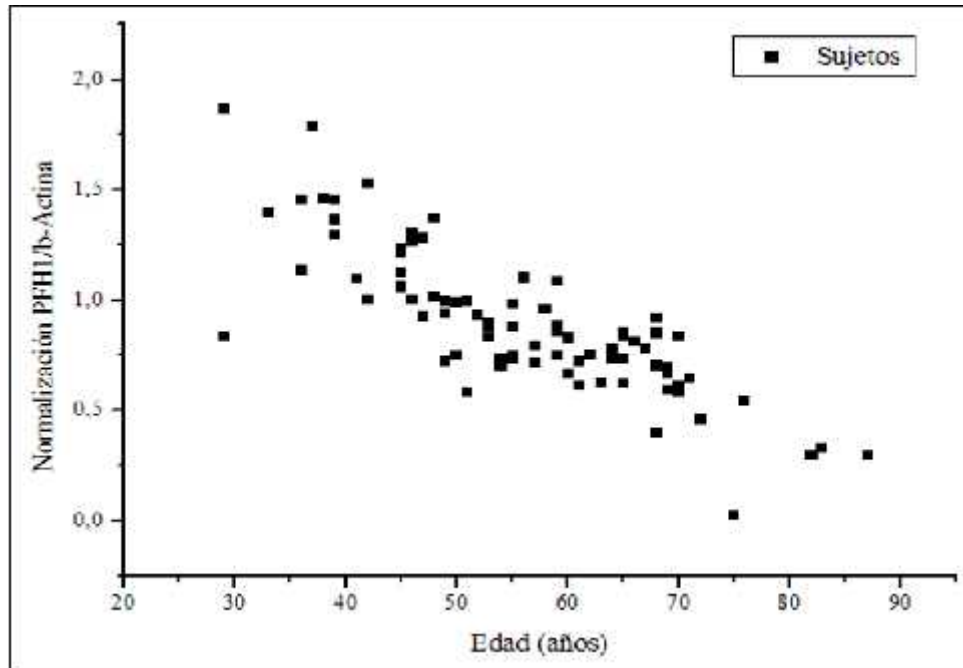
Se reclutaron 104 sujetos de edades que fluctuaron entre 29 y 87 años (promedio  $57,7 \pm 12,2$  años) entre la población que acude al servicio de toma de muestras del Hospital de Peñaflores. Se obtuvo un consentimiento informado de los participantes en la investigación y se tomó una muestra de 6 cc de sangre venosa que fue procesada de acuerdo a los protocolos que se describen en los puntos 5.3, 5.6, 5.7, 5.11 y a la figura 10, para obtener un extracto de proteínas de plaquetas que fue analizado mediante técnicas de *immunoblot* con el anticuerpo Tau-5, que reconoce tau total, Tau-1 que reconoce formas no fosforiladas de tau y PHF-1 que reconoce formas fosforiladas de tau. Se realizó un análisis mediante densitometría de las bandas de proteína tau en *immunoblots*, encontrándose que la relación entre formas de alto y bajo peso molecular de tau, se mantiene estable a un amplio rango de edades tal como se aprecia en la Figura 8.

**Figura 8:** Gráfico de dispersión de datos que muestra la razón entre formas de tau de alto y bajo peso molecular (HMW-tau/L-tau) en sujetos sin deterioro cognitivo a distintas edades. Los puntos negros corresponden a inmunoblots realizados con el anticuerpo Tau-5, mientras que los puntos rojos corresponden a las mismas muestras, pero esta vez analizadas con el anticuerpo Tau-1. Se aprecia que para ambos casos la razón HMW-tau/L-tau (en el eje de las ordenadas) tiende a mantenerse constante dentro de un amplio rango de edades (abscisas).  $R^2 = 0,3089$ ;  $SD = 0,2283$ ;  $p < 0,0001$  para Tau-5 y  $R^2 = 0,0235$ ;  $SD = 0,0897$ ;  $p = 0,0172$ . (Pérez, 2009).



En los mismos sujetos se realizó un análisis semicuantitativo de la cantidad de tau fosforilada, evaluada en *inmunoblots* con el anticuerpo PHF-1, encontrándose que la cantidad de tau fosforilada reconocida por el anticuerpo tiende a decrecer en relación a la edad, tal como se muestra en la Figura 9.

**Figura 9:** Gráfico de dispersión de datos, que muestra la cantidad relativa de tau fosforilada a distintas edades. Cada punto representa la cantidad de tau fosforilada normalizada por  $\beta$ -actina en *immunoblots* de extractos de proteínas plaquetarias con el anticuerpo PHF-1.  $R^2 = 0,682$ ;  $SD = 0,179$ ;  $p < 0,0001$ . (Pérez, 2009).



Los datos experimentales, entonces, sugieren que los cambios en la proporción entre HMW-tau y L-tau que se aprecian en pacientes con EA no son una alteración secundaria al envejecimiento y podrían estar relacionados a la fisiopatología de la EA y, por lo tanto, pudiesen ser utilizados como un novedoso marcador bioquímico de la enfermedad. La disminución de la cantidad de tau fosforilada que se observa en relación a la edad puede tener relación con cambios en los patrones de actividad de los sistemas de quinasas y fosfatasa durante el envejecimiento, lo que sería similar a los cambios descritos durante el desarrollo (Yu *et al*, 2009). Por otro lado, se cuenta con evidencia de que el estrés oxidativo es capaz de aumentar la actividad de la fosfatasa PP1, lo que a su vez lleva a una disminución en la fosforilación de tau (Zambrano *et al*, 2004); un mecanismo semejante podría ser responsable por los cambios en el patrón de fosforilación de tau en relación al envejecimiento.

### 3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Para el desarrollo de la investigación en la presente Tesis Doctoral hemos propuesto las siguientes hipótesis de trabajo:

- A) La enfermedad de Alzheimer no es una patología solamente circunscrita al sistema nervioso, sino un desorden sistémico que se expresa mayormente, pero no en forma única, a nivel del sistema nervioso central
- B) Existen cambios a nivel celular y bioquímico que involucran a la proteína tau en las plaquetas de los pacientes con EA, cuyo análisis podría de utilidad para un diseño futuro de biomarcadores periféricos de la enfermedad (Maccioni y Farías 2009).
- C) Las formas de proteína tau de alto peso que hemos encontrado en plaquetas corresponderían a formas oligoméricas de la proteína
- D) Basados en evidencias del estudio piloto de esta Tesis Doctoral y en estudios previos de nuestro laboratorio, planteamos que existe una correlación entre la razón HMW-tau/L-tau en plaquetas y el nivel de deterioro cognitivo en pacientes portadores de EA. Así esperamos que pacientes con mayor grado de deterioro cognitivo tengan una mayor razón HMW-tau/L-tau
- E) La medición de la razón HMW-tau/L-tau en plaquetas puede servir de base para desarrollar un biomarcador para el diagnóstico precoz y el seguimiento de pacientes con EA. Este podría ser parte de un algoritmo de evaluación clínica y de laboratorio de la enfermedad que ayude a mejorar nuestra capacidad diagnóstica en vivo e, idealmente, de forma presintomática.

#### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Evaluar los patrones electroforéticos de HMW-tau y L-tau en plaquetas humanas de pacientes con EA y controles sanos pareados por edad.
  
- 2) Evaluar si existe una correlación directa entre las distintas formas de tau y p-tau con el nivel de deterioro cognitivo de pacientes con EA, evaluados por neuropsicología
  
- 3) Evaluar la relación entre niveles de las distintas fracciones de tau plaquetaria y de la relación HMW-tau/L-tau con las fracciones de distinto peso molecular de APP en plaquetas de pacientes portadores de EA y controles

## 5. MÉTODOS

### Estudio clínico

**5.1 Pacientes:** 66 sujetos fueron reclutados, de acuerdo a criterios de inclusión definidos, entre abril de 2007 y mayo de 2010 siendo clasificados en uno de los siguientes 4 grupos:

- 1) EA inicial (21 sujetos): puntaje en Minimental de Folstein (MMSE) (Folstein *et al*, 1975) 18 a 26 puntos de 30
- 2) EA moderada (15 sujetos): MMSE 10 a 17 puntos.
- 3) EA avanzada (11): MMSE 0 a 9 puntos
- 4) sujetos controles, sin alteración cognitiva en las evaluaciones realizadas (19).

También se reclutó y analizaron muestras provenientes de 3 sujetos con deterioro cognitivo leve (MCI) y de 3 sujetos portadores de demencias no correspondientes a EA.

Los sujetos participantes en el estudio pertenecen a la población que atiende la Unidad de neurología Cognitiva del Hospital del Salvador y el Instituto chileno de neurología cognitiva y cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

- 1) Los pacientes con EA probable cumplieron los criterios de NINCDS-ADRDA (McKhann *et al*, 1984). En el caso de los sujetos controles, las evaluaciones neuropsicológicas demuestran un desempeño cognitivo dentro de rangos normales y acorde a su edad y nivel educacional.
- 2) Edades de los sujetos entre 50 y 90 años.
- 3) Los sujetos no eran portadores de patologías médicas, neurológicas o psiquiátricas, que pudiesen afectar su participación en el estudio o los resultados de este.
- 4) Los sujetos indicaron que estaban dispuestos a participar en el estudio tras otorgar un consentimiento informado que fue firmado también por el representante legal en caso de pacientes con deterioro cognitivo.

Los estudios se realizaron con la aprobación del Comité de Ética Médica de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, y del respectivo Comité del Hospital Salvador (ver Anexos 2 y 3).



Los pacientes fueron agrupados por género, edad y nivel educacional y los controles fueron seleccionados entre sujetos de similares características. Los participantes pertenecen a la población del área residencial de Santiago (alrededor de 41% de ancestros amerindios y 59% caucásicos). Todos los participantes fueron evaluados en su estado médico y neurológico con el fin de descartar patologías que pudiesen alterar los resultados del estudio y confirmar su estado neurológico y función cognitiva. Se requirió que los pacientes con deterioro cognitivo contasen con una tomografía axial computada o resonancia nuclear magnética de encéfalo para descartar lesiones vasculares cerebrales, neoplasias, hematomas subdurales o cualquier otra causa de deterioro cognitivo que no corresponda a EA o invalide el diagnóstico o estratificación cognitiva del paciente.

## **5.2 Evaluación neuropsicológica**

Los sujetos que ingresaron al estudio participaron en una evaluación neuropsicológica para apoyar a su diagnóstico y clasificación cognitiva. Esta evaluación incluyó como mínimo la aplicación de los instrumentos Minimental de Folstein (MMSE) (Folstein *et al*, 1975), y *Global Deterioration Scale* (GDS) (Reisberg *et al*, 1982).

### **Análisis bioquímicos**

#### **5.3 Purificación de plaquetas**

Muestras de 5 cc de sangre venosa periférica se obtuvieron mediante punción venosa en la vena antecubital con sistema Venoject® (Terumo medical products) en tubos que contienen K<sub>2</sub>EDTA (10,8 mg) (BD Vacutainer®) las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente se procesaron tras un período no mayor a 2 horas. Las plaquetas fueron aisladas mediante centrifugación diferencial de acuerdo a Rao (1988), con modificaciones menores. La sangre se centrifugó a 200 g durante 10 minutos a 25°C (Rotina 35R Hettich Zentrifugen), obteniéndose un sobrenadante de plasma rico en plaquetas, el que posteriormente se centrifuga a 1600 g durante 10 minutos a 25°C, para obtener un pellet de plaquetas. El plasma se guardó a -80°C para eventuales análisis posteriores. Se agregaron 220 µL de NH<sub>4</sub>Cl 0,83% a 25°C durante 5 minutos con el fin de lisar eritrocitos residuales. Se centrifugó nuevamente las muestras a 1500 g durante 10

minutos a 25°C, y se lavó las plaquetas con 220 µL de tampón fosfato salino (PBS, 1,4 mM NaCl, 0,02 mM KCl, 0,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,017 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) - EDTA 1 mM en dos ocasiones.

## **5.4 Inmunofluorescencia**

**5.4.1 Plaquetas no adheridas:** Las plaquetas frescas obtenidas en tubos *Eppendorf* se resuspendieron en 30 µL de formaldehído al 2% durante 15 minutos. Esta muestra se centrifugó a 1500 g durante 10 minutos a 25°C, y se lava 3 veces con buffer PBS, para luego centrifugar a 1200 g durante 5 minutos a 25°C, recuperandose el pellet. Se permeabilizaron las plaquetas con 30µL de PBS - Triton X-100 0,1% durante 10 minutos a 25°C. Luego se lavó 3 veces con buffer PBS. Posteriormente se centrifugó a 1200g durante 5 minutos a 25°C, recuperando el pellet. Se bloquea con PBS – Albumina de suero bovino (BSA) 1% durante 30 minutos. Luego se centrifugó a 1200g durante 5 minutos a 4°C recuperando el pellet, el cual se incubó con los anticuerpos Tau-5 (50 µg/ml, aporte generoso del Dr. Lester Binder, *Northwestern University*, Chicago, IL), Tau-1 (50 µg/ml, donación del Dr. Lester Binder) o PHF-1 (1:20, generoso aporte del Dr. Peter Davies, *Albert Einstein College of Medicine*, NY, USA) en BSA 1% durante toda la noche a 4°C. Posterior a la incubación con anticuerpo primario, se realizó un lavado con Tampón PBS durante 5 minutos. Esta solución se resuspendió y centrifugó a 1200g durante 5 minutos a 4°C. Se incubó con el anticuerpo secundario Alexa fluor 555 1:300 y faloidina FITC (Sigma Chemical Co, St. Louis MO) 1: 400 en PBS - BSA 1% durante 1 hora a 4°C. Se realizaron 3 lavados con PBS por 5 minutos y posteriormente se centrifugó a 1200 g a 4°C y se recuperó un pellet que se resuspendió en PBS. Se colocó una gota de la suspensión anterior en el portaobjeto y se dejó secar (no completamente). Se adicionó medio de montaje (Fluorsave). Las muestras se cubrieron con cubreobjeto y se las dejó secar toda la noche a 25°C en oscuridad. Las muestras se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia y microscopía confocal (Zeiss META10). Las características de los anticuerpos primarios utilizados en el presente estudio se describen en la tabla 1.

**Tabla 1:** Anticuerpos primarios utilizados en el presente estudio.

<b>Anticuerpo</b>	<b>características</b>
Tau-5	IgG1 de ratón, reacciona con formas fosforiladas y no fosforiladas de tau. Su epítipo está en la zona media de tau. No presenta reacción cruzada con MAPs o tubulina
Tau-1	IgG1 de ratón monoclonal. Detecta múltiples isoformas de tau. Reconoce tau no fosforilada en Ser 195/198/199/202
Tau-12	IgG1 monoclonal de ratón específico contra los residuos 9 – 18 del N-terminal de tau. Este epitomo se pierde tras corte de tau por caspasa 6 (implica formas más maduras de tau patológica)
PHF-1	Anticuerpo generado en ratón, reconoce tau fosforilada en Ser 396 y Ser 404
22C11	IgG1 monoclonal de ratón. Reconoce los residuos 66 – 81 del N-terminal de APP en todas las isoformas de APP

**5.4.2 Plaquetas adheridas:** Plaquetas frescas suspendidas en PBS, son colocadas sobre un cubreobjeto inmediatamente después de ser purificadas para permitir que se activen y adhieran a la superficie de vidrio de acuerdo a Vega *et al* (2006) con modificaciones menores. Se permitió la adhesión de plaquetas al cubreobjetos durante 20 minutos y posteriormente se eliminaron las plaquetas no adheridas mediante dos lavados con PBS. Las plaquetas adheridas fueron fijadas y permeabilizadas en 2% paraformaldehído, 0,05% glutaraldehído y 0,04% NP40 en solución estabilizante de citoesqueleto (PHEM: 100 mM PIPES, 5,25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 20 mM MgCl<sub>2</sub>) por 20 minutos. Las plaquetas posteriormente se incubaron durante 1 hora en PBS-BSA 5% y posteriormente se incubaron con los anticuerpos: Tau-5 (50 µg/ml), Tau-1 (50 µg/ml) o PHF-1 (1:20) en BSA 1% a 4° C durante la noche o una hora a temperatura ambiente y luego se incubaron con faloidina FITC 1:400 y Alexa Fluor 555 1:300 en PBS – BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron los cubreobjetos con PBS por tres veces y

posteriormente en agua destilada y desionizada, se agregó medio de montaje y se montaron las muestras en portaobjetos, dejándolas en la oscuridad durante la noche, para ser evaluadas al día siguiente.

### **5.5 Análisis de citometría de flujo**

Las plaquetas fueron fijadas en formaldehído 2%, tal como se describe en el punto 5.4.1 y posteriormente fueron suspendidas en 200 µl de PBS y contadas en un hemocitómetro (Neubauer). Se tomaron 1000 plaquetas por ml y fueron analizadas mediante FACScan utilizando el software FACSDiva 6.1.1 (Becton Dickinson, San José, CA, USA).

### **5.6 Extracción de proteínas de plaquetas**

La muestra de plaquetas purificadas se centrifugaron a 1500 g durante 10 minutos a 25 °C y posteriormente se lisa el pellet de plaquetas con 150 µL de buffer de radioinmunoensayo (RIPA, 5,0 mM Tris - HCl pH 7.,5, 1,5 mM NaCl, 10% NP-40, 10% deoxycholate, 20 mM EDTA pH 8,0, 500 mM NaF, 1% SDS). La solución se centrifuga a 1500g durante 10 minutos a 25 °C, y se agregan 3 µL de un “cocktail” de inhibidores de proteasas (Sigma). Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta ser analizadas. La concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando reactivo Bradford Protein Assays (Bio-Rad) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, utilizando concentraciones estándar de BSA para realizar curvas de titulación en placas de ELISA, las cuales fueron evaluadas en un lector de microplacas (Sunrise™, Tecan, Suiza) utilizando el software Magellan™ 2,5,0,6.

**5.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida:** Se realizó la separación de las proteínas plaquetarias en geles verticales utilizando minigeles según la técnica estándar de geles de Laemmli (Laemmli, 1970). Se cargó 50 µg de proteína en un gel de poliacrilamida - bisacrilamida 10% y se realizó electroforesis (PAGE) a 100 mV por 90 minutos, bajo las siguientes condiciones

- PAGE en condiciones nativas (PAGE no desnaturalante): muestra de proteínas en tampón de carga no denaturante (62 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5% glicerol, 0,01% azul de bromofenol)

- PAGE en condiciones desnaturalantes y reductoras (SDS-PAGE): muestra de proteínas en tampón de carga reductor (12 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5% glicerol; 0,4% Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), 0,02% azul de bromofenol, 1% 2-mercapto etanol), se hierve a 100° C por 5 minutos, previo a cargar la muestra en el gel
- PAGE en condiciones desnaturalantes no reductoras (NR-PAGE): muestra de proteínas en tampón de carga no reductor (33 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5% glicerol, 1% SDS, 0.016% azul de bromofenol), se hierve a 100 °C por 5 minutos, previo a cargar la muestra en el gel

### **5.8 Tinción de proteínas en gel de poliacrilamida con Azul de Coumassie**

Se sumergió el gel de poliacrilamida durante 1 hora en una solución de Azul de Coumassie G 250 0,1%, metanol 50% en Agua MilliQ (solución filtrada tras ser preparada), en agitación constante. Posteriormente, se procedió a la destinción del gel en una solución de metanol al 40% bajo agitación, realizando varios lavados y reemplazando la solución una vez que se torna de color azul, hasta que se logra distinguir adecuadamente las bandas de proteína en el gel. Posteriormente el gel se mantuvo en agua a 4 °C hasta ser analizado.

### **5.9 Tinción de Plata**

Se sumergió el gel en una solución de fijación (10% ácido acético, 30% etanol) toda la noche, posteriormente se lavó en etanol al 30% 3 veces por 20 minutos, luego se lavó con agua destilada 2 veces por 15 minutos. Se dejó el gel en solución sensibilizadora de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0,015% por 1 minuto, se lavó 2 veces con agua por 1 minuto a continuación, se dejó en la solución de tinción (0,2% de AgNO<sub>3</sub>, 1mM formaldehído) por 1 hora, se lavó en agua por 1 minuto, para dejar en solución reveladora (6% NaCO<sub>3</sub>, 6mM formaldehído) hasta que las bandas de proteína se hacen visibles, se sumergió el gel en la solución de detención por 20 minutos, se lavó 4 veces por 30 minutos. Todos los pasos anteriormente descritos se realizaron en agitación constante para una tinción homogénea del gel, que finalmente, se guardó en etanol al 20% a 4 °C hasta su análisis.

### **5.10 Tinción reversible de proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa con rojo Ponceau**

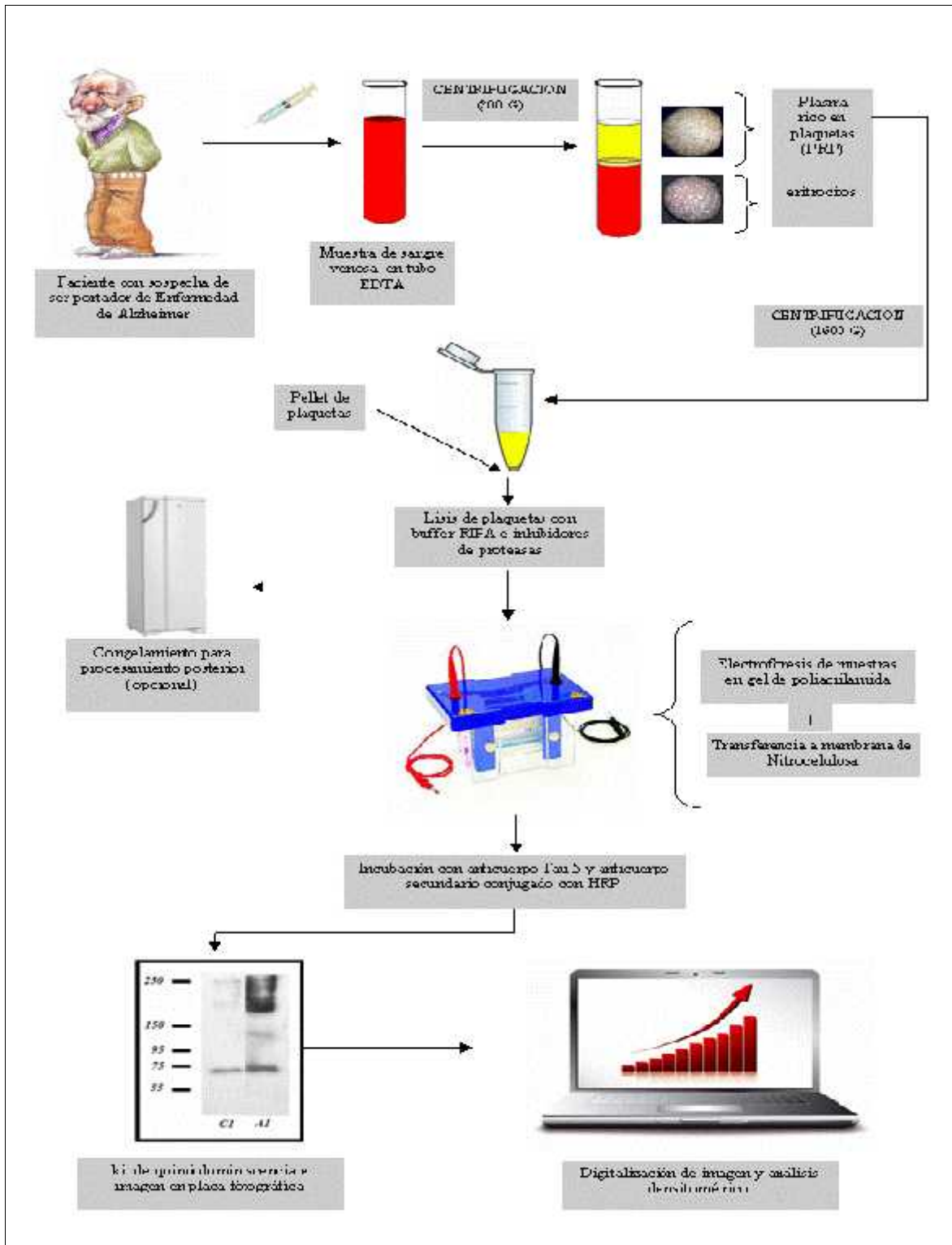
Se dejó la membrana una vez transferida en solución de rojo Ponceau (Ponceau S 0,3%, ácido acético 1%), por 5 minutos a temperatura ambiente en constante agitación, posteriormente se eliminó el exceso de tinción con agua por 2 min. Luego se fotografió la membrana y se destiñó completamente por 10 minutos en PBS-Tween 0,05% para permitir continuar con el protocolo de inmunoblot

### **5.11 Inmunoblots**

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante transferencia en tanque a 100 mV por una hora. A continuación, la membrana fue bloqueada con leche descremada 5% en PBS por 1 hora. Posteriormente las membranas fueron incubadas con alguno de los siguientes anticuerpos primarios: Tau-5 (2 µg/ml), Tau-1 (2 µg/ml), PHF-1 (1:100), 22C11 (Chemicon®) (0,25 µg/ml) -actina (1:6000) en leche descremada al 1% en PBS por 2 horas. Después de tres lavados con PBS-Tween (0.05%) las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario asociado a peroxidada (Santa Cruz) (1:5000 en leche descremada al 1% en PBS). Todas las etapas de incubación y lavado fueron realizadas en agitación constante. Finalmente la detección se llevó a cabo utilizando un sistema de quimioluminiscencia con el kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific), capaz de detectar femtogramos de antígeno. La señal se detectó en placas Kodak y la imagen se digitalizó para analizar las intensidades de las bandas utilizando el programa ImageJ 1.40 (National Institutes of Health, USA). En el caso se ocurrir sobreexposición de la placa fotográfica se utilizó el kit Erase-It® Background Eliminator (Pierce), para eliminar artefactos del revelado, de acuerdo a instrucciones del fabricante. Se realizó luego un análisis densitométrico cuantificando la razón entre las diferentes variantes de peso molecular de tau, p-tau y APP y la razón entre estas y el control de carga ( $\beta$ -actina) para el cálculo de cantidades relativas de las distintas proteínas. La Figura 10 resume los pasos realizados desde la obtención de una muestra de sangre venosa hasta el análisis densitométrico de las distintas fracciones de tau.

Cuando fue necesario realizar análisis repetidos con diversos anticuerpos en una misma membrana se procedio a eliminar los anticuerpos unidos previamente lavando la membrana con tampón de “stripping” (100 mM 2-Mercaptoetanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8) por 30 minutos bajo agitación a 50 °C. Posteriormente se lavó la membrana durante 10 minutos por 3 veces con PBS-Tween 0,05% y se bloqueó con leche descremada 5% en PBS por una hora antes de utilizar otro anticuerpo.

**Figura 10:** Diagrama esquemático de la metodología para el análisis de las fracciones de tau plaquetaria en muestras de sangre periférica.





## **5.12 Inmunoprecipitación de tau plaquetaria**

Se utilizó el kit Seize X® Protein G immunoprecipitation (Pierce, Rockford, IL, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante en los siguientes pasos

**5.12.1 Unión del anticuerpo a la proteína G inmovilizada:** La proteína G inmovilizada y sus reactivos fueron llevados a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Una vez ambientada, se adiciono 500 µL de agua ultra pura al tampón liofilizado para su resuspensión. Se agregó 0,4 ml de proteína G inmovilizada (50% lechosa) dentro de una columna de centrifugación Handee™ dentro de un tubo de microcentrifuga Handee™ y centrifugó por 1 minuto a 3000 g. Se descartó el flujo completamente y se reemplazó el recipiente de centrifuga. Se lavó el gel por adición de 0,4mL de tampón de unión/lavado (0,14 M NaCl, 0,008 M fosfato de sodio, 0,002 M fosfato de potasio, 0,01 M KCl, pH7,4). Se tapó el tubo y resuspendió el gel invirtiéndolo con una suave agitación. Se centrifugó por 1 minuto a 3000 g, luego se descartó el flujo completamente y se reemplazo el recipiente de centrifuga. Se repitió este paso una vez. Dentro de un tubo de microcentrífuga se colocó la columna con el gel preparado. Se agregó 500 µg de anticuerpo Tau-5 preparado en 0,4 ml de tampón de unión/lavado. Se agitó la columna por 30 minutos para permitir que el anticuerpo se una al gel. Se centrifugó a 3000 g por 1 minuto. Se colocó la columna en otro tubo de microcentrífuga y se agregó 0,5 mL de tampón de unión/lavado. Se invirtió el tubo 10 veces, luego se centrifugó el tubo por 1 minuto a 3000 g, se descartó el flujo completamente. Se repitió este paso dos veces usando el mismo tubo colector. Se transfirió la columna a otro tubo de microcentrífuga y se agrego 0,4mL de tampón de unión/lavado.

**5.12.2 Vinculación del anticuerpo unido:** Se agregó 80 µL de dimetilsulfoxido (DMSO) a un tubo de No-Weigh™ DSS. Se adicionó 25 µL de esta solución a la columna que contiene el anticuerpo unido al gel. Se agitó lentamente por 60 minutos, luego se centrifugó por 1 minuto a 3000 g y se descartó el líquido remanente. Se adicionó 500 µL de tampón de elución Immunopure® (pH 2.8) en la columna. La columna se invirtió 10 veces para luego centrifugar por 1 minuto a 3000 g y se descartó todo el

sobrenadante. Se colocó la columna en otro tubo de microcentrífuga. Se repitió este paso 4 veces para detener la reacción y eliminar el exceso de DSS y el anticuerpo no acoplado. La columna se colocó en un nuevo tubo de microcentrífuga y el gel fue lavado 2 veces con 500 µL de tampón de unión/lavado.

**5.12.3 Inmunoprecipitación del antígeno:** Se diluyó la muestra de lisis de plaquetas 1:1 con tampón de unión/lavado y se agregó 0,5mL a la columna. Posteriormente se incubó la muestra agitando suavemente por 1 hora, para luego centrifugar a 3000 g durante 1 minuto. Se colocó la columna en un nuevo tubo de centrifuga y se adicionó 0,5 mL de tampón unión/lavado en la columna, se agitó por inversión 10 veces. Se centrifugó a 3000 g por 1 minuto y se descartó el flujo. Se repitieron los lavados 2 veces más.

**5.12.4 Elución del antígeno inmunoprecipitado:** Para este procedimiento se agregó 190 µL de de tampón de elución Immunopure® en la columna. Se agitó por inversión 10 veces, luego se centrifugó a 3000 g por 1 minuto. Esta etapa se repitió 2 veces para eluir la totalidad de la muestra. Se evaluaron las 3 fracciones eluidas por SDS-PAGE.

**5.12.5 PAGE del antígeno inmunoprecipitado:** Se tomaron 20 µl de la muestra obtenida y se agregó 5 µl buffer de carga contenido en el kit de inmunoprecipitación (0,3 M Tris-HCl, 5% SDS, 50% glicerol, pH 6,8) previamente equilibrado a temperatura ambiente. Se realiza mezcla por inversión 10 veces en tubo de microcentrífuga y se hirvió la muestra por 5 minutos. El buffer de carga no contiene agente reductor. Para los experimentos en condiciones reductoras se adicionó ditionitrotiol (DTT) (2 - 3 µl de DTT 1 M por muestra).

### **Estadística**

**5.13 Análisis estadístico:** se utilizó el programa computacional SPSS 17.0 para Windows. Las comparaciones de niveles de biomarcadores, edad, educación y mediciones cognitivas entre los distintos grupos se realizaron mediante el estadígrafo t de Student para muestras no relacionadas o mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía para comparar más de dos promedios, considerando cada medición como la variable

independiente comparando los grupos. Se utilizó el test de Bonferroni *post hoc* para evaluar diferencias significativas entre promedios.

También se realizó análisis multivariado mediante regresión logística binaria para evaluar la relación entre el estado cognitivo de los sujetos y las posibles variables predictoras, introduciendo las variables independientes en el modelo hacia delante y por pasos.

El nivel de significancia se fijó en 0,05 para considerar las diferencias significativas en los distintos análisis estadísticos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Características de los sujetos participantes

Los participantes de este estudio tenían edades que oscilaban entre los 52 a los 105 años, correspondiendo en un 39,4% a hombres y 60,6% a mujeres, con escolaridad promedio de 11 años para controles y 8 años para el grupo de sujetos con EA. La Tabla 2 muestra las características de los sujetos participantes

**Tabla 2: Características relevantes de los sujetos participantes en el estudio.** Para cada una de las características descritas se muestra el número de sujetos y entre paréntesis el porcentaje al que corresponden o el rango que incluye al 95% de ellos. En la columna de la derecha se aprecia el nivel de significancia (p) de las diferencias entre los grupos control y EA

	<b>Control</b>	<b>EA</b>	<b>p</b>
Hombres	5 (19%)	21 (78%)	0,167
Mujeres	14 (31%)	26 (58%)	0,167
Edad	70 (52 - 82)	76 (61 – 89)	0,014
Educación (años)	11 (4 – 17)	8 (1 -17)	0,041
GDS	1 (1 – 2)	5 (4 – 6)	0,000
MMSE	29 (22 – 30)	16 (4 – 26)	0,000

Los sujetos fueron clasificados de acuerdo a su rendimiento cognitivo en MMSE como sujetos controles, portadores de EA inicial, portadores de EA moderada y portadores de EA avanzada, tal como se describe en la Tabla 3.

**Tabla 3: Agrupación de los participantes en el estudio de acuerdo a su estado cognitivo**

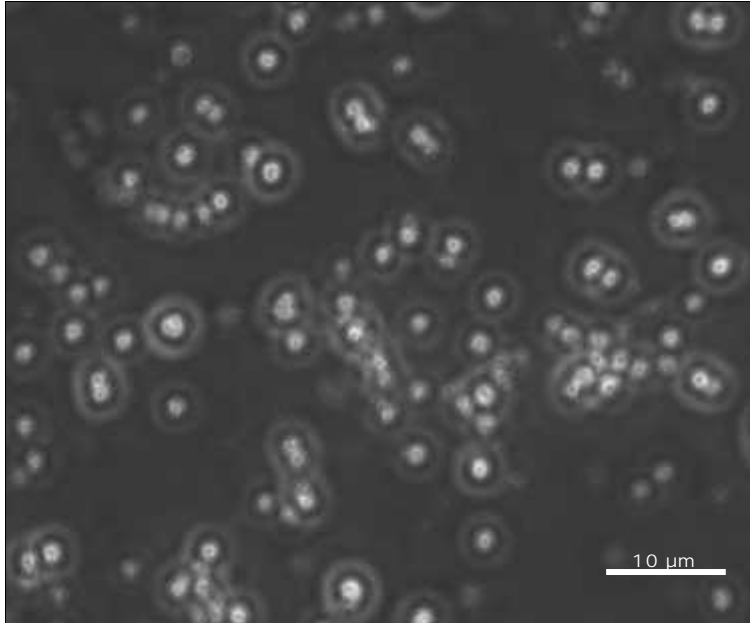
<b>Control</b>	<b>EA inicial (MMSE 26 -18)</b>	<b>EA moderada (MMSE 17 – 10)</b>	<b>EA severa (MMSE 9 – 0)</b>	<b>MCI</b>	<b>Otras demencias</b>
<b>19</b>	<b>21</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>3</b>

En la Tabla 3 también se incluye a 3 sujetos portadores de MCI y a 3 sujetos portadores de demencia que no corresponden a EA (uno correspondiente a DCB y dos a demencia frontotemporal (DFT)). Tanto los sujetos con MCI como los portadores de demencia no EA en estricto rigor no cumplen con los criterios de inclusión en este estudio, sin embargo, también fueron incluidos dentro de los análisis pues se consideró que ellos podían servir de manera importante como un indicador inicial del comportamiento de sus respectivas poblaciones en los análisis bioquímicos que se describen más abajo.

## **6.2 Estandarización de la técnica de purificación de plaquetas mediante centrifugación diferencial**

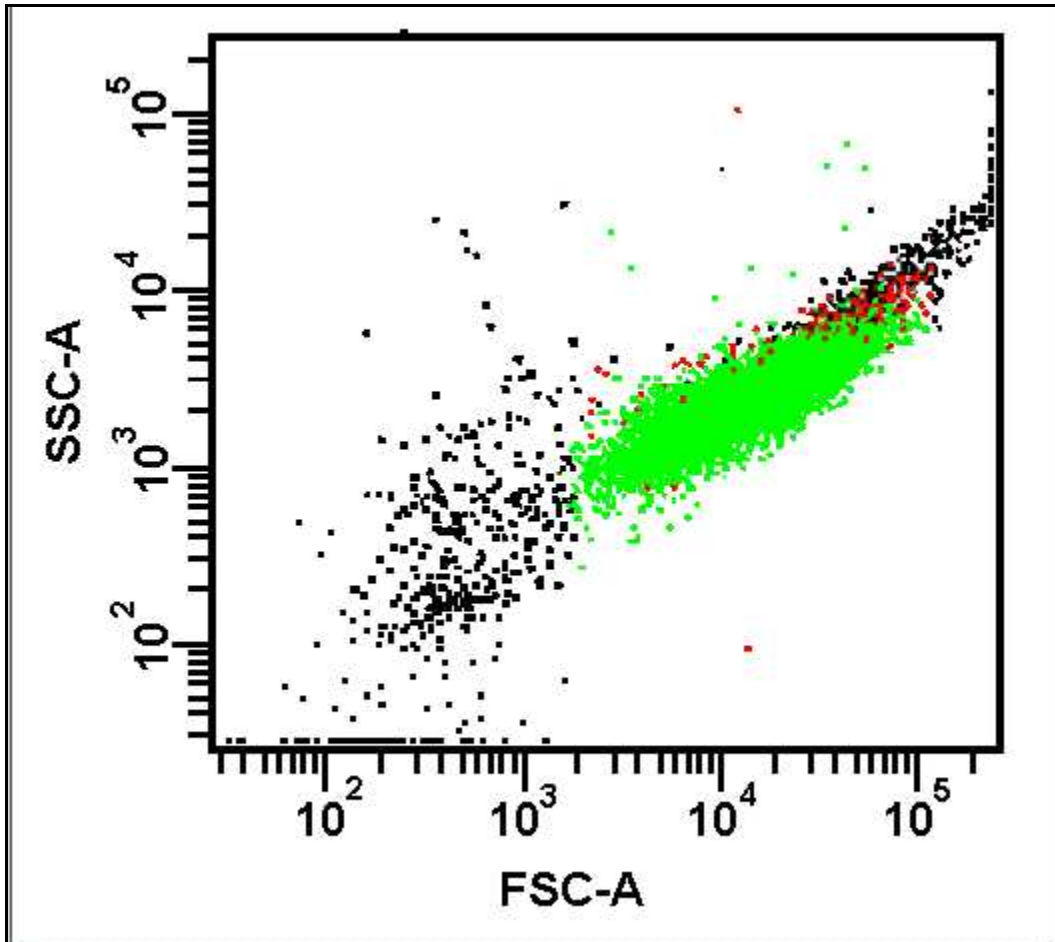
Se estandarizó la técnica de purificación de plaquetas mediante centrifugación diferencial de acuerdo a Rao (1988). Se evaluó el rendimiento de los pasos de purificación de plaquetas mediante microscopía de campo oscuro (Figura 11). En estas imágenes se observa en forma prácticamente exclusiva la presencia de células esféricas de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro, compatibles con plaquetas.

**Figura 11:** Microscopía de campo oscuro mostrando las plaquetas obtenidas mediante los pasos de centrifugación diferencial. Sólo se aprecia la presencia de células de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro que corresponden a plaquetas. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .



Con el fin de cuantificar la pureza de las plaquetas obtenidas se utilizó técnicas de citometría de flujo para analizar de plaquetas purificadas desde muestras de sangre periférica de sujetos control. Tal como se aprecia en la Figura 12, la pureza de las muestras de plaquetas es cercana al 90%

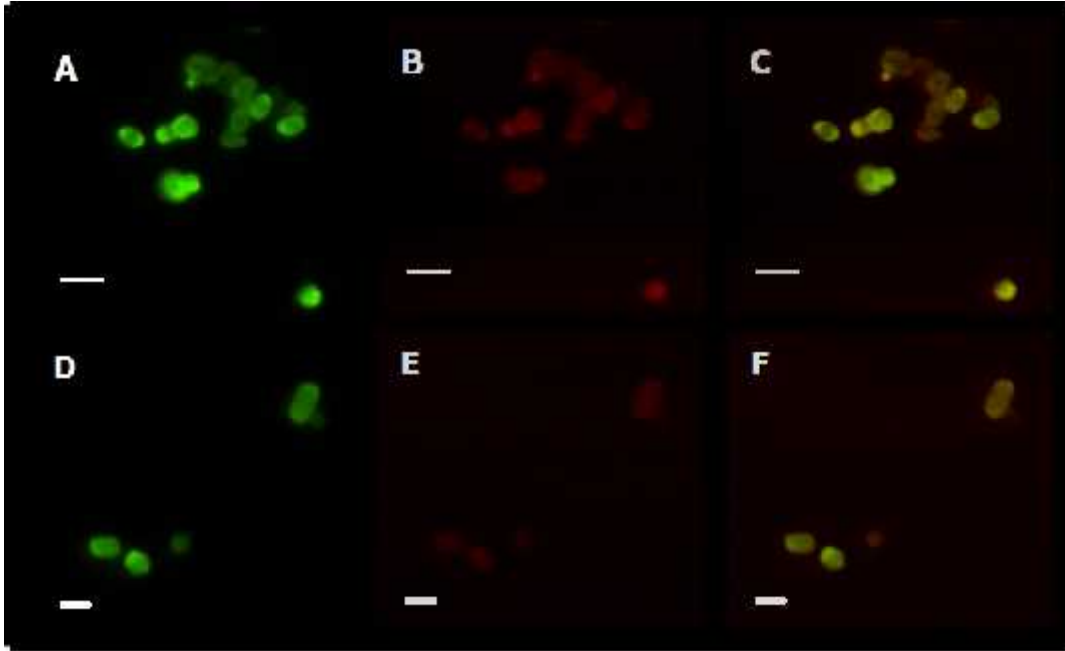
**Figura 12:** Estudio de citometría de flujo que muestra el patrón de dispersión de luz característico de plaquetas obtenidas de sangre total y posteriormente fijadas. Los datos fueron recogidos y representados como logaritmo de la dispersión de luz ortogonal y frontal. Las plaquetas aisladas se identifican por su patrón de dispersión de luz y se representan en verde, correspondiendo al 84,1% de la muestra. En rojo se incluyen las plaquetas que están formando agregados. En total, las plaquetas corresponden al 89,8% de la muestra.



### 6.3 Inmunofluorescencia de plaquetas

Se realizó inmunofluorescencia con anticuerpos específicos dirigidos contra tau en plaquetas purificadas a partir de muestras provenientes de sujetos controles y portadores de EA. Como se observa en la Figura 13 no se encontró diferencias en el patrón ni en la intensidad de señal de tau entre sujetos con EA y controles.

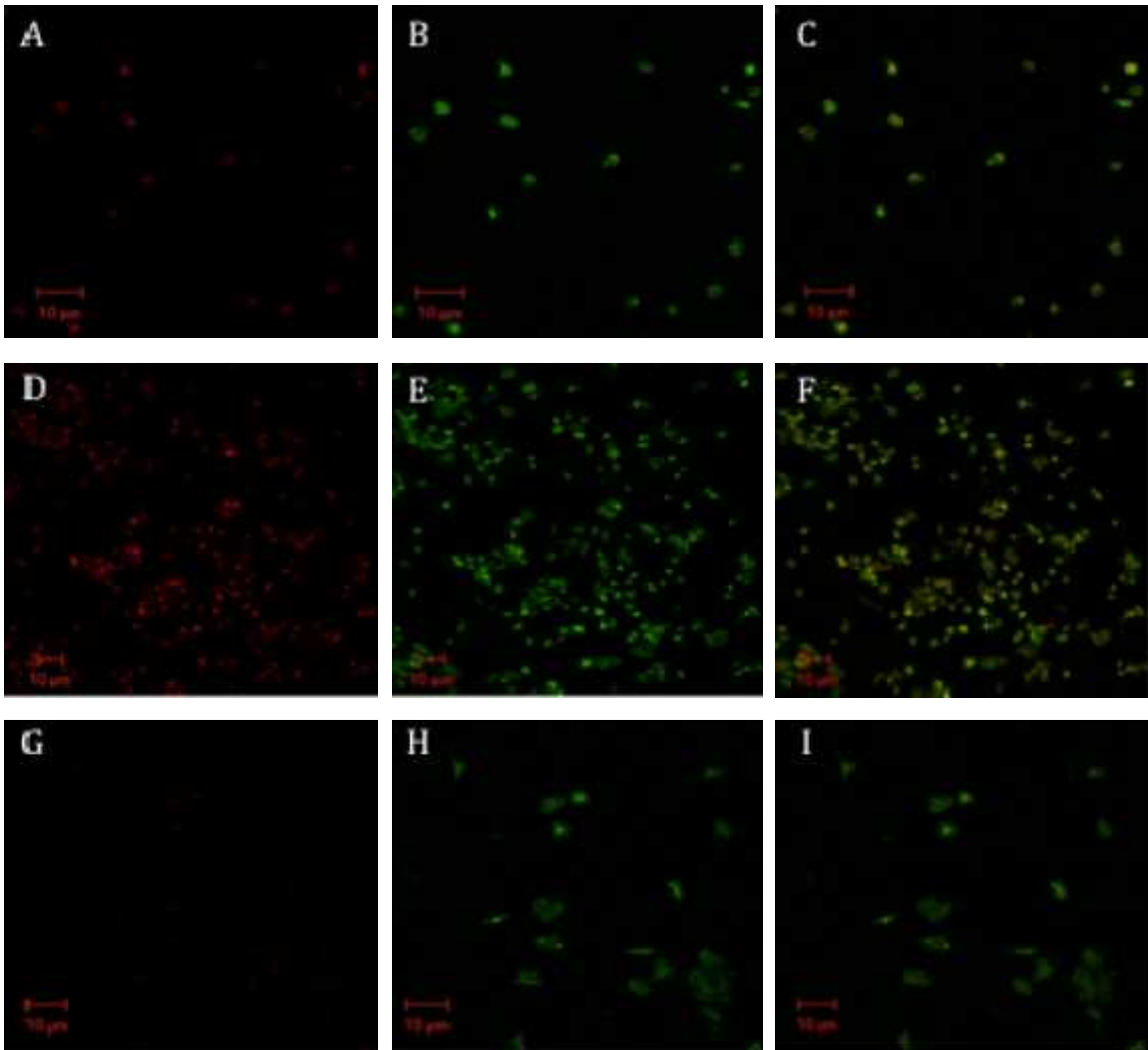
**Figura 13:** Microscopía de epifluorescencia de plaquetas aisladas de sujetos control (A – C) y pacientes con EA (D – F). A y D corresponden a  $\alpha$ -actina (marcada con faloidina conjugada con Alexa verde). B y E corresponden a señal de tau total (anticuerpo Tau-5); C y F son imágenes sobrepuestas. Las barras representan 5  $\mu$ m.



Además se comparó el patrón de señal de tau plaquetaria con anticuerpos dirigidos contra formas de tau total (anticuerpo Tau-5) y tau fosforilada (anticuerpo PHF-1) sin demostrar mayores diferencias en el patrón de señal para ambas formas de tau (Figura 14).



**Figura 14:** Microscopia confocal de plaquetas marcadas con los anticuerpos Tau-5 que reconoce tau total (A-C) y PHF-1 contra tau hiperfosforilada (D-F). (G-I) corresponde a control sin anticuerpo primario. En A y D se aprecia la señal de tau; B, E y H corresponden a citoesqueleto de actina marcado con faloidina; C, F e I corresponden a la superposición de las imágenes A-B, D-E, G-H respectivamente. Barra corresponde a 10  $\mu$ m

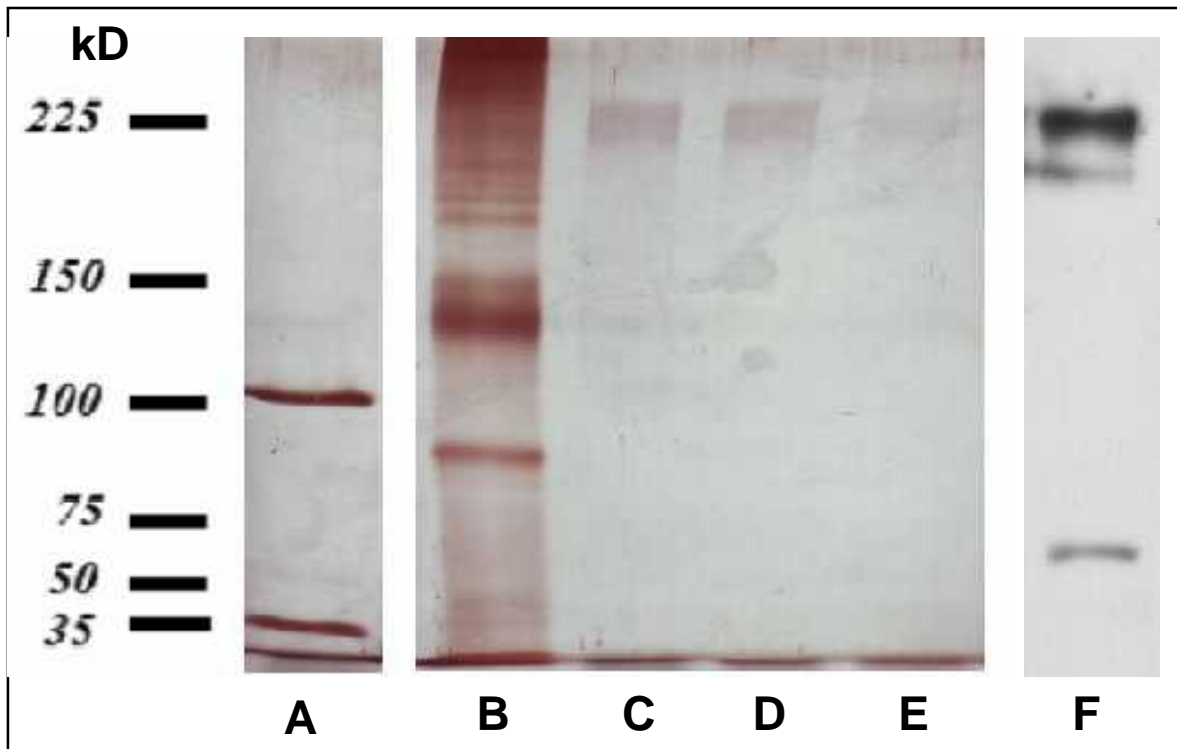


#### 6.4 Inmunoprecipitación de tau plaquetaria

Extractos de proteínas totales de plaquetas aisladas de un sujetos control fueron sometidas a inmunoprecipitación en una columna de esferas de Sefarosa unida a proteína G y por unión covalente al anticuerpo Tau-5. En este sistema el anticuerpo no unido a

Sefarosa se eluye (Figura 15 A) previo a incubar la columna con el extracto de proteínas plaquetarias. Posteriormente se eluye las proteínas no reconocidas por el anticuerpo Tau-5 (Figura 15 B) y en un último paso se realiza elusión de las proteínas unidas al anticuerpo Tau-5 que corresponden a formas de tau plaquetaria (Figura 15 C, D, E). Se realizó NR-PAGE de los inmunoprecipitados de tau y se comprobó que la proteína inmunoprecipitada correspondía a tau mediante *immunoblot* con un segundo anticuerpo específico para tau (PHF-1). Bajo estas condiciones se observa la presencia de formas del peso esperado para monómeros de tau (cercano a 60 kDa) y también la presencia de formas de tau de mayor peso molecular (cercano a 200 kDa).

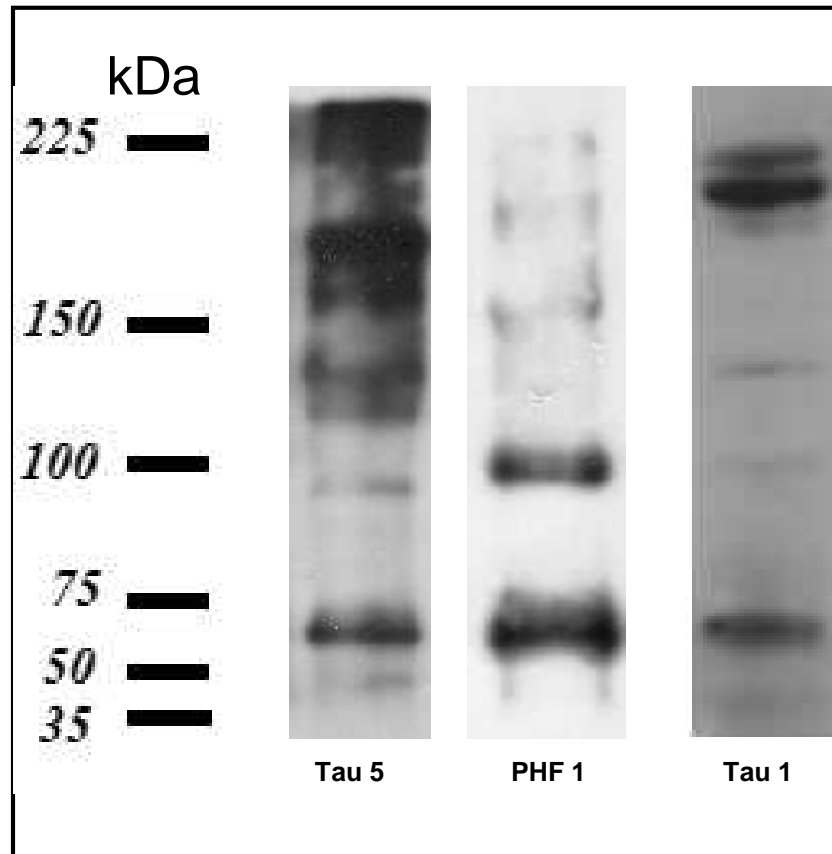
**Figura 15:** Diversas fracciones de proteínas obtenidas en los pasos de inmunoprecipitación de tau plaquetaria analizados en geles de poliacrilamida con tinción de plata (A – E) y en inmunoblot con el anticuerpo PHF-1 (F). A) Eluido de anticuerpo Tau-5 no unido a Sefarosa durante la preparación de la columna de inmunoprecipitación. B) Eluido de proteínas plaquetarias no unidas al anticuerpo Tau-5. C), D) y E) corresponden respectivamente al primer, segundo y tercer eluido de la proteína tau inmunoprecipitada. En F) se observa *immunoblot* de la proteína tau inmunoprecipitada reconocida por el anticuerpo PHF-1



## **6.5 Patrones electroforéticos de HMWp-tau y L-tau en plaquetas humanas de pacientes con EA y controles (Objetivo 1)**

Se evaluaron los patrones electroforéticos y la intensidad de señal de las proteínas identificadas de extractos de proteínas plaquetarias en PAGE e *immunoblot* con diversos anticuerpos específicos para la proteína tau. Como se aprecia en la Figura 16 y en concordancia con estudios preliminares se encontró la presencia de múltiples bandas de proteínas con inmunoreactividad a tau en diversos pesos moleculares que van desde los 50 kDa a pesos por sobre los 200 kDa. Estas bandas de tau a alto peso molecular parecen contener proteína con distintos grados de fosforilación, pues pueden ser reconocidas tanto por anticuerpos que reconocen tau fosforilada (PHF-1), como no fosforilada (Tau-1), así como por aquellos que reconocen tau independiente de su estado de fosforilación (Tau-5).

**Figura 16:** SDS-PAGE e *immunoblot* de un extracto de plaquetas con anticuerpos dirigidos contra diversas formas de la proteína tau, incluyendo tau total (Tau-5), tau fosforilada (PHF-1) y Tau no fosforilada (Tau-1).

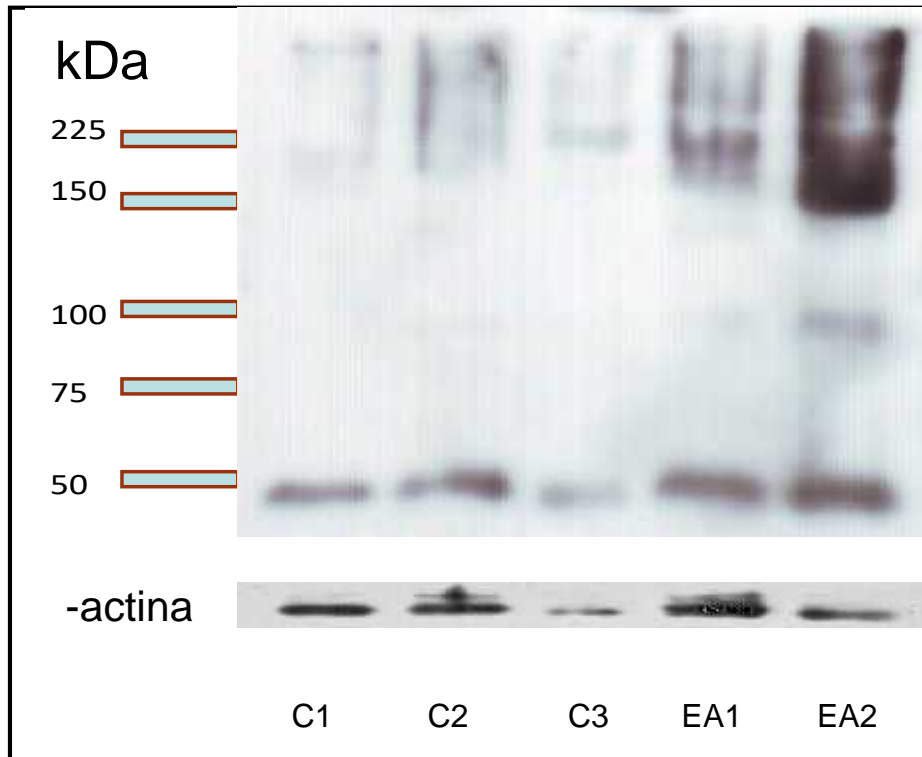


Se evaluó el comportamiento de las distintas formas de tau en condiciones no desnaturalantes (Figura 17) y en condiciones reductoras y no reductoras (Figuras 18, 19 y 20) con el fin de definir si HMW-tau corresponde a polímeros de la proteína tau que puedan ser afectados (desagregados) en las condiciones desnaturalantes y reductoras usuales en técnicas de electroforesis de proteínas.

Se observó que en PAGE de extractos de proteínas plaquetarias, tanto en condiciones nativas como en condiciones no reductoras, ocurre un aumento de la proporción de HMW-tau con respecto a las formas bajo peso. Esta mayor proporción de formas de tau

de alto peso es particularmente significativo en PAGE en condiciones nativas. En estos casos también es posible comprobar que en los sujetos portadores de EA, la fracción de HMW-tau corresponde a una mayor proporción de la tau total de plaquetas en comparación con los sujetos controles tal como se aprecia en la Figura 17. Los datos de la Figura 17 no muestran alguna clara alteración en los patrones electroforéticos de tau respecto a la edad. Sin embargo, llama la atención al comparar los sujetos EA1 y EA2 que a pesar de tener un grado de deterioro cognitivo semejante, presentan patrones disímiles en *immunoblot*, lo que puede estar en contexto de diferencias no controladas en las condiciones de electroforesis, transferencia a membrana o *immunoblot*, o alternativamente a diferencias en el grado de agregación o alteración de la proteína tau que puede darse en el contexto de distinto avance de la patología a nivel bioquímico, a pesar de presentar un grado de deterioro cognitivo semejante.

**Figura 17:** PAGE (poliacrilamida 10%) en condiciones nativas de extractos de proteínas plaquetarias totales e inmunoblot con el anticuerpo Tau-5. C1 a C3 corresponden a sujetos controles de distintas edades (40, 60 y 80 años respectivamente). EA1 y EA2 corresponden a pacientes portadores de EA avanzada (EA1 puntaje GDS: 6; EA2 puntaje GDS 5). EA1: 82 años, EA2: 81 años. En el recuadro inferior se observa  $\beta$ -actina como control de carga.

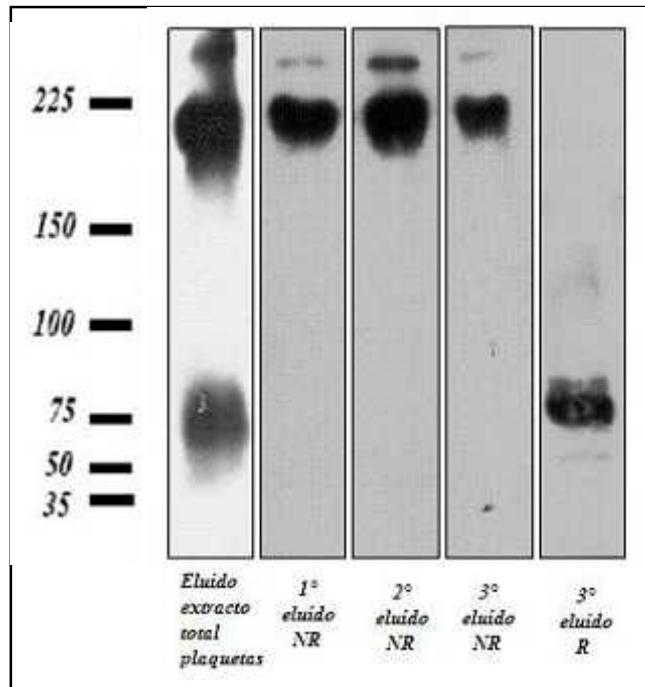


Las condiciones reductoras durante el proceso de PAGE, las cuales están dadas por la adición o falta de un agente reductor (como DTT o  $\beta$ -mercaptoetanol) en el buffer de carga previo a la electroforesis, también afectan de manera relevante los patrones de migración de la proteína tau plaquetaria

Al evaluar los resultados obtenidos en PAGE e *inmunoblot* de la tau inmunoprecipitada se observa que existen diferencias sustanciales en el patrón de migración de tau en condiciones reductoras y no reductoras. Así, tal como indica la Figura 18, en condiciones

de NR-PAGE la mayor señal de tau se observa en pesos de aproximadamente 200 kDa, sin embargo, en condiciones reductoras la señal de tau se aprecia mayoritariamente cerca de los 60 kDa (peso esperado para los monómeros de tau), lo que es compatible con la presencia de oligómeros de la proteína que se disgregan ante la presencia de un agente reductor en el buffer de carga.

**Figura 18:** PAGE e *immunoblot* (anticuerpo Tau-5) de tau inmunoprecipitada. A la izquierda se aprecia un extracto total de proteínas de plaquetas en NR-PAGE. Las siguientes tres imágenes corresponden a NR-PAGE de tres eluidos de tau inmunoprecipitada. A la derecha se muestra tau inmunoprecipitada en PAGE en condiciones reductoras. Se aprecia la influencia de un agente reductor (DTT) sobre el patrón electroforético de la proteína



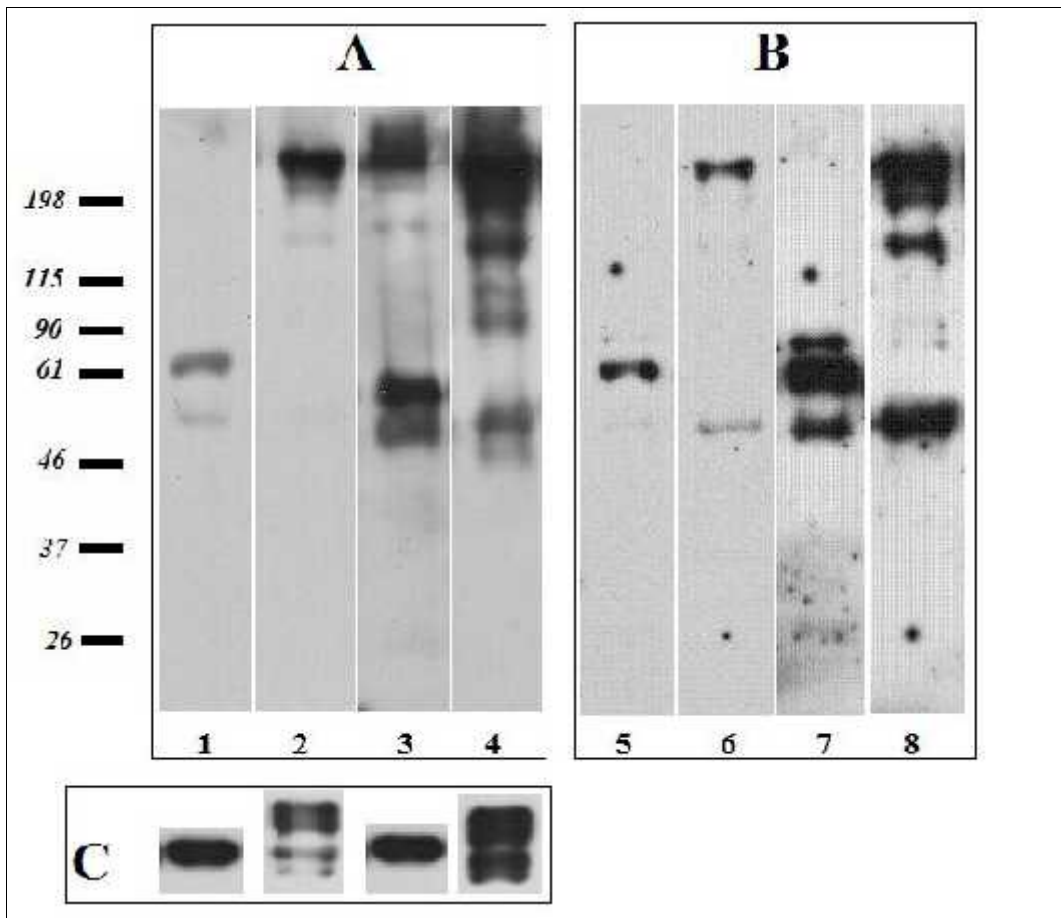
Cuando se realizó la evaluación de extractos completos de proteínas plaquetarias mediante PAGE en condiciones reductoras y no reductoras se observa un comportamiento semejante a lo que ocurre con los inmunoprecipitados de tau. Tal como se observa en las Figuras 19 y 20, tanto la presencia de un agente reductor, como los tiempos de exposición de la película fotográfica son sumamente relevantes para

determinar el patrón de la imagen observada. Así bajo condiciones de NR-PAGE nuevamente se observa que la mayor proporción de la señal de tau se encuentra en zonas de pesos sobre 80 kDa, mientras que en condiciones reductoras gran parte de la señal de tau se ubica alrededor de los 50 a 65 kDa. Por otro lado los tiempos de exposición de la película fotográfica determinan si sólo se captura la imagen de la forma de tau preponderante (L-tau en condiciones reductoras o HMW-tau en condiciones no reductoras), o si por el contrario, es posible también visualizar formas de tau menos abundantes en las condiciones de PAGE utilizadas.

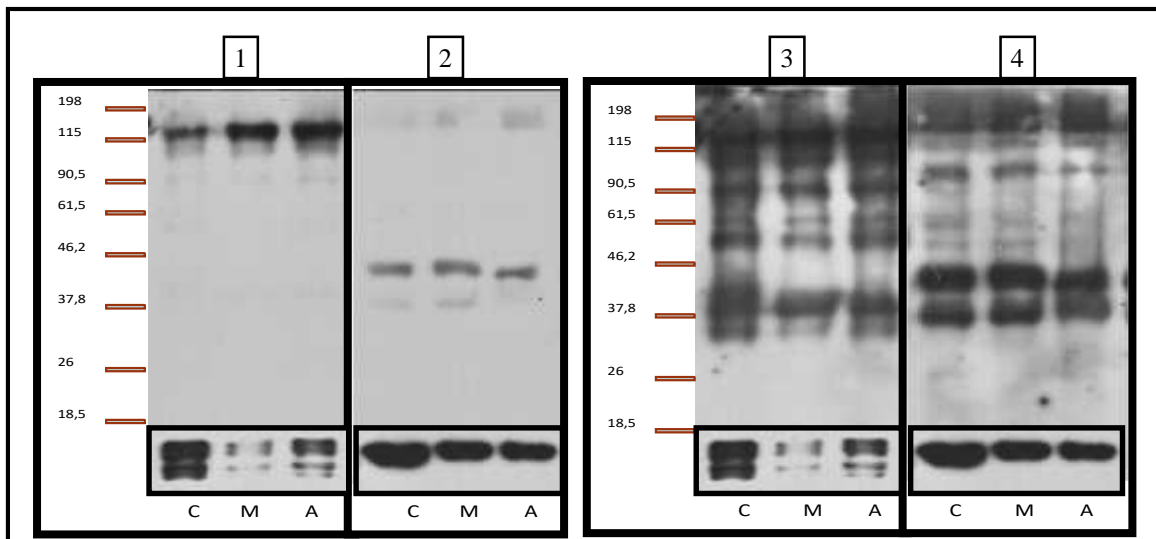
Como se aprecia en la Figura 19 los efectos del uso de agentes reductores y del tiempo de exposición pueden ser apreciados con el uso de diversos tipos de anticuerpos específicos para tau, como son Tau-5 (Figura 19 A) y PHF-1 (Figura 19 B)



**Figura 19: PAGE en condiciones reductoras y no reductoras e inmunoblot con los anticuerpos Tau-5 (A) y PHF-1 (B).** Se realizó por duplicado electroforesis de una muestra de proteínas plaquetarias (sujeto control sano) en gel de acrilamida – bisacrilamida 10%. A) corresponde a inmunoblot con el anticuerpo Tau-5. B) corresponde a inmunoblot con el anticuerpo PHF-1. En condiciones reductoras (muestras 1, 3, 5 y 7) la señal más intensa corresponde a L-tau, mientras que en condiciones no reductoras (muestras 2, 4, 6 y 8) las formas de HMW-tau son las preponderantes. La imagen demuestra la relevancia de los tiempos de exposición de la placa fotográfica en el patrón electroforético registrado. A tiempo de exposición corto (5 segundos) sólo se observa una o dos bandas de tau (muestras 1, 2, 5 y 6), mientras que a mayores tiempos de exposición se hace evidente la presencia de múltiples formas de tau. En C) se observa señal de  $\alpha$ -actina como control de carga.



**Figura 20:** PAGE e *immunoblot* con el anticuerpo Tau-5 en condiciones no reductoras (1 y 3) y en condiciones reductoras (2 y 4). Se aprecia las variaciones en el patrón electroforético observado a tiempos cortos de exposición de la placa fotográfica (5 segundos, en las imágenes 1 y 2) o en tiempos de exposición más prolongados (5 minutos, en las imágenes 3 y 4). Las muestras corresponden a un sujeto control sano (C), a un sujeto portador de deterioro cognitivo leve (M) y, por último, a un portador de EA (A). Los recuadros inferiores muestran  $\beta$ -actina como control de carga.



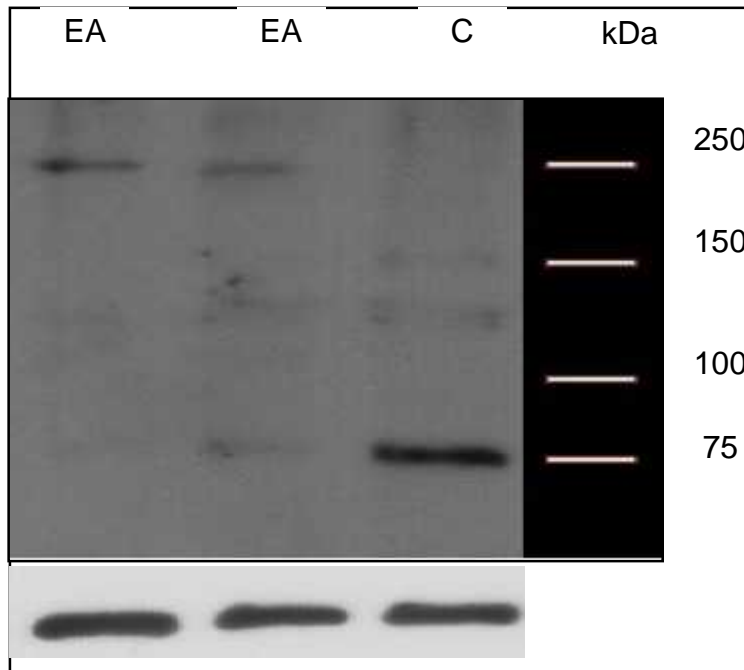
## 6.6 Relación entre las distintas formas de la proteína tau y el desempeño cognitivo de sujetos controles y portadores de EA, evaluados por neuropsicología (objetivo 2)

Se realizaron electroforesis en el sistema SDS-PAGE e *immunoblot* de extractos de proteínas de plaquetas de los sujetos controles y portadores de EA. La Figura 21 demuestra los cambios observados en el patrón electroforético de pacientes portadores de EA, respecto de sujetos controles. Llama la atención el un marcado aumento de la proporción de HMW-tau, respecto de L-tau en los sujetos con EA. La misma Figura 21 demuestra el efecto de distintos tiempos de exposición de la placa fotográfica durante el proceso final de quimioluminiscencia del *immunoblot*. Así, nuevamente es notable que a cortos períodos de exposición sólo se observa la señal de las bandas de tau más intensas,

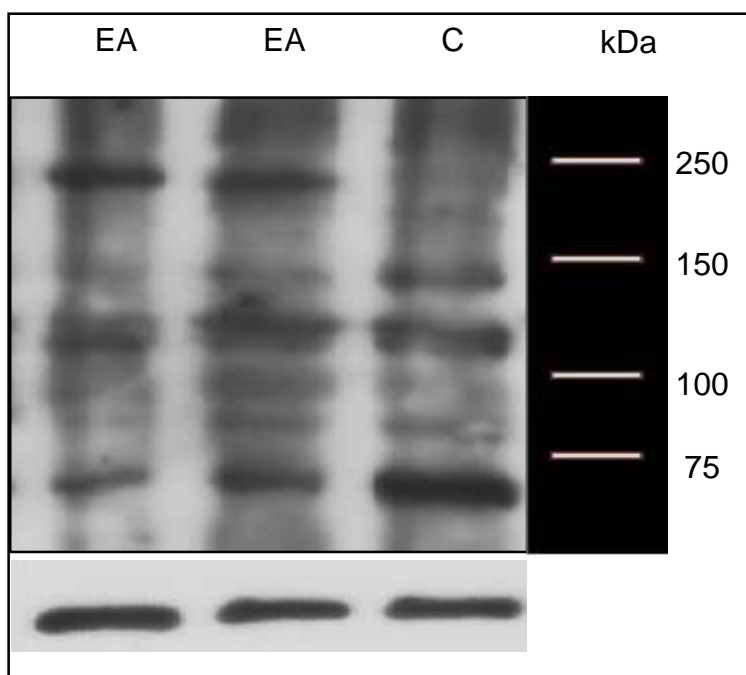
pero a largos períodos de exposición se aprecia la presencia de señal de tau a distintas pesos, lo que sugiere la existencia de formas heterogéneas de esta proteína tanto en sujetos con EA como en controles. Se puede apreciar en la Figura 21 B, que las principales bandas de tau se encuentran en pesos de alrededor de 60 kDa, 120-130 kDa y 200 kDa, lo que podría corresponder a monómeros de tau (L-tau) y oligómeros formados por dos o tres monómeros de tau que corresponderían a HMW-tau.

**Figura 21:** SDS-PAGE e *immunoblot* de extractos de plaquetas de sujetos portadores de EA (EA) y sujeto control (C) utilizando el anticuerpo Tau-5. En A) se aprecia la imagen producida por un corto periodo de exposición del film fotográfico (5 segundos). En B) se observa las muestras tras un período prolongado de exposición de la placa fotográfica (5 minutos), lo que permite apreciar la presencia de inmunoreactividad de tau a distintos pesos moleculares.

A)



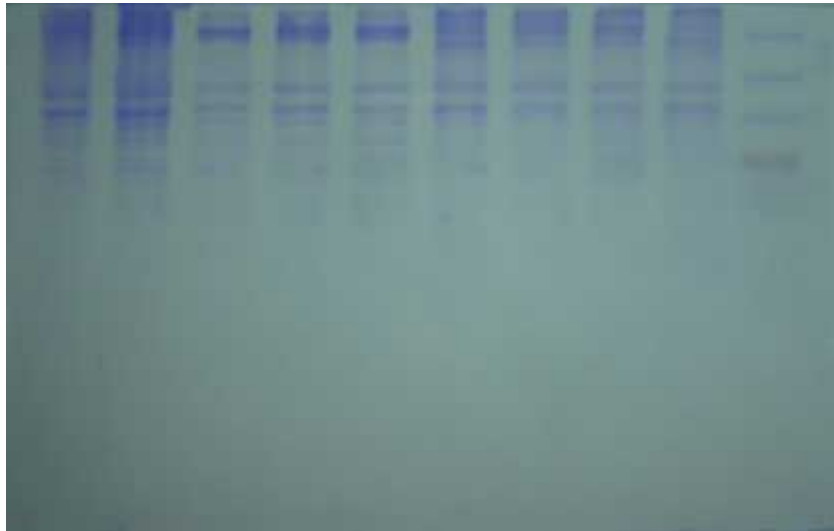
B)



Los estudios de SDS-PAGE e *immunoblot* para evaluar la utilidad de tau plaquetaria como biomarcador de EA fueron realizados de acuerdo a un procedimiento estandarizado, tal como se describe en la sección de metodología, de manera de lograr resultados con comparables entre sí y con la máxima reproductibilidad posible. Se decidió utilizar el anticuerpo Tau-5 para estos ensayos, pues dicho anticuerpo, que reconoce todas las formas de la proteína tau nos permitió obtener los resultados más reproducibles. Sin perjuicio de lo anterior, también se ensayaron otros anticuerpos dirigidos a distintas formas de tau cuando se contaba con suficiente muestra para realizar PAGE en forma repetida, o las condiciones de una membrana de nitrocelulosa y la cantidad de proteína que ella contenía permitían realizar múltiples pruebas. Mediante ensayos repetidos y ajustes de los distintos reactivos utilizados se logró la estandarización de las cantidades de proteínas cargadas en los geles de acrilamida-bisacrilamida 10% (50  $\mu$ g de proteínas por carril), así como de las concentraciones de los distintos anticuerpos utilizados y los tiempos necesarios para los distintos pasos de incubación del procedimiento de *immunoblot*. También se seleccionó un kit de quimioluminiscencia adecuado, capaz de detectar femtogramos de proteína, para lograr una señal con la

rapidez, intensidad y duración adecuada. Uno de los puntos que demostró ser crítico en el procedimiento experimental consiste en la estandarización de los tiempos de transferencia de las proteínas entre el gel de poliacrilamida y la membrana de nitrocelulosa para posterior realización del *immunoblot*. Se debe hacer notar que las moléculas de peso molecular elevado, como es el caso de HMW-tau se transfieren con mayor lentitud que las de bajo peso (L-tau). Por lo tanto, si la transferencia no se realiza con el voltaje o el tiempo suficiente se afectará la transferencia de HMW-tau lo que comprometerá el posterior análisis de los resultados (Figura 22).

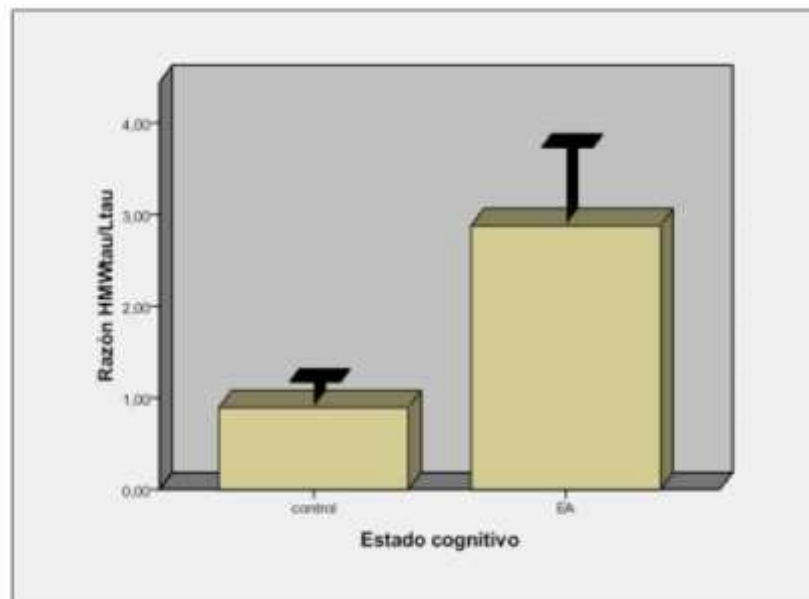
**Figura 22:** Importancia de las condiciones de transferencia entre el gel de poliacrilamida y la membrana de nitrocelulosa para lograr una transferencia adecuada de las proteínas de alto peso molecular. Se realizó SDS-PAGE de extractos de proteínas plaquetarias y posterior transferencia a membrana de nitrocelulosa. Después de la transferencia se realizó tinción de Coomassie para demostrar la presencia de proteínas en el gel que no lograron ser transferidas. En este caso por tiempo de transferencia inadecuado no se logró el paso total de las proteínas de alto peso molecular (Gel de acrilamida bisacrilamida 10%).



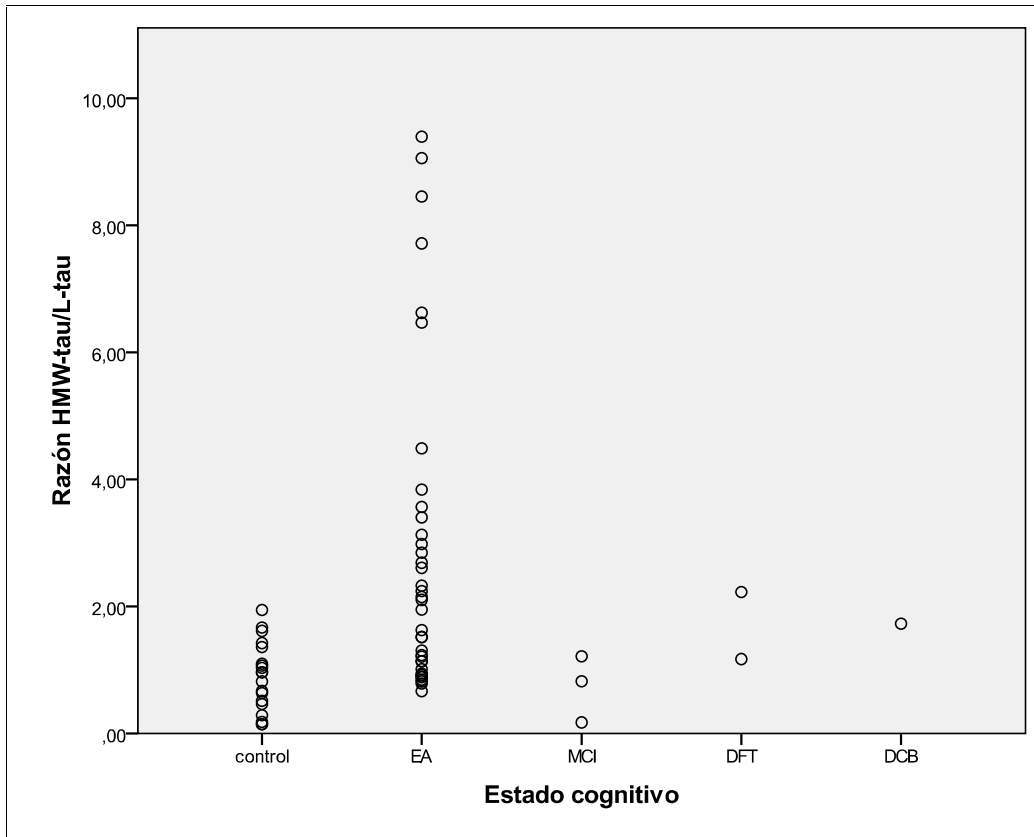
Tras la estandarización completa de los procedimientos experimentales se procedió a realizar SDS-PAGE e inmunoblot con el anticuerpo Tau-5 de las 72 muestras obtenidas

de los sujetos reclutados en el estudio. Las imágenes obtenidas en placas fotográficas se digitalizaron y se realizó análisis densitométrico de las distintas bandas inmunoreactivas a tau. Se realizó medición de la intensidad óptica de las bandas (unidades arbitrarias) y se calculó la relación HMW-tau/L-tau para cada uno de los sujetos y se comparó los promedios obtenidos para los grupos control y EA mediante el estadígrafo t de Student para muestras no relacionadas. Tal como se aprecia en la Figura 23, la razón HMW-tau/L-tau es significativamente más alta en sujetos con EA que en sujetos controles (p: 0,001). En promedio los sujetos controles tienen una razón HMW-tau/L-tau de 1,45 con intervalo de confianza de 95% (IC 95) de 0,14 a 4,28, mientras que los sujetos EA tienen una razón HMW-tau/L-tau promedio de 2,8 con IC 95 de 0,19 a 9,06. La Figura 24 corresponde a un diagrama de dispersión de puntos que muestra la razón HMW-tau/L-tau para cada uno de las muestras analizadas. Es llamativo que, si bien la escasa cantidad de sujetos no permite realizar inferencias, los sujetos clasificados como MCI y demencias no correspondientes a EA presentan razones HMW-tau/L-tau en un rango intermedio entre sujetos controles y EA.

**Figura 23:** gráfico de barras de la razón HMW-tau/L-tau en sujetos controles (control) y portadores de EA (EA). Las barras corresponden a IC 95. Valor p = 0,001

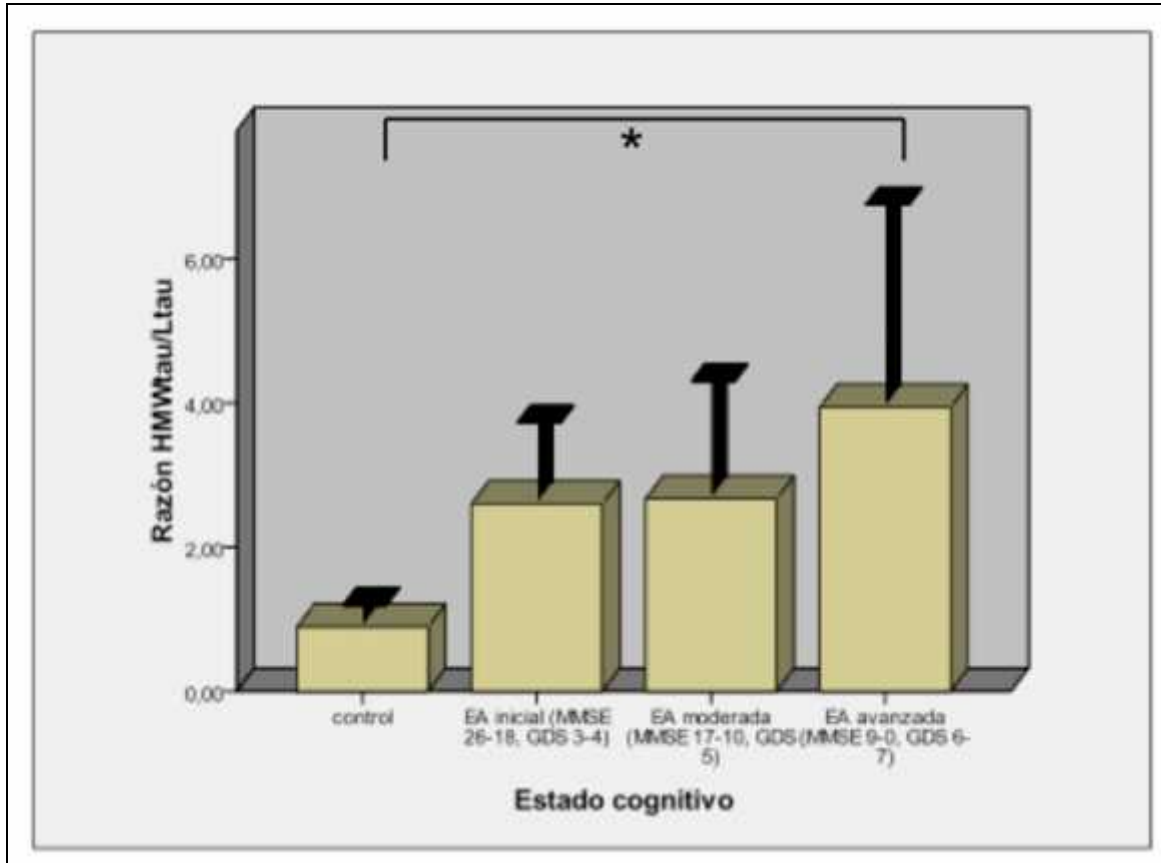


**Figura 24:** Gráfico de dispersión de puntos mostrando la razón HMW-tau/L-tau para cada uno de los sujetos en los grupos control, EA, MCI, DFT y DCB.



Cuando se realizó un análisis evaluando la razón HMW-tau/L-tau en relación al desempeño cognitivo de los sujetos se encontró que existe una clara tendencia a presentar un aumento de la razón HMW-tau/L-tau en relación a la presencia de un mayor grado de deterioro cognitivo. Así, al dividir los sujetos portadores de EA en EA inicial, EA moderada y EA avanzada se encontró una tendencia al aumento de la razón HMW-tau/L-tau, a mayor grado de avance de la enfermedad. Para el número de muestras analizadas en este caso sólo se encontró diferencias significativas entre sujetos del grupo control y portadores de EA avanzada (Figura 25)

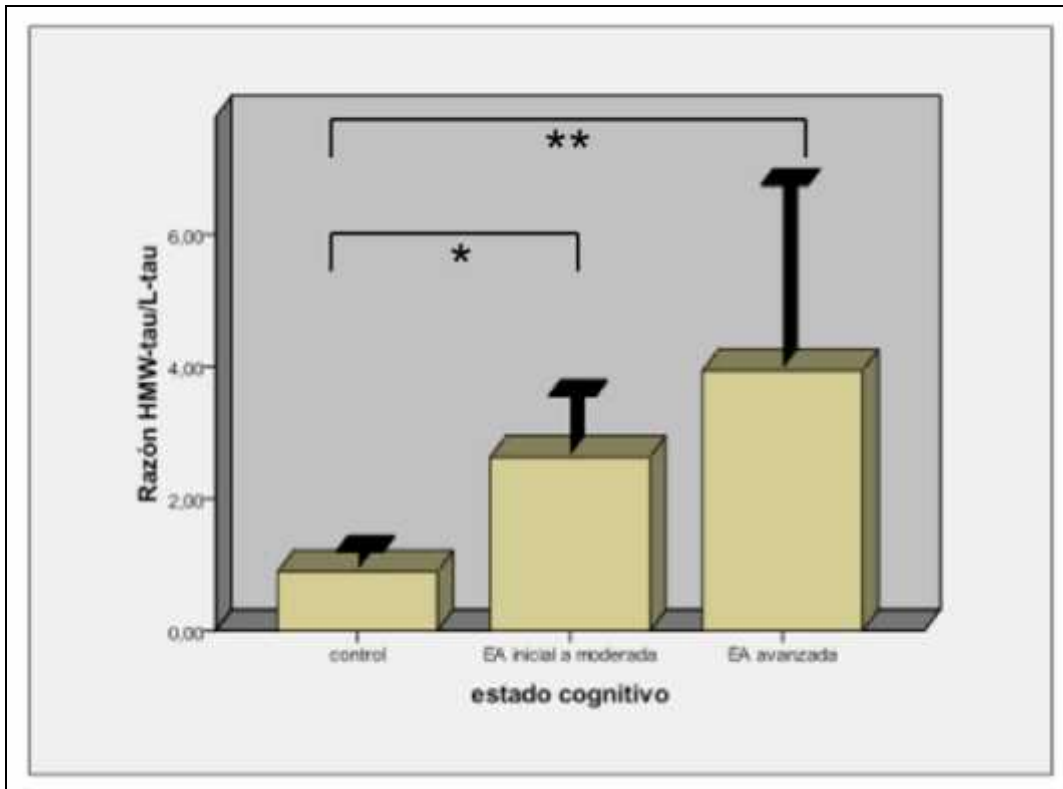
**Figura 25:** Razón HMW-tau/L-tau en sujetos controles y portadores de EA en estadio inicial (EA inicial), EA con avance moderado (EA moderada) y EA en estado avanzado (EA avanzada). Se aprecia una tendencia a presentar mayor razón HMW-tau/L-tau en sujetos con mayor grado de deterioro cognitivo. Barras corresponden a IC 95. \*:  $p = 0,009$ .



Al analizar los sujetos portadores de EA inicial y moderada como un solo grupo (EA inicial a moderada) se encontró diferencias significativas tanto en los sujetos portadores de EA inicial – moderada, como en los portadores de EA avanzada respecto del grupo control (Figura 26)

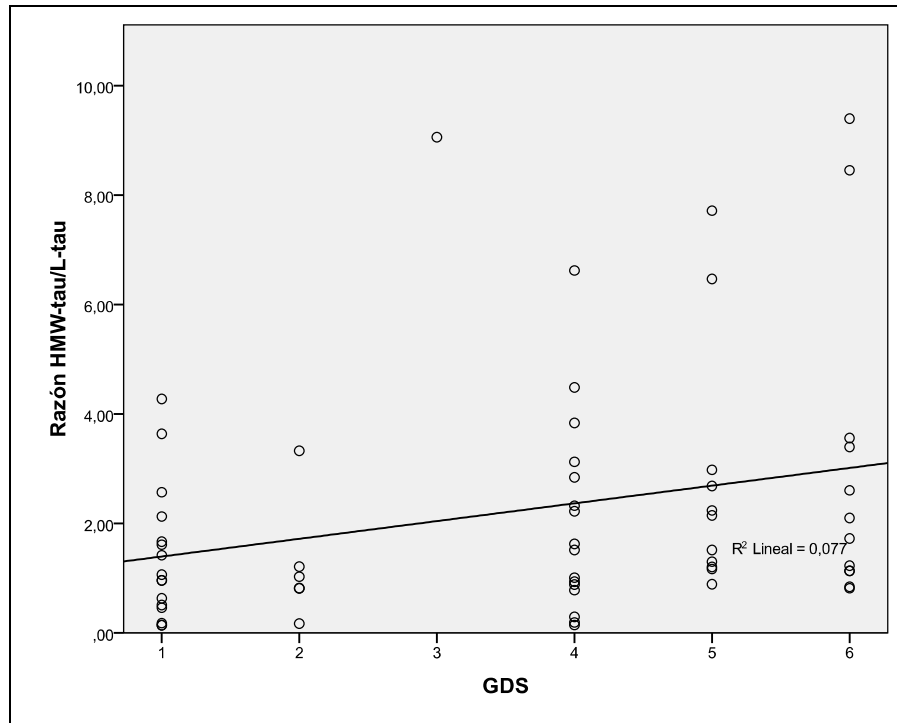


**Figura 26:** Razón HMW-tau/L-tau en sujetos controles y portadores de EA en estadio inicial - moderado (EA inicial a moderada) y EA en estado avanzado (EA avanzada). Barras corresponden a IC 95. \*:  $p = 0,016$ , \*\*:  $p = 0,004$ .



Cuando se evaluó la relación entre desempeño cognitivo en la escala GDS (Figura 27), se encontró una tendencia a presentar un aumento en la razón HMW-tau/L-tau a mayor grado de deterioro cognitivo (mayor puntaje en la escala).

**Figura 27:** Relación entre el patrón de tau plaquetaria y el grado de deterioro cognitivo de los sujetos. Se grafica la razón HMW-tau/L-tau en relación al puntaje de los sujetos en la escala GDS.



Ya que existen diferencias significativas para más de una variable entre el grupo portador de EA y los sujetos del grupo control, se decidió generar un modelo de regresión logística binaria a fin de definir las variables que realmente resultan predictoras del estado cognitivo de los sujetos. En este tipo de análisis se determinó que las variables relevantes para el modelo corresponden a la razón HMW-tau/L-tau y a los años de educación de los sujetos. Este modelo permite estimar que la razón de momios (OR) para presentar EA es de 6,15 si aumenta en una unidad la razón HMW-tau/L-tau plaquetaria (Figura 28 A, columna Exp(B) a la derecha de la tabla).

**Figura 28:** Tablas de salida obtenidas en regresión logística binaria con el programa SPSS 17.0. En A) se muestran las variables que fueron incluidas en el modelo y que corresponden a la razón HMW-tau/L-tau en plaquetas y a los años de estudios de los sujetos. En B) se muestran las variables que no fueron incorporadas al modelo y que corresponden a la edad y el sexo de los sujetos. En C) se aprecia la tabla de clasificación de los datos obtenidos, que muestra que el modelo clasifica correctamente el 75,6% de los casos como EA o controles, con una especificidad de 41,7% y una sensibilidad de 89,7%.

A)

Variables en la ecuación							
		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1 <sup>a</sup>	HMWtauLtau	1,423	,735	3,750	1	,053	4,149
	Constante	-1,046	,901	1,349	1	,245	,351
Paso 2 <sup>b</sup>	HMWtauLtau	1,817	,915	3,940	1	,047	6,152
	añosdeestudios	-,189	,096	3,904	1	,048	,828
	Constante	,318	1,196	,071	1	,790	1,375

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: HMWtauLtau.

b. Variable(s) introducida(s) en el paso 2: añosdeestudios.

B)

Variables que no están en la ecuación					
			Puntuación	gl	Sig.
Paso 1	Variables	edad	,142	1	,706
		sexo(1)	1,325	1	,250
		añosdeestudios	4,509	1	,034
	Estadísticos globales		5,997	3	,112
Paso 2	Variables	edad	,079	1	,778
		sexo(1)	1,773	1	,183
	Estadísticos globales		1,808	2	,405

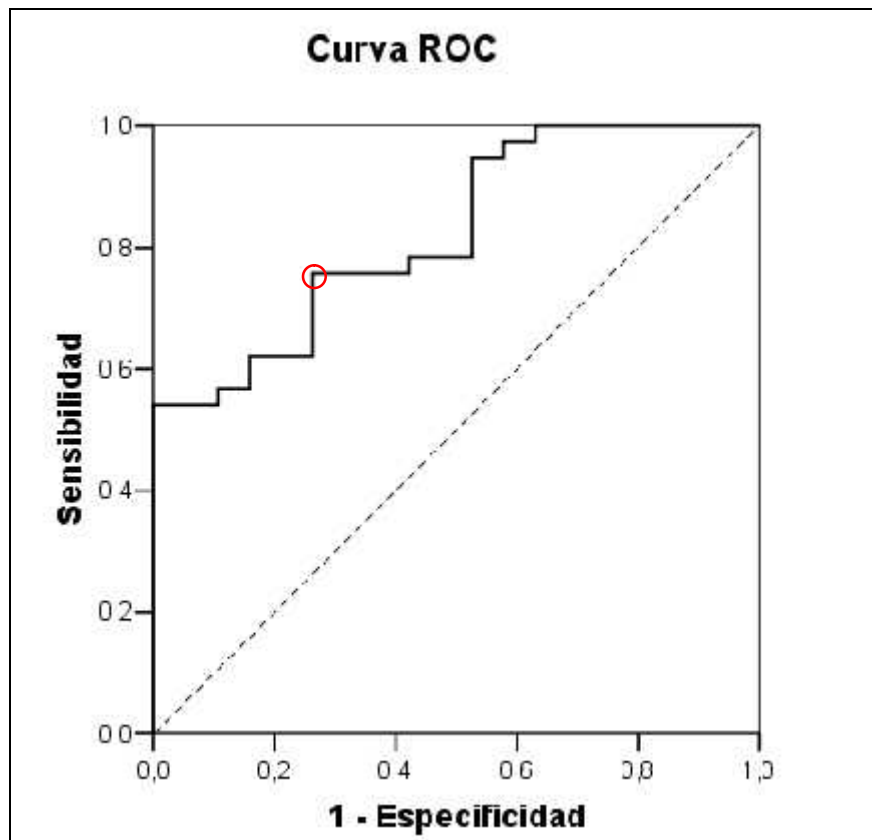
C)

Tabla de clasificación <sup>a</sup>					
Observado	Pronosticado				
	estado cognitivo (0:control, 1:EA)		Porcentaje correcto		
	0	1			
Paso 1	estado cognitivo (0:control, 1:EA)	0	4	8	33.3
		1	1	28	96.6
	Porcentaje global				78.0
Paso 2	estado cognitivo (0:control, 1:EA)	0	5	7	41.7
		1	3	26	89.7
	Porcentaje global				75.6

a. El valor de corte es .500

Con el fin de evaluar la utilidad del índice HMW-tau/L-tau como un test diagnóstico de la EA se analizó la sensibilidad y especificidad de distintos valores del índice HMW-tau/L-tau como punto de corte para identificar si los sujetos correspondían a controles o EA, mediante análisis en una curva de receptor-operador (ROC) tal como se observa en la Figura 28.

**Figura 28:** Curva ROC de la capacidad del índice HMW-tau/L-tau para discriminar sujetos controles y portadores de EA. La sensibilidad de distintos valores de HMW-tau/L-tau (ordenada) se presenta como una línea continua en relación a 1 – especificidad (abscisa). La línea interrumpida corresponde a la diagonal de referencia. El área bajo la curva corresponde a 0,824 (IC 95: 0,716 – 0,932), de un valor máximo de 1. Se indica con un círculo el valor de HMW-tau/L-tau de 1,11, al que corresponde una sensibilidad de 75,7% y una especificidad de 73,7%



En este tipo de análisis y tal como se aprecia en la Tabla 4, con un valor de HMW-tau/L-tau de 0,65 como punto de corte, se logra una sensibilidad de 100% a expensas de una especificidad de sólo 36,8%, mientras que con un índice HMW-tau/L-tau de 1,95 se logra una especificidad de 100%, pero con una sensibilidad de sólo 54,1%. Se consideró que el mejor balance entre sensibilidad (75,7%) y especificidad (73,7%) se logró con un punto de corte del valor HMW-tau/L-tau de 1,11.

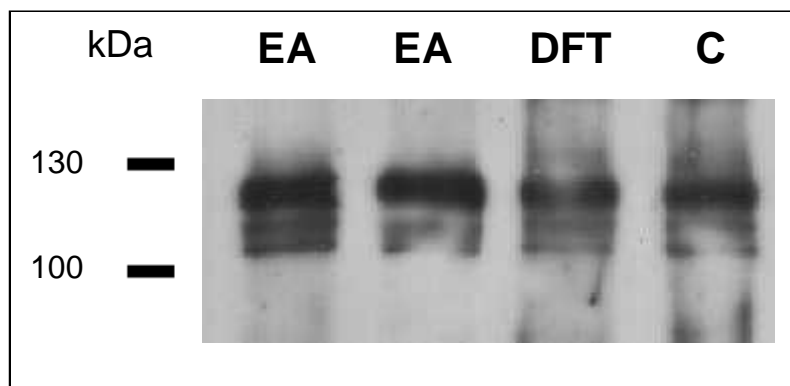
**Tabla 4:** valores del índice HMW-tau/L-tau y sus sensibilidades y especificidades (representada como 1 – especificidad) para discriminar entre sujetos controles y portadores de EA. En rojo se observa el punto de corte del índice HMW-tau/L-tau (1,11) utilizado para generar el modelo de regresión logística

Test positivo para EA si el valor del índice HMW-tau/L-tau es mayor o igual a:	Sensibilidad	1 – Especificidad
,1433	1,000	,947
,1620	1,000	,895
,2317	1,000	,842
,3729	1,000	,789
,4866	1,000	,737
,5724	1,000	,684
,6492	1,000	,632
,6649	,973	,632
,7238	,973	,579
,7994	,946	,579
,8167	,946	,526
,8312	,919	,526
,8654	,892	,526
,8890	,865	,526
,9053	,838	,526
,9282	,811	,526
,9494	,784	,526
,9607	,784	,474
,9859	,784	,421
1,0200	,757	,421
1,0473	,757	,368
1,0800	,757	,316
<b>1,1136</b>	<b>,757</b>	<b>,263</b>
1,1349	,730	,263
1,1725	,703	,263
1,2196	,676	,263
1,2675	,649	,263
1,3312	,622	,263
1,3902	,622	,211
1,4684	,622	,158
1,5162	,595	,158
1,5651	,568	,158
1,6202	,568	,105
1,6472	,541	,105
1,8046	,541	,053
1,9451	,541	,000
2,0252	,514	,000
2,1248	,486	,000
2,1936	,459	,000
2,2823	,432	,000
2,4655	,405	,000
2,6464	,378	,000
2,7652	,351	,000
2,9122	,324	,000
3,0537	,297	,000

## 6.6 Relación entre cambios en el patrón de tau plaquetaria y las fracciones de APP en plaquetas de pacientes portadores de EA y controles (objetivo 3)

Se realizaron *immunoblots* con el anticuerpo 22C11 de los extractos de proteínas plaquetarias para evaluar el patrón de expresión de las diversas formas de APP. Para estos experimentos se utilizaron las mismas membranas de nitrocelulosa previamente utilizadas para *immunoblot* con anticuerpos dirigidos contra tau. En estas membranas se eliminaron los anticuerpos unidos a tau, utilizando tampón de “stripping” y posteriormente se reincubó con el anticuerpo dirigido a APP, con lo que se obtuvo una intensidad de señal aceptable para realizar un análisis densitométrico. A diferencia de lo reportado por grupos de investigadores italianos y taiwaneses (Borroni *et al*, 2003; Borroni *et al*, 2002; Colciaghi *et al*, 2004; Di Luca *et al*, 2000; Liu *et al*, 2005; Padovani *et al*, 2001a; Padovani *et al*, 2002; Padovani *et al*, 2001b; Zainaghi *et al*, 2007); en las presentes evaluaciones no se observó diferencias en el grado de expresión de las distintas formas de APP entre sujetos controles y aquellos con EA (Figura 29).

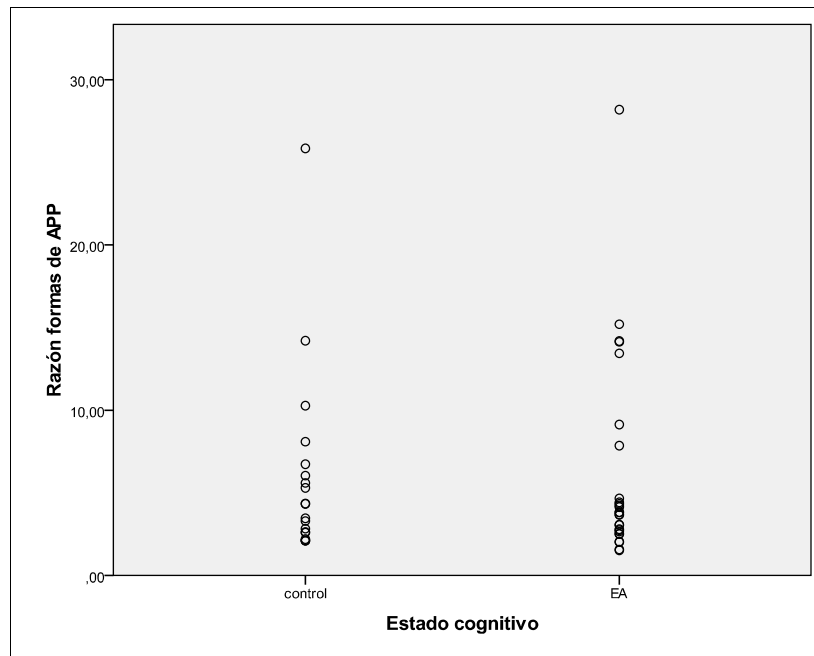
**Figura 29:** SDS-PAGE e *immunoblot* de extractos de proteínas plaquetarias con el anticuerpo 22C11 dirigido contra APP. En esta imagen se aprecia que no existen mayores diferencias en el patrón de expresión de las distintas formas de APP (106, 110 y 130 kDa) entre sujetos portadores de EA, portadores de DFT y sujetos controles (C).



Al realizar el análisis densitométrico de la señal de APP en inmunoblot y calcular la razón entre las formas de APP de 130 kDa y las de 106-110 kDa no se encontró diferencias en dicha razón entre sujetos controles y portadores de EA. (Figura 30).

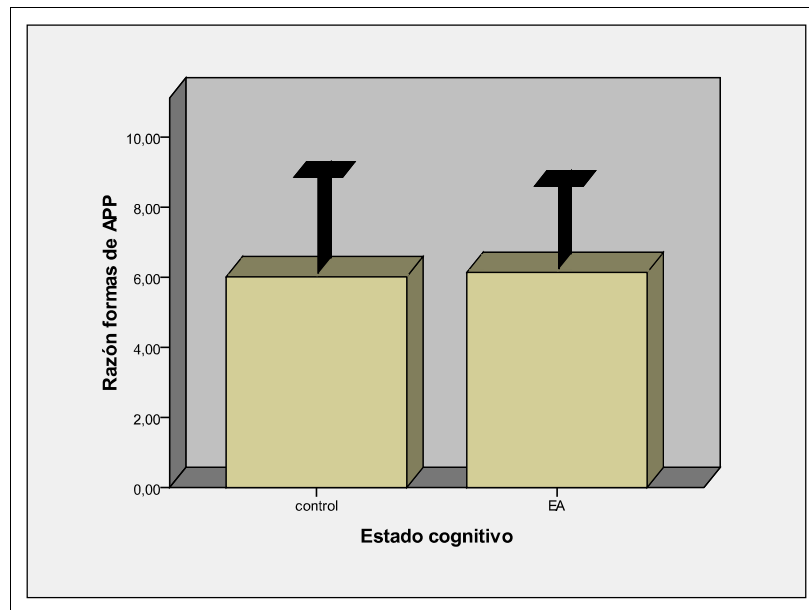
**Figura 30:** Relación entre estado cognitivo de los sujetos y razón de formas de APP de 130/106-110 kDa. A) razón de formas de APP en cada una de las muestras analizadas tanto para sujetos control, como para portadores de EA (EA). B) Promedios de razón de formas de APP para sujetos controles y EA. Las barras corresponden a IC 95. Los promedios son muy semejantes en ambos grupos (control: 6,01, IC 95: 2,1 - 25,83; EA: 6,13, IC 95: 1,58 – 15,25), con valor p: 0,945.

A)



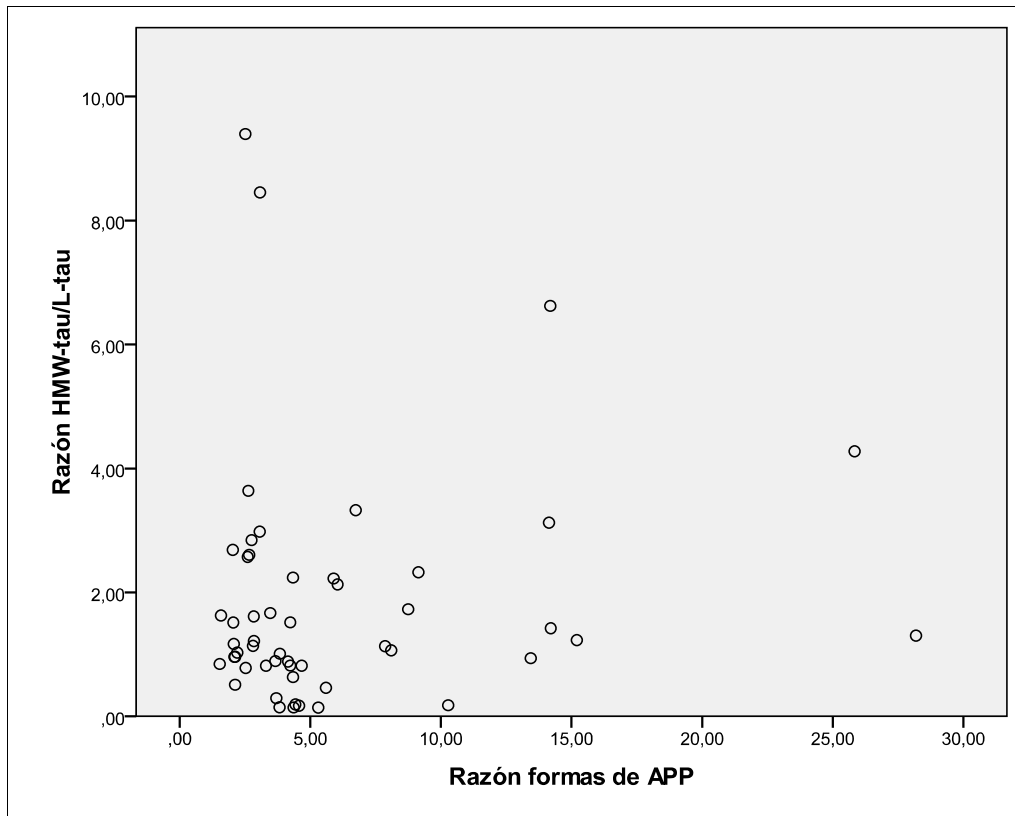


**B)**



Cuando se comparó las razones entre formas de APP y la razón entre formas de tau se observa que no existe una clara correlación entre ambos tipos de análisis, como puede verse en la Figura 31.

**Figura 31:** Relación entre razón de formas de APP (abscisa) y razón HMW-tau/L-tau (ordenada). Cada punto corresponde a una muestra analizada. La dispersión de puntos no permite mostrar alguna correlación entre ambas metodologías.



## **7. Discusión**

### **7.1 La proteína tau plaquetaria.**

Con el envejecimiento de la población mundial y el aumento de la expectativa de vida, las demencias han cobrado una relevancia trascendental como problema de salud, tanto por sus implicancias médicas, como por sus repercusiones a nivel familiar, social y económico. El componente más relevante de este grupo de patologías corresponde a la EA. A pesar de las considerables cantidades de recursos y múltiples equipos de investigación que se han dedicado al estudio de esta enfermedad, debemos reconocer que nuestros avances técnicos y científicos en el diagnóstico y tratamiento de la EA son aún muy pobres. Para buscar soluciones científicas que ayuden en el manejo de una patología tan compleja como esta, es necesario contar con conocimiento certero respecto de su patogenia. Hasta ahora gran parte de los esfuerzos en el estudio con enfoque diagnóstico y/o terapéutico de la EA se basan en la adherencia a hipótesis respecto de la fisiopatología de la enfermedad con distinto grado de sostén en la evidencia. Así gran cantidad de recursos se han destinado al desarrollo de terapias dirigidas a inhibir la formación de placas seniles y patología amiloide, hasta ahora sin aplicación en la clínica (Maccioni *et al*, 2010). En vista de nuestra actual falta de conocimiento de todos los mecanismos involucrados en el desarrollo de una patología tan compleja como la EA, han debido priorizarse nuevos caminos en el estudio de esta patología. En este sentido en los últimos años han aparecido un gran número de publicaciones evaluando las modificaciones post traduccionales y mecanismos de agregación de la proteína tau (Farías *et al*, *in press*). Se cuenta con evidencia de que bajo ciertas condiciones de modificación y agregación tau puede tener efectos neurotóxicos; sin embargo, desconocemos cual es la repercusión real de las alteraciones de tau en la EA, ya sea como una alteración patogénica inicial o como uno más de múltiples elementos que se afectan en el transcurso de la enfermedad (Fernandez *et al*, 2008; Maccioni *et al*, 2010). Por lo mismo aún queda camino por recorrer para poder definir si futuras terapias dirigidas a controlar las alteraciones de tau tendrán un real efecto en la vida diaria de los pacientes portadores de EA. Independiente de lo anterior, resulta meridianamente claro que las

alteraciones de la proteína tau son un evento que ocurre tempranamente y prosigue a todo lo largo de la enfermedad. No es de extrañar por tanto que la evaluación de tau tanto a nivel histopatológico en el parénquima cerebral, como la medición de formas de tau en LCR sea un muy buen indicador de la progresión de la EA, por lo que cualquier metodología relacionada al diagnóstico o seguimiento de la EA que se base en la evaluación de formas alteradas de tau tendrá una alta probabilidad de mostrar un adecuado rendimiento (Lavados *et al*, 2005; Maccioni *et al*, 2006; Maccioni *et al*, 2004; Sonnen *et al*, 2007).

Existe evidencia de múltiples fuentes que indica que la EA no es sólo un patología relacionada a alteraciones del Sistema Nervioso Central y que de hecho es posible encontrar ciertas alteraciones en células y fluidos periféricos. La creencia de que es posible encontrar alteraciones periféricas capaces de reportar respecto de lo que ocurre en el encéfalo es lo que ha empujado a múltiples grupos a investigar posibles marcadores bioquímicos periféricos en la EA. Entre los marcadores propuestos, nos resultó de sumo interés la idea de considerar a las plaquetas de sangre periférica como un indicador de lo que ocurre en células neuronales, ya que se sabe que ellas son portadoras de importantes cantidades de APP, el cual, según diversas publicaciones, sufriría alteraciones en portadores de EA, pudiendo ser incluso un reportero de la respuesta a tratamiento (Liu *et al*, 2005). Considerando lo anterior, resulta lógico considerar que las plaquetas de pacientes con EA podrían experimentar otras alteraciones distintas de las relacionadas con la expresión de APP y es por ello que nuestro laboratorio realizó los análisis iniciales para determinar si las plaquetas expresaban la proteína tau (algo que no había sido descrito previamente), y si de ser ese el caso, esta proteína presentaba algún tipo de modificación en la EA.

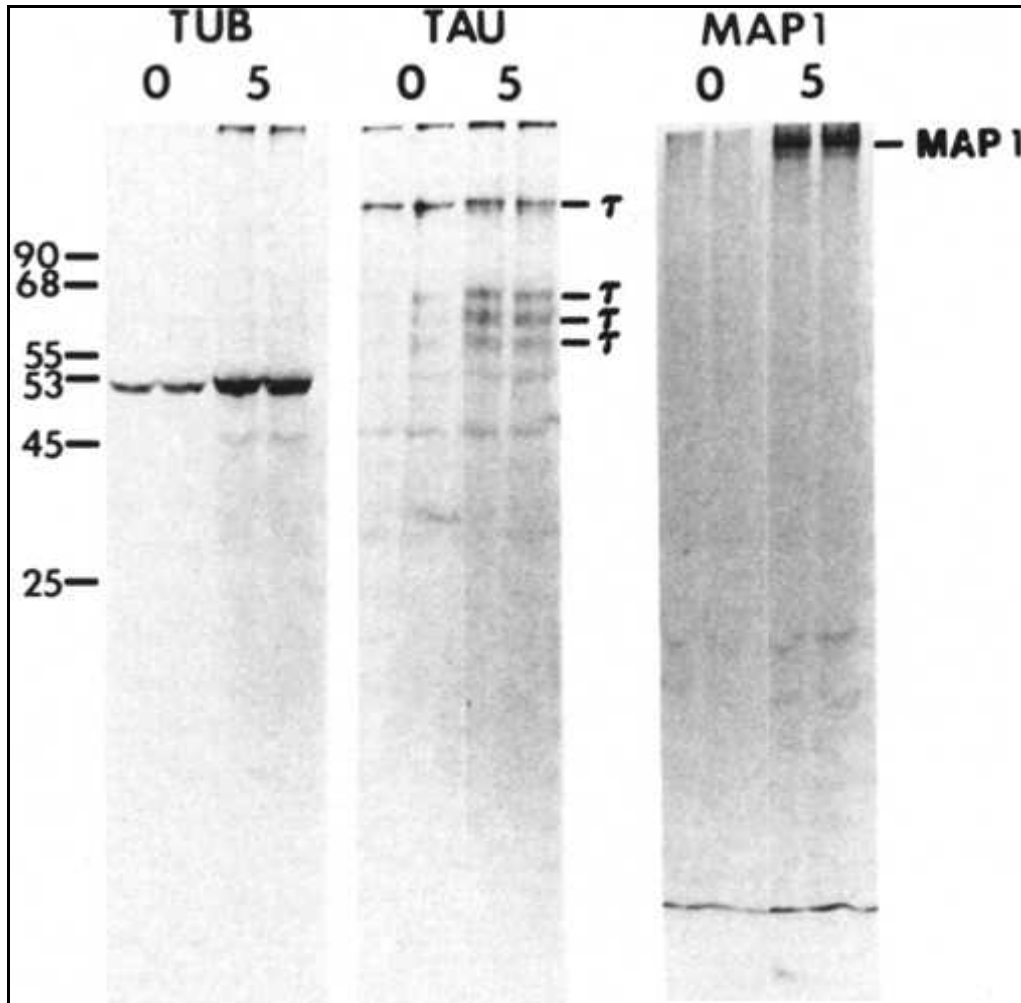
Los resultados obtenidos en ensayos de inmunoblot muestran que la presencia de inmunorreactividad a la proteína tau, la cual puede ser reconocida por una variedad de anticuerpos que se unen a ella en distintos epitopos. El hecho de observar un patrón de bandeo semejante con todos estos anticuerpos hace altamente improbable que la señal observada corresponda a unión inespecífica de los anticuerpos a otra proteína. Además el hecho de que la presencia de la proteína tau pueda ser demostrada mediante técnicas de inmunoprecipitación, inmunoblot e inmunofluorescencia sirven como argumento a favor

para informar que la proteína tau está presente en plaquetas tanto en condiciones fisiológicas como en sujetos portadores de EA. El significado y rol fisiológico de tau en plaquetas aún es una interrogante, pero es posible postular que puesto que las plaquetas presentan una serie de modificaciones dependientes de funciones del citoesqueleto durante su activación, tales como alteraciones morfológicas y aparición de prolongaciones, no es de extrañar que presenten una rica maquinaria proteica que incluya una MAP como es tau.

## **7.2 Formas de tau de alto peso**

Los ensayos de inmunoblot han dejado de manifiesto la existencia de señal de tau en zonas de peso molecular mucho mayor a la esperado para los monómeros normales de la proteína. Al respecto se consideró que las formas de alto peso de tau pudiesen corresponder a una variante de alto peso molecular de la proteína tau que ha sido descrita sobre todo a nivel del Sistema Nervioso Periférico y en líneas celulares derivadas de la cresta neural (Drubin *et al*, 1988). Esta forma de la proteína fue llamada “heavy tau” por su peso molecular alrededor de 110 – 130 kDa (Gache *et al*, 1992; Georgieff *et al*, 1993; Georgieff *et al*, 1991; Mavilia *et al*, 1994), a diferencia de los 66 – 68 kDa de las formas adultas “livianas” de tau. Ambas formas de tau son expresadas en forma diferencial por un mecanismo de splicing alternativo del mismo gen (Mavilia *et al*, 1993) y heavy tau contiene los exones 4A, 6 o ambos que se expresan diferencialmente en varias regiones del sistema nervioso (Couchie *et al*, 1993; Georgieff *et al*, 1993; Goedert *et al*, 1992). La Figura 32 ejemplifica el patrón de migración en SDS-PAGE para L-tau como para heavy tau. Tal como queda claro la “heavy tau” se comporta como una banda de peso definido en SDS-PAGE y no como una serie de bandas en alto peso molecular tal como se observa en los extractos de proteínas plaquetarias (ver Figuras 16 y 21).

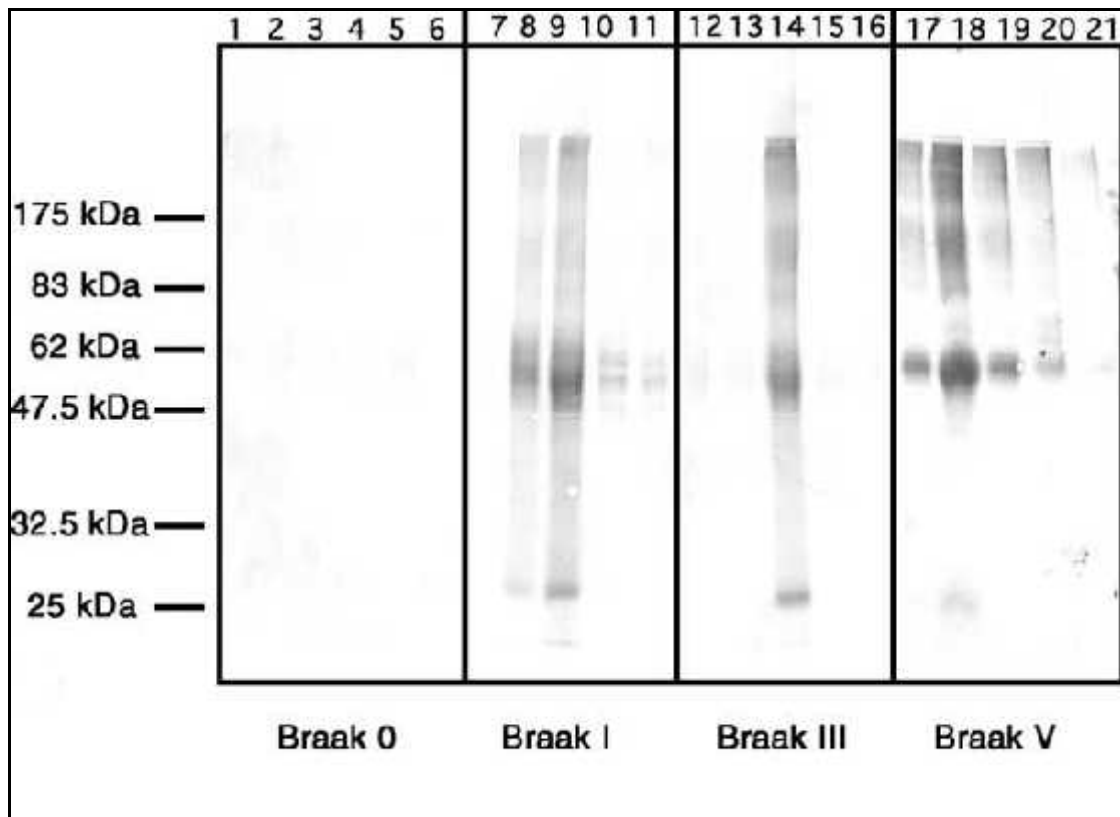
**Figura 32:** Marcación con [S<sup>32</sup>]metionina de las proteínas tubulina (TUB), tau (TAU) y MAP 1 (MAP1) en células PC12 no tratadas (0) o tratadas por 5 días (5) con Factor de Crecimiento Neural (NGF). Fluorografía de SDS-PAGEs tomados de Drubin *et al* (1988). La figura demuestra el patrón de migración de los monómeros de distintas isoformas de tau y de Heavy tau (120-130 kDa) en estudios de electroforesis



La agregación progresiva de tau es un evento central en la patogénesis de la EA y el seguimiento de la aparición formas patológicas (ONFs, neuritas distróficas) de tau permite estratificar distintos estadios de la EA (Braak *et al*, 1991). Sin embargo, existen formas oligoméricas de tau que aparecen previo a la formación de estructuras más complejas como los PHFs y ONFs. Estas formas oligoméricas de tau pueden ser

purificadas en el cerebro de pacientes con EA y servir como un marcador de progresión de la EA (Maeda *et al*, 2006) (Figura 33).

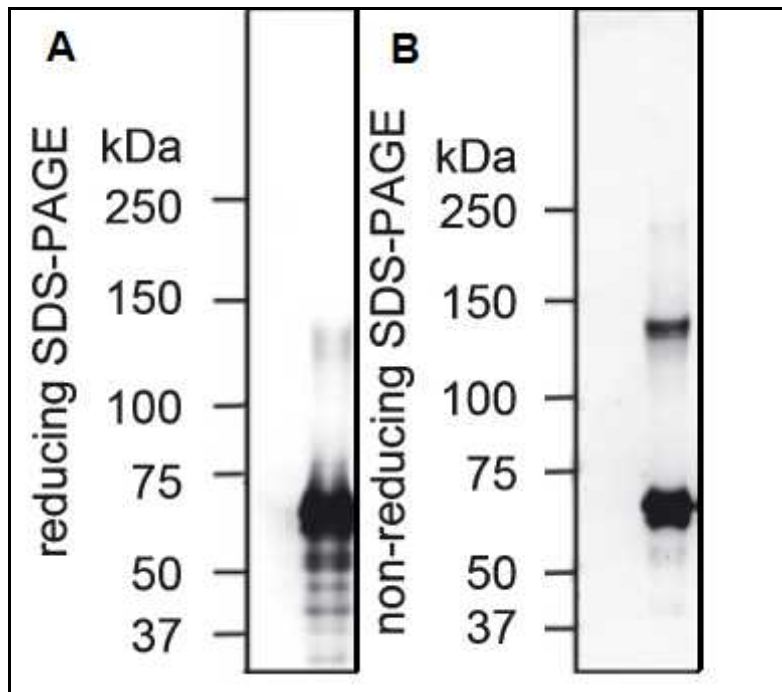
**Figura 33:** Oligómeros granulares de tau en diferentes estadios hitopatológicos de la EA. Se purificó oligómeros de tau de cerebros de pacientes en distintas etapas de la EA (estadios de Braak). Se aprecia un aumento de los oligómeros al avanzar la enfermedad. Cada carril corresponde a un sujeto distinto en SDS-PAGE e *immunoblot* de tau (Maeda *et al*, 2006)



Ante las semejanzas entre las formas oligoméricas de tau descritas en el cerebro de pacientes con EA y los patrones electroforéticos de la tau plaquetaria, se realizó una serie de experimentos para evaluar si la HMW-tau de las plaquetas podía corresponder a oligómeros de tau. Así se observó los cambios en el patrón de migración de tau que pudiesen ocurrir en distintas condiciones que afecten la capacidad de oligomerizar de la proteína. Así en condiciones no reductoras y más aún en condiciones nativas las formas

HMW-tau son mucho más abundantes que en condiciones desnaturalantes y reductoras, lo que es compatible con formas oligoméricas de la proteína tau que se desagregan en estas últimas condiciones. Un efecto semejante de las condiciones de reducción ha sido descrito con tau agregada *in Vitro* o en modelos animales de taupatía (Sahara *et al*, 2007) (Figura 34).

**Figura 34:** Efecto de las condiciones de reducción en SDS-PAGE de oligómeros de tau. Oligómeros de tau recombinante fueron evaluados mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (A) o no reductoras (B). En el último caso son mucho más notorias las formas oligoméricas de tau (Sahara *et al*, 2007).



### 7.3 Tau plaquetaria como biomarcador de la EA

Los ensayos de SDS-PAGE e inmuoblot de proteínas plaquetarias con anticuerpos dirigidos contra tau han demostrado que las formas de alto peso de tau (HMW-tau) se encuentran aumentadas en pacientes portadores de EA. Previamente nuestro grupo ha demostrado que las distintas formas de tau no presentan variación significativa en relación a la edad (Pérez *et al*, 2009). Por lo tanto, la presente tesis tuvo como uno de sus



objetivos centrales el evaluar la posible utilidad clínica de tau plaquetaria como biomarcador de la EA. Para ello hemos obtenido muestras de un grupo portador de EA y un grupo control comparable, ambos con una completa evaluación médica y neuropsicológica que nos permitiese tener claro si cualquier diferencia que fuese encontrada en tau plaquetaria en realidad sea secundaria a la presencia de EA.

Los experimentos realizados demuestran que la razón HMW-tau/L-tau se encuentra aumentada en portadores de EA y que el grado de aumento de esta razón está claramente relacionado con el nivel de deterioro cognitivo de los sujetos. Si bien los tamaños muestrales no son suficientes para una evaluación adecuada de las alteraciones de tau plaquetarias en todos los subgrupos de sujetos con EA (EA inicial, moderada y avanzada), nos permiten mostrar una tendencia al aumento de HMW-tau/L-tau al avanzar la enfermedad.

De la observación de los resultados queda claro que existe un amplio traslape en la relación HMW-tau/L-tau entre sujetos controles y EA, lo que afecta factibilidad de utilizar a tau plaquetaria como un examen diagnóstico de EA. De hecho, la ya descrita relación entre el grado de aumento de HMW-tau/L-tau y el grado de deterioro cognitivo de los sujetos hace pensar que este tipo de exámenes tendría un rol más importante en el seguimiento que en el diagnóstico de la EA. Sin embargo, aún faltan múltiples pruebas de estandarización y optimización del ensayo y su evaluación en un mayor número de sujetos para definir la utilidad clínica real que pudiese tener este tipo de ensayos en pacientes con EA. A pesar de lo anterior, ha sido posible estimar un punto de corte de 1,11 para el índice HMW-tau/L-tau con sensibilidad y especificidad de 75,7 y 73,7% respectivamente. Más importante aún, ha sido posible demostrar mediante modelos de regresión logística multivariada que el índice HMW-tau/L-tau es un predictor independiente del riesgo de ser portador de EA en los sujetos analizados.

#### **7.4 Relación entre APP y tau plaquetario**

La evaluación de formas de APP en plaquetas actualmente no ha sido introducida a la práctica clínica como un kit diagnóstico fiable. Lo anterior probablemente se deba a dificultades en la estandarización y reproductibilidad del ensayo, que requiere plaquetas muy frescas y bajo diversas condiciones que eviten su activación. En la presente tesis no logramos encontrar alguna relación entre el grado de alteración de las formas de APP y el desempeño cognitivo de los sujetos. Esto puede deberse a que las condiciones en cuanto a tiempo entre toma y procesamiento de la muestra de sangre o a condiciones de manipulación y tampones utilizados.

Nosotros evaluamos varios tampones y condiciones de procesamiento para intentar obtener los mejores resultados posibles con los ensayos de APP plaquetario, sin embargo, no fue posible demostrar cambios en las formas de APP en sujetos portadores de EA, ni tampoco se pudo encontrar alguna relación entre los ensayos de APP y los análisis de tau plaquetaria. Esto demuestra las dificultades que persisten para considerar a APP plaquetario como un biomarcador útil de la EA. Por otro lado demuestran que, al menos en nuestros ensayos, el análisis de tau plaquetaria cuenta con mayor potencial para convertirse en un biomarcador útil de la enfermedad.

## **8. Conclusiones**

La presente tesis tuvo como fin caracterizar las distintas formas de la proteína tau plaquetaria y evaluar el potencial de este tipo de ensayo para convertirse en un biomarcador útil de la EA. Hemos demostrado que existen cambios en tau plaquetaria que permiten diferenciar a sujetos controles de portadores de EA y que estos cambios se relacionan con el grado de alteración cognitiva de los sujetos. Se muestra evidencia de que las formas de tau plaquetaria de alto peso molecular corresponden a agregados de proteína tau que se acumularían en las plaquetas de forma similar a lo que ocurre en el cerebro de pacientes con EA y, por lo tanto, la evaluación y seguimiento de estas formas de tau se correlaciona con el grado de avance de la EA y con el desempeño del sujeto en pruebas cognitivas.

El presente es un trabajo inicial y, por lo tanto, aún se requiere un esfuerzo considerable para avanzar en la estandarización y optimización de este tipo de ensayo y para definir si este puede convertirse en un examen clínico útil que ayude al diagnóstico precoz y certero de la EA, de manera de iniciar tratamiento en la forma más precoz posible, lo que puede ser de particular relevancia en un futuro en que esperamos contar con nuevas drogas capaces de detener el avance de la enfermedad.

## Referencias

Alafuzoff I, Adolfsson R, Grundke-Iqbal I, Winblad B (1987) Blood-brain barrier in Alzheimer dementia and in non-demented elderly. An immunocytochemical study. *Acta Neuropathol* **73**: 160-166.

Alvarez A, Toro R, Caceres A, Maccioni RB (1999) Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett* **459**: 421-426.

Alzheimer A (1907) Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiat*: 146-148.

Andersson C, Blennow K, Johansson SE, Almkvist O, Engfeldt P, Lindau M, Eriksdotter-Jonhagen M (2007) Differential CSF biomarker levels in APOE-epsilon4-positive and -negative patients with memory impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord* **23**: 87-95.

Andersson C, Blennow, K, Johansson, S. (2007) Differential CSF Biomarker Levels in APOE- 4 Positive and Negative Patients with Memory Impairment *Dement Geriatr Cogn Disord* **23**: 87-95.

Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* **42**: 631-639.

Barghorn S, Mandelkow E (2002) Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* **41**: 14885-14896.

Behrens MI (2007) *Guías clínicas de diagnóstico y tratamiento de las demencias*, first edn. Santiago: Ediciones de la sociedad de Neurología, Psiquiatría y Neurocirugía de Chile.

Berger Z, Roder H, Hanna A, Carlson A, Rangachari V, Yue M, Wszolek Z, Ashe K, Knight J, Dickson D, Andorfer C, Rosenberry TL, Lewis J, Hutton M, Janus C (2007) Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *J Neurosci* **27**: 3650-3662.

Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E (1993) Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* **11**: 153-163.

Bird TD, Nochlin D, Poorkaj P, Cherrier M, Kaye J, Payami H, Peskind E, Lampe TH, Nemens E, Boyer PJ, Schellenberg GD (1999) A clinical pathological comparison of three families with frontotemporal dementia and identical mutations in the tau gene (P301L). *Brain* **122** ( Pt 4): 741-756.

Blasko I, Jellinger K, Kemmler G, Krampla W, Jungwirth S, Wichart I, Tragl KH, Fischer P (2008) Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: prediction by plasma amyloid beta 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine. *Neurobiol Aging* **29**: 1-11.

Blennow K, Zetterberg H, Minthon L, Lannfelt L, Strid S, Annas P, Basun H, Andreasen N (2007) Longitudinal stability of CSF biomarkers in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **419**: 18-22.

Borroni B, Colciaghi F, Caltagirone C, Rozzini L, Broglio L, Cattabeni F, Di Luca M, Padovani A (2003) Platelet amyloid precursor protein abnormalities in mild cognitive impairment predict conversion to dementia of Alzheimer type: a 2-year follow-up study. *Arch Neurol* **60**: 1740-1744.

Borroni B, Colciaghi F, Pastorino L, Archetti S, Corsini P, Cattabeni F, Di Luca M, Padovani A (2002) ApoE genotype influences the biological effect of donepezil on APP metabolism in Alzheimer disease: evidence from a peripheral model. *Eur Neuropsychopharmacol* **12**: 195-200.

Borroni B, Colciaghi F, Pastorino L, Pettenati C, Cottini E, Rozzini L, Monastero R, Lenzi GL, Cattabeni F, Di Luca M, Padovani A (2001) Amyloid precursor protein in platelets of patients with Alzheimer disease: effect of acetylcholinesterase inhibitor treatment. *Arch Neurol* **58**: 442-446.

Borroni B, Di Luca M, Padovani A (2006) Predicting Alzheimer dementia in mild cognitive impairment patients. Are biomarkers useful? *Eur J Pharmacol* **545**: 73-80.

Bouwman FH, van der Flier WM, Schoonenboom NS, van Elk EJ, Kok A, Rijmen F, Blankenstein MA, Scheltens P (2007) Longitudinal changes of CSF biomarkers in memory clinic patients. *Neurology* **69**: 1006-1011.

Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**: 239-259.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Brion JP, Flament-Durand J, Dustin P (1986) Alzheimer's disease and tau proteins. *Lancet* **2**: 1098.

Buerger K, Alafuzoff I, Ewers M, Pirttila T, Zinkowski R, Hampel H (2007) No correlation between CSF tau protein phosphorylated at threonine 181 with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain* **130**: e82.

Cambiazio V, Gonzalez M, Maccioni RB (1995) DMAP-85: a tau-like protein from *Drosophila melanogaster* larvae. *J Neurochem* **64**: 1288-1297.

Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M, Tolnay M (2009) Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* **11**: 909-913.

Colciaghi F, Marcello E, Borroni B, Zimmermann M, Caltagirone C, Cattabeni F, Padovani A, Di Luca M (2004) Platelet APP, ADAM 10 and BACE alterations in the early stages of Alzheimer disease. *Neurology* **62**: 498-501.

Congdon EE, Kim S, Bonchak J, Songrug T, Matzavinos A, Kuret J (2008) Nucleation-dependent tau filament formation: the importance of dimerization and an estimation of elementary rate constants. *J Biol Chem* **283**: 13806-13816.

Corey-Bloom J (2004) Alzheimer's disease. *Continuum* **10**: 29-56.

Couchie D, Gache Y, Mavilia C, Guilleminot J, Bridoux AM, Nivez MP, Nunez J (1993) [High molecular weight tau proteins and acquisition of neuronal polarity in peripheral nervous system]. *C R Acad Sci III* **316**: 404-409.

Chin SS, Goldman JE (1996) Glial inclusions in CNS degenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**: 499-508.

Degerman Gunnarsson M, Kilander L, Basun H, Lannfelt L (2007) Reduction of phosphorylated tau during memantine treatment of Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* **24**: 247-252.

Di Luca M, Colciaghi F, Pastorino L, Borroni B, Padovani A, Cattabeni F (2000) Platelets as a peripheral district where to study pathogenetic mechanisms of Alzheimer disease: the case of amyloid precursor protein. *Eur J Pharmacol* **405**: 277-283.

Di Luca M, Pastorino L, Bianchetti A, Perez J, Vignolo LA, Lenzi GL, Trabucchi M, Cattabeni F, Padovani A (1998) Differential level of platelet amyloid beta precursor protein isoforms: an early marker for Alzheimer disease. *Arch Neurol* **55**: 1195-1200.

Diniz BS, Pinto Junior JA, Forlenza OV (2008) Do CSF total tau, phosphorylated tau, and beta-amyloid 42 help to predict progression of mild cognitive impairment to Alzheimer's disease? A systematic review and meta-analysis of the literature. *World J Biol Psychiatry* **9**: 172-182.

Drubin D, Kobayashi S, Kellogg D, Kirschner M (1988) Regulation of microtubule protein levels during cellular morphogenesis in nerve growth factor-treated PC12 cells. *J Cell Biol* **106**: 1583-1591.

Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P (2007) Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* **6**: 734-746.

Engelborghs S, Sleegers K, Cras P, Brouwers N, Serneels S, De Leenheir E, Martin JJ, Vanmechelen E, Van Broeckhoven C, De Deyn PP (2007) No association of CSF biomarkers with APOEepsilon4, plaque and tangle burden in definite Alzheimer's disease. *Brain* **130**: 2320-2326.

Ewers M, Buerger K, Teipel SJ, Scheltens P, Schroder J, Zinkowski RP, Bouwman FH, Schonknecht P, Schoonenboom NS, Andreasen N, Wallin A, DeBernardis JF, Kerkman DJ, Heindl B, Blennow K, Hampel H (2007) Multicenter assessment of CSF-phosphorylated tau for the prediction of conversion of MCI. *Neurology* **69**: 2205-2212.

Fariás G, Cornejo A, Jiménez J, Guzmán L, Maccioni RB (*in press*) Mechanisms of tau selfaggregation and neurotoxicity. *Current Alzheimer's Research*.

Farias GA, Munoz JP, Garrido J, Maccioni RB (2002) Tubulin, actin, and tau protein interactions and the study of their macromolecular assemblies. *J Cell Biochem* **85**: 315-324.

Farias GA, Vial C, Maccioni RB (1992) Specific macromolecular interactions between tau and the microtubule system. *Mol Cell Biochem* **112**: 81-88.

Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* **278**: 1349-1356.

Fellgiebel A, Scheurich A, Bartenstein P, Muller MJ (2007) FDG-PET and CSF phospho-tau for prediction of cognitive decline in mild cognitive impairment. *Psychiatry Res* **155**: 167-171.

Fernandez JA, Rojo L, Kuljis RO, Maccioni RB (2008) The damage signals hypothesis of Alzheimer's disease pathogenesis. *J Alzheimers Dis* **14**: 329-333.

Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* **366**: 2112-2117.

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* **12**: 189-198.

Froelich-Fabre S, Bhat RV (2004) Mechanisms of tauopathies. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* **1**: 391-398.

Frost B, Jacks RL, Diamond MI (2009a) Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* **284**: 12845-12852.

Frost B, Ollesch J, Wille H, Diamond MI (2009b) Conformational diversity of wild-type Tau fibrils specified by templated conformation change. *J Biol Chem* **284**: 3546-3551.

Fukutani Y, Kobayashi K, Nakamura I, Watanabe K, Isaki K, Cairns NJ (1995) Neurons, intracellular and extracellular neurofibrillary tangles in subdivisions of the hippocampal cortex in normal ageing and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **200**: 57-60.

Gache Y, Guilleminot J, Ricolfi F, Theiss G, Nunez J (1992) A tau-related protein of 130 kDa is present in Alzheimer brain. *J Neurochem* **58**: 2005-2010.

Gendron TF, Petrucelli L (2009) The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* **4**: 13.

Georgieff IS, Liem RK, Couchie D, Mavilia C, Nunez J, Shelanski ML (1993) Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems. *J Cell Sci* **105** ( Pt 3): 729-737.

Georgieff IS, Liem RK, Mellado W, Nunez J, Shelanski ML (1991) High molecular weight tau: preferential localization in the peripheral nervous system. *J Cell Sci* **100** ( Pt 1): 55-60.

Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **120**: 885-890.

Goedert M, Baur CP, Ahringer J, Jakes R, Hasegawa M, Spillantini MG, Smith MJ, Hill F (1996) PTL-1, a microtubule-associated protein with tau-like repeats from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci* **109** ( Pt 11): 2661-2672.

Goedert M, Jakes R (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J* **9**: 4225-4230.

Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA (1992) Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1983-1987.



Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989a) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* **3**: 519-526.

Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA (1989b) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J* **8**: 393-399.

Goux WJ, Kopplin L, Nguyen AD, Leak K, Rutkofsky M, Shanmuganandam VD, Sharma D, Inouye H, Kirschner DA (2004) The formation of straight and twisted filaments from short tau peptides. *J Biol Chem* **279**: 26868-26875.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* **261**: 6084-6089.

Grundke-Iqbal I, Vorbrodt AW, Iqbal K, Tung YC, Wang GP, Wisniewski HM (1988) Microtubule-associated polypeptides tau are altered in Alzheimer paired helical filaments. *Brain Res* **464**: 43-52.

Gu Y, Oyama F, Ihara Y (1996) Tau is widely expressed in rat tissues. *J Neurochem* **67**: 1235-1244.

Gustafson DR, Skoog I, Rosengren L, Zetterberg H, Blennow K (2007) Cerebrospinal fluid beta-amyloid 1-42 concentration may predict cognitive decline in older women. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **78**: 461-464.

Herczenik E, Bouma B, Korporaal SJ, Strangi R, Zeng Q, Gros P, Van Eck M, Van Berkel TJ, Gebbink MF, Akkerman JW (2007) Activation of human platelets by misfolded proteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**: 1657-1665.

Hernandez F, Avila J (2008) Tau aggregates and tau pathology. *J Alzheimers Dis* **14**: 449-452.

Hernandez P, Lee G, Sjoberg M, Maccioni RB (2009) Tau phosphorylation by cdk5 and Fyn in response to amyloid peptide A $\beta$  (25-35): involvement of lipid rafts. *J Alzheimers Dis* **16**: 149-156.

Himmler A (1989) Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol Cell Biol* **9**: 1389-1396.

Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW, Jr. (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* **9**: 1381-1388.

Holzer M, Craxton M, Jakes R, Arendt T, Goedert M (2004) Tau gene (MAPT) sequence variation among primates. *Gene* **341**: 313-322.

Irizarry MC, Gurol ME, Raju S, Diaz-Arrastia R, Locascio JJ, Tennis M, Hyman BT, Growdon JH, Greenberg SM, Bottiglieri T (2005) Association of homocysteine with plasma amyloid beta protein in aging and neurodegenerative disease. *Neurology* **65**: 1402-1408.

Irminger-Finger I, Laymon RA, Goldstein LS (1990) Analysis of the primary sequence and microtubule-binding region of the Drosophila 205K MAP. *J Cell Biol* **111**: 2563-2572.

Isobe C, Murata T, Sato C, Terayama Y (2005) Increase of total homocysteine concentration in cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Life Sci* **77**: 1836-1843.

Jeganathan S, von Bergen M, Mandelkow EM, Mandelkow E (2008) The natively unfolded character of tau and its aggregation to Alzheimer-like paired helical filaments. *Biochemistry* **47**: 10526-10539.

Kaiser E, Schonknecht P, Thomann PA, Hunt A, Schroder J (2007) Influence of delayed CSF storage on concentrations of phospho-tau protein (181), total tau protein and beta-amyloid (1-42). *Neurosci Lett* **417**: 193-195.

Koseoglu E, Karaman Y (2007) Relations between homocysteine, folate and vitamin B12 in vascular dementia and in Alzheimer disease. *Clin Biochem* **40**: 859-863.

Kosik KS, Finch EA (1987) MAP2 and tau segregate into dendritic and axonal domains after the elaboration of morphologically distinct neurites: an immunocytochemical study of cultured rat cerebrum. *J Neurosci* **7**: 3142-3153.

Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* **2**: 1389-1397.

Ksiazak-Reding H, Wall JS (2005) Characterization of paired helical filaments by scanning transmission electron microscopy. *Microsc Res Tech* **67**: 126-140.

Kuemmerle S, Gutekunst CA, Klein AM, Li XJ, Li SH, Beal MF, Hersch SM, Ferrante RJ (1999) Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease. *Ann Neurol* **46**: 842-849.

Kurt MA, Davies DC, Kidd M (1997) Paired helical filament morphology varies with intracellular location in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett* **239**: 41-44.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lambert JC, Coyle N, Lendon C (2004) The allelic modulation of apolipoprotein E expression by oestrogen: potential relevance for Alzheimer's disease. *J Med Genet* **41**: 104-112.

Lanni C, Racchi M, Mazzini G, Ranzenigo A, Polotti R, Sinforiani E, Olivari L, Barcikowska M, Styczynska M, Kuznicki J, Szybinska A, Govoni S, Memo M, Uberti D (2008) Conformationally altered p53: a novel Alzheimer's disease marker? *Mol Psychiatry* **13**: 641-647.

Lavados M, Farias G, Rothhammer F, Guillon M, Mujica MC, Maccioni C, Maccioni RB (2005) ApoE alleles and tau markers in patients with different levels of cognitive impairment. *Arch Med Res* **36**: 474-479.

Lavados M, Guillon M, Mujica MC, Rojo LE, Fuentes P, Maccioni RB (2008) Mild cognitive impairment and Alzheimer patients display different levels of redox-active CSF iron. *J Alzheimers Dis* **13**: 225-232.

Lee G, Cowan N, Kirschner M (1988) The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science* **239**: 285-288.

Lee G, Neve RL, Kosik KS (1989) The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* **2**: 1615-1624.

Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* **24**: 1121-1159.

Liu HC, Chi CW, Ko SY, Wang HC, Hong CJ, Lin KN, Wang PN, Liu TY (2005) Cholinesterase inhibitor affects the amyloid precursor protein isoforms in patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* **19**: 345-348.

Liu HC, Wang HC, Ko SY, Wang PN, Chi CW, Hong CJ, Lin KN, Liu TY (2007) Correlation between platelet amyloid precursor protein isoform ratio and cognition in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **11**: 77-84.

Liu Y, Xia J, Ma D, Faber DS, Fischer I (1997) Tau-like proteins in the nervous system of goldfish. *Neurochem Res* **22**: 1511-1516.

Lu Q, Kanumury R, Wood JG (1994) Abnormal phosphorylation of tau proteins associated with bovine brain microtubules: activation by excess ATP and tyrosine dephosphorylation. *J Neurosci Res* **37**: 759-768.

Luchsinger JA, Tang MX, Miller J, Green R, Mehta PD, Mayeux R (2007) Relation of plasma homocysteine to plasma amyloid beta levels. *Neurochem Res* **32**: 775-781.

Llibre Rodriguez JJ, Ferri CP, Acosta D, Guerra M, Huang Y, Jacob KS, Krishnamoorthy ES, Salas A, Sosa AL, Acosta I, Dewey ME, Gaona C, Jotheeswaran AT, Li S, Rodriguez D, Rodriguez G, Kumar PS, Valhuerdi A, Prince M (2008) Prevalence of dementia in Latin America, India, and China: a population-based cross-sectional survey. *Lancet* **372**: 464-474.

Maccioni RB, Cambiazo V (1995) Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev* **75**: 835-864.

Maccioni RB, Farias G, Morales I, Navarrete L (2010) The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease. *Arch Med Res* **41**: 226-231.

Maccioni RB, Farías GA (2009) An innovative blood platelets biomarker for early diagnosis of Alzheimer's disease.

Maccioni RB, Lavados M, Guillon M, Mujica C, Bosch R, Farias G, Fuentes P (2006) Anomalously phosphorylated tau and Abeta fragments in the CSF correlates with cognitive impairment in MCI subjects. *Neurobiol Aging* **27**: 237-244.

Maccioni RB, Lavados M, Maccioni CB, Mendoza-Naranjo A (2004) Biological markers of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Curr Alzheimer Res* **1**: 307-314.

Maccioni RB, Munoz JP, Barbeito L (2001) The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res* **32**: 367-381.

Maccioni RB, Perry G (2009) *Current hypotheses and research milestones in Alzheimer's disease*. New York: Springer.

Maeda S, Sahara N, Saito Y, Murayama M, Yoshiike Y, Kim H, Miyasaka T, Murayama S, Ikai A, Takashima A (2007) Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. *Biochemistry* **46**: 3856-3861.

Maeda S, Sahara N, Saito Y, Murayama S, Ikai A, Takashima A (2006) Increased levels of granular tau oligomers: an early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neurosci Res* **54**: 197-201.

Mavilia C, Couchie D, Mattei MG, Nivez MP, Nunez J (1993) High and low molecular weight tau proteins are differentially expressed from a single gene. *J Neurochem* **61**: 1073-1081.

Mavilia C, Couchie D, Nunez J (1994) Diversity of high-molecular-weight tau proteins in different regions of the nervous system. *J Neurochem* **63**: 2300-2306.

Mayeux R, Saunders AM, Shea S, Mirra S, Evans D, Roses AD, Hyman BT, Crain B, Tang MX, Phelps CH (1998) Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of

Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* **338**: 506-511.

McDermott JB, Aamodt S, Aamodt E (1996) *ptl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene whose products are homologous to the tau microtubule-associated proteins. *Biochemistry* **35**: 9415-9423.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* **34**: 939-944.

Mitchell TW, Nissanov J, Han LY, Mufson EJ, Schneider JA, Cochran EJ, Bennett DA, Lee VM, Trojanowski JQ, Arnold SE (2000) Novel method to quantify neuropil threads in brains from elders with or without cognitive impairment. *J Histochem Cytochem* **48**: 1627-1638.

Mondragon-Rodriguez S, Basurto-Islas G, Santa-Maria I, Mena R, Binder LI, Avila J, Smith MA, Perry G, Garcia-Sierra F (2008) Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease. *Int J Exp Pathol* **89**: 81-90.

Morales I, Farías G, Maccioni R (2010a) Mechanisms of tau selfaggregation and neurotoxicity. *Rev Chil Neuro-Psiquiat* **48**: 49-57.

Morales I, Farias G, Maccioni RB (2010b) Neuroimmunomodulation in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Neuroimmunomodulation* **17**: 202-204.

Morsch R, Simon W, Coleman PD (1999) Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**: 188-197.

Mulder C, Scheltens P, Visser JJ, van Kamp GJ, Schutgens RB (2000) Genetic and biochemical markers for Alzheimer's disease: recent developments. *Ann Clin Biochem* **37** ( Pt 5): 593-607.

Murphy DB, Wallis KT (1985) Erythrocyte microtubule assembly in vitro. Determination of the effects of erythrocyte tau, tubulin isoforms, and tubulin oligomers on erythrocyte tubulin assembly, and comparison with brain microtubule assembly. *J Biol Chem* **260**: 12293-12301.

Nelson PT, Stefansson K, Gulcher J, Saper CB (1996) Molecular evolution of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *J Neurochem* **67**: 1622-1632.

Oddo S, Vasilevko V, Caccamo A, Kitazawa M, Cribbs DH, LaFerla FM (2006) Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J Biol Chem* **281**: 39413-39423.

Padovani A, Borroni B, Colciaghi F, Pastorino L, Archetti S, Cottini E, Caimi L, Cattabeni F, Di Luca M (2001a) Platelet amyloid precursor protein forms in AD: a peripheral diagnostic tool and a pharmacological target. *Mech Ageing Dev* **122**: 1997-2004.

Padovani A, Borroni B, Colciaghi F, Pettenati C, Cottini E, Agosti C, Lenzi GL, Caltagirone C, Trabucchi M, Cattabeni F, Di Luca M (2002) Abnormalities in the pattern of platelet amyloid precursor protein forms in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol* **59**: 71-75.

Padovani A, Pastorino L, Borroni B, Colciaghi F, Rozzini L, Monastero R, Perez J, Pettenati C, Mussi M, Parrinello G, Cottini E, Lenzi GL, Trabucchi M, Cattabeni F, Di Luca M (2001b) Amyloid precursor protein in platelets: a peripheral marker for the diagnosis of sporadic AD. *Neurology* **57**: 2243-2248.

Pérez P, Farías G, Maccioni RB (2009) Hallazgo y evaluación de la proteína tau en plaquetas en distintos grupos etéreos. In *XXXI congreso de la Sociedad de Farmacología de Chile*, Concepción, Chile.

Pérez PG (2009) Estudio de la agregación de la proteína tau en la elaboración de un test diagnóstico en sangre para la detección de la Enfermedad de Alzheimer. In *Departamento de Ciencias Químicas y Farmacéuticas* p 75. Universidad Arturo Prat, Iquique.

Peskind ER, Riekse R, Quinn JF, Kaye J, Clark CM, Farlow MR, Decarli C, Chabal C, Vavrek D, Raskind MA, Galasko D (2005) Safety and acceptability of the research lumbar puncture. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **19**: 220-225.

Raina P, Santaguida P, Ismaila A, Patterson C, Cowan D, Levine M, Booker L, Oremus M (2008) Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: evidence review for a clinical practice guideline. *Ann Intern Med* **148**: 379-397.

Rao GH (1988) Measurement of ionized calcium in normal human blood platelets. *Anal Biochem* **169**: 400-404.

Reisberg B, Ferris SH, de Leon MJ, Crook T (1982) The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am J Psychiatry* **139**: 1136-1139.

Riekse RG, Li G, Petrie EC, Leverenz JB, Vavrek D, Vuletic S, Albers JJ, Montine TJ, Lee VM, Lee M, Seubert P, Galasko D, Schellenberg GD, Hazzard WR, Peskind ER (2006) Effect of statins on Alzheimer's disease biomarkers in cerebrospinal fluid. *J Alzheimers Dis* **10**: 399-406.

Rojo L, Sjoberg MK, Hernandez P, Zambrano C, Maccioni RB (2006) Roles of cholesterol and lipids in the etiopathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biomed Biotechnol* **2006**: 73976.

Rojo LE, Fernandez JA, Maccioni AA, Jimenez JM, Maccioni RB (2008) Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Med Res* **39**: 1-16.

Sahara N, Maeda S, Murayama M, Suzuki T, Dohmae N, Yen SH, Takashima A (2007) Assembly of two distinct dimers and higher-order oligomers from full-length tau. *Eur J Neurosci* **25**: 3020-3029.

Sahara N, Maeda S, Takashima A (2008) Tau oligomerization: a role for tau aggregation intermediates linked to neurodegeneration. *Curr Alzheimer Res* **5**: 591-598.

Sanchez MP, Alvarez-Tallada V, Avila J (2001) [The microtubule-associated protein tau in neurodegenerative diseases. Tauopathies]. *Rev Neurol* **33**: 169-177.

Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* **309**: 476-481.

Schonknecht P, Pantel J, Kaiser E, Thomann P, Schroder J (2007) Increased tau protein differentiates mild cognitive impairment from geriatric depression and predicts conversion to dementia. *Neurosci Lett* **416**: 39-42.

Schoonenboom NS, van der Flier WM, Blankenstein MA, Bouwman FH, Van Kamp GJ, Barkhof F, Scheltens P (2008) CSF and MRI markers independently contribute to the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **29**: 669-675.

Sergeant N, Delacourte A, Buee L (2005) Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta* **1739**: 179-197.

Serot JM, Barbe F, Arning E, Bottiglieri T, Franck P, Montagne P, Nicolas JP (2005) Homocysteine and methylmalonic acid concentrations in cerebrospinal fluid: relation with age and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **76**: 1585-1587.

Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA (2002) Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **346**: 476-483.

Sonnen JA, Keene CD, Montine KS, Li G, Peskind ER, Zhang J, Montine TJ (2007) Biomarkers for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* **7**: 1021-1028.

Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE, Moir RD The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS ONE* **5**: e9505.

Steinhilb ML, Dias-Santagata D, Mulkearns EE, Shulman JM, Biernat J, Mandelkow EM, Feany MB (2007) S/P and T/P phosphorylation is critical for tau neurotoxicity in *Drosophila*. *J Neurosci Res* **85**: 1271-1278.

The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association, The National Institute on Aging Working Group (1998) Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". In *Neurobiol Aging* pp 109-116.

Uberti D, Lanni C, Carsana T, Francisconi S, Missale C, Racchi M, Govoni S, Memo M (2006) Identification of a mutant-like conformation of p53 in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* **27**: 1193-1201.

Uberti D, Lanni C, Racchi M, Govoni S, Memo M (2008) Conformationally altered p53: a putative peripheral marker for Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* **5**: 209-211.

van Swieten J, Spillantini MG (2007) Hereditary frontotemporal dementia caused by Tau gene mutations. *Brain Pathol* **17**: 63-73.

Vanderstichele H, De Vreese K, Blennow K, Andreasen N, Sindic C, Ivanoiu A, Hampel H, Burger K, Parnetti L, Lanari A, Padovani A, DiLuca M, Blaser M, Olsson AO, Pottel H, Hulstaert F, Vanmechelen E (2006) Analytical performance and clinical utility of the INNOTEST PHOSPHO-TAU181P assay for discrimination between Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Clin Chem Lab Med* **44**: 1472-1480.

Vanier MT, Neuville P, Michalik L, Launay JF (1998) Expression of specific tau exons in normal and tumoral pancreatic acinar cells. *J Cell Sci* **111** ( Pt 10): 1419-1432.

Vega S, Reyes-Maldonado E, Vela-Ojeda J, Xolotl-Castillo M, Montiel-Cervantes L, Cerecedo-Mercado DA (2006) [Ultrastructural study of platelets patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria]. *Rev Invest Clin* **58**: 475-486.

von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, Mandelkow E (2000) Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5129-5134.

Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, Hull M, Hampel H, Kessler H, Frolich L, Schroder J, Peters O, Jessen F, Luckhaus C, Perneczky R, Jahn H, Fiszer M, Maler JM, Zimmermann R, Bruckmoser R, Kornhuber J, Lewczuk P (2007) Amyloid beta peptide ratio 42/40 but not A beta 42 correlates with phospho-Tau in patients with low- and high-CSF A beta 40 load. *J Neurochem* **101**: 1053-1059.

Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA (1988) Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 4884-4888.



World Health Organization (2003) The World Health Report 2003-Shaping the future. World Health Organization, Geneva.

Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, Maeda J, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM (2007) Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* **53**: 337-351.

Yu Y, Run X, Liang Z, Li Y, Liu F, Liu Y, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX (2009) Developmental regulation of tau phosphorylation, tau kinases, and tau phosphatases. *J Neurochem* **108**: 1480-1494.

Zainaghi IA, Forlenza OV, Gattaz WF (2007) Abnormal APP processing in platelets of patients with Alzheimer's disease: correlations with membrane fluidity and cognitive decline. *Psychopharmacology (Berl)* **192**: 547-553.

Zambrano CA, Egana JT, Nunez MT, Maccioni RB, Gonzalez-Billault C (2004) Oxidative stress promotes tau dephosphorylation in neuronal cells: the roles of cdk5 and PP1. *Free Radic Biol Med* **36**: 1393-1402.

Zetterberg H, Pedersen M, Lind K, Svensson M, Rolstad S, Eckerstrom C, Syversen S, Mattsson UB, Ysander C, Mattsson N, Nordlund A, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Jonsson M, Edman A, Blennow K, Wallin A (2007) Intra-individual stability of CSF biomarkers for Alzheimer's disease over two years. *J Alzheimers Dis* **12**: 255-260.

Zhong Z, Ewers M, Teipel S, Burger K, Wallin A, Blennow K, He P, McAllister C, Hampel H, Shen Y (2007) Levels of beta-secretase (BACE1) in cerebrospinal fluid as a predictor of risk in mild cognitive impairment. *Arch Gen Psychiatry* **64**: 718-726.

Zimmermann M, Borroni B, Cattabeni F, Padovani A, Di Luca M (2005) Cholinesterase inhibitors influence APP metabolism in Alzheimer disease patients. *Neurobiol Dis* **19**: 237-242.

## ANEXO 1

### ABREVIATURAS UTILIZADAS

A	Péptido beta amiloide
APP	Péptido precursor del beta amiloide
DCB	Degeneración corticobasal
DFT	Demencia frontotemporal
DFTP-17	Demencia frontotemporal – parkinsonismo asociada al cromosoma 17
DTT	Ditiotretiol
EA	Enfermedad de Alzheimer
IC 95	intervalo de confianza de 95%
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MCI	Deterioro cognitivo leve
NGF	Factor de Crecimiento Neural
NR-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no reductoras
ONF	Ovillo neurofibrilar
OR	Razón de momios (odds ratio)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PHF	Filamento helicoidal pareado
p-tau	Forma fosforilada de la proteína tau
ROC	Curva de receptor-operador
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (condición desnaturalante) y en condición reductora

## ANEXO 2



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS



### ACTA DE APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS

Con fecha 26 de mayo de 2009, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente  
Sra. Marianne Gaudlitz H., Enfermera, Mg. Humanidades, Vicepresidente  
Dr. Hugo Amigo C., Ph. D., Especialista en Salud Pública  
Dr. Leandro Blagini A., Médico Internista  
Dra. Lucía Cifuentes, Médico Genetista  
Sra. Nina Horwitz, Sociólogo, Mg. Bioética  
Sr. Claus Jahn W., Representante de la Comunidad  
Dr. Miguel O'Ryan, Médico Pediatra Infectólogo  
Dr. Julio Pallavicini, Médico Psiquiatra

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: "**EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES PLAQUETARIOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**" y cuyo investigador responsable es el **DR. GONZALO FARIAS G.**, quien desempeña funciones en el **Doctorado en Ciencias Médicas Neurología Adultos, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.**

*El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:*

- *Proyecto de Investigación in extenso*
- *Consentimiento informado*
- *CV del investigador responsable y de los Co-investigadores*
- *Carta de aceptación de las autoridades de la institución en que se realizará el estudio*
- *Carta compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado éste.*

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2002, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de esta información el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

**Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl**



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS



- a) Carácter de la población estudiada: No cautiva y se trata de una investigación no terapéutica.
- b) Utilidad del Proyecto: Se estudiará el rendimiento diagnóstico de un marcador de Enfermedad de Alzheimer presente en las plaquetas.
- c) Riesgos y Beneficios: Los riesgos son mínimos (las propias de una punción venosa periférica) y los beneficios, de comprobarse las hipótesis de los autores, muy grandes.
- d) Protección de los participantes: Se solicita la participación mediante la firma de un formulario de consentimiento informado, que esta redactado de manera adecuada.
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: Dado que esta no es una investigación de tipo terapéutica, esta no es aplicable.
- f) El investigador responsable se ha comprometido a entregar los resultados del estudio a este Comité al finalizar el proyecto.

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión corregida del 18 de mayo de 2009, que se adjunta firmado, fechado y timbrado por el CEISH.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Sra. Marianne Gaudlitz H.  
Vicepresidenta  
Comité de Ética en Investigación  
en Seres Humanos

MGH/mva.

c.c.: Proy. 012-2008 .

- Programa de Doctorado en Ciencias Médicas, Escuela de Postgrado, Facultad de Medicina,  
Universidad de Chile

Santiago, 01 de junio de 2009.

**Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl**



19 de mayo de 2009, Versión 2

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Proyecto: "Evaluación de biomarcadores plaquetarios en la Enfermedad de Alzheimer"**

Le invitamos a participar en el proyecto de investigación "Evaluación de biomarcadores plaquetarios en la Enfermedad de Alzheimer" llevado a cabo por la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y la Unidad de Neurociencias Cognitivas del Centro Internacional de Biomedicina (ICC), para ayudar al diagnóstico temprano de la enfermedad de Alzheimer.

Le solicitamos aportar una muestra de sangre venosa de aproximadamente 5 cc (una cucharada) sobre la base de su consentimiento. Usted puede sentir algunas molestias localizadas, dolor o mareos cuando se extraiga sangre de una vena en su brazo, y en algunos casos usted podría llegar a tener un moretón. Hay una pequeña posibilidad de que usted pudiese adquirir una infección.

Usted además entrega su consentimiento para participar en evaluaciones psicológicas necesarias para el presente estudio.

Usted no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio. Por otra parte, usted o su sistema previsional deberán financiar las hospitalizaciones, honorarios, exámenes y tratamientos habituales para el estudio y tratamiento de su enfermedad.

Toda información derivada de su participación será mantenida en estricta confidencialidad. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.



Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de su enfermedad.

Esta investigación está amparada bajo la aprobación de los Comités de Etica respectivos. Si Ud. requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede llamar a:

Dr. Gonzalo Farías, (02) 9787228

**Conclusión:**

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto “Evaluación de biomarcadores plaquetarios en la Enfermedad de Alzheimer”.

\_\_\_\_\_  
Nombre del paciente

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre del representante legal del paciente

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Fecha

Dr. GONZALO FARIAS  
Nombre del Jefe Medico

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Fecha

## ANEXO 3



GOBIERNO DE CHILE  
Servicio de Salud Metropolitano Oriente  
Comité de Ética Científico

### PROTOCOLO DE APROBACIÓN DE PROYECTOS CLÍNICOS

Con fecha 07 de Julio de 2009, el CEC del S.S.M. Oriente analizó y aprobó el Proyecto de Tesis, titulado:

"Evaluación de biomarcadores plaquetarios en la Enfermedad de Alzheimer", para optar al Título de Doctor en Ciencias Médicas de la Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Escuela de Post Grado, Programa de Grados Académicos;

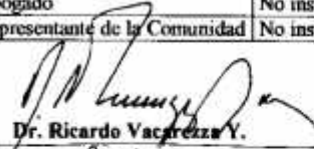
y que conducirá el Dr. Gonzalo Farias en el Servicio de Neurología del Hospital del Salvador, ubicado en Av. Salvador 364.

Se analizó y aprobó los siguientes documentos del Protocolo:

- Proyecto de Tesis in extenso;
- Consentimiento Informado, fechado, firmado y timbrado por el CEC del S.S.M. Oriente el 07 de Julio de 2009;
- Acta de Aprobación Proyecto de Investigación Seres Humanos del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, ;

Envío la nómina de los miembros permanentes del CEC del S.S.M. Oriente que participaron del análisis y aprobación del Protocolo antes señalado:

Dr. Gustavo Díaz Pérez	Neurocirujano	Inst. Nac. de Neurocirugía
Dra. María Esther Meroni	Geriatra	Inst. Nac. de Geriatria
Dr. Manuel Sedano Lorca	Gineco-Obstetra	Hospital Dr. Luis Tisné
Dr. Jorge Plasser Troncoso	Cirujano- Oncólogo	Hospital del Salvador
Dr. Luis Soto Román	Utiólogo	Inst. Nacional del Tórax
Dr. Andrés Stuardo Luengo	Neurólogo- Presidente	Hospital del Salvador
Dr. Ricardo Vacarezza Yávar	Hematólogo- Secretario	Hospital del Salvador
Dra. Liliana Vicherat Mauro	Inmunóloga	Inst. Nac. del Tórax
Sra. Elena Núñez Migone	Enfermera- Coordinadora	S.S.M.O
Sra. Angélica Sotomayor	Abogado	No institucional
Sr. Hugo Gutiérrez Guerra	Representante de la Comunidad	No institucional

  
Dr. Ricardo Vacarezza Y.  
Secretario

Santiago, 07 de Julio de 2009



### CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### ***Proyecto: "Evaluación de biomarcadores plaquetarios en la Enfermedad de Alzheimer"***

Le invitamos a participar en el proyecto de investigación "Evaluación de biomarcadores plaquetarios en la Enfermedad de Alzheimer" llevado a cabo por la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y la Unidad de Neurociencias Cognitivas del Centro Internacional de Biomedicina (ICC), para ayudar al diagnóstico temprano de la enfermedad de Alzheimer.

Le solicitamos aportar una muestra de sangre venosa de aproximadamente 5 cc (una cucharada) sobre la base de su consentimiento. Usted puede sentir algunas molestias localizadas, dolor o mareos cuando se extraiga sangre de una vena en su brazo, y en algunos casos usted podría llegar a tener un moretón. Hay una pequeña posibilidad de que usted pudiese adquirir una infección.

Usted además entrega su consentimiento para participar en evaluaciones psicológicas necesarias para el presente estudio.

Usted no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio. Por otra parte, usted o su sistema previsional deberán financiar las hospitalizaciones, honorarios, exámenes y tratamientos habituales para el estudio y tratamiento de su enfermedad.

Toda información derivada de su participación será mantenida en estricta confidencialidad. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de su enfermedad.





Esta investigación está amparada bajo la aprobación de los Comités de Etica respectivos.  
Si Ud. requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede llamar a:

Dr. Gonzalo Farias, (02) 9787228

**Conclusión:**

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto "Evaluación de biomarcadores plaquetarios en la Enfermedad de Alzheimer".

\_\_\_\_\_  
Nombre del paciente

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre del representante  
legal del paciente

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Fecha

Dr. GONZALO FARIAS  
Nombre del Jefe Medico

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Fecha

