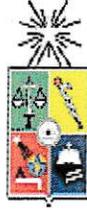


UCH-FC  
Biotecnología  
t. 172  
C01



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

## **“Evaluación de biomarcadores periféricos en el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

**José Pablo Tapia Calabrese**

Director del Seminario de Título:  
Dr. Gonzalo Farías Gontupil

Patrocinante:  
Dr. Ricardo Benjamín Maccioni



Septiembre 2016  
Santiago - Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. José Pablo Tapia.

**“Evaluación de biomarcadores periféricos en el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Gonzalo Farías Gontupil  
Director Seminario de Título:

Dr. Ricardo Maccioni  
Patrocinante

### Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Marco T. Nuñez  
Presidente Comisión:

Dr. Alejandro Roth  
Evaluador:

Santiago de Chile 2016

## BIOGRAFIA



Nacido el 13 de abril de 1990, en la ciudad de Santiago, hijo de Juan Carlos Tapia y Gisela Calabrese. Mi educación comenzó en el Colegio Lo Castillo, donde gracias a sus profesores encontré mi interés por las ciencias biológicas y finalmente me graduaría en Cuarto Medio.

Esto me llevaría a ingresar al Programa Académico de Bachillerato de la Universidad de Chile, en ahí descubrí las distintas ramas de investigación científicas, donde encontré a la carrera de Ing. En Biotecnología Molecular lejos la más interesante.

En el transcurso de esta carrera participé dentro de laboratorios de investigación básica como el de Neurofarmacología y conducta del Dr. Patricio Iturriaga. Sin embargo, con el tiempo descubrí mi interés por el enfoque de las ciencias aplicadas y las innovaciones científicas. Así di con el laboratorio del Dr. Ricardo Maccioni, en donde comencé a trabajar el año 2015 en mi seminario de título a cargo del Dr. Gonzalo Farías, enfocado en aplicaciones biomédicas.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero agradezco a mis padres y toda mi familia, por siempre apoyarme, guiarme en mis decisiones y estresarme cuando era necesario, deseando siempre lo mejor para mí.

A todos mis amigos del colegio, Salinas, Tito, Gonzalo y de Bachillerato, Pame, Ernesto, Yassef, Gabriel, Claudio y Álvaro, por tantas aventuras y litros compartidos juntos. Y a todos aquellos que participaron en algún momento en mi vida, por aportar a lo que soy ahora.

Gracias a mis compañeros del laboratorio, Ine, Nico y especialmente al Leo por su infinita paciencia, sabiduría y generosidad a su padawan, desde el primer día que llegué hasta hoy. También al Dr. Maccioni y todo el equipo del ICC, Coni, Romi y Victor.

A mi profesor guía Dr. Gonzalo Farías, por su constante apoyo y haber confiado siempre en mí para sacar adelante esta Tesis.

## ÍNDICE

BIOGRAFIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE.....	v
INDICE FIGURAS.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIONES.....	33
REFERENCIAS.....	35

## ÍNDICE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Razón de distintas isoformas de Tau plaquetaria en los distintos grupos.....	20
<b>Figura 2.</b> Razón de las isoformas 130/110 de APP en plaquetas.. .....	21
<b>Figura 3.</b> Concentraciones de alfa-sinucleína en saliva para los distintos grupos. ....	23
<b>Figura 4.</b> Determinación de la concentración de $\alpha$ -sinucleína para los distintos grupos .....	23
<b>Figura 5.</b> Correlación entre la prueba del olfato y las razones de Tau.....	24
<b>Figura 6.</b> Perfiles de migración de proteínas plaquetarias mediante 2D SDS-PAGE.....	25
<b>Figura 7.</b> Comparación de perfiles mediante representación 3D. ....	25

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resumen de población de estudio.....	26
--	----

## ABREVIATURAS

APP	:	La Proteína precursora amiloidea
A $\beta$	:	Péptido beta amiloide
BSA	:	Albumina de suero bovino
DCL	:	Demencia por cuerpos de Lewy
DNA	:	Ácido desoxirribonucleico
EA	:	Enfermedad de Alzheimer
EH	:	enfermedad de Huntington
ELISA	:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EP	:	Enfermedad de Parkinson
FAB	:	Batería de evaluación frontal
FCSR-IR	:	Prueba de memoria libre y selectiva con recuerdo inmediato
LCR	:	Líquido cefalorraquídeo
MRI	:	Imagen por resonancia magnética
mRNA	:	RNA mensajero
NFT	:	Ovillos neurofibrilares (neurofibrillary tangles,)
PHF	:	Filamentos helicoidales pareados (paired helical filaments,)
PMD	:	Mal plegamiento Proteico (protein misfolding diseases)
RNA	:	ácido ribonucleico
ROC	:	Característica Operativa del Receptor
SDS PAGE	:	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SPECT	:	Tomografía computarizada de emisión monofotónica
TMT	:	Trail making test
UPDRS	:	Escala unificada para la evaluación de la Enfermedad de Parkinson

WB : Western Blot  
WCST : Clasificación de cartas de Wisconsin  
 $\alpha$ -syn :  $\alpha$ -sinucleína

## RESUMEN

En los últimos años gracias a los avances en tecnologías y sus aplicaciones biomédicas la esperanza de vida ha aumentado significativamente, esto ha llevado por un lado a un aumento de la población más senescente, y por tanto una mayor predominancia de las enfermedades asociadas a la edad. En este contexto las enfermedades neurodegenerativas son una de las más prevalentes en este grupo etario, particularmente las llamadas enfermedades por mal plegamiento proteico (PMD), siendo la enfermedad de Alzheimer (EA) y Parkinson (EP) de las más comunes. Sin embargo, las distintas PMDs comparten muchas de sus características clínicas y bioquímicas, lo que dificulta el diagnóstico diferencial entre ellas. Entre las principales proteínas asociadas a esta clase de enfermedad se encuentra Tau, APP y  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -syn), las que generan agregados proteicos intra o extracelulares asociados a la enfermedad. Previamente se han realizado estudios de estas proteínas en fluidos como cefalorraquídeo (LCR) o por imagenología, pero han mostrado ser altamente invasivos o costosos. Para hacer frente a este problema, este estudio evaluó la migración proteica y concentración de estas principales proteínas en pacientes con la EP, sujetos controles y algunos pacientes con demencia por cuerpos de Lewy (DCL) en plaquetas, plasma y saliva, con el objetivo de poder identificar diferencias significativas que permitieran establecerlas como biomarcadores de la enfermedad. Así, se evaluó mediante Western Blot (WB) los patrones de migración en plaquetas. Para Tau se encontró una prevalencia de sus formas monoméricas en pacientes con DCL, diferenciándola de los otros grupos controles y EP, para APP se encontró la una menor

proporción 130/110 kDa de las isoformas en los grupos EP con respecto a los controles (ROC: 0,81, sensibilidad 71,0% y especificidad 80,0%). Para los estudios de WB y ELISA en saliva de  $\alpha$ -syn no se pudieron obtener concentraciones óptimas para su detección, pero en plasma se obtuvieron medidas significativas mediante ELISA, donde se encontró una mayor concentración en pacientes con EP (ROC: 0,77, sensibilidad 67,7% y especificidad de 66,7%). Posteriormente se evaluó una correlación entre estos resultados bioquímicos y una batería de pruebas neuropsicológicas por si eran indicadores de la progresión o estado de la enfermedad, pero no se encontró una correlación significativa, sólo una tendencia negativa entre el test olfatorio y las proporciones de Tau. Finalmente se realizó un análisis proteómico mediante 2D SDS PAGE, en donde se encontró una señal alrededor de los 120 kDa en pacientes con EP diferente a grupos controles, que con posteriores análisis por espectrometría de masas podría llevar a la identidad proteica de esta señal como indicador de la EP. Como conclusión las diferencias obtenidas entre grupos controles y de EP mostraron la potencialidad del uso de fluidos periféricos para el diagnóstico diferencial de estas enfermedades, y su uso como biomarcadores.

## INTRODUCCIÓN

El envejecimiento de la población es uno de los cambios demográficos más asociados con el estado de desarrollo de un país y, si bien, ha sido en gran parte debido a los avances en ciencia, tecnología y medicina, también ha llevado a una serie de nuevos desafíos como el manejo de las enfermedades crónicas (Eldemire-Shearer, Mitchell-Fearon et al. 2014). Actualmente existe un incremento importante de la población sobre los 65 años de edad, en los que 8 de cada 10 están afectados por una o más enfermedades crónicas (Dexter, Miller et al. 2010). Las enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad son de las más comunes y costosas para la sociedad con unas 20 millones de personas afectadas a nivel mundial, sólo para la enfermedad de Alzheimer (EA) su tasa de incidencia es del 1% anual para personas sobre los 65 años de edad en Estados Unidos, siendo la enfermedad neurodegenerativa más común, le sigue la enfermedad de Parkinson (EP) con una tasa anual de incidencia de 0,6%, (Mayeux 2003 y de Rijk, Launer et al. 2000).

Las enfermedades neurodegenerativas como de EA, EP y DCL entre otras, tienen como característica en común el que todas ellas presentan agregados proteicos, resultado de un mal plegamiento de alguna forma de proteína neuronal (Farías GA 2015). Por lo anterior han sido llamadas enfermedades por mal plegamiento proteico (Protein miss-folding diseases, PMD), dentro de estas, las principales 3 proteínas involucradas en la patología para estas enfermedades son la proteína asociada a microtúbulos Tau, la proteína precursora amiloidea (APP) y  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -syn) proteína neuronal presináptica y elemento principal de los cuerpos de Lewy.

### **Proteínas involucradas en enfermedades neurodegenerativas:**

$\alpha$ -sinucleína: La EP se caracteriza por ser una enfermedad que afecta a las neuronas dopaminérgicas de la zona *pars compacta* en el cerebro de forma irreversible y progresiva, mostrando alteraciones en el movimiento como temblor en reposo, bradicinesia y rigidez muscular en estados más avanzados de la enfermedad (Nussbaum and Ellis 2003). Como una PMD, en EP se forman agregados proteicos intracelulares en estas neuronas, llamados cuerpos de Lewy, en los que  $\alpha$ -syn es el principal componente.  $\alpha$ -syn forma parte de una familia de 3 proteínas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) y si bien, su función específica aún no es clara, se ha visto que interactúa con otras proteínas en forma de chaperona auxiliar y asociándose a la membrana de vesículas presinápticas (Irvine, El-Agnaf et al. 2008). En EP cumple un rol patológico,  $\alpha$ -syn cambia su conformación por factores como mutaciones, fosforilación, exposición a iones que en particular podrían verse más potenciados debido al ambiente oxidativo de las neuronas dopaminérgicas, ya que la dopamina es una molécula relativamente inestable, regulada por metabolismo oxidativo la cual pasa por un proceso de auto-oxidación formando radicales libres (Dias, Junn et al. 2013). Esto conlleva a la formación de oligómeros de  $\alpha$ -syn que generan finalmente a estos depósitos fibrilares (Irvine, El-Agnaf et al. 2008) .

Tau: Fue la primera proteína en ser relacionada con la EA en 1975 por Weingarten et al. (Weingarten, Lockwood et al. 1975). Forma parte de una familia de proteínas neuronales, presenta funciones principalmente de regulación en la estabilidad de microtúbulos las que están condicionadas por su estado de fosforilación, característica muy importante considerando que casi el 20% de esta proteína es fosforilable por gran número de residuos

de Serina y Treonina (Stoothoff and Johnson 2005) siendo regulado por diferentes proteínas quinasas y fosfatasas, como proteína fosfatasa 1 (PP1), PP2A, PP2B, las que se han estudiado como podrían estar involucradas en la patogenicidad. Se ha evidenciado, por ejemplo, que existe una menor actividad de PP2A en cerebros de personas con EA, la que podría estar favoreciendo la hiperfosforilación de Tau (Tian and Wang 2002). Por lo que el estado de fosforilación de Tau es fundamental. Así, cuando Tau pasa a estar hiperfosforilada está en un estado patogénico, se han encontrado evidencias que muestran cómo se vuelve menos eficiente en regular la unión de microtúbulos y también una alta concentración de esta proteína en este estado en cerebros y líquido cefalorraquídeo (Hu, He et al. 2002). Tau fue considerada la principal proteína en la EA, su estado hiperfosforilado forman filamentos helicoidales pareados (paired helical filaments, PHF) los que finalmente generan los ovillos neurofibrilares (neurofibrillary tangles, NFTs) intracelulares.

A $\beta$ : Las inclusiones de Tau fueron signo patológico más significativo de la enfermedad, hasta el descubrimiento del péptido beta amiloide (A $\beta$ ) en la formación de placas seniles extracelulares, llegando a ser uno de los principales blancos para los estudios de PMD (Glennner and Wong 1984). A $\beta$  es producto del clivaje de la proteína precursora del péptido  $\beta$  amiloide (amyloid precursor protein, APP). APP es una proteína de transmembrana con una larga porción N-terminal extracelular, esta puede estar sujeta a clivajes por distintas secretasas, existe la vía de la  $\alpha$ -secretasa o no amiloidogénica en que el producto evita la formación de péptidos A $\beta$ , ya que, corta en medio del dominio A $\beta$  resultando en otro péptido p3 de menor tamaño (Bohm, Chen et al. 2015). La otra

existente es la vía de la  $\beta$ -secretasa, la cual es menos abundante, pero resulta en la formación de péptidos beta amiloide y su posterior corte  $\gamma$ -secretasa resultando en la liberación de péptidos de distintos tamaños por su región C-terminal, los más relevantes son  $A\beta(1-40)$  y  $A\beta(1-42)$ , así en las PMD estos monómeros se asocian entre ellos formando oligómeros cada vez más grandes, resultando en placas amiloides (Hampel and Blennow 2004).

Otras proteínas asociadas a enfermedades neurodegenerativas. En la enfermedad de Huntington (EH) existe una proteína Huntingtina mutada (mHTT), la cual tiene una extensión por repetidos CAG en la secuencia codificante, lo que se traduce en extensiones de poliglutamina (poliQ) en la región N-terminal, resultando en una conformación propensa a la agregación. La proteína mHTT es una proteína intracelular que se caracteriza por generar agregados que tienen una tasa muy lenta de agregación y liberación extracelular, por lo que dificulta mucho su cuantificación (Byrne and Wild 2016), sólo recientemente mediante inmuno ensayos de conteo de moléculas individuales se han detectado a escalas femtomolares de sensibilidad (Wild, Boggio et al. 2015). Existe también otra familia de enfermedades por mal plegamiento proteico, las TDP-43 proteinopatías, estas incluyen la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la degeneración lobar frontotemporal (DLFT) (Tan, Kril *et al.* 2015). TDP-43 es una proteína transactivadora de unión a DNA, que se diferencia por generar agregados no del tipo amiloide, pero si presenta características comunes de proteinopatías como hiperfosforilaciones y ubiquitinaciones (Kwong, Uryu et al. 2008). Estas otras proteínas, si bien, han sido bien caracterizadas, son pocos los estudios relacionados a sus potenciales

como Biomarcadores y comparten una relación muy acotada a sus enfermedades para extenderse a este estudio.

### **Biomarcadores**

Uno de los principales desafíos de las enfermedades neurodegenerativas es el poder establecer diagnóstico clínico que sea temprano y específico. Esto es debido a que por un lado cerca del 90% de la aparición de estos casos son esporádicos (Mayeux 2003), y también por otro lado existe una sobreposición de características clínicas entre las distintas PMD como EA y los distintos Parkinsonismos, por ejemplo los casos de demencia por cuerpos de Lewy que además de presentar estos cuerpos de  $\alpha$ -syn pueden presentar ovillos neurofibrilares (NFT), o los casos de EP con demencia que incluyen también la presencia de NFT (Jellinger 2011). Así se han realizado numerosos estudios para determinar Biomarcadores que permitan identificar y discriminar tempranamente entre estas enfermedades, sobretodo en enfermedades como EP, donde los síntomas clínicos son detectados cuando ya ha ocurrido una degeneración importante de las neuronas dopaminérgicas (Mollenhauer and Zhang 2012).

Los Biomarcadores corresponden a características biológicas objetivas y medibles como indicadores de la presencia, progresión y respuesta de una enfermedad (Farías GA 2015). De manera más general los Biomarcadores pueden ser clasificados en moleculares, que corresponden a todos aspectos genéticos como mutaciones, expresión genética, proteínas, péptidos, metabolitos, y por otra parte están los biomarcadores por imagenología, en que se utilizan herramientas de resonancia magnética (MRI), tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT), para generar imágenes que den cuenta de signos de

progresión de la enfermedad (Sharma, Moon et al. 2013), una de las más utilizadas son los radiofármacos (radiotracer neuroimaging, RTI) utilizando la tomografía por emisión de positrones con  $^{18}\text{F}$ -fluorodopa, permitiendo generar neuroimagenes del sistema nigroestriatal, estos avances han permitido el diagnóstico de EP antes de los síntomas motores y la distinción de otras enfermedades como la EA, sin embargo esta técnica es altamente costosa, no ampliamente disponible (Clark, Xie et al. 2003).

Por otro lado, los biomarcadores moleculares han sido los más estudiados para generar un diagnóstico de manera más simple y económica en EP. Existen varios Biomarcadores genéticos que dan cuenta en mayor o menor medida la tendencia a generar la enfermedad, hay genes autosomales dominantes como PARK1, PARK4, mutaciones en gen  $\alpha$ -syn y autosomales recesivas como PARK2, PARK6, PINK1, que en total forman parte de alrededor de 13 locis y 9 genes en total. Sin embargo, todas estas no dan cuenta más del 5% de los casos y aun así existe un factor dependiente de los cambios fisiológicos y ambientales expuestos al individuo (Sharma, Moon et al. 2013). Pese a que estas mutaciones en la parte codificante del DNA no han sido los mejores candidatos como biomarcador, existe otra parte no codificante pero regulatoria que se ha estudiado con tal fin, los microRNA. Estos son fragmentos cortos de 22nt de RNA aproximadamente, que cumplen funciones regulatorias uniéndose a otros fragmentos de mRNA destinándolos a clivaje o represión (Bartel 2004), por lo que son un factor decisivo en el producto de muchas proteínas. En esta categoría, estudios de microRNA realizados en sangre a pacientes con EP mostraron importantes diferencias en relación a grupos controles, detectando los niveles de expresión de miR-1, miR-22\* y miR-29, además utilizando otra

batería de microRNAs (miR-16-2\*, miR26a2, miR30a) se logró diferenciar entre pacientes con y sin tratamiento (Margis, Margis et al. 2011). Este estudio remarca 2 aspectos importantes de Biomarcadores, primero logrando identificar la presencia y tratamiento de la enfermedad, y por otro lado la eficacia de utilizar fluidos biológicos periféricos para el estudio, siendo rápida y no invasiva.

Esto es particularmente importante, ya que, existe previamente toda una gama de estudios de Biomarcadores moleculares midiendo niveles de proteínas patogénicas en LCR. Este es un fluido biológico que está en constante contacto con el sistema nervioso central, generando un intercambio de moléculas significativo (Guzman-Martinez, Farias et al. 2012). Fue en la EA donde se realizaron los primeros estudios de esta clase para Biomarcadores, donde se midieron los niveles de Tau y A $\beta$  en este medio para evaluar su capacidad para discriminar entre controles y otras enfermedades neurodegenerativas, de esto se destacó la prevaecía concentraciones más elevadas de Tau en grupos de EA, diferenciándola de grupos controles con un 85% de sensibilidad y 84% de especificidad, en cambio, A $\beta$  en LCR se encontró en concentraciones menores para los grupos de la EA distinguiéndolo de los grupos controles, pero en menor medida que Tau (Clark, Xie et al. 2003). Estos estudios generaron un precedente importante para los Biomarcadores posteriores, en los que se extendería para otras enfermedades neurodegenerativas, como en la EP donde se aplicó el mismo tipo de estudio, encontrando que los niveles de proteína Tau y A $\beta$ 42 también tendrían un aumento y disminución de los niveles respectivamente, más aún de subgrupos de la enfermedad en estado temprano, con alto temblor avanzado y sin temblor, los niveles de Tau y A $\beta$ 42 se ven alterados logrando diferenciarse entre ellos

(Prikrylova Vranova, Mares et al. 2012). En otro estudio también se evaluó los niveles de Tau y A $\beta$ 42 bajo condiciones similares para estudiar el nivel de deterioro cognitivo en EP, el cual es relativamente común, así determinaron una correlación entre la disminución de A $\beta$ 42 con un aumento del deterioro cognitivo, siendo una herramienta predictiva para su progresión (Siderowf, Xie et al. 2010). Mientras los estudios de  $\alpha$ -syn en LCR han mostrado una baja concentración en grupos de sinucleopatías como EP y DCL con respecto a grupos controles y de EA, logrando un 70% de sensibilidad, pero sólo un 52% para el diagnóstico de EP (Mollenhauer, Locascio et al. 2011), esto tiene una gran importancia considerando de que DCL es una PMD que presenta una condición relativamente intermedia entre EA y EP, por lo que es una posible herramienta para establecer un diagnóstico diferencial importante entre estas enfermedades.

Así el LCR ha demostrado ser una fuente de estudio para Biomarcadores muy importante y confiable, y no sólo para la EP, sino también para otras como EA donde, a diferencia de EP, se han encontrado aumento en los niveles de la proteína Tau con respecto a grupos controles (Maccioni, Lavados et al. 2006). Sin embargo es un procedimiento de toma de muestra involucra una punción lumbar, lo que es altamente invasivo y no considerable como un examen que pudiese ser de rutina. Es por esto que se han realizado proyecciones de estos estudios de Biomarcadores en LCR en una gama de fluidos periféricos más accesibles como sangre (plasma y plaquetas), saliva u orina. Para el caso de APP, esta es una proteína principalmente del sistema nervioso central, pero que también se expresan variantes por splicing alternativo varios tejidos, como células musculares, epiteliales y también en fuentes como plaquetas (Borroni, Agosti et al. 2010). Así fue como se

encontró una razón alterada de las distintas isoformas 130/110 kDa en plaqueta pueden dar cuenta de la enfermedad en EA en relación a grupos controles, alcanzando una sensibilidad de 88,2% y especificidad del 89,4% (Padovani, Pastorino et al. 2001), mostrando por un lado así su eficacia y potencialidad como biomarcador y por otro lado mostrando como el metabolismo de APP en el sistema nervioso podría estar relacionada con los péptidos amiloides periféricos (Roher, Esh et al. 2009).

Más aun, en el caso de  $\alpha$ -syn y DJ-1 para EP los primeros estudios realizados en LCR, mostraron una baja concentración para ambas proteínas y con un 90% de sensibilidad y 70% especificidad (Hong, Shi et al. 2010), decidieron expandir el estudio de estas proteínas a un fluido periférico, escogieron saliva como su objetivo. Principalmente motivados por el modelo inicial del tipo prion, propuesto por Braak, Del Tredici et al. 2003 , donde se plantea la progresión regional de la EP en el cerebro. Este modelo da cuenta básicamente de como la enfermedad comienza en centros del cerebro que no son dopaminérgicos, en el núcleo motor dorsal del nervio vago en el tronco encefálico inferior, o también en estructuras olfativas. Las alteraciones patogénicas de las proteínas después progresan de manera rostral, afectando a múltiples estructuras como el tubérculo olfatorio, locus coeruleus, hipotálamo, etc., dando lugar a alteraciones premotoras como hiposmia que se evalúa mediante test de olfato y trastorno conductual del sueño REM. Finalmente se termina afectando a la sustancia negra, lo que da lugar a la aparición de síntomas motores de la enfermedad. Posteriormente debido a hallazgos de cuerpos de Lewy afectando al sistema nervioso entérico, se planteó una nueva hipótesis en que esta lesión estaría empezando en esta zona antes que en el sistema nervioso central, y por tanto

la patología progresaría de forma ascendente hasta el tronco encefálico (Braak, de Vos et al. 2006). Así con esta hipótesis, evaluaron como progresaría a la glándula submandibular, la que está ligada al sistema nervioso central e involucrada en etapas tempranas, siendo efectora de la sialorrea típica de la EP y presentando alta presencia de  $\alpha$ -syn (Beach, Adler et al. 2010) y como esta glándula produce cerca del 70% de la saliva, este último fluido sería una buena fuente de biomarcadores de EP. Sin embargo, los resultados no fueron los óptimos, ya que, no se alcanzaron diferencias significativas pero si claras tendencias de que hay un aumento de DJ-1 y disminución de  $\alpha$ -syn, y así como una tendencia negativa de la concentración de  $\alpha$ -syn con respecto a los síntomas motores (Devic, Hwang et al. 2011). Este estudio mostró por un lado la accesibilidad de este medio periférico para muestras como biomarcadores, pero falló por un lado en la significancia, probablemente debido al bajo número de sujetos reclutados (24 con EP, 25 Controles) y que debieron hacer un pool de saliva para hacer el estudio y no muestras individuales.

Finalmente al igual que el estudio anterior, estudios iniciales de Maccioni 2006 et al de Tau y A $\beta$  en LCR en pacientes con EA y con leve deterioro cognitivo ya mostraban alteraciones comparado a grupos controles. Sumado a estudios de Maeda, Sahara et al. 2006, Berger, Roder et al. 2007 que muestran Western blot un patrón de bandas de formas oligoméricas de Tau sobre los 70 kDa hasta 170 kDa en muestras de extractos de cerebro. Llevarían a Neumann, Farias et al. 2011 a evaluar la presencia de estas formas de Tau en plaquetas, encontrando patrón Tau de peso molecular alto (HMWTau) >70 kDa, mediante Western Blot, que corresponderían a formas oligoméricas de Tau en pacientes



con la EA. Así, posteriormente Farias, Perez et al. 2012 evaluaron los variantes de alto peso molecular (HMW) y bajo peso molecular (LMW), que corresponderían a Tau monomérica, en grupos con la EA y controles para determinar su posible dependencia con la edad y su capacidad como biomarcador de la enfermedad, el resultado fue que la razón entre las variantes de alto y bajo peso molecular son independientes de la edad y logran un 75,7% de sensibilidad y 73,7% especificidad.

Con estos antecedentes, se decidió extender estos estudios previos de proteínas Tau, APP realizados principalmente para la enfermedad de Alzheimer hacia la enfermedad de Parkinson, e incluir los estudios de  $\alpha$ -syn en fluidos periféricos para evaluarlos como posibles candidatos a biomarcadores de la enfermedad. Por lo que se generó la siguiente

**Hipótesis:**

El patrón de migración electroforética de las proteínas Tau y APP en plaquetas, y las concentraciones  $\alpha$ -syn en plasma y saliva son distintos entre pacientes con la EP, DCL y grupos controles sanos.

## **Objetivos**

Para abordar estos desafíos actuales, se determinaron los siguientes objetivos:

- La determinación de los patrones de migración electroforética de proteínas plaquetarias para Tau y APP, en pacientes con EP, DCL y controles sanos.
- La determinación de los patrones de migración electroforética proteica y concentración de  $\alpha$ -syn en saliva y sangre en pacientes con EP, DCL y controles sanos.
- Determinar si los análisis de migración de Tau, App y a-syn permiten diferenciar entre los grupos

## **Objetivos Secundarios**

- Estudiar una posible correlación entre los patrones de migración proteica y las evaluaciones clínicas neuropsicológicas
- Realizar estudios en electroforesis de 2 dimensiones en geles de poliacrilamida para identificar posibles señales de proteínas plaquetarias que pudiesen ser indicadores de la enfermedad de Parkinson.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Pacientes*

Para este estudio se reclutaron 34 pacientes diagnosticados con la enfermedad de Parkinson, 7 pacientes con DCL y 30 sujetos controles en mismo rango etario y sin ninguna enfermedad neurológica.

Todos los voluntarios o sus respectivos representantes firmaron un consentimiento informado ante un comité de ética. Para los exámenes neuropsicológicos, motores y cognitivos, los participantes fueron evaluados por neurólogos y neuropsicólogos especializados. Estas pruebas incluyeron la escala unificada para la evaluación de la Enfermedad de Parkinson (UPDRS) subescalas UPDRS I, UPDRS II y UPDRS III, escala Hoen y Yahr, examen mini mental de Folstein, batería de evaluación frontal (FAB), test del dígito directo e inverso, Trail making test A(TMT) , Prueba de memoria libre y selectiva con recuerdo inmediato (FCSR-IR), Prueba de figura compleja Rey Osterrieth, Prueba de denominación de Boston, prueba fonémica y fluidez verbal semántica, pruebas de clasificación de cartas de Wisconsin (WCST) y la batería de pruebas de objetos visuales y de percepción (VOSP). Además se hicieron estudios clínicos de sonografía transcranial y test olfatorio.

### *Procesamiento de muestras de sangre*

Para el análisis de sangre se extrajeron 5 mL de sangre periférica de la vena antecubital en tubos con K<sub>2</sub>EDTA (BD Franklin Lakes NJ USA). Estas muestras fueron posteriormente centrifugadas a 200 × g por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido es el plasma enriquecido en plaquetas, el cual es recolectado y nuevamente centrifugado a 200 x g por 10 min, eliminando cualquier rastro de células rojas presentes. El plasma rico en plaquetas fue centrifugado a 1600 x g por 10 min a temperatura ambiente, logrando separar el plasma de las plaquetas. Este precipitado fue resuspendido en NH<sub>4</sub>Cl 0,83% a temperatura ambiente por 5 min y luego centrifugado a 1600 x g por 10 min a 4 °C. Posteriormente las plaquetas fueron lavadas en 2 veces buffer EGTA 1 mM (NaCl 1,4 mM, KCl 0,02 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,017 mM) y centrifugadas a 1600 x g por 10 min a 4 °C. El pellet fue lisado usando 100 µL de buffer de lisis RIPA (Tris-HCl 5,0 mM pH 7,5, NaCl 1,5mM, NP-40 10%, deoxycholate 10%, EDTA 20 mM pH 8,0, NaF 500 mM, SDS 1%) junto con un cóctel de inhibidor de proteasas. Finalmente el lisado fue centrifugado a 1600 x g por 10 min a 4 °C, obteniendo sólo el sobrenadante rico en proteínas. La concentración de proteínas fue posteriormente medida por método de Bradford (Biorad) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### *Procesamiento muestras de saliva*

A todos los participantes se les tomó una muestra de 5 mL, tras 30 minutos sin comer y con un previo lavado bucal con agua. Los sujetos salivaron de forma pasiva en un tubo

Falcon de 50 mL con Inhibidor de proteasas. La muestra primero se sometió a un breve vortex, después a una centrifugación de 2.600 x g por 15 min a 4 °C para eliminar cualquier contaminación inicial. Posteriormente el sobrenadante fue centrifugado a 15.000 x g por 15 min a 4 °C.

Las proteínas de las muestras fueron precipitadas con ácido tricloroacético al 20% (TCA), añadiendo un volumen a razón 1:1, posteriormente fueron sometidas a un vórtex e incubadas en hielo por 1 hora. A continuación fueron centrifugadas a 15.000 x g por 15 min a 4 °C, eliminando el sobrenadante y lavando 2 veces el pellet resultante con un volumen a razón de 1:4 de acetona pre-enfriado a -20 °C, y centrifugado a 15.000 x g por 10 min a 4 °C. Finalmente se eliminó el sobrenadante, se evaporó la acetona del pellet el cual fue resuspendido en buffer urea (urea 8 M, CHAPS 4%, DTT 50 mM, glicerol 10%, Tris 62,5 mM pH 6,8).

#### *Análisis Western blot*

Se utilizaron 50 µg de proteínas de muestra procesadas (saliva o sangre) resuspendidas en buffer de carga. Para muestras de sangre se realizó un SDS-PAGE al 10% a 120 V por 90 min, en cambio para muestras procedentes de saliva se realizó un SDS-PAGE de mayor concentración, al 15% a 120 V por 60 min por tratarse de una proteína más pequeña.

Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa por 90 min a 330 mA. Seguido, las membranas fueron bloqueadas con suero albumina bovina (BSA) al 5% por 1 hr a temperatura ambiente e incubada con uno de los anticuerpos

monoclonales primarios: Tau-5 para reconocer todas las isoformas fosforiladas o no de Tau (1:10.000 o 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 22C11 que reacciona con los aminoácidos 66 al 81 N-terminal de cualquier isoforma de  $\text{A}\beta$  (0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),  $\alpha$ -sinucleína LB509 (5,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y anticuerpo monoclonal anti  $\alpha$ -tubulina (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

Las membranas se revelaron mediante un kit ECL para Western Blot ((Pierce, Rockford, IL) y películas fotosensibles Amersham Hyperfilms ECL (GE Healthcare Ltd), detectando así las bandas inmunoreactivas. Finalmente las películas se escanearon y la intensidad de las bandas fueron cuantificadas mediante el software ImageJ (National Institutes of Health, USA).

#### *2D SDS-PAGE*

Primero las muestras fueron lavadas de todas las sales, iones, metabolitos y ácidos nucleicos que pudiesen contaminar la migración de las proteínas durante el Isoelectroenfoque, para esto las muestras se lavaron con un Clean up Kit (GE, Healthcare) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente fueron resuspendidas en buffer de Isoelectroenfoque (Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 2%, DTT 18 mM) con IPG Buffer de anfolitos pH3-10 no lineal al 1%.

Las proteínas de las muestras fueron incorporadas a tiras de 7 cm con rango pH3-10 no lineal mediante rehidratación pasiva durante al menos 16 hrs, posteriormente se realizó el isoelectroenfoque mediante el instrumento Ettan<sup>TM</sup> IPGphor<sup>TM</sup> 3 (GE Healthcare), aplicando 7000 Vh (Volt x hora) a 50  $\mu\text{A}$ .

Luego del isoelectroenfoque se incubó con un buffer de equilibrado (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 50 mM, urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2%) primero con DTT 16mM durante 10min y luego con buffer de equilibrado con Iodoacetamida 35 mM por otros 10 min. Finalmente la tira es cargada sobre un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones denaturantes con SDS a 25 mA/gel por 45 min y posteriormente 35 mA/gel por 2 hrs.

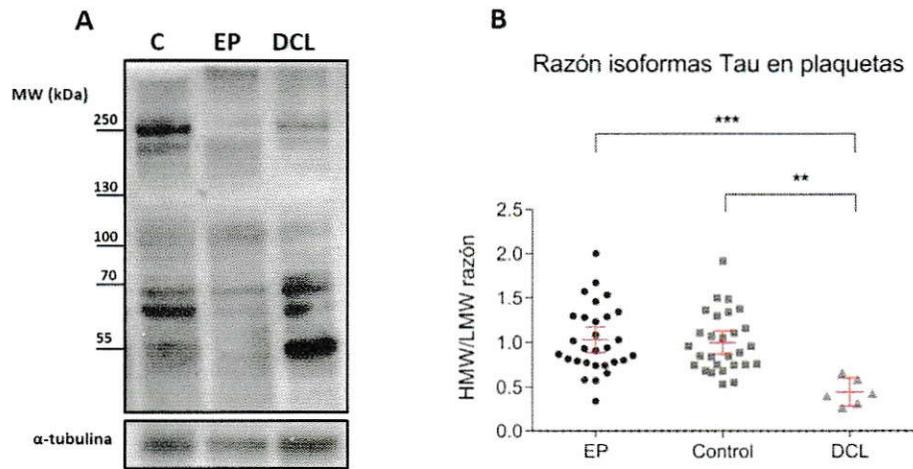
Para la detección de proteínas tras la electroforesis se realizó una tinción de plata descrito por (Chevallet, Luche et al. 2006). Primero una fijación con etanol 30% y ácido acético 10% al menos 18 hrs para adicionalmente eliminar anfolitos. Seguido la sensibilización con tiosulfato de sodio 0,8 mM por 1 min y lavado con agua ultra-pura. Para la tinción se sumergieron los geles nitrato de plata 12 mM por 30 min y lavado con agua ultra-pura por 15 segundos. Posteriormente el gel fue revelado en solución carbonato de potasio 3%, formaldehido 250 µL/Litro solución y 125 µL/Litro solución por 8min hasta la adición de la solución Stop, Tris 4% w/v y ác. Acético 2% v/v para detener la reacción.

#### *Análisis estadístico*

Los resultados de densitometría de proteína y resultados de ELISA fueron analizados por ANOVA de una vía y posteriormente por prueba de múltiples comparaciones de Tukey, para detectar diferencias significativas, en resultados realizados por triplicado. Los análisis de sensibilidad y especificidad se realizaron mediante curvas de característica operativa del receptor (ROC), utilizando sólo los grupos controles y EP, por ser los con mayor número de individuos, permitiendo obtener el mejor valor clasificatorio que discrimine entre ambos grupos con la mayor especificidad y sensibilidad posible.

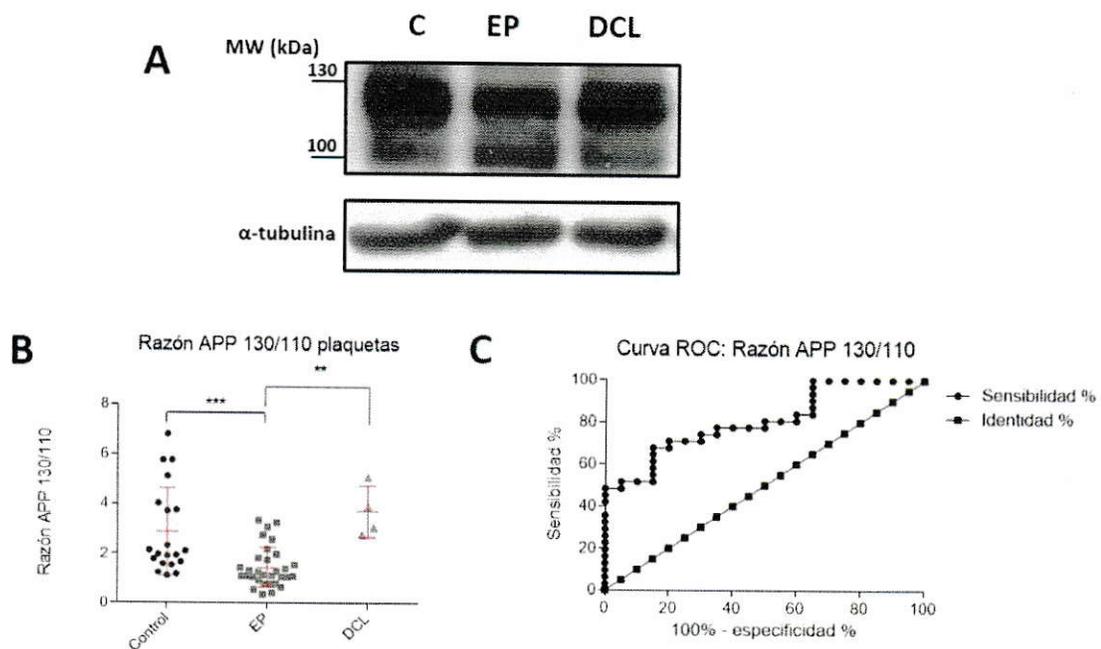
## RESULTADOS

Se compararon los patrones de migración de las proteínas Tau y APP en plaquetas para pacientes diagnosticados con la EP, DCL y un grupo control sin manifestaciones clínicas de alguna enfermedad neurodegenerativa. Los resultados obtenidos entre las isoformas de alto peso molecular de Tau (HMWtau, mayor a 70 kDa) y de bajo peso (LMWtau, menor a 70 kDa) (Fig. 1A) muestran que los pacientes con DCL tienen una mayor predominancia las formas de bajo peso molecular de Tau comparado con los otros grupos, resultando en una razón significativamente menor a los pacientes EP y grupos controles, pero no hay diferencias entre pacientes con EP y grupos controles (Fig. 1B).



**Figura 1. Razón de distintas isoformas de Tau plaquetaria en los distintos grupos.** A) Inmuno ensayo de western blot destacando las distintas isoformas de la proteína Tau a partir de lisado de plaquetas aisladas, de pacientes con enfermedad de Parkinson (EP), demencia de cuerpos de Lewy (DCL) y sujetos controles (C), en el eje de la abscisa se muestra el peso molecular de las bandas inmnoactivas (kDa) donde se pueden observar las bandas mayores a 70 kDa que corresponden a las de alto peso molecular y las menores a 70 kDa las de bajo peso, y utilizando  $\alpha$ -tubulina como control de carga. B) Razón de la densitometría (cuantificación de la densidad de las bandas) de las formas de alto/bajo peso molecular (HMW/LMW) en el eje y, entre los distintos grupos. Destacando el grupo de pacientes con DCL con una menor razón, con respecto a los demás grupos. Datos representativos del promedio de un triplicado. (\*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ )

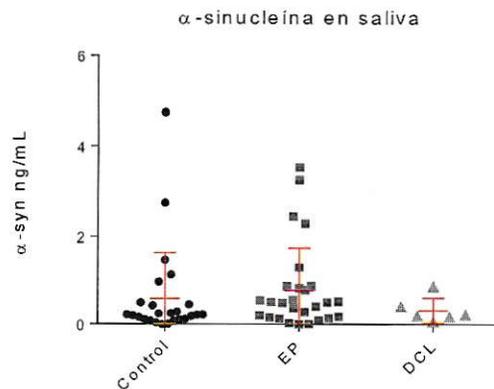
En los análisis de APP plaquetario se lograron detectar sus isoformas con distinto peso molecular para APP (Fig. 2A), encontrando que la razón entre estas isoformas 130/110 kDa de APP al medir la densitometría marcaron una diferencia entre los grupos de EP y controles, y entre los pacientes con DCL y EP (Fig. 2B). Además se realizó un análisis de característica operativa del receptor (ROC) entre grupos controles y de EP para obtener el mejor valor de la razón 130/110 APP que pudiese discriminar entre estos grupos con la mayor sensibilidad y especificidad posible, obteniendo un área bajo la curva de 0,81, una sensibilidad del 71,0% y especificidad del 80.0% con una razón de APP 130/110 <1,57 (Fig. 2C).



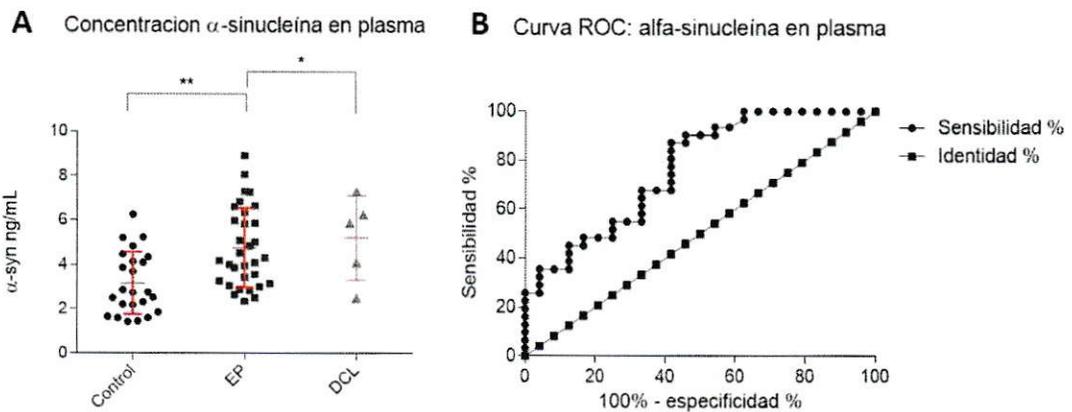
**Figura 2. Razón de las isoformas 130/110 de APP en plaquetas.** A) Inmuno ensayo representativo realizado a un lisado de plaquetas aisladas de los grupos control (C), de enfermedad de Parkinson (EP), demencia por cuerpos de

Lewy (DCL), detectando las isoformas de 130 y 110 kDa de APP y  $\alpha$ -tubulina utilizado como control de carga. B) Razón de la densitometría de las bandas inmunoreactivas para APP 130 y 100, para los distintos grupos en el eje y (\*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ ). Datos representativos del promedio de un triplicado. C) Curva ROC (característica operativa del receptor) representando la sensibilidad frente a la especificidad para obtener el mejor umbral de la razón de APP 130/110 para discriminar entre los grupos C y EP, siendo 1,57.

Las concentraciones de alfa-sinucleína en saliva para los distintos grupos resultaron ser demasiado bajas para determinar un patrón de migración por Western Blot, resultando no ser un método válido de análisis. Sin embargo, se analizaron las mismas muestras de saliva mediante un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) para detectar la concentración de alfa-sinucleína. Los resultados obtenidos muestran concentraciones muy bajas y ninguna diferencia significativa entre los grupos estudiados (Fig. 3). Adicionalmente, se analizaron las concentraciones de alfa-sinucleína en plasma sanguíneo, en las que si se logró encontrar una mayor concentración, detectando una mayor concentración en los pacientes con EP y DCL que permiten diferenciarse significativamente del grupo control (Fig. 4A). Posteriormente se realizó otro análisis por curva de ROC entre los grupos controles y de EP con área bajo la curva de 0,767, sensibilidad 67,7% y especificidad 66,7% utilizando 3.86ng/mL como concentración para discriminar entre los grupos (Fig. 4B).



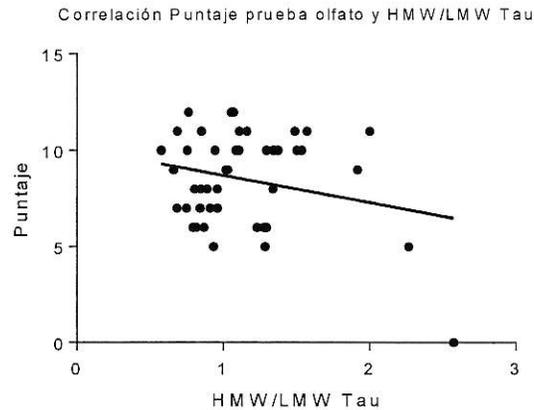
**Figura 3. Concentraciones de alfa-sinucleína en saliva para los distintos grupos.** Ensayo de ELISA para determinar la concentración (eje y) de  $\alpha$ -sinucleína en saliva de muestras de los grupos control, enfermedad de Parkinson (EP), demencia por cuerpos de Lewy (DCL).



**Figura 4. Determinación de la concentración de  $\alpha$ -sinucleína para los distintos grupos** A) Concentraciones plasmáticas (eje y) de alfa-sinucleína en los distintos grupos medidos mediante un kit ELISA (\*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ ). B) Curva ROC entre grupo control y EP, representado la sensibilidad frente la especificidad para obtener la concentración umbral que permita discriminar entre los grupos. Resultando 3.86ng/mL la concentración umbral para discriminar y obtener una sensibilidad 67,7% y especificidad 66,7%.

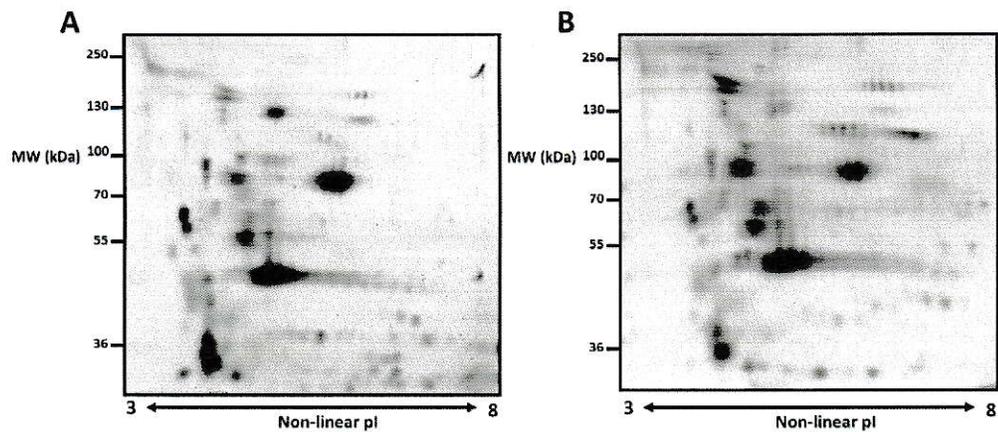
Se analizaron las distintas evaluaciones neuropsicológicas para los 3 grupos participantes del estudio (Tabla 1) con el fin de evaluar una correlación entre los patrones de migración para las distintas proteínas y el grado de deterioro cognitivo y motor. Sin embargo, no se encontraron evidencias de alguna correlación significativa para ninguna de las evaluaciones neuropsicológicas o exámenes clínicos, excepto sólo una baja tendencia

negativa entre la prueba del olfato y las razones de Tau (Pvalue 0,1005,  $R^2$ : 0,61) (Fig. 5).

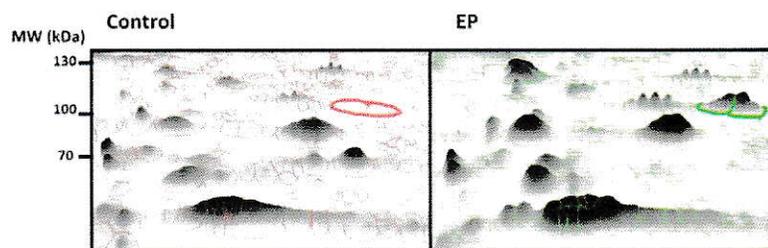


**Figura 5. Correlación entre la prueba del olfato y las razones de Tau.** Evaluación de una correlación de Pearson entre la razón de las isoformas de Tau (eje x) y el puntaje obtenido en la prueba olfatoria (eje y), incluye sujetos controles y con EP (P value 0,1005,  $R^2$ : 0,61).

Finalmente, se realizaron análisis de proteínas plaquetarias de pacientes con la EP y grupos controles mediante electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones denaturantes y separación por isoelectroenfoque (2D SDS-PAGE) en un gradiente no lineal de pH entre 3 y 8 (Fig. 6). Se detectaron algunas diferencias de señales en los geles, principalmente una señal entre los 130 y 110 kDa (Fig. 7), el cual fue consistente en los triplicados realizados.



**Figura 6. Perfiles de migración de proteínas plaquetarias mediante 2D SDS-PAGE.** Se utilizaron 50  $\mu\text{g}$  de proteínas plaquetarias de individuo Control (A) y paciente con enfermedad de Parkinson (B), en tiras de 7 cm con un rango 3 a 8 de distribución no lineal de pH, 7000 Vh (Volt x hora) y 50  $\mu\text{A}$  para el isoelectroenfoque. Posteriormente se realizó la migración electroforética en condiciones denaturantes con SDS a 25 mA/gel por 45 min y posteriormente 35 mA/gel por 2 hrs y revelado mediante tinción de plata. Representativos de 3 determinaciones.



**Figura 7. Comparación de perfiles mediante representación 3D.** Se utilizó software DECODON Delta2D® para obtener densitometría representada en 3 dimensiones de una región con un punto diferencial entre individuo control y sujeto con EP.

Tabla 1. Resumen de población de estudio. Características clínicas y demográficas de estudio.

	PD	DLB	Control	P value
<b>Promedio Características demográficas</b>				
Age	67,7 ± 12,4	74,6 ± 7,76	60,1 ± 10,7	0,117 <sup>a</sup>
Female (percentage)	12 (27,9%)	2 (28,6%)	22 (71%)	0,049 <sup>b</sup>
Education (Years)	11,1 ± 4,6	7,43 ± 4,4	14,5 ± 3,9	0,14 <sup>a</sup>
Cigarette packs per year	2,43 ± 8,17	7,13 ± 14,02	5,30 ± 9,47	0,374 <sup>a</sup>
Cups of coffee per day	0,86 ± 1,17	0,71 ± 0,95	1,24 ± 1,57	0,668 <sup>a</sup>
Alcohol consumption per week (glasses)	0,52 ± 1,29	0,57 ± 1,13	1,2 ± 2,87	0,676 <sup>a</sup>
<b>Promedio pruebas motoras</b>				
Hoehn & Yahr I	18,20%	0	41,20%	< 0,001 <sup>b</sup>
Hoehn & Yahr II	48,50%	33,30%	23,50%	< 0,001 <sup>b</sup>
Hoehn & Yahr III	30,30%	33,30%	5,88%	< 0,001 <sup>b</sup>
Hoehn & Yahr IV	3,03%	33,30%	29,40%	< 0,001 <sup>b</sup>
UPDRS I	2,44 ± 1,67	9,17 ± 1,95	0,59 ± 1,06	< 0,001 <sup>a</sup>
UPDRS II	9,32 ± 6,97	15,17 ± 6,87	0,04 ± 0,19	< 0,001 <sup>a</sup>
UPDRS III	24,41 ± 9,99	32,86 ± 8,56	3,39 ± 2,90	< 0,001 <sup>a</sup>
REM sleep behaviour disorder scale	3,27 ± 2,97	4,86 ± 2,90	2 ± 2,27	0,182 <sup>a</sup>
<b>Promedio pruebas neuropsicológicas</b>				
MMSE (Total Score)	26,97 ± 3,08	23,4 ± 5,9	28,6 ± 1,2	< 0,001 <sup>a</sup>
FAB	13,26 ± 3,08	11,6 ± 4,32	15,6 ± 1,9	< 0,001 <sup>a</sup>
Direct digit span	4,87 ± 1,01	4,2 ± 0,4	5,2 ± 0,8	0,324 <sup>a</sup>
Reverse Digit span	3,29 ± 0,92	2,6 ± 0,5	4,4 ± 1,3	0,005 <sup>a</sup>
Trail making test A (seconds)	67,03 ± 47,42	115 ± 75,1	40,9 ± 18,8	< 0,001 <sup>a</sup>
FCSR-IR (total recall)	42,16 ± 7,27	34,6 ± 10,0	46,0 ± 2,4	< 0,001 <sup>a</sup>
FCSR-IR (delayed recall)	14,26 ± 2,45	10,8 ± 5,9	15,6 ± 0,5	< 0,001 <sup>a</sup>
Rey Osterrieth figure (time in seconds)	27,31 ± 6,97	21,9 ± 9,8	62,9 ± 1,3	< 0,001 <sup>a</sup>
Rey Osterrieth Type of copy				0,002 <sup>b</sup>
Type I	16,13%	0%	41,20%	
Type II	19,35%	0%	23,50%	
Type III	22,58%	80%	5,88%	
Type IV	35,48%	20%	29,40%	
Type V	6,45%	0	0	
VOSP sub-item 1 (siluets)	17,45 ± 5,43	15,60 ± 5,16	19,38 ± 3,97	0,056 <sup>a</sup>
VOSP sub-item 2 (max score 10)	7,94 ± 2,02	7,00 ± 3,03	8,44 ± 2,00	0,486 <sup>a</sup>
Boston Naming Test (BNT)	25,06 ± 3,17	21,60 ± 5,04	28,18 ± 1,65	0,003 <sup>a</sup>
Wisconsin sorting card test (WCST)	3,03 ± 1,53	2,00 ± 1,79	5,06 ± 1,35	< 0,001 <sup>a</sup>
Category verbal fluency	16,03 ± 5,00	10,60 ± 4,88	19,71 ± 3,80	0,003 <sup>a</sup>
Phonological verbal fluency (FAS)	26,84 ± 13,40	14,60 ± 8,01	35,24 ± 9,53	0,001 <sup>a</sup>
Trail making test B (seconds)	215,86 ± 137,70	338,25 ± 155,98	109,76 ± 48,14	< 0,001 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P values calculados por *one way ANOVA*.

<sup>b</sup>P values calculado usando *Pearson chi cuadrado*

Modificado de: Fariás GA, Nuñez JC, Venegas P, Guzmán-Martínez L, Tapia JP, Martínez M, Soto A, Maccioni RB. Determination of peripheral levels of Tau, Amyloid Beta Precursor Protein and alpha synuclein in protein misfolding diseases. Submitted to Journal of Alzheimer's Disease 2016.

## DISCUSIÓN

Muchas de las enfermedades relacionadas con la edad son enfermedades relacionadas con PMD presentando síntomas como demencia y/o parkinsonismos, y han sido en gran parte uno de los grandes desafíos de la medicina moderna, tanto por los tratamientos y costos como por la dificultad del diagnósticos y seguimiento, sobre todo por la superposición de muchas de sus características patogénicas. La EP es una de las más comunes y es por esto que se han desarrollado estas tecnologías para proveer de métodos no invasivos y específicos para su detección.

En el caso de la Demencia por cuerpos de Lewy es al igual que EA y EP una enfermedad neurodegenerativa por una PMD. Esta se caracteriza por presentar cuerpos de Lewy en el sistema nervioso central, que están hechos principalmente de  $\alpha$ -syn, sin embargo también se observan la presencia de NFT e incluso depósitos amiloides (Mukaetova-Ladinska, Monteith et al. 2010). Eso hace de DLC uno de los diagnósticos diferenciales más difíciles, sobre todo con la EA, debido a las manifestaciones de demencia o deterioro cognitivo que comparten ambas. Según los resultados, los pacientes con DCL muestran una tendencia mayor a las formas de bajo peso molecular, a diferencia de en la EA donde se ven que predominan principalmente las formas de mayor peso molecular de Tau (>70 kDa) (Farias, Perez et al. 2012). En relación a la EP en los análisis de Tau plaquetaria, este grupo presentó una diferencia significativa en relación a los grupos Controles y de DCL, y si bien, es un número muy bajo de individuos para generar una curva de ROC y determinar su efectividad como biomarcador, muestra una clara tendencia para generar un diagnostico que separe las sinucleopatias de EP y DCL. Así, estas diferencias

bioquímicas podrían significar aplicaciones clínicas muy importantes para los diagnósticos, por lo que sería muy interesante seguir este estudio comparando entre los grupos de DCL y EA para determinarlo con mayor detalle.

El péptido A $\beta$  es el principal componente de las placas seniles, y presentes como distintas isoformas que han sido ampliamente estudiadas en la EA, estas isoformas no sólo están presentes en el sistema nervioso central, sino que también en son secretadas por líneas celulares periféricas (Selkoe, Podlisny et al. 1988). Previamente, Di Luca et al 1998, ya habría detectado diferencia en las proporciones de las isoformas 130/110 kDa de A $\beta$  en plaquetas en pacientes de la EA, obteniendo estos una menor proporción a los grupos controles, al igual que los estudios realizados posteriormente por Borroni et al 2010 como biomarcador y demostrando como estos niveles son independientes de la edad. En este caso las razones obtenidas por los pacientes con la EP, al igual que los mencionados, tendrían una menor razón de las isoformas 130/110 kDa que los grupos controles e incluso de los de DCL, logrando una buen índice de área bajo la curva de ROC (0,81), sensibilidad y especificidad. Esto estaría sugiriendo habría una alteración en el procesamiento de APP similar a la observada en EA. Al igual que en EA, existe la presencia de placas amiloides en casos de la EP. Se ha visto que se generan en el núcleo estriado, principalmente en los casos de la EP con demencia (Kalaitzakis, Graeber et al. 2008), lo que lo asemeja a los casos de EA. Sin embargo, en ambos casos aún no se conoce la relación existente entre esta alteración del procesamiento de APP en plaquetas y el cerebro. En estos resultados obtenidos, no se podría decir específicamente si existe una mayor liberación de la isoforma más pesada, o bien, que existe una mayor degradación de la forma de menor

tamaño, que provocaría esta diferencia entre grupos. Probablemente mediante técnicas de qPCR se podría obtener mejor información al respecto.

No se lograron obtener resultados significativos para la detección de  $\alpha$ -syn en saliva mediante Western Blot ni mediante ELISA principalmente debido a las bajas concentraciones de esta proteína por las proteasas presentes en este medio y la inmediatez necesaria de procesar las muestras. Devic et al 2011 lograron identificar y medir concentraciones de  $\alpha$ -syn en saliva, sin embargo para esto debieron utilizar pool de muestra de varios sujetos para lograrlo, por lo que no podría considerarse como un método válido para generar un biomarcador de la enfermedad y por tanto su aplicación biomédica estaría altamente limitada. Sin embargo, al medir las concentraciones de  $\alpha$ -syn en plasma si se encontraron diferencias importantes entre los grupos, los grupos con sinucleopatías obtuvieron las concentraciones más altas con un buen índice de área bajo la curva, sensibilidad y especificidad. Sin embargo, las mediciones de  $\alpha$ -syn en plasma y plaquetas han sido particularmente cuestionadas, ya que, existe mucha variedad de resultados de  $\alpha$ -syn en plasma y plaquetas, ahora esto es debido principalmente a las distintas metodologías y fuente de donde se hacen las mediciones. Existen estudios donde coinciden estos resultados, con una mayor concentración, y bajo misma metodología (Lee, Lee et al. 2006, Duran, Barrero et al. 2010), otros estudios han hecho la medición de sólo las formas oligoméricas de  $\alpha$ -syn en plasma, encontrando una mayor concentración en pacientes con EP (El-Agnaf, Salem et al. 2006) lo que lleva a la hipótesis si estas formas oligoméricas comienzan a formarse tras los inicios de la enfermedad cuando ocurren los daños en las neuronas de la sustancia nigra. Existen también estudios

que contradicen estos resultados, por ejemplo Li et al 2006 (Li, Mok et al. 2007) realizo similares mediciones de  $\alpha$ -syn en plasma en sujetos con la EP, obteniendo una menor concentración en estos sujetos respecto a los controles, sin embargo en su metodología no contempla la separación de plaquetas, en cambio, en la metodología empleada aquí contempló la separación de plaquetas y a una temperatura de ambiente para evitar su activación, esto es importante porque se ha demostrado como plaquetas contribuyen al pool de  $\alpha$ -syn en plasma (Shi, Zabetian et al. 2010). El rol de  $\alpha$ -syn en plasma es aún desconocido y a pesar de no tener la secuencia para ser dirigido al retículo endoplasmático (RE) y ser secretado se ha evidenciado la presencia extracelular de esta en cultivos neuronales, LCR y plasma, y se cree que es debido a su dominio anfipático que le otorga una fuerte unión a membranas, así permite la unión con la membrana del RE y la interacción con el complejo COPII de transporte de proteínas ER al aparato de Golgi y su posterior secreción (El-Agnaf, Salem et al. 2003). Es entonces la naturaleza de  $\alpha$ -syn y las distintas metodologías que han hecho cuestionar su validez como biomarcador de la enfermedad en plasma.

Los biomarcadores como herramientas de diagnóstico deben ser capaces de identificar la presencia de la enfermedad, pero además deben de dar cuenta de la progresión y respuesta de la enfermedad ante posibles tratamientos. Para esto se buscó una relación entre los resultados bioquímicos obtenidos y las distintas pruebas neuropsicologías y la edad de todos los grupos. En esta labor no se encontró una correlación significativa de Tau, A $\beta$  ni  $\alpha$ -syn para las pruebas como el índice de síntomas motores UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale). Respecto al test olfatorio, siendo de las pruebas más

validadas, sólo se encontró una tendencia a una correlación negativa entre proporción HMW/LMW Tau y test olfatorio, esto significa que a un mayor índice en la proporción de esta proteína tiende a un peor puntaje (una menor capacidad para identificar olores), esto se condice con los resultados obtenidos entre los grupos de EP y control, probablemente aumentando el número de individuos de la muestra ayudaría a concretar una posible correlación que sea significativa e indicadora de la progresión de la enfermedad. Por otro lado, al establecer la relación de estos marcadores con la edad de los participantes no se detectó una correlación, indicando al menos que no se tratan de marcadores relacionados ni influenciados con la edad de los pacientes, sino por su diagnóstico. Resultados similares obtuvo Vivacqua G 2016, donde las formas oligoméricas de  $\alpha$ -syn en plasma no son influenciados con la edad y sólo una tendencia positiva con la prueba UPDRS. Para AB Padovani 2001, logró establecer una correlación significativa de las razones de APP 130/110 y el examen Mini-Mental state y su independencia con la edad para la enfermedad de Alzheimer.

La utilización de un gel 2D DIGE para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas se ha utilizado desde ya varios años, y desde sus primeras aplicaciones ha permitido generar un enfoque proteómico de estas y otras enfermedades, comparado con otras técnicas como ELISA o Western Blot que no lo permiten (Wiederkehr, Ogilvie et al. 1985). Esta técnica ha evolucionado junto a las tecnologías de secuenciación por espectrometría de masas y bioinformática para generar Neuroproteomas, con objetivo de establecer perfiles proteicos asociados a enfermedades neurodegenerativas (Pienaar, Daniels et al. 2008). Así con este objetivo, se comparó un análisis por 2D DIGE de

proteínas plaquetarias en pacientes de EP y sujetos controles. El resultado fue la presencia en una señal de 120 kDa, aproximadamente, en muestras de EP. Un posterior análisis de intensidad de bandas (Fig. 7) mostraría una diferencia significativa de esta señal respecto a los grupos controles, logrando diferenciar a estos grupos. Por el peso molecular y el rango de pH en que se encuentra podría sugerir que es una diferencia de isoformas de APP, probablemente debido a las agregaciones. La utilización de secuenciación por espectrometría de masas sería el próximo análisis para obtener mayor información de esta señal. Alguna de las limitaciones de esta técnica de generar perfiles proteómicos como biomarcadores, es el largo procesamiento y cantidad de muestra que requiere para obtener este perfil, además de la alta cantidad y las grandes agrupaciones de señales dificulta el análisis para poder establecer los cambios en los niveles presentes de una proteína en particular con respecto a sus isoformas. Por lo que dificulta su práctica como alternativa a biomarcador. No obstante, su capacidad de separación junto a la secuenciación es un enfoque necesario, ya que, estudiar múltiples proteínas a la vez que pudiesen estar involucradas o alteradas en los distintos diagnósticos.

## CONCLUSIONES

Se lograron determinar los patrones de migración plaquetaria de APP, logrando su objetivo de diferenciar entre controles y sujetos con EP. No así para los patrones de migración para las formas de Tau, donde sólo se encontró diferencias significativas en pacientes con DCL. No obstante, estos últimos resultados dan cuenta de un posible marcador entre pacientes DCL y EA, que sería importante de estudiar para su aplicación biomédica.

Para los estudios de  $\alpha$ -sinucleína en saliva no se encontraron concentraciones ni migraciones adecuadas que pudiesen servir para establecer diferencias entre grupos controles y de EP, descartándolo de esta manera como fluido periférico para biomarcador. En cambio, interesantemente si se encontraron diferencias en las concentraciones de  $\alpha$ -sinucleína en plasma que permitan diferenciar significativamente entre los sujetos controles y EP, respaldando así el potencial del plasma como fuente de estudio para biomarcadores.

Al estudiar la batería de pruebas neuropsicológicas con respecto a los resultados de migración y concentración proteica en los distintos fluidos periféricos, no se encontró una correlación significativa que diera cuenta de la progresión o estado de enfermedad, sólo una tendencia negativa entre la prueba de olfato y migración de Tau. Probablemente debido al escaso número de pacientes, y las variables subjetivas de muchas de las pruebas realizadas que dificultan esta correlación.

Para los estudios de geles en 2 dimensiones si se logró obtener una señal diferencial entre grupos controles y EP, posteriores análisis de secuenciación por espectrometría de masa podrían revelar mayor información respecto de cual proteína podría tratarse y evaluar su posible utilidad como marcador para diagnóstico y terapia dependiendo de que si es una proteína ya identificada anteriormente o no.

Así los resultados de este trabajo sustentan las diferencias que existen entre los patrones de migración electroforética entre las proteínas Tau y APP en plaquetas y las concentraciones de  $\alpha$ -syn en plasma entre los distintos grupos controles, EP y DCL

## REFERENCIAS

- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* **116**(2): 281-297.
- Beach, T. G., C. H. Adler, L. I. Sue, L. Vedders, L. Lue, C. L. White lli, H. Akiyama, J. N. Caviness, H. A. Shill, M. N. Sabbagh, D. G. Walker and C. Arizona Parkinson's Disease (2010). "Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders." *Acta Neuropathol* **119**(6): 689-702.
- Berger, Z., H. Roder, A. Hanna, A. Carlson, V. Rangachari, M. Yue, Z. Wszolek, K. Ashe, J. Knight, D. Dickson, C. Andorfer, T. L. Rosenberry, J. Lewis, M. Hutton and C. Janus (2007). "Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy." *J Neurosci* **27**(14): 3650-3662.
- Bohm, C., F. Chen, J. Sevalle, S. Qamar, R. Dodd, Y. Li, G. Schmitt-Ulms, P. E. Fraser and P. H. St George-Hyslop (2015). "Current and future implications of basic and translational research on amyloid-beta peptide production and removal pathways." *Mol Cell Neurosci* **66**(Pt A): 3-11.
- Borroni, B., C. Agosti, E. Marcello, M. Di Luca and A. Padovani (2010). "Blood cell markers in Alzheimer Disease: Amyloid Precursor Protein form ratio in platelets." *Exp Gerontol* **45**(1): 53-56.
- Braak, H., R. A. de Vos, J. Bohl and K. Del Tredici (2006). "Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology." *Neurosci Lett* **396**(1): 67-72.
- Braak, H., K. Del Tredici, U. Rub, R. A. de Vos, E. N. Jansen Steur and E. Braak (2003). "Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease." *Neurobiol Aging* **24**(2): 197-211.
- Byrne, L. M. and E. J. Wild (2016). "Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Huntington's Disease." *J Huntingtons Dis* **5**(1): 1-13.
- Chevallet, M., S. Luche and T. Rabilloud (2006). "Silver staining of proteins in polyacrylamide gels." *Nat Protoc* **1**(4): 1852-1858.
- Clark, C. M., S. Xie, J. Chittams, D. Ewbank, E. Peskind, D. Galasko, J. C. Morris, D. W. McKeel, Jr., M. Farlow, S. L. Weitlauf, J. Quinn, J. Kaye, D. Knopman, H. Arai, R. S. Doody, C. DeCarli, S. Leight, V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2003). "Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid: how well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses?" *Arch Neurol* **60**(12): 1696-1702.
- de Rijk, M. C., L. J. Launer, K. Berger, M. M. Breteler, J. F. Dartigues, M. Baldereschi, L. Fratiglioni, A. Lobo, J. Martinez-Lage, C. Trenkwalder and A. Hofman (2000). "Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group." *Neurology* **54**(11 Suppl 5): S21-23.
- Devic, I., H. Hwang, J. S. Edgar, K. Izutsu, R. Presland, C. Pan, D. R. Goodlett, Y. Wang, J. Armaly, V. Tumas, C. P. Zabetian, J. B. Leverenz, M. Shi and J. Zhang (2011). "Salivary alpha-synuclein and DJ-1: potential biomarkers for Parkinson's disease." *Brain* **134**(Pt 7): e178.
- Dexter, P. R., D. K. Miller, D. O. Clark, M. Weiner, L. E. Harris, L. Livin, I. Myers, D. Shaw, L. A. Blue, J. Kunzer and J. M. Overhage (2010). "Preparing for an aging population and improving chronic disease management." *AMIA Annu Symp Proc* **2010**: 162-166.
- Dias, V., E. Junn and M. M. Mouradian (2013). "The role of oxidative stress in Parkinson's disease." *J Parkinsons Dis* **3**(4): 461-491.

Duran, R., F. J. Barrero, B. Morales, J. D. Luna, M. Ramirez and F. Vives (2010). "Plasma alpha-synuclein in patients with Parkinson's disease with and without treatment." Mov Disord **25**(4): 489-493.

El-Agnaf, O. M., S. A. Salem, K. E. Paleologou, L. J. Cooper, N. J. Fullwood, M. J. Gibson, M. D. Curran, J. A. Court, D. M. Mann, S. Ikeda, M. R. Cookson, J. Hardy and D. Allsop (2003). "Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma." FASEB J **17**(13): 1945-1947.

El-Agnaf, O. M., S. A. Salem, K. E. Paleologou, M. D. Curran, M. J. Gibson, J. A. Court, M. G. Schlossmacher and D. Allsop (2006). "Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease." FASEB J **20**(3): 419-425.

Eldemire-Shearer, D., K. Mitchell-Fearon, H. Laws, N. Waldron, K. James and D. L. Holder-Nevins (2014). "Ageing of Jamaica's Population -- What Are the Implications for Healthcare?" West Indian Med J **63**(1): 3-8.

Farias, G., P. Perez, A. Slachevsky and R. B. Maccioni (2012). "Platelet tau pattern correlates with cognitive status in Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **31**(1): 65-69.

Farías GA, A. L., Guzmán-Martínez L, Morales I, Tapia JP and Maccioni RB. (2015). "Biochemical Markers for Alzheimer's and Parkinson's Disease." Austin J Clin Neurol **2**(7).

Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochem Biophys Res Commun **120**(3): 885-890.

Guzman-Martinez, L., G. A. Farias and R. B. Maccioni (2012). "Emerging noninvasive biomarkers for early detection of Alzheimer's disease." Arch Med Res **43**(8): 663-666.

Hempel, H. and K. Blennow (2004). "CSF tau and beta-amyloid as biomarkers for mild cognitive impairment." Dialogues Clin Neurosci **6**(4): 379-390.

Hong, Z., M. Shi, K. A. Chung, J. F. Quinn, E. R. Peskind, D. Galasko, J. Jankovic, C. P. Zabetian, J. B. Leverenz, G. Baird, T. J. Montine, A. M. Hancock, H. Hwang, C. Pan, J. Bradner, U. J. Kang, P. H. Jensen and J. Zhang (2010). "DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease." Brain **133**(Pt 3): 713-726.

Hu, Y. Y., S. S. He, X. Wang, Q. H. Duan, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal and J. Wang (2002). "Levels of nonphosphorylated and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients : an ultrasensitive bienzyme-substrate-recycle enzyme-linked immunosorbent assay." Am J Pathol **160**(4): 1269-1278.

Irvine, G. B., O. M. El-Agnaf, G. M. Shankar and D. M. Walsh (2008). "Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases." Mol Med **14**(7-8): 451-464.

Jellinger, K. A. (2011). "Interaction between alpha-synuclein and other proteins in neurodegenerative disorders." ScientificWorldJournal **11**: 1893-1907.

Kalaitzakis, M. E., M. B. Graeber, S. M. Gentleman and R. K. Pearce (2008). "Striatal beta-amyloid deposition in Parkinson disease with dementia." J Neuropathol Exp Neurol **67**(2): 155-161.

Kwong, L. K., K. Uryu, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2008). "TDP-43 proteinopathies: neurodegenerative protein misfolding diseases without amyloidosis." Neurosignals **16**(1): 41-51.

Lee, P. H., G. Lee, H. J. Park, O. Y. Bang, I. S. Joo and K. Huh (2006). "The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy." J Neural Transm (Vienna) **113**(10): 1435-1439.

Li, Q. X., S. S. Mok, K. M. Laughton, C. A. McLean, R. Cappai, C. L. Masters, J. G. Culvenor and M. K. Horne (2007). "Plasma alpha-synuclein is decreased in subjects with Parkinson's disease." Exp Neurol **204**(2): 583-588.

Maccioni, R. B., M. Lavados, M. Guillon, C. Mujica, R. Bosch, G. Farias and P. Fuentes (2006). "Anomalously phosphorylated tau and Abeta fragments in the CSF correlates with cognitive impairment in MCI subjects." Neurobiol Aging **27**(2): 237-244.

Maeda, S., N. Sahara, Y. Saito, S. Murayama, A. Ikai and A. Takashima (2006). "Increased levels of granular tau oligomers: an early sign of brain aging and Alzheimer's disease." Neurosci Res **54**(3): 197-201.

Margis, R., R. Margis and C. R. Rieder (2011). "Identification of blood microRNAs associated to Parkinson's disease." J Biotechnol **152**(3): 96-101.

Mayeux, R. (2003). "Epidemiology of neurodegeneration." Annu Rev Neurosci **26**: 81-104.

Mollenhauer, B., J. J. Locascio, W. Schulz-Schaeffer, F. Sixel-Doring, C. Trenkwalder and M. G. Schlossmacher (2011). "alpha-Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study." Lancet Neurol **10**(3): 230-240.

Mollenhauer, B. and J. Zhang (2012). "Biochemical premotor biomarkers for Parkinson's disease." Mov Disord **27**(5): 644-650.

Mukaetova-Ladinska, E. B., R. Monteith and E. K. Perry (2010). "Cerebrospinal fluid biomarkers for dementia with lewy bodies." Int J Alzheimers Dis **2010**: 536538.

Neumann, K., G. Farias, A. Slachevsky, P. Perez and R. B. Maccioni (2011). "Human platelets tau: a potential peripheral marker for Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **25**(1): 103-109.

Nussbaum, R. L. and C. E. Ellis (2003). "Alzheimer's disease and Parkinson's disease." N Engl J Med **348**(14): 1356-1364.

Padovani, A., L. Pastorino, B. Borroni, F. Colciaghi, L. Rozzini, R. Monastero, J. Perez, C. Pettenati, M. Mussi, G. Parrinello, E. Cottini, G. L. Lenzi, M. Trabucchi, F. Cattabeni and M. Di Luca (2001). "Amyloid precursor protein in platelets: a peripheral marker for the diagnosis of sporadic AD." Neurology **57**(12): 2243-2248.

Pienaar, I. S., W. M. Daniels and J. Gotz (2008). "Neuroproteomics as a promising tool in Parkinson's disease research." J Neural Transm (Vienna) **115**(10): 1413-1430.

Prikrylova Vranova, H., J. Mares, P. Hlustik, M. Nevrlý, D. Stejskal, J. Zapletalova, R. Obereigneru and P. Kanovsky (2012). "Tau protein and beta-amyloid(1-42) CSF levels in different phenotypes of Parkinson's disease." J Neural Transm (Vienna) **119**(3): 353-362.

Roher, A. E., C. L. Esh, T. A. Kokjohn, E. M. Castano, G. D. Van Vickle, W. M. Kalback, R. L. Patton, D. C. Luehrs, I. D. Daus, Y. M. Kuo, M. R. Emmerling, H. Soares, J. F. Quinn, J. Kaye, D. J. Connor, N. B. Silverberg, C. H. Adler, J. D. Seward, T. G. Beach and M. N. Sabbagh (2009). "Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **5**(1): 18-29.

Selkoe, D. J., M. B. Podlisny, C. L. Joachim, E. A. Vickers, G. Lee, L. C. Fritz and T. Oltersdorf (1988). "Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(19): 7341-7345.

Sharma, S., C. S. Moon, A. Khogali, A. Haidous, A. Chabenne, C. Ojo, M. Jelebinkov, Y. Kurdi and M. Ebadi (2013). "Biomarkers in Parkinson's disease (recent update)." Neurochem Int **63**(3): 201-229.

Shi, M., C. P. Zabetian, A. M. Hancock, C. Ghingina, Z. Hong, D. Yearout, K. A. Chung, J. F. Quinn, E. R. Peskind, D. Galasko, J. Jankovic, J. B. Leverenz and J. Zhang (2010). "Significance and confounders of peripheral DJ-1 and alpha-synuclein in Parkinson's disease." Neurosci Lett **480**(1): 78-82.

Siderowf, A., S. X. Xie, H. Hurtig, D. Weintraub, J. Duda, A. Chen-Plotkin, L. M. Shaw, V. Van Deerlin, J. Q. Trojanowski and C. Clark (2010). "CSF amyloid {beta} 1-42 predicts cognitive decline in Parkinson disease." Neurology **75**(12): 1055-1061.

Stoothoff, W. H. and G. V. Johnson (2005). "Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences." Biochim Biophys Acta **1739**(2-3): 280-297.

Tan, R. H., J. J. Kril, M. Fatima, A. McGeachie, H. McCann, C. Shepherd, S. L. Forrest, A. Affleck, J. B. Kwok, J. R. Hodges, M. C. Kiernan and G. M. Halliday (2015). "TDP-43 proteinopathies: pathological identification of brain regions differentiating clinical phenotypes." Brain **138**(Pt 10): 3110-3122.

Tian, Q. and J. Wang (2002). "Role of serine/threonine protein phosphatase in Alzheimer's disease." Neurosignals **11**(5): 262-269.

Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo and M. W. Kirschner (1975). "A protein factor essential for microtubule assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(5): 1858-1862.

Wiederkehr, F., A. Ogilvie and D. J. Vonderschmitt (1985). "Two-dimensional gel electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins from patients with various neurological diseases." Clin Chem **31**(9): 1537-1542.

Wild, E. J., R. Boggio, D. Langbehn, N. Robertson, S. Haider, J. R. Miller, H. Zetterberg, B. R. Leavitt, R. Kuhn, S. J. Tabrizi, D. Macdonald and A. Weiss (2015). "Quantification of mutant huntingtin protein in cerebrospinal fluid from Huntington's disease patients." J Clin Invest **125**(5): 1979-1986.