

EXPRESIÓN DE PROTEÍNA TAU Y A-
SINUCLÉINA
EN LA PIEL DE PACIENTES CON
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER,
ENFERMEDAD DE PARKINSON Y PARÁLISIS
SUPRANUCLEAR PROGRESIVA

TESIS QUE PRESENTA

ILDEFONSO RODRIGUEZ LEYVA

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS APLICADAS**



DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARIA ESTHER JIMÉNEZ CATAÑO

FEBRERO 2016

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se llevó a cabo en el Programa de Doctorado en Ciencias Aplicadas y en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luís Potosí, bajo la tutoría de la Dra. María Esther Jiménez Cataño, gracias a los apoyos 201249 para MEJC del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y C15-FAI-04-95.95 de la UASLP para IRL.



Tesis que presenta:
ILDEFONSO RODRIGUEZ LEYVA

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS APLICADAS

DIRECTOR DE TESIS
Dra. María Esther Jiménez Cataño

ASESORES
Dra. Ana Laura Calderón Garcidueñas
Dr. Miguel Ángel Vidal Borbolla
Dr. Sergio Rosales Mendoza

RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas se consideran proteinopatías, por asociarse al acúmulo de proteínas mal plegadas, que inicialmente provocan disfunción y finalmente muerte celular, afectando principalmente a las células del encéfalo. De la localización de la proteinopatía dependen las manifestaciones clínicas y las características fenotípicas de la enfermedad. Dado que las células de la piel comparten el origen ectodérmico de las células del tejido nervioso, podrían compartir un patrón similar de expresión de proteínas. Con el planteamiento de encontrar la expresión de las proteinopatías que caracterizan en el encéfalo a la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP) y la parálisis supranuclear progresiva (PSP) en la piel, realizamos la presente investigación.

OBJETIVOS

Demostrar la presencia por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia de las proteínas Tau y α -sinucleína en la piel de pacientes con alguna de las siguientes enfermedades neurodegenerativas: EA, EP y PSP, compararlas con un grupo de pacientes con demencia no neurodegenerativa (DND) y contra una población control aparentemente sana de características demográficas similares.

SUJETOS Y MÉTODOS

Con la técnica de inmunohistoquímica se utilizaron anticuerpos dirigidos contra dos formas fosforiladas de la proteína Tau, una que se expresa tanto en tejido cerebral sano como enfermo, denominada PHF; y una segunda forma que se expresa predominantemente en tejido cerebral enfermo, denominada AT8; y contra la proteína α -sinucleína en biopsias de piel. Se incluyeron en el estudio 20 pacientes con EA, 17 con EP, 10 con PSP, 12 con DND y dos grupos de controles sanos (CS), demográficamente comparables. Se obtuvo una biopsia de piel a nivel retroauricular de cada uno de los pacientes, y la inmunopositividad a cada una de las proteínas de interés se analizó digitalmente en microfotografías obtenidas de los tejidos procesados inmunohistoquímicamente. Para corroborar la identidad de las

proteínas se utilizó además la técnica de Western-blot en tejido cerebral humano, en cerebro de rata y en piel humana.

RESULTADOS

En la epidermis de sujetos con EA, EP y PSP se demostró una inmunopositividad significativamente mayor a p-Tau (AT8) en comparación con los grupos de DND y CS. La inmunopositividad de α -sinucleína fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con EP en relación a los demás grupos.

CONCLUSIONES

Demostramos la presencia de proteína Tau en la piel de pacientes con las enfermedades reconocidas como taupatías (EA, PSP) así como en EP. Además, la mayor presencia α -sinucleína en la piel de pacientes con EP la distingue del resto de los grupos estudiados. Este procedimiento puede ser un biomarcador de apoyo diagnóstico en vida para los pacientes con enfermedades neurodegenerativas.

| | |
|---|----|
| Título de la tesis | 1 |
| Creditos institucionales | 2 |
| Resumen | 3 |
| Contenido | 5 |
| Lista de Tablas | 7 |
| Lista de figuras | 7 |
| Lista de Abreviaturas | 8 |
| Dedicatoria | 9 |
| Introducción | 10 |
| Plegamiento anormal y proteínas participantes | 11 |
| Enfermedades neurodegenerativas | 16 |
| Enfermedad de Alzheimer | 16 |
| Enfermedad de Parkinson | 19 |
| Parálisis supranuclear progresiva | 22 |
| Demencias No-Neurodegenerativas | 23 |
| Biomarcadores y enfermedades neurodegenerativas | 25 |
| Biomarcador | 25 |
| Justificación | 26 |
| Hipótesis | 27 |
| Objetivos | 27 |
| Material y métodos | 27 |
| Descripción general | 27 |
| Criterios de inclusión y exclusión | 28 |
| Estudios de imagen | 30 |

| | |
|---|----|
| Estudio del estado mental | 30 |
| Técnica de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia | 31 |
| Anticuerpos | 31 |
| Evaluación de las biopsias | 33 |
| Western blot | 34 |
| Análisis estadístico | 34 |
| Resultados | 37 |
| Discusión | 51 |
| Conclusiones | 58 |
| Bibliografía | 58 |
| Anexos | 76 |
| Productos | 98 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|----------------|---|
| Tabla 1 | Características demográficas de la población: Control, EA, DNND |
| Tabla 2 | Características en género, edad, tiempo de evolución y MMSE, Hoehn-Yahr, UPDRS |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|------------------|--|
| Figura 1 | Toma de biopsia |
| Figura 2 | Tau y α -sinucleína y sitios de marcaje más usados |
| Figura 3 | Biopsia de la piel, campos, sistema de cuantificación |
| Figura 4 | Cuantificación subjetiva y por el sistema digital RGB (porcentaje de expresión en área) |
| Figura 5 | Inmunohistoquímica neuronas hipocampales, marcadas para Tau, PFH y α -sinucleína |
| Figura 6 | Patrones de inmunohistoquímica en los anexos de la piel. |
| Figura 7 | Inmunofluorescencia de la piel en controles y en EA. |
| Figura 8 | Presencia de la proteína Tau (AT8) demostrada por Western blot |
| Figura 9 | Inmunopositividad para AT8 y PHF |
| Figura 10 | Identificación de Tau y α -sinucleína en SNC, SNP y por Western blot. |
| Figura 11 | Inmunorreactividad en la epidermis para PHF, AT8 y α -sinucleína en EP, PSP y control |
| Figura 12 | Inmunofluorescencia en la piel EP, PSP y control |
| Figura 13 | Inmunopositividad para PHF, AT8 y α -sinucleína |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| EA (AD) | Enfermedad de Alzheimer |
| EP (PD) | Enfermedad de Parkinson |
| PSP | Parálisis supranuclear progresiva |
| DCL (LBD) | Demencia por cuerpos de Lewy |
| DLFT (FTLD) | Demencia Lobar fronto-temporal |
| DCB (CBD) | Degeneración cortico-basal |
| EH (HD) | Enfermedad de Huntington |
| DNND | Demencia No neurodegenerativa |
| DCM (MCI) | Deterioro cognitivo mínimo |
| CS | Controles sanos |
| PHF | Anticuerpo contra S296 (Tau) |
| AT8 | Anticuerpo contra S202 (p-Tau) |
| A-Sin | α -sinucleína |
| β-A | Beta-Amiloide |
| SNPs | Polimorfismos de un solo nucleótido |

DEDICATORIA

Al mejor de los amigos.

A mis padres y hermanos por ser mi origen y base.

A Gema Rosaura y nuestros hijos por ser lo mejor y la inspiración de mi vida.

A Ma. Esther por su inspiración, ejemplo, paciencia, tolerancia, perseverancia y apoyo.

A Ana Laura por estar siempre lista para sugerir, corregir, apoyar y consolar.

A Miguel y Sergio por ser claves para encontrar las respuestas.

A Linda por su apoyo incondicional a nuestros pacientes.

A Juan por su invaluable trabajo e incondicional entrega.

A Lula, Sergio, Alex, Adriana, Alfredo por ser maravillosos compañeros y hacer valer nuestro trabajo conjunto.

A Chely por su apoyo en la edición y su amistad de años.

A los alumnos de Neurología que son la razón de este esfuerzo.

INTRODUCCION

Las enfermedades neurodegenerativas son denominadas actualmente también proteinopatías y aunque el principal factor de riesgo para padecerlas es la

edad, intervienen en su presentación indudablemente tanto la genética (con mutaciones que se han asociado a estos padecimientos) como el ambiente (trauma, pesticidas, herbicidas, infecciones, beber agua de pozo). El ambiente, a través de una serie de modificaciones postraduccionales y mediante mecanismos epigenéticos puede conducir a modificaciones proteicas, provocando la producción de polipéptidos anormales, que al plegarse forman polímeros fibrilares. Estos polímeros al acumularse forman en ocasiones, cuerpos de inclusión y entre ambos (fibrillas y cuerpos de inclusión) probablemente favorezcan la muerte celular (1).

La complejidad de las enfermedades neurodegenerativas estriba en que abarcan un abanico de posibilidades en su expresión fenotípica; pueden ser desde puramente genéticas (como la enfermedad de Huntington) hasta las totalmente dependientes del ambiente (como la demencia pugilística); sin embargo, la mayoría dependerán de la interacción entre la genética y el medio ambiente, teniendo como mediador a la epigenética. En su semiología se manifiestan con una gama de síntomas y signos, que en ocasiones nos llevan a confundir diagnósticos (la Enfermedad de Parkinson con la parálisis supranuclear progresiva, por ejemplo). Hay autores que proponen que enfermedades consideradas hasta ahora diferentes en realidad pueden corresponder a una misma patología (Enfermedad de Parkinson y Demencia por Cuerpos de Lewy) (2).

La fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas es semejante a nivel celular; la transformación de una proteína que era útil y funcional a una mal conformada, insoluble, tóxica, que lleva finalmente a la disfunción y muerte celular, con ello afectando estructuras corticales, subcorticales, núcleos de la base, tallo cerebral, médula espinal e incluso al sistema nervioso periférico, y, lo más interesante y el porqué de nuestra investigación, puede localizarse incluso en otros tejidos como el corazón, tubo digestivo y desde luego a la piel. Se ha planteado que pueden ser enfermedades sistémicas, lo que permitiría explicar la presencia de las alteraciones cardiovasculares, gastrointestinales y cutáneas que manifiestan.

Gracias a la identificación de defectos genéticos se comienzan a dilucidar los mecanismos moleculares de la etiología de las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la

demencia de cuerpos de Lewy (DCL), la demencia lobar fronto-temporal (DLFT), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Huntington (EH) y las enfermedades por priones (EPP) entre otras; todas estas patologías se caracterizan por ser proteinopatías, y ser genéticamente complejas. En ellas se suman la carga genética mendeliana y factores epigenéticos que la modifican, inducidos por cambios ambientales (trauma craneal, educación, nutrición, exposición a tóxicos) que harán manifiesta una enfermedad (3,4).

Los cuadros clínicos de las enfermedades neurodegenerativas expresan el sitio del daño: bulbo olfatorio (anosmia), alteraciones en el ánimo (sistema límbico), pérdida de la memoria reciente (hipocampo), alteraciones en el movimiento (núcleos de la base), problemas de lenguaje (corteza frontal y temporal izquierda) etc.. Son enfermedades crónicas (meses a años de duración), incapacitantes, progresivas y llevan a la muerte a quien las padece. Si bien la muerte sobrevendrá entre años y décadas después del inicio de la enfermedad, será el resultado de la pérdida neuronal progresiva que está ocurriendo en el paciente (5) o de complicaciones provocadas por ésta.

1.1 Plegamiento anormal y principales proteínas participantes en las enfermedades neurodegenerativas

La secuencia de decenas o hasta cientos de aminoácidos que conforma la estructura primaria de una proteína es traducida por el ARN mensajero y contiene en sí misma la información para plegarse en una estructura tridimensional compleja, precisa y única, que determina su funcionalidad. El ordenamiento de la cadena primaria en estructuras secundarias tales como hélices α y láminas β , la formación de la estructura terciaria y el ensamblaje de varios polipéptidos en una estructura cuaternaria, es un proceso favorecido por las fuerzas de atracción entre los grupos funcionales que constituyen al polipéptido. El establecimiento de enlaces y, principalmente, de un gran número de interacciones no-covalentes e hidrófobas, define una estructura final de baja energía en la que la proteína permanecerá hasta su degradación. Esta conformación podrá variar de manera reversible al modificarse la estructura en uno o varios sitios, ya sea por la unión de una molécula (fosforo: P),

como es el caso de la fosforilación, o de numerosos factores alostéricos que modificarán la actividad enzimática. Aunque para cada enfermedad neurodegenerativa sobresale una proteína anormal, pueden converger en un padecimiento varias proteínas patógenas. De manera interesante, la producción proteica mantiene un control de calidad a nivel celular.

Los padecimientos neurodegenerativos en general se caracterizan además de la agregación de proteínas plegadas de manera defectuosa, por una distribución en diferentes regiones del encéfalo que suelen seguir un patrón específico para cada padecimiento, lo que suele conducir a un fenotipo clínico. Estos agregados proteicos consiguen escapar a los mecanismos de degradación de proteínas anómalas y disparan una serie de efectos neurotóxicos, entre los que se encuentran disfunción sináptica y/o de los organelos celulares (mitocondrias, lisosomas) y del citoesqueleto, favoreciendo una respuesta inflamatoria que conduce finalmente a la muerte celular. Se pensaba que la formación de estos agregados era de manera totalmente independiente en distintas regiones cerebrales; sin embargo, recientemente se han encontrado evidencias que apoyan la hipótesis de que los agregados proteicos se diseminan entre las células del sistema nervioso de manera similar a las proteínas priónicas, por lo que se les ha relacionado a ellas y cada vez es más fuerte la evidencia de que se comportan en forma similar (6-9).

Recientemente, el concepto de que el plegado anormal de proteínas pueda ser en realidad un evento beneficioso para la célula ha sido apoyado experimentalmente. Lo que hasta el momento se han denominado “agregados de proteínas mal plegadas” pudieran ser en realidad inclusiones celulares de proteínas que, al alterar su conformación en respuesta a un estímulo, inician una respuesta al estrés formando complejos de unión al ARN, secuestrando mARN y proteínas con el fin de proteger a la célula mediante la modificación del proteoma (10). El descubrimiento de que varias proteínas participantes en enfermedades neurodegenerativas sean proteínas de unión a ácidos nucleicos, como TDP43 (proteína de unión TAR (elemento regulatorio del transactivador Tat dependiente del ARN) al ADN) y FUS (proteína de unión al sarcoma), condujo a considerar el plegamiento anormal de proteínas como un posible mecanismo de protección

celular. Un grupo de proteínas denominadas chaperoninas se localizan en la cercanía del sitio de síntesis del polipéptido a fin de evitar su plegamiento anómalo y por tanto tienen efectos protectores a nivel celular (11).

Las proteinopatías mejor estudiadas son las taupatías, amiloidopatías y sinucleopatías, y entre ellas se encuentran las que se estudian en este trabajo y que se observan en EA, EP y PSP, por lo que se detallarán a continuación las características de las proteínas Tau, α -sinucleína y β -amiloide.

La proteína Tau es una proteína conformada por 459 aminoácidos, también denominada tau asociada a los microtúbulos o también proteína tau de filamentos helicoidales pareados (PHF). Su función está relacionada a mantener la polaridad neuronal, formar parte del citoesqueleto celular uniéndose a los microtúbulos en su terminal C y a la membrana neuronal con su terminal N. Tiene seis isoformas que difieren una de la otra por la ausencia o presencia de alguno de sus 4 exones. La fosforilación de Tau puede ocurrir en varios de sus residuos de serina (S-P) o treonina (S-T); puede facilitar el plegamiento y la formación laminar beta, que de tornarse irreversible facilitará la formación de las marañas neurofibrilares características de la EA (12). Tau en su isoforma más larga contiene 35 treoninas, 45 serinas y 5 tirosinas, permitiendo que hasta un 20 % del total de la proteína pueda ser fosforilada. Ensayos de inmunotinción en tejido cerebral humano han permitido marcar mediante anticuerpos dependientes de fosforilación epítopes fosforilados tales como PHF (epítope pS396/pS404) y AT8 (dirigidos a los epítopes pS199/pT205 y pS262), revelando la agregación proteica y la citotoxicidad en las taupatías (13). En la EA, la patología de tau se asocia al deterioro cognitivo y se ha observado en tres estadios morfológicos: a) Pre-NFT (pre-marañas neurofibrilares) o de NFT difusas, en donde se aprecian agregados puntuales o difusos dentro de neuronas y dendritas que lucen por lo demás conservadas; b) iNFT (intraneuronales) maduras o fibrilares que consisten en agregados filamentosos que desplazan al núcleo y distorsionan las dendritas y al segmento proximal del axón y c) eNFT (extraneuronales) resultando de la muerte neuronal o neuronas fantasmas en donde ya no se puede distinguir ni el núcleo ni el citoplasma (14,15, 16).

Aunque la proteína tau fue inicialmente definida como una proteína neuronal, citosólica y predominantemente axonal, con un papel esencial en la estabilización de microtúbulos (17,18), se sabe ahora que Tau se encuentra también en el núcleo y en células no-neuronales, incluyendo a los fibroblastos, lo que ha llevado a suponer que tiene funciones diversas más allá de la estabilización del citoesqueleto neuronal. Un estudio reciente muestra que en condiciones de estrés neuronal, Tau puede ser traslocada al núcleo y proteger de daño al ADN (19). Por otra parte, en células no neuronales (fibroblastos), se ha demostrado que tau se localiza en el nucléolo y se asocia al ADN (20). Todos estos hallazgos refuerzan la noción de que en las proteinopatías existe un cambio en el metabolismo del ARN y que ciertas proteinopatías probablemente inician como un mecanismo de defensa ante el estrés celular y en algún momento se convierten en un proceso dañino, desencadenando finalmente la neurodegeneración (1, 2).

La formación de una proteína Tau patógena depende de mutaciones o de potenciadores que se encuentran en algunos cromosomas mediante un programa genéticamente establecido (21). Sin embargo, en ausencia de mutaciones o de SNP que favorezcan su hiperfosforilación y consecuente agregación anormal, estados fisiológicos normales como la hibernación o de estrés agudo como el trauma craneal, la hipotermia y la anestesia general pueden inducir a un incremento en la fosforilación y agregación de Tau (22). Mediante autopsias practicadas a individuos sanos, se demostró que la presencia de agregados de proteína tau no es un fenómeno raro, sino común, y que se presenta desde la juventud. La incidencia de NFT va aumentando en relación directa con la edad y el alcanzar un nivel crítico de estos agregados se asocia a déficit cognitivo (MCI) y a la plena manifestación de enfermedades conocidas como Taupatías, la mejor caracterizada de las cuales es la EA (23). Entre las taupatías más importantes se incluyen la DLFT asociada a parkinsonismo (FTDP-17), el síndrome de Down, la distrofia miotónica tipo 1, la PSP y la DCB entre casi una veintena más de los padecimientos

La α -sinucleína es una proteína de 140 aminoácidos denominada también SNCA y es el componente más importante de los cuerpos de Lewy, principal marcador patológico de EP y DCL. Esta proteína participa en la integración de la

señalización presináptica y el tráfico transmembranal, localizándose tanto a nivel citoplasmático como en el espacio extracelular (24). Su concentración está elevada en plasma y líquido cefalorraquídeo en la EP y no en EA ni en PSP (25). Su eje central tiene características que facilitan la formación de láminas beta (26) y su agregación y plegamiento se asocian a disfunción especialmente en la dinámica de las vesículas sinápticas (27, 28, 29) afectando quizá especialmente las dopaminérgicas (30), lo que se asocia a disfunción presináptica y podría asociarse a neurodegeneración (31), se considera que la agregación de α -sinucleína puede conducir a la EP (32). La disfunción celular asociada a la agregación de la sinucleína no solamente es a nivel sináptico, sino afecta también a las mitocondrias (33), con producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (34) disfunción neuronal y apoptosis (35). La presencia de α -sinucleína extracelular (36) sugiere otras actividades patógenas (37). Por tanto, α -sinucleína tiene una doble función: un papel fisiológico implicado en la regulación de la transmisión sináptica, y un papel patológico asociado con neurodegeneración cuando existe una modificación de la flexibilidad estructural de α -sinucleína y cambia de soluble (fisiológica) a un estado de agregación inflexible (patógeno). El mecanismo a través del cual los monómeros de α -sinucleína se convierten en oligómeros tóxicos y luego en fibras es desconocido, pero se cree que este proceso se inicia en la membrana lipídica plasmática, constituyendo finalmente los cuerpos y neuritas de Lewy (38). La presencia de estos agregados en el sistema nervioso central (SNC) se asocia a los estadios de la EP (39) y a varios estados patológicos denominados sinucleopatías, entre los que se encuentran los ya mencionados EP y DCL y la atrofia de múltiples sistemas (AMS).

β -amiloide que es una proteína que se encuentra principalmente a nivel extracelular y que resulta del procesamiento del péptido precursor amiloide (APP). Si bien tanto la existencia del precursor como de su producto metabólico son normales en el SNC, defectos en el metabolismo de APP conducen a la acumulación de β - amiloide en forma de placas amiloideas o "placas seniles", las cuales están presentes en varias enfermedades neurodegenerativas, la mejor descrita de ellas es la EA. Como se mencionará en la próxima sección, los defectos

genéticos en la enzimas que procesan APP pueden conducir a la patología amiloidea y ser determinantes de la aparición temprana de EA.

1.2 Enfermedades neurodegenerativas: neuropatología, epidemiología y características clínicas

Enfermedad de Alzheimer (EA)

La EA es la patología neurodegenerativa más frecuente y el problema de salud más preocupante para la economía en las próximas décadas debido al incremento de la población en la tercera edad en el mundo. Aunque es el diagnóstico que con mayor frecuencia se hace en relación a las demencias neurodegenerativas, no todos los casos de deterioro cognitivo en el adulto mayor corresponden a una enfermedad neurodegenerativa, ni todos los casos de demencia asociada a proteinopatía corresponden a AD. Se caracteriza clínicamente por la pérdida de la memoria episódica (amnesia) que es el heraldo para un deterioro cognitivo progresivo. El marcador neuropatológico es la presencia de placas seniles compuestas por la proteína β amiloide ($A\beta$) y de NFTs constituidas por proteína tau fosforilada (p-Tau). La presencia de ambas proteínas defectuosas provoca una disfunción celular y sináptica, pérdida progresiva neuronal inicialmente a nivel hipocampal y que posteriormente en forma paulatina progresará a una atrofia cortical difusa.

La EA representa a la forma de demencia más frecuente en el mundo. Actualmente se calcula que existen 24 millones afectados y 5 de ellos se encuentran en los Estados Unidos de América. El 1 % de la población de 65 años y el 8 % a los de 85 años o más, la padecen, lo que habla de un crecimiento logarítmico de la enfermedad. Entre el 5 al 10 % de los casos de EA son familiares (fEA) y en ellos se ha demostrado asociación con mutaciones en la proteína precursora del amiloide (APP), y en las presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2); es posible que el porcentaje de casos familiares sea mayor (GeneReviews® atribuye 25 % de los casos) (41). Como la mayoría de los casos de este padecimiento son esporádicos, cuando inicia en forma tardía se asocia a la presencia del alelo ϵ de la apolipoproteína E (apoE4,

cromosoma 19q13) y a múltiples polimorfismos en diferentes genes que se han planteado como posibles candidatos a predisponer a la enfermedad. (40). Se han descrito asociaciones con mutaciones de riesgo (SNP) que favorecen el padecer un incremento en la producción amiloidogénica de β - amiloide o de tau y cambios en el metabolismo celular, que pueden explicar su sobreproducción y su papel central en la génesis de la EA (42).

Los principales factores de riesgo ambiental conocidos son la exposición a algunos agentes virales, enfermedad vascular cerebral, la hipertensión arterial crónica, la presencia de diabetes mellitus, el sobrepeso, el alcoholismo, el ingerir grasas saturadas y abundantes en colesterol y al bajo nivel de educación. Mientras que se reconocen como factores de protección la dieta mediterránea, el ingerir grasas polinsaturadas, ingerir pescado, tener una actividad social importante, un alto nivel de educación, actividad física y la utilización crónica de AINES (43).

En EA y en otras formas de neurodegeneración, los agregados proteicos insolubles inducen la pérdida de plasticidad neuronal, imposibilidad para formar nuevas sinapsis, toxicidad, proceso inflamatorio secundario y finalmente muerte celular. La pérdida funcional hipocampal provoca amnesia a hechos recientes como manifestación primaria. Este proceso afecta de manera progresiva a la corteza entorrinal (estadio 1), seguido por la afección de la región CA1 hipocampal (estadio II), luego las estructuras límbicas como el subiculum y la región hipocampal (estadio III), luego a la amígdala, el tálamo y el claustró (estadio IV) y finalmente una diseminación en todas las áreas de la isocorteza, primero las sensoriales, luego las motoras y finalmente las visuales (estadio V) (44, 45).

La pérdida celular progresa en forma distinta dependiendo de la proteína causal, mientras que la Taupatía afecta especialmente al hipocampo y amígdala en forma inicial (lo que explica la amnesia), la proteína beta-amiloide afecta más la neocorteza inicialmente parieto-occipital (lo que explica que algunos pacientes pierdan la capacidad de reconocer rostros, confundan a sus familiares). En la EA, aunque la proteína β -amiloide, y la Tau jueguen un papel estelar en la fisiopatogenia de la enfermedad, también la α -sinucleína podría tener un papel secundario y explicar una sobre-posición semiológica y molecular (46).

Entre los mecanismos implicados en la patogenia de la EA, podrían mencionarse una inadecuada señalización celular, la falla en la proteólisis, alteraciones en la homeostasis del ion calcio, el estrés oxidativo y la inflamación en el sistema nervioso central. Especialmente resulta importante en este proceso la función lisosomal, que con un comportamiento endocitótico y autofágico, explica la destrucción de agregados de proteínas ubiquitinizadas anormales, la destrucción de organelos inservibles, además de la eliminación de células envejecidas y enfermas o muertas. La proteólisis lisosomal y la autofagia requieren de la activación del sistema de proteasas; si este sistema es deficiente, se presentará una “distrofia neurítica” problema que se aprecia en la EA. De manera interesante, precisamente las mutaciones de la presenilina 1 (PS1) y la APP (o la duplicación de este gene) modifican la autofagia, la endocitosis y reducen la sobrevivencia neuronal. Debido a una insuficiente proteólisis lisosomal, existe un incremento en la producción de “neuritas distróficas” potencialmente neurotóxicas, que se van “almacenando” (como ocurre en las enfermedades lisosomales) con una deficiente autofagia, aceleración anormal de la endocitosis neuronal y mayor depósito de material amiloide en la neocorteza (47). Otras alteraciones que han sido propuestas para explicar la patogénesis de la EA incluyen al complejo PS1 secretasa, que promueve la escisión de otras proteínas transmembranales (48).

Con el desarrollo de la imagenología aplicada a la clínica, se pueden visualizar los cambios estructurales propios de algunos de estos padecimientos, como la atrofia hipocampal y amigdalina y el incremento de tamaño de los ventrículos laterales a nivel de sus cuernos temporales así como una atrofia difusa cortical inicialmente parieto-temporal para la EA; también, mediante PET (tomografía por emisión de positrones) podemos visualizar la presencia de agregados de proteínas anormalmente plegadas que caracterizan a esta enfermedad. En este sentido, actualmente el estudio más usado es el PiB (Pittsburgh 11C-F 18) (49) y para Tau (el pTau181 y el pTau231). Aunando ambos estudios, se puede hacer una correlación estructural y funcional de lo que está sucediendo en un sujeto que podría estar incluso apenas en un deterioro cognitivo mínimo (MCI) o ya francamente demenciado (EA). La búsqueda de β -amiloide y de Tau como

biomarcadores de la enfermedad ha permitido encontrarles en el líquido cefalorraquídeo (50) .

La compleja interacción en este padecimiento entre la genética y el ambiente, la diversidad de proteínas implicadas y la variabilidad topográfica en la afección que un sujeto enfermo puede tener, hace que los fenotipos de este y de los padecimientos neurodegenerativos sean tan peculiares pero formando un verdadero abanico de posibilidades, en ocasiones no fáciles de distinguir. Esto apoya la frase del médico español Gregorio Marañón de “no hay enfermedades sino enfermos” (51).

La Enfermedad de Parkinson (EP)

Este padecimiento se caracteriza por temblor, rigidez, lentitud motora (bradicinecia) y frecuentemente inestabilidad postural (TRAP). La EP es el padecimiento más frecuente que afecta el movimiento, también es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes, solamente superada en incidencia y prevalencia por la EA y tiene como característica común a ella que entre el 20 al 40 % de los pacientes desarrollarán demencia en el transcurso del tiempo. Existe un buen número de padecimientos que comparten las características cardinales de la EP (TRAP), conocidas como parkinsonismos (Parkinson plus). Para hacer una mejor distinción se requiere sumar a las manifestaciones clínicas citadas, la presentación inicial generalmente unilateral, la buena y duradera respuesta a la levodopa, así como el no antecedentes de consumo de fármacos antidopaminérgicos, de exposición a tóxicos y el no tener manifestaciones clínicas que hagan sospechar de un diagnóstico distinto (cerebelosas, piramidales, autonómicas, etc.). Las manifestaciones no motoras de la EP incluyen anosmia, alteraciones visuales, depresión, apatía, somnolencia, estreñimiento disfunción urinaria, trastorno conductual del sueño MOR (sueño de movimientos oculares rápidos), y dolor articular entre otras; suelen inicialmente expresarse en forma leve, años antes de las motoras y desafortunadamente muchos médicos no las reconocen.

La EP tiene como marcador histológico característico la presencia de cuerpos de Lewy, inicialmente descritos en la pars compacta de la sustancia nigra mesencefálica; se asocian a pérdida neuronal y a gliosis secundaria, su componente principal es la α -sinucleína que no solamente se expresa en esta región sino en algunos núcleos del tallo cerebral (dorsal del vago, tegmental pontino, coeruleus), núcleos de la base, la corteza cerebral e incluso a nivel simpático y parasimpático en corazón, tubo digestivo, sistema nervioso periférico y piel, por lo que la EP ha sido considerada como una enfermedad sistémica. La historia es similar a otras enfermedades ND; la proteína patógena forma neurofibrillas insolubles que se distribuyen en múltiples sitios de la economía formando las “neuritas de Lewy” y en las neuronas mesencefálicas forman conglomerados eosinófilos con un halo claro conocidos como “cuerpos de Lewy”. Estos agregados contienen además de la α -sinucleína, otras proteínas como la ubiquitina, la sinfilina-1, elementos del proteosomas y otras proteínas del citoesqueleto (52, 53). Su presencia se asocia con alteraciones en los mecanismos de transporte neuronal y axonal, agregados tóxicos de proteína, disfunción mitocondrial y muerte (54, 55).

La EP afecta al 1 % de los sujetos de 55 años y a más del 3% a la población de los sujetos de más de 75 años; tiene una incidencia aproximada de 13.4 x 100,000 y es más frecuente (19:100,000) en hombres que en mujeres (9.9:100,000). Los factores genéticos de riesgo para padecer de EP familiar son: mutaciones en el gen de la sinucleína SNCA (cromosoma 4), LRRK2 (cromosoma 12p12), PARK2 (cromosoma 6q26), DJ1 (PARK 7: cromosoma 1p36.23), PINK1 (PARK6: cromosoma 1p35-p36) y ATP13A2 (PARK 9: 1p.36). Son genes que confieren una mayor susceptibilidad: MAPT (cromosoma 17), LRRK2, SNCA, GBA todas ellas enzimas que interactúan de alguna manera regulando el funcionamiento de la α -sinucleína (56).

Hasta el siglo pasado, la EP fue considerado como una enfermedad puramente ambiental, especialmente relacionada a exposición a tóxicos. Sin embargo, la relación con factores genéticos se ha ido incrementando, especialmente cuando la enfermedad aparece en gente joven, reportándose tanto

formas dominantes (PARK8, PARK17, PARK2, PARK6, PARK7), como recesivas (PARK9, PARK15, SLC6A3), así como ligadas a X (PARK12).

La posibilidad de equivocarse en el diagnóstico de EP es relativamente alta, ya que existen padecimientos que tienen TRAP en sus manifestaciones cardinales por lo que es necesario encontrar biomarcadores que realmente distingan una EP de un parkinsonismo. Como en la EA, la imagen de la estructura cerebral es parte del abordaje diagnóstico de este padecimiento, sin embargo, las características distintivas de la EP respecto a otros parkinsonismos se encuentran en la imagen por resonancia magnética hasta las etapas avanzadas de la enfermedad. En la EP se ha sugerido realizar un estudio doppler para valorar la ecogenicidad de la sustancia nigra mesencefálica, pero resulta poco práctico y la sensibilidad y especificidad no son suficientes. El depósito de hierro en los núcleos basales es común en muchos padecimientos neurodegenerativos y el estudio ideal que sería el PET funcional para ver la presencia de actividad dopaminérgica (18Flouordesoxiglucosa: FDG) (57) no permite distinguir entre estos tres padecimientos: EP, AMS y PSP, que son los problemas neurodegenerativos con parkinsonismo más frecuentes (58). Se han propuesto otras posibilidades como la determinación de α -sinucleína en el LCR, así como la búsqueda de la expresión de esta por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en tubo digestivo, glándulas salivales, corazón y piel (59).

Parálisis supranuclear progresiva

La PSP es una enfermedad progresiva caracterizada por la presencia de parkinsonismo axial (rigidez, bradicinecia), con caídas frecuentes desde el inicio de su presentación, asociada a disfagia e incontinencia de las emociones (parálisis pseudobulbar), disfunción ejecutiva (alteraciones en la atención, planeación, realización), alteraciones conductuales (desinhibición, apatía) y especialmente limitación “supranuclear” de la mirada y que permite denominar así a este padecimiento neurodegenerativo. En la exploración física del enfermo con PSP se aprecia esta limitación con la imposibilidad para el seguimiento voluntario de

estímulos en la mirada vertical y con preservación de la movilidad en la maniobra de “ojos de muñeca” (60).

La incidencia de la PSP es de 0.3 a 1.1 x 100,000 habitantes, de 5.3 x 100,000 en mayores de 55 años y con una prevalencia de 1.3-5 x 100,000 habitantes (61). El factor de riesgo genético más importante es el tener mutaciones en el cromosoma 17 (MAPT: proteína tau asociada a los microtúbulos); no se han reconocido factores de riesgo ni de protección ambiental (62).

La proteína característica de la PSP es también la tau que suele afectar al sistema nervioso por la presencia de inclusiones gliales que condicionan los “astrocitos copetudos” y los “cuerpos en espiral” (oligodendrocitos) y marañas NF neuronales que se aprecian principalmente a nivel del núcleo subtalámico, la sustancia nigra mesencefálica, el globo pálido y en la corteza. A nivel macroscópico existe atrofia frontal y atrofia mesencefálica con despigmentación de la sustancia nigra, pero a diferencia de la EP hay adelgazamiento del pedúnculo cerebeloso superior y el mesencéfalo se nota globalmente atrofiado. Al igual que el EA, la PSP es una taupatía, sin embargo, en aquella, las seis isoformas de tau pueden encontrarse en el cerebro enfermo, mientras que en la PSP, el empalme alternativo de los exones 2 y 3, resulta en que los sitios fosforilados aberrantes de tau de la PSP sean para las isoformas 3 (3R) y 4 (4R); otra diferencia importante es la abundancia de la proteína tau tanto en la sustancia gris como en la blanca, en esta última predomina la isoforma 4 (4R) (63, 64); por tanto, los agregados de NFT en la PSP se encuentran en la glía en sustancia gris y en la glia de la sustancia blanca (“astrocitos copetudos”) (65); en la oligodendroglía se pueden observar los denominados “cuerpos espirales” (66).

Este padecimiento generalmente inicia entre los 40 y 60 años de edad (aunque puede hacerlo antes o después) y suele tener características comunes a la EP, pero también a las Taupatías, en donde además de la PSP, se encuentran la degeneración cortico-basal (CBD) y la demencia fronto-temporal asociada al cromosoma 17 (FTDP-17) (65).

La mayoría de los casos de PSP se consideran esporádicos, sin embargo, las mutaciones en MAPT son consideradas de riesgo para padecer PSP y resulta

obligado estudiar genéticamente a un individuo que tiene antecedentes familiares, de la misma enfermedad en parientes de primer o segundo grado (62).

La imagen de tomografía computada o de Resonancia Magnética muestra en estos pacientes atrofia fronto-temporal y característicamente se aprecia disminución del tamaño mesencefálico con adelgazamiento importante del pedúnculo cerebeloso superior, lo que en la imagen de TC o de RM se aprecia como el “colibrí” o “pingüino barrigón” (66). La FDG-PET muestra hipometabolismo fronto-temporal y la captación dopaminérgica en los núcleos basales es similar a la imagen que se aprecia en la EP y en la AMS (67, 68).

Demencias No-Neurodegenerativas

Se considera una demencia no neurodegenerativa a la que sufre un paciente en forma aguda (ej. vascular) o progresiva (ej. hidrocefalia normotensa del adulto) por una etiología diferente a las proteinopatías.

Las causas por las que un proceso demencial puede presentarse son múltiples y siempre convendrá que en todo paciente con un deterioro progresivo de la función cognitiva se descarte la posibilidad de un proceso diferente al neurodegenerativo.

Se ha propuesto el utilizar la nemotecnia de “vitaminas” para recordar que una demencia puede tener un origen “vascular”, “iatrogénico”, “traumático”, “autoinmune”, “metabólico”, “infeccioso”, “neoplásico”, “adicciones” y a enfermedades “sistémicas”.

Generalmente el cuadro clínico mismo permite hacer la diferenciación entre un proceso vascular que tiene una presentación escalonada (cada vez que el sujeto sufre de un nuevo infarto, baja un escalón en su funcionalidad), mientras que los procesos neurodegenerativos siguen una progresión lineal. La exposición a un fármaco antidopaminérgico (flunarizina, cinnarizina, haloperidol, levomepromacina, etc) contribuye a identificar que el deterioro cognitivo y motor con parkinsonismo que presenta el paciente es secundario a la administración de un fármaco y no a un proceso neurodegenerativo. Los procesos infecciosos generalmente son de más rápida presentación y suelen manifestarse con fiebre, ataque al estado general, leucocitosis y a un líquido cefalorraquídeo con marcadores de inflamación. Las

neoplasias se asocian a pérdida de peso, un síndrome consuntivo, cráneo hipertensivo y generalmente signos de focalización. La hidrocefalia normotensa del adulto, puede confundirse con un parkinsonismo neurodegenerativo, aunque la triada clásica de demencia, apraxia de la marcha e incontinencia urinaria permite distinguirla y más con una imagen que corrobore la hidrocefalia y la permeación periventricular característica. Las adicciones asociadas a demencia se identifican por una historia de exposición; en algunas resulta fácil identificar el alcoholismo crónico relacionado a una mala nutrición que explica el síndrome de demencia, oftalmoplegia y ataxia características de la enfermedad de Wernicke, la cual al asociarse a confabulación se conoce como enfermedad de Korsakoff, ambas son por déficit de tiamina. Algunas enfermedades sistémicas que inician en algún órgano y tienen repercusión generalizada se asocian a demencia, tales como el hipotiroidismo, la insuficiencia renal, hepática, respiratoria y cardíaca; generalmente en ellas, el cuadro clínico y los exámenes de laboratorio y gabinete nos permiten hacer el diagnóstico diferencial (69).

1.3 Biomarcadores y enfermedades neurodegenerativas

Un biomarcador es la característica objetivamente medible y evaluable de un proceso biológico normal, patológico o de respuesta farmacológica a una intervención terapéutica. Los biomarcadores pueden ser divididos en clínicos, imagenológicos, bioquímicos, genéticos, proteómicos y patológicos dependiendo de que es lo que miden. Sirven por tanto, para confirmar un diagnóstico, hacer proyecciones epidemiológicas, pruebas predictivas, monitorizar la progresión de la enfermedad después de diagnosticarla, desarrollar fármacos, medir respuesta al tratamiento y evaluar la función (70) .

Idealmente convendría identificar a cualquier sujeto en riesgo de padecer un proceso neurodegenerativo previamente a su inicio o muy al principio del proceso, cuando está cursando apenas con un deterioro cognitivo mínimo en el caso de la EA o con las manifestaciones premotoras (trastorno conductual del sueño MOR, constipación, anosmia, depresión) en el caso de la EP. También convendría tener

formas de evaluar la progresión de la enfermedad, que sabemos que correlaciona directamente con el esparcimiento de los agregados proteicos en los diferentes niveles del SNC y SNP, y sería importante medir aspectos clínicos específicos como la demencia (mediante el MMSE por ejemplo), la depresión (con la escala de Hamilton por ejemplo) o las fluctuaciones motoras (con el UPDRS por ejemplo) (71).

La necesidad de biomarcadores para la neurodegeneración por tanto, van desde establecer un diagnóstico preclínico, tener certeza diagnóstica (ante la variabilidad de síntomas, signos, síndromes clínicos), establecer terapéuticas específicas y adecuadamente justificadas, mejorar la calidad de vida del enfermo, reconocer las medidas neuroprotectoras y la terapia realmente modificadora de la enfermedad, dar tratamiento neurorestaurativo, evitar diagnósticos incorrectos, identificar la comorbilidad ante una población que suele ser heterogénea (72).

De hecho la única manera de hacer el diagnóstico de precisión hasta ahora de un proceso neurodegenerativo es mediante la demostración de la presencia de NFT en la EA o de neuritas o cuerpos de Lewy en la EP o de astrocitos copetudos u oligodendrocitos con inclusiones espirales para la PSP, en tejido cerebral obtenido mediante autopsia. Respecto a las sinucleopatías, la demostración de estos agregados proteicos se consiguió gracias a la inmunohistoquímica cuando la Prof. María Spillantini y sus colaboradores identificaron la relación entre la α -sinucleína como el principal componente de los cuerpos de Lewy y de las neuritas de Lewy (73), lo cual ha dado lugar a la búsqueda de esta proteína en los pacientes con EP en el sistema nervioso central, en el periférico, y luego en la región preganglionar parasimpática y en las proyecciones simpáticas de la médula espinal a nivel torácico y en otras partes del cuerpo incluyendo al epicardio cardiaco, la vejiga urinaria, la médula adrenal y en la piel (59, 74).

Sabiendo que la piel puede ser un espejo de lo que está ocurriendo en el cerebro en la neurodegeneración (75) nos dimos a la tarea de buscar la presencia de la proteína tau y de la α -sinucleína en sujetos con enfermedades degenerativas del sistema nervioso, intentando encontrar un biomarcador útil para buscar diferenciar los padecimientos neurodegenerativos entre sí.

JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas son un verdadero reto porque aunque cada una de ellas tiene características distintivas suelen coincidir en algunas de sus manifestaciones clínicas (edad de presentación, alteraciones de memoria, depresión), de imagen estructural (atrofia cerebral) y desafortunadamente de imagen funcional (SPECT o PET con fluordopa, el PiB (Pittsburgh 11C-F 18) para amiloide y para Tau (el pTau181 y el pTau231). Por ello, no siempre es sencillo diferenciarlas, de manera que en el mundo se han buscado biomarcadores que faciliten el tener un mejor diagnóstico de manera temprana. Si la piel puede ser un espejo del tejido nervioso, dado que las células de ambos tejidos tienen un origen ectodérmico y la producción de proteínas se basa en la programación celular localizada en el ADN, transcrita al ARN y traducida en la formación de proteínas, las células de ambos tejidos pueden mostrar características comunes. En base a lo anterior y dado que las proteínopatías son enfermedades sistémicas, podrían encontrarse manifestaciones de las enfermedades neurodegenerativas en la piel.

HIPOTESIS

Si la piel expresa al igual que el cerebro los agregados proteicos característicos de las enfermedades neurodegenerativas por tanto, debe ser posible demostrar por inmunohistoquímica las proteínas anormales que caracterizan a la EA, la EP y a la PSP.

1. OBJETIVOS

- 1.1. Demostrar la presencia de α -sinucleína y Tau en la piel
- 1.2. Demostrar la diferencia en expresión α -sinucleína y Tau en sujetos con EA, EP y PSP y con respecto a sujetos sanos y con otras formas de demencia.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Descripción general

Previa autorización del Comité de Ética e Investigación del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” de nuestra ciudad y firma del Consentimiento

informado por parte del tutor o del propio sujeto de investigación, se tomaron biopsias de piel de 4 mm a nivel retroauricular 3 centímetros por detrás de la inserción del pabellón auricular, a pacientes y sujetos control. El tejido fue fijado en parafina y sometido a las técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Se utilizaron anticuerpos dirigidos a distintos epítopes de las proteínas Tau y α -sinucleína y se analizaron mediante microscopía de luz y confocal. En algunos sujetos, las biopsias contralaterales se homogenizaron para identificar la presencia de las proteínas de interés por medio de Western blot. A través del análisis digital de microfotografías de las inmunotinciones se obtuvo el porcentaje de área positiva para cada inmunotinción. Los datos obtenidos se agruparon en dos estudios que se reportaron de manera independiente y que se describen en esta sección.

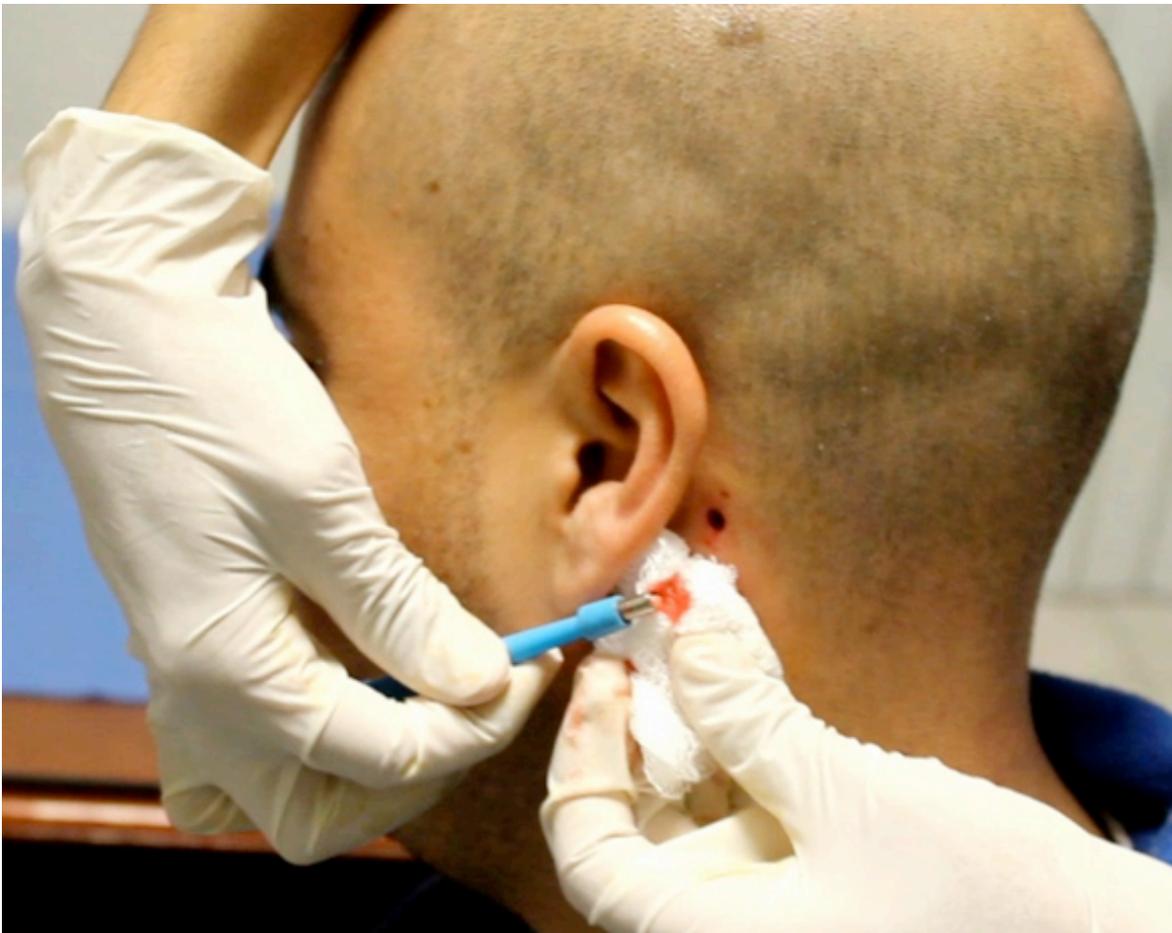


Figura 1. La toma de biopsia se realiza 3 cm por detrás de la inserción del pabellón auricular utilizando un punch de 4 mm de diámetro. Es un procedimiento de mínima invasión y con muy pocas posibilidades de complicación.

2.2 Criterios de inclusión y exclusión

La selección de pacientes se hizo de la consulta externa del alumno y del Servicio de Neurología del Hospital Central, tomando como criterios de inclusión el padecer de EA, EP o DND, y el grupo control se conformó de sujetos sanos (muchas veces la pareja del enfermo) que aceptaron participar como sujeto control dentro del estudio.

Se hizo una distribución de los sujetos en cuatro grupos: 1. Padecer EA de acuerdo a los criterios diagnósticos propuestos por los criterios del NINCDS-ARDA (76), que son los siguientes: diagnóstico clínico de demencia: tener dos o más déficits en las áreas de la cognición con pérdida progresiva de la memoria, sin alteraciones de la consciencia, con una edad de inicio entre los 40 y los 90 años, con ausencia de enfermedades sistémicas o cerebrales que pudieran provocar el déficit de la memoria y cognición encontrado, y con una imagen de cráneo mostrando atrofia cerebral, y una calificación en el instrumento validado Minimal State Scale (anexo 1) inferior a 27 puntos . 2. El segundo grupo fue conformado por pacientes EP diagnosticada por clínica, utilizando los criterios diagnósticos de la Society Brain Bank Criteria (77) que son los siguientes: bradicinecia, rigidez, temblor de reposo de 4 a 6 Hz, inestabilidad postural sin historia de enfermedad vascular cerebral, trauma craneal, encefalitis o crisis oculógiras; sin tratamiento neuroléptico previo al diagnóstico, temblor inicialmente unilateral, demencia, alteraciones de lenguaje, hiperreflexia, Babinski, tumor cerebral, hidrocefalia normotensa o con ausencia de respuesta a la levodopa, exposición a la neurotoxina MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina), la cual produce síntomas muy similares a EP Con al menos una de las siguientes características: temblor unilateral inicial, de reposo, alteración progresiva, asimétrica de inicio, con excelente respuesta a la levodopa, que después de cinco años induce a coreoatetosis importante y con una evolución crónica. 3. El tercer grupo se conformó por cuatro sujetos del Hospital Central y seis más del Instituto Nacional de Neurología y

Neurocirugía con diagnóstico de PSP probable , los cuales cumplieran los criterios NINDS-SPSP (National Institute of Neurological Disorders and Stroke and Society for Progressive Supranuclear Palsy (78), que son los siguientes: historia de parkinsonismo axial simétrico, deterioro cognoscitivo, parálisis de la mirada vertical, incontinencia de las emociones, inestabilidad postural, y, por imagen la presencia de atrofia del pedúnculo cerebeloso superior y/ó el signo del “colibrí” o del “pingüino barrigón” (79), así como una pobre y transitoria respuesta a la levodopa. 4. El cuarto grupo fue conformado por sujetos con enfermedad demencial no degenerativa (hidrocefalia normotensa, enfermedad vascular cerebral, epilepsia, trauma craneal (69). Un grupo final control conformado por sujetos aparentemente sanos con características demográficas similares a las de los pacientes.

Los criterios de exclusión fueron a) estar padeciendo de un proceso infeccioso local (cuello) o sistémico que contraindicara el procedimiento y b) tener un problema de coagulación sanguínea que pudiera complicar el procedimiento y c) para participar como sujeto control, el tener parkinsonismo (vascular, traumática, tóxica, iatrogénica o por hidrocefalia), tener una imagen con lesiones vasculares, hidrocefalia, procesos ocupativos).

2.3 Estudios de Imagen

Todos los sujetos con EA, EP y DND contaron con estudio de imagen (TC de cráneo o IRM). La mayoría de los pacientes con enfermedad de Parkinson EP tenían también estudio de imagen (que no necesariamente está indicada para el apoyo diagnóstico, aunque ahora corremos un protocolo paralelo para evaluar su importancia) y los sujetos control no fueron sometidos a este estudio.

Los hallazgos característicos de la imagen que permitieron distinguir los pacientes con DND de los pacientes con EA son la presencia de atrofia generalizada, más prominente a nivel hipocampal, mostrándose de manera importante en la punta temporal de los ventrículos laterales en EA. La imagen de los pacientes con hidrocefalia normotensa muestra crecimiento ventricular con permeación de líquido cefalorraquídeo a nivel intersticial periventricular. En la epilepsia se suele encontrar esclerosis hipocampal, mientras que en la enfermedad

vascular cerebral se aprecian zonas de infarto ya sea por oclusión de pequeños, medianos o grandes vasos, de origen ateroscleroso o cardioembólico, mientras que en el trauma craneal se suelen apreciar las zonas de encefalomalacia o bien la ocupación epi o subdural por sangrado que comprime el parénquima cerebral, lo que ocasiona el problema cognoscitivo.

2.4 Estudio del estado mental

Todos los participantes fueron sometidos a la prueba de Minimal State Examination (MMSE) para corroborar el deterioro cognoscitivo y tener un valor numérico; idealmente se debe tener entre 27 y 30 puntos para considerarse sin deterioro mental (Ver anexo 1).

2.5 Técnica de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

Anticuerpos

Se utilizaron anticuerpos contra epítopes fosforilados y no fosforilados, ya que la fosforilación tanto de α -sinucleína como de Tau están relacionadas a la agregación disfunción y proceso patológico. En la figura 2 se muestra en la parte superior un esquema de la proteína Tau con dos sitios de fosforilación contra los que se dirigen los anticuerpos más reportados en la literatura. La fosforilación en el sitio Ser396 (reconocido por el anticuerpo denominado PHF) se incrementa tanto en procesos patológicos como con la edad mientras que el sitio Ser 202 (reconocido por el anticuerpo AT8) es característico de las taupatías (80). Ensayos en tejido cerebral humano posmortem confirmaron el marcaje de NFTs con ambos anticuerpos (ver sección resultados), que fueron 1) Monoclonal de conejo anti-tau (pSer396) (E178) (PHF; Ab32057, Abcam, Cambridge, MA) y 2) Monoclonal de ratón anti-tau pSer202+pT205 (AT8, MN1020, Thermo Scientific, Rockford, IL).

En la parte inferior de la figura se muestra el sitio de fosforilación de α -sinucleína. Si bien se probó un anticuerpo ante este epítope, en cerebro humano marcó numerosas estructuras además de los cuerpos de Lewy; por lo tanto los anticuerpos que se utilizaron en este trabajo fueron contra aminoácidos no

fosforilados cercanos a la región C terminal de la molécula, que marcaban exclusivamente cuerpos de Lewy (ver sección resultados). Se utilizaron 2 anticuerpos obtenidos en ratón, un policlonal y un monoclonar (Thermo Scientific, Rockford, IL y Bencton Dickinson Biosciences, respectivamente). Un anticuerpo policlonal de ratón de la casa Bencton Dickinson Biosciences, dirigido para α -sinucleína (81), buscando detectar con ambos el epítipo mas importante patológicamente demostrado la pSer129, El anticuerpo secundario con biotina se obtuvo de la casa DAKO (Carpinteria, CA) y para la inmunofluorescencia fueron empleados anticuerpos de cabra anti-conejo y anti-ratón marcados con Alexa-Flour 488 y con Cy5(A1101 y A10523 Molecular Probes Eugene, OR, respectivamente).

El núcleo celular fue evidenciado con una tinción nucleica naranja denominada Sytox (S-11368, de Molecular Probes, Eugene, OR).

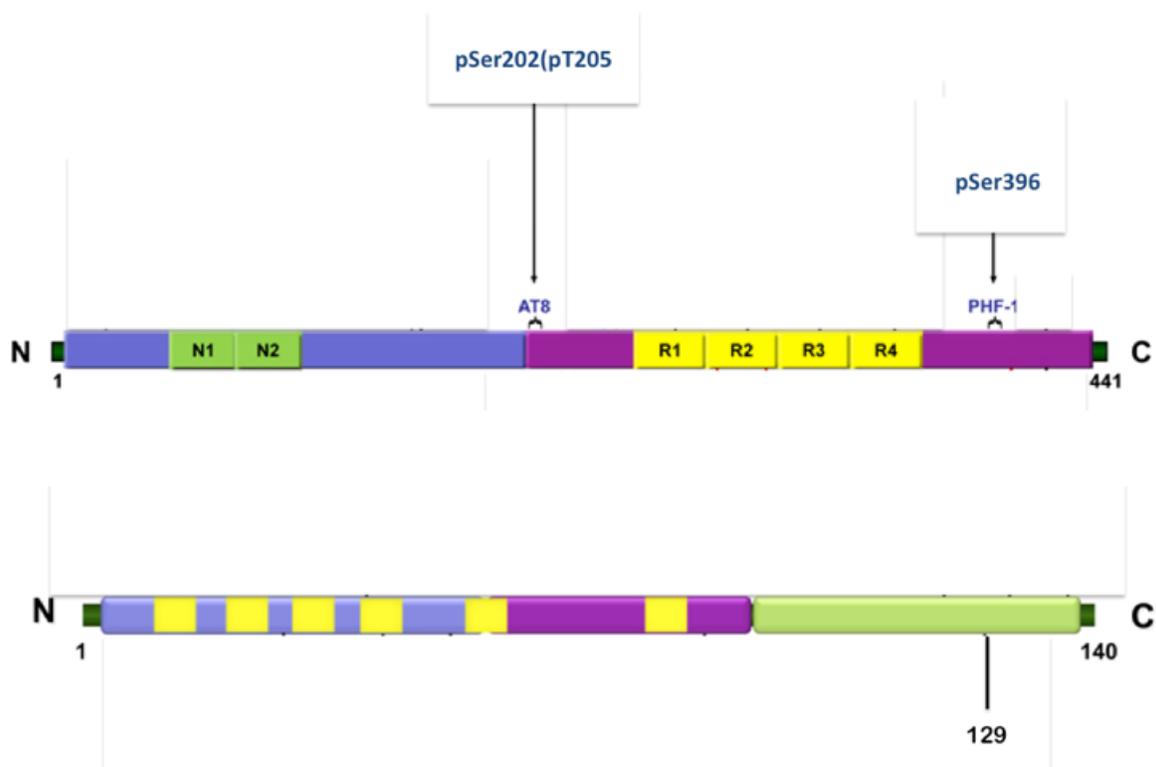


Figura 2. La proteína tau está conformada por cuatrocientos cuarenta y un aminoácidos y los sitios a los que se dirigen los anticuerpos que utilizamos son pS202 (AT8) y pSer396 (PHF). La α -sinucleína es una proteína de ciento cuarenta aminoácidos y se emplearon anticuerpos contra formas no fosforiladas de la proteína.

Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Todos los participantes fueron biopsiados con un punch de 4 mm, 3 centímetros posterior a la inserción del oído, con previa asepsia de la región y aplicación de lidocaína al 2 % como anestesia local. El tejido fue colocado en paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1 M durante 24 horas. Posteriormente se realizó el proceso de inclusión en parafina. Del bloque en parafina se realizaron cortes coronales de 4 µm que fueron colocados en laminillas electrocargadas (Biocare Medical LLC, Concord, USA) para luego ser desparafinadas mediante calor (60o C, durante 10 minutos), seguido por pasos a través de xileno y etanol, para luego rehidratar. Para la recuperación del epítome, las laminillas con tres secciones de tejido fueron sumergidas en solución DIVA (Biocare Medical LLC, Concord, CA) y colocadas en una olla express durante 30 minutos a 1000 C, para enseguida ser enfriadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Después de tres baños con agua bidestilada, se les agotó la peroxidasa endógena por incubación durante 15 minutos con peróxido de hidrógeno al 3 %. Enseguida las laminillas fueron sometidas a tres pasos de 15 minutos cada uno a temperatura ambiente para bloquear el fondo que puede dar una tinción inespecífica (Biocare Medical LLC, Concord CA) y la biotina endógena y la unida a proteínas (avidin/biotin blocking Kit, Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA), seguido siempre de enjuagues con TBS-Tween. La incubación con anticuerpos monoclonales fue durante 1 hora, seguido por la aplicación de un anticuerpo secundario marcado con estreptavidina-biotina durante 15 minutos a temperatura ambiente. La actividad de la peroxidasa fue visualizada por incubación de los cortes con diaminobenzidina, para obtener una coloración parda o bien con 3-amino-etil-carbazol para obtener una coloración rojiza, lo que permitió poder diferenciar los gránulos inmunopositivos presentes en la epidermis de los gránulos de melanina. Los cortes fueron contra-teñidos con hematoxilina (Harris) y cubiertos con gelatina de glicerol. Las laminillas finalmente fueron revisadas con un microscopio de luz equipado con cámara digital. Para inmunofluorescencia, los anticuerpos primarios fueron incubados toda una noche a 4⁰ C; y el análisis se realizó mediante

microscopía confocal ((LEICA TCS SP2; Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Alemania)

2.6 Evaluación de las biopsias.

De cada biopsia se fotografiaron cinco campos por sección, a la misma amplificación (40x) y nivel de iluminación (Figura 3A), para facilitar la interpretación, medición y unificar criterios. Se probaron 3 métodos de semicuantificación de inmunopositividad que se describen a continuación.

1. Valoración de inmunopositividad en niveles. En la figura 3 B,C,D y E se muestran ejemplos de lo que constituiría inmunopositividad nula, escasa, moderada y abundante, imitando el método de cuantificación que se utiliza en patología para cuantificar las marañas neurofibrilares en hipocampo de los pacientes con EA en neuropatología acorde al sistema 3(82).

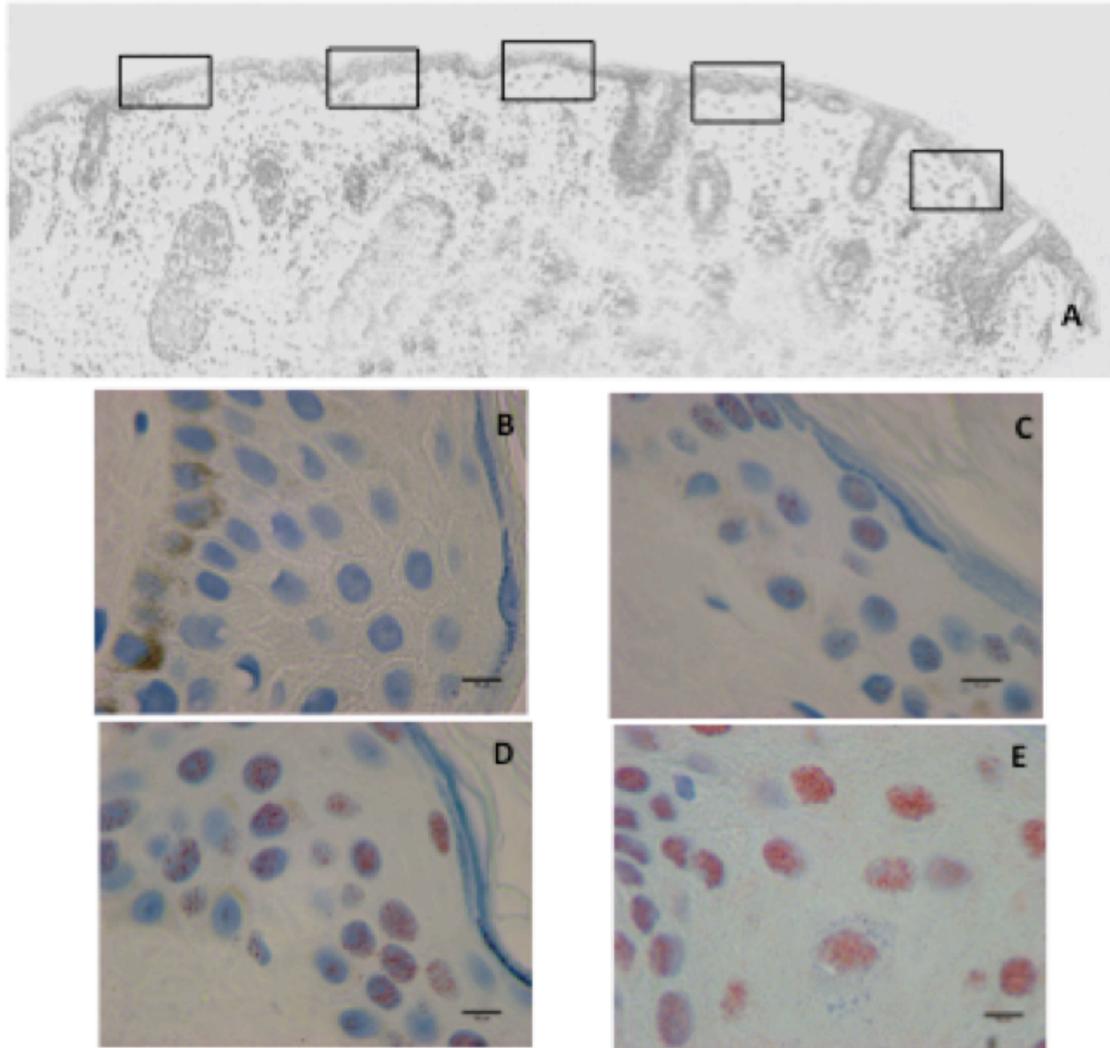


Figura 3. Se muestra como de cada biopsia se fotografiaron cinco campos (A), cada uno de ellos fue evaluado de acuerdo a un nivel de expresión en nula (B), escasa o + (C), moderada o ++ (D), abundante o +++ (E).

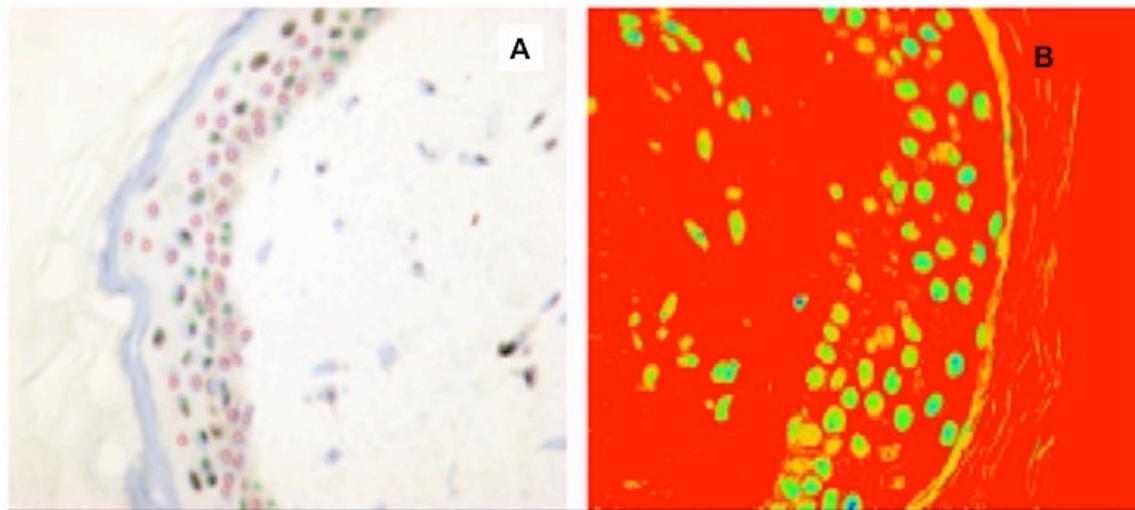


Figura 4. Ejemplos de la cuantificación de la inmunopositividad por conteo de células (A) y mediante procesamiento de imagen digital basado en el modelo RGB (rojo, verde, azul) (B)

2. Conteo de células inmunopositivas. En cada una de las cinco microfotografías se contaron al azar 40 células, en total 200 células entre inmunopositivas e inmunonegativas. Se consideró positiva cualquier célula que tuviera más de 3 gránulos de marcaje, y éste conteo se expresó en porcentaje de células positivas (Figura 4).

3. Procesamiento digital de imágenes. Se diseñó un método para el análisis digital utilizando un software comercial, Image Pro Plus 7 (MediaCybernetics, Bethesda, MD, USA). En este caso, se obtuvieron datos de % de área inmunopositiva. El método se describe con detalle en el anexo 3.

Por medio de los métodos 1 y 2, la observación por dos observadores independientes arrojó una coincidencia de 90%, mientras que entre el conteo celular y el análisis digital la coincidencia fue de 80%. El método escogido para analizar estadísticamente los datos y reportar los resultados fue el procesamiento digital de las imágenes.

2.7 Western blot

Con el fin de comprobar el peso molecular de las proteínas marcadas por inmunopositividad en piel, se procesaron algunas biopsias por Western blot. Utilizando como control positivo tejido cerebral de rata y humano, los tejidos fueron procesados para obtener 150-500 µg de proteína total homogeneizándolos en buffer de lisis (0.025 M Tris, 0.15M NaCl, 0.001 M EDTA, 1% NP-40 y glicerol al 5 %) a un pH de 7.4 y suplementado con inhibidores de proteasas y de fosfatasas (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). El sobrenadante fue recuperado mediante centrifugación 12000 x g por 10 minutos. La proteína total se cuantificó mediante el ensayo de BCA. 50-80µg se suspendieron en buffer Laemli 2X suplementado con 10% β-mercaptoetanol, hervido 10 min a 95 ° C y se corrieron en un gel SDS-PAGE al 10-15%. Las proteínas se transfirieron electroforéticamente a membranas de PVDF (2 µm, BioRad Laboratories, Hercules, CA) y se bloquearon con 3% de albúmina de suero bovino (BSA) en solución salina tamponada con Tris (pH 7,6) que contiene 0,1% de Tween (TBST) y se dejaron durante la noche a 4 ° C con PHF-Tau (1: 500) y AT8 (1: 250). Además, todas las membranas se marcaron con un anticuerpo dirigido contra la β-actina como control de una proteína en lisados enteros. Después de lavar con TBST, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (1: 5.000) en TBST + BSA al 3% durante 1h 30 min. Después de lavados posteriores, las bandas se visualizaron por quimioluminiscencia (Pierce, Rockford, IL EE.UU.), seguido por autorradiografía (83).

2.8 Análisis estadístico

Si bien los pacientes y controles se fueron reclutando según se tuvo acceso a ellos durante aproximadamente 2 años, para su análisis los datos obtenidos en este trabajo se agruparon en dos estudios. En el primero se comparó la presencia de proteína Tau en la epidermis de pacientes con EA, DND y sujetos sanos, y en el segundo la presencia de Tau y de α-sinucleína en pacientes con EP, PSP y sujetos sanos. En ambos estudios se utilizó el mismo tipo de análisis estadístico para comparar los 3 grupos de interés.

Mediante un análisis paramétrico (ANOVA, prueba de Tuckey y T de Student) se compararon las variables edad, y los puntajes en las escalas MMSE, Hohen Yahr y UPDRS. Los porcentajes de inmunopositividad fueron sometidos a análisis no paramétrico por medio de la prueba de Kruskal-Wallis, seguidos de la U-Mann Whitney para hacer una comparación entre los grupos. Se consideró significancia estadística ante una p menor a 0.05 para ANOVA, prueba de Tuckey, T de Student y Kruskal-Wallis, mientras que para la U-Mann Whitney se corrigió este nivel por el número de comparaciones entre grupos realizadas, siendo de 0.017. (84)

3. RESULTADOS

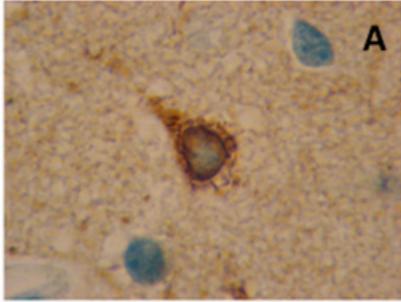
3.1 Presencia de Tau en la piel de pacientes con EA

En la primera fase, la comparación se efectuó entre sujetos control y pacientes con EA y DND. Los sujetos control y pacientes se encontraban prácticamente en la misma edad ($p=0.7$). El grupo control se conformó para este reporte por 17 sujetos sin enfermedad neurológica (MMSE normal); una población de 20 pacientes con diagnóstico de EA (un MMSE con una media de 14 puntos) formando el segundo grupo y el tercero conformado por 12 sujetos con DNND (Tabla 1). Se encontraron diferencias significativas entre las puntuaciones de MMSE entre EA y el grupo control ($p<0.001$), así como entre DND y el grupo control ($p<0.001$).

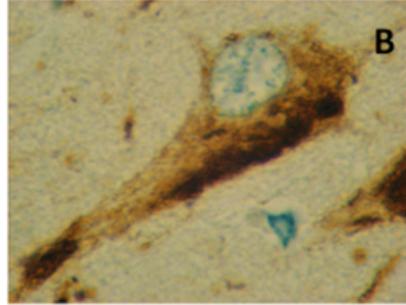
La efectividad de los anticuerpos y de la técnica inmunohistoquímica fueron previamente comprobadas en tejido cerebral de un paciente autopsiado con diagnóstico de EA. Ambos anticuerpos reaccionaron positivamente tanto en neuronas hipocampales como en corticales demostrándose la presencia de marañas neurofibrilares (Figura 5 A y B). Además, el anticuerpo PHF marcó de manera importante el neurópilo tanto en la región cortical como en el hipocampo (Figura 5 A). A continuación se analizó el patrón de inmunopositividad en las biopsias de la piel. Una positividad citoplásmica importante comparada con una escasa positividad nuclear se apreció en las células epidérmicas para el anticuerpo PHF (Figura 5C), las terminaciones nerviosas fueron también encontradas con

positividad. La población control expresó en su piel nula o mínima positividad para el anticuerpo AT8 (Figura 5D). Mientras que la piel de los sujetos con EA (Figura 5E) mostró una clara positividad tanto para PHF (Fig 5E) como para AT8 (Figura 5F) la que se ve claramente expresada en los queratinocitos especialmente a nivel nuclear.

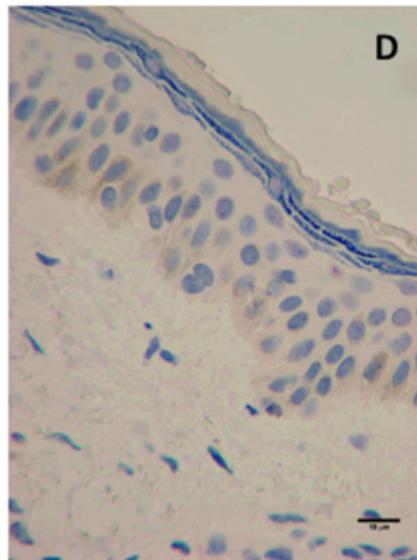
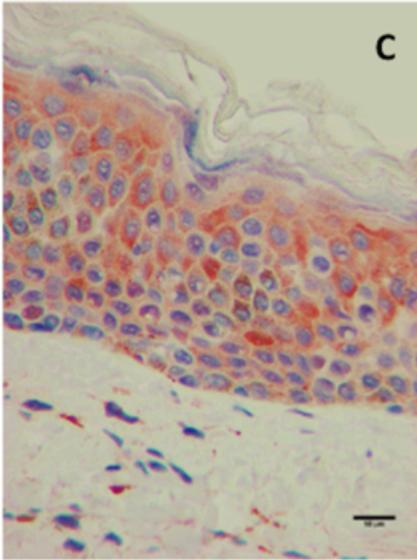
PHF



AT8



CONTROL



AD

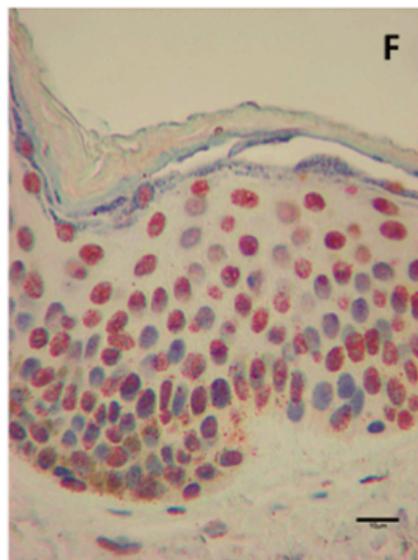
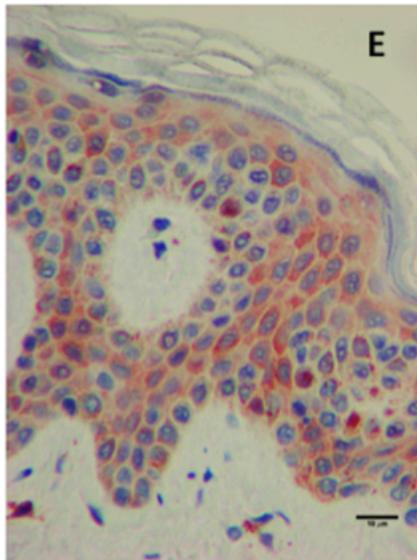


Figura 5 .Inmunohistoquímica. Neuronas hipocampales marcadas con PHF (A) y AT8 (B) mostrando marañas neurofibrilares; tejido proveniente del cerebro de un paciente con diagnóstico de EA (100X) con tinción de diaminobenzidina. Los patrones de inmunorreactividad in la epidermis de un sujeto control (C-D) y un paciente con EA (E-F), con anticuerpos para PHF y AT8, 40X tinción con amino-etil-carbazol.

Además, en los pacientes con EA (Figura 5F) se encontró con el anticuerpo AT8 una expresión yuxtaneuclear roja, con una tinción granular en los núcleos de queratinocitos, en todo el espesor de la epidermis. Cuando los anexos de la piel se evaluaron (Figura 6), la unidad pilosebácea (PSU) de los pacientes con EA mostró una fuerte inmunopositividad yuxtaneuclear roja a PHF y a AT8, tanto en la PSU (6A, 6C) como en la glándula ecrina (6B, 6C). El anticuerpo PHF tiñe el citoplasma de las células de las glándulas ecrinas intensamente, mientras que los núcleos celulares fueron inmunopositivos a AT8.

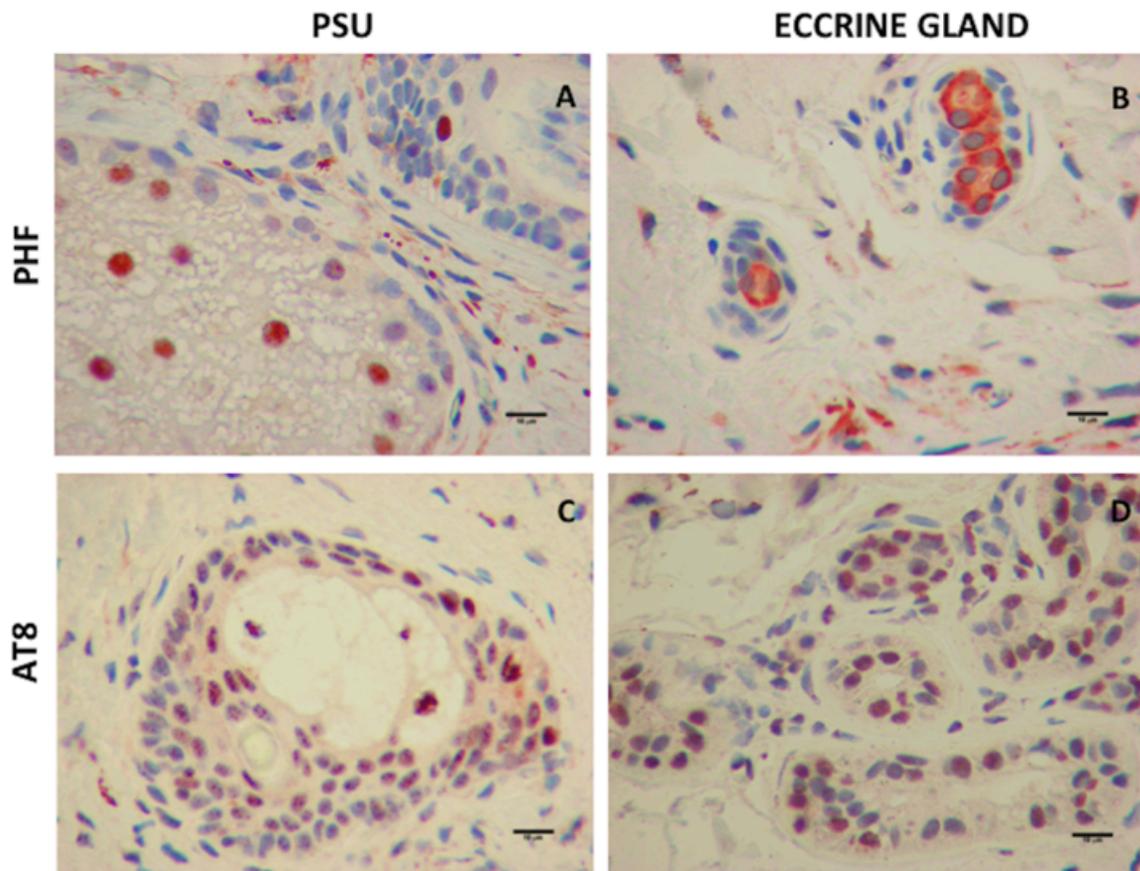


Figura 6. Patrones de inmunopositividad en apéndices de la piel de un paciente con EA. El anticuerpo AT8 mostró inmunopositividad a nivel yuxtannuclear en la unidad pilosebácea y en las glándulas écrinas. Tinción con amino-etil-carbazol a 40 X.

La localización nuclear y yuxtannuclear de inmunopositividad a AT8 en pacientes con EA fue confirmada por inmunofluorescencia (Figura 7F). mientras que el epítipo (porción de la molécula reconocida inmunológicamente) para PHF mostró inmunopositividad tanto en los controles (7A) como en los pacientes con EA (7E), con una localización citoplasmática predominante (Figura 7A y 7E). La localización de los gránulos se confirmó con la coloración distinta al delimitar los núcleos en rojo (Sytox, Figura 7C y 7G) y mediante las imágenes de ambos anticuerpos.

Se observó un patrón claramente diferente de inmunofluorescencia entre los controles y los pacientes con el AT8 (Figuras 7D y 7H).

El análisis comparativo del grupo de control con los pacientes con EA mostró que los controles presentan gránulos escasos, yuxtannucleares en los queratinocitos con el anticuerpo AT8 (Figura 7B); versus gránulos abundantes, en los pacientes con EA (Figura 7F). La presencia de positividad a AT8 en queratinocitos es clara en la fusión de imágenes (Figura 7H).

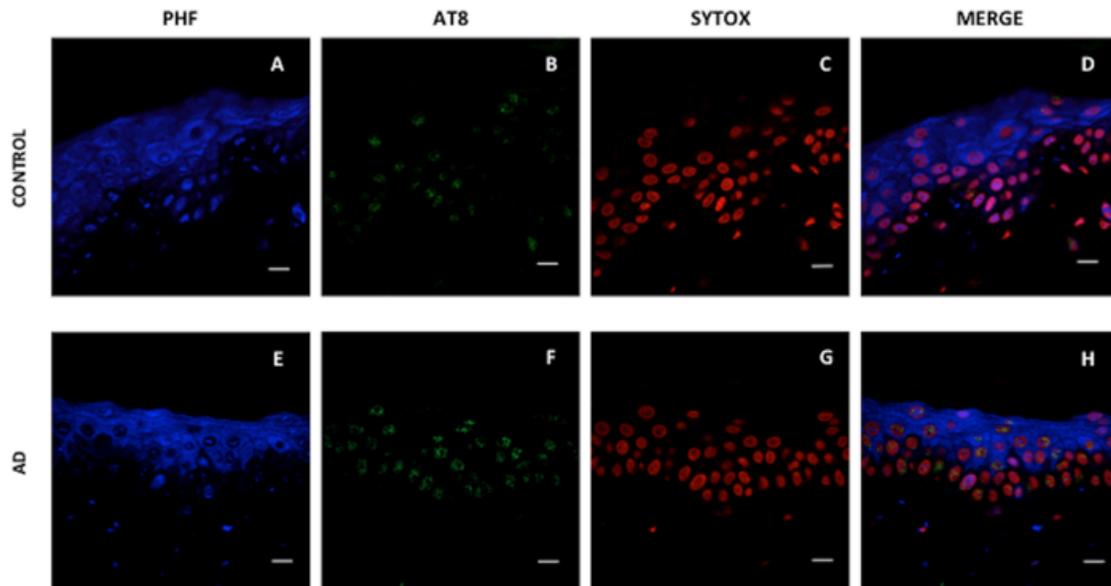


Figura 7. inmunofluorescencia en la piel. Microscopía confocal. Anticuerpos PHF (Cy5) y AT8 (Alexa Fluor 488). Sujeto control (A-D) y paciente con EA (E-H). Los núcleos celulares están teñidos con Sytox (C-G). La tinción yuxtanclear positiva se observó en los pacientes EA con el anticuerpo AT8. Barra en escala de 10 μ m.

La presencia de p-Tau en la piel humana fue confirmada mediante Western Blot (Figura 8).

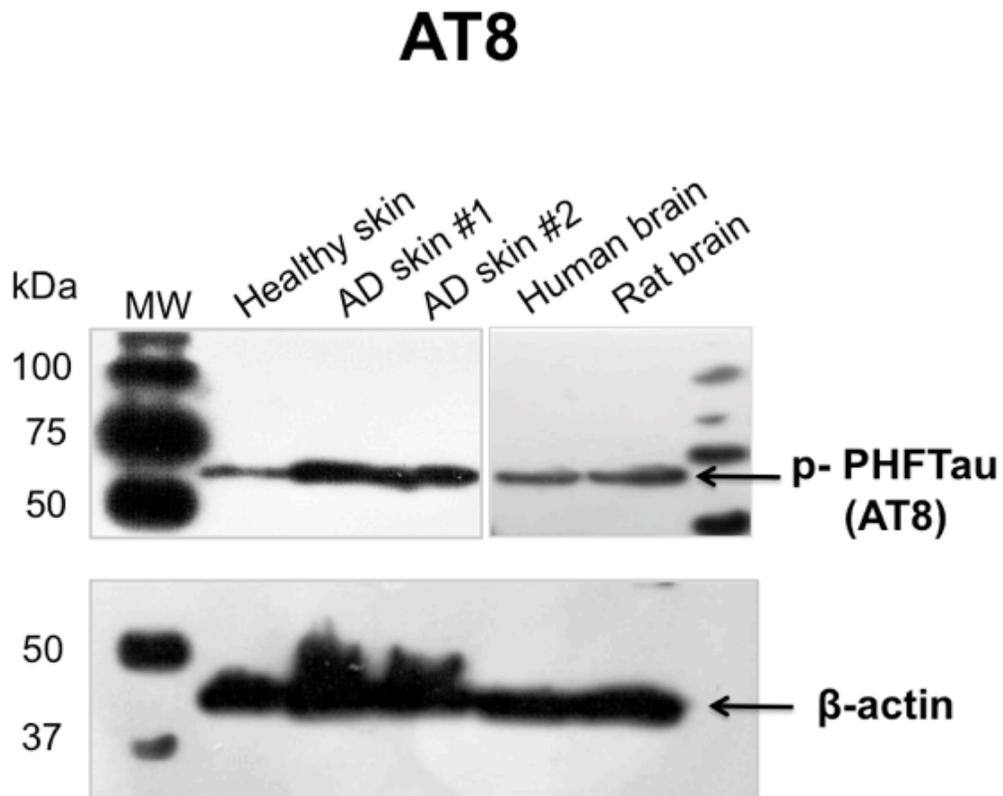


Figura 8. Western blot para AT8, demostrando su presencia en piel de sujeto control, en piel de dos enfermos con AD, en cerebro humano y en cerebro de rata.

Aunque se detectaron agregados de proteínas en los diferentes estratos de la piel y en sus anexos, la estructura que permitió un análisis profundo y la comparación de la inmunoreactividad para proteínas buscadas fue la epidermis (Figura 9).

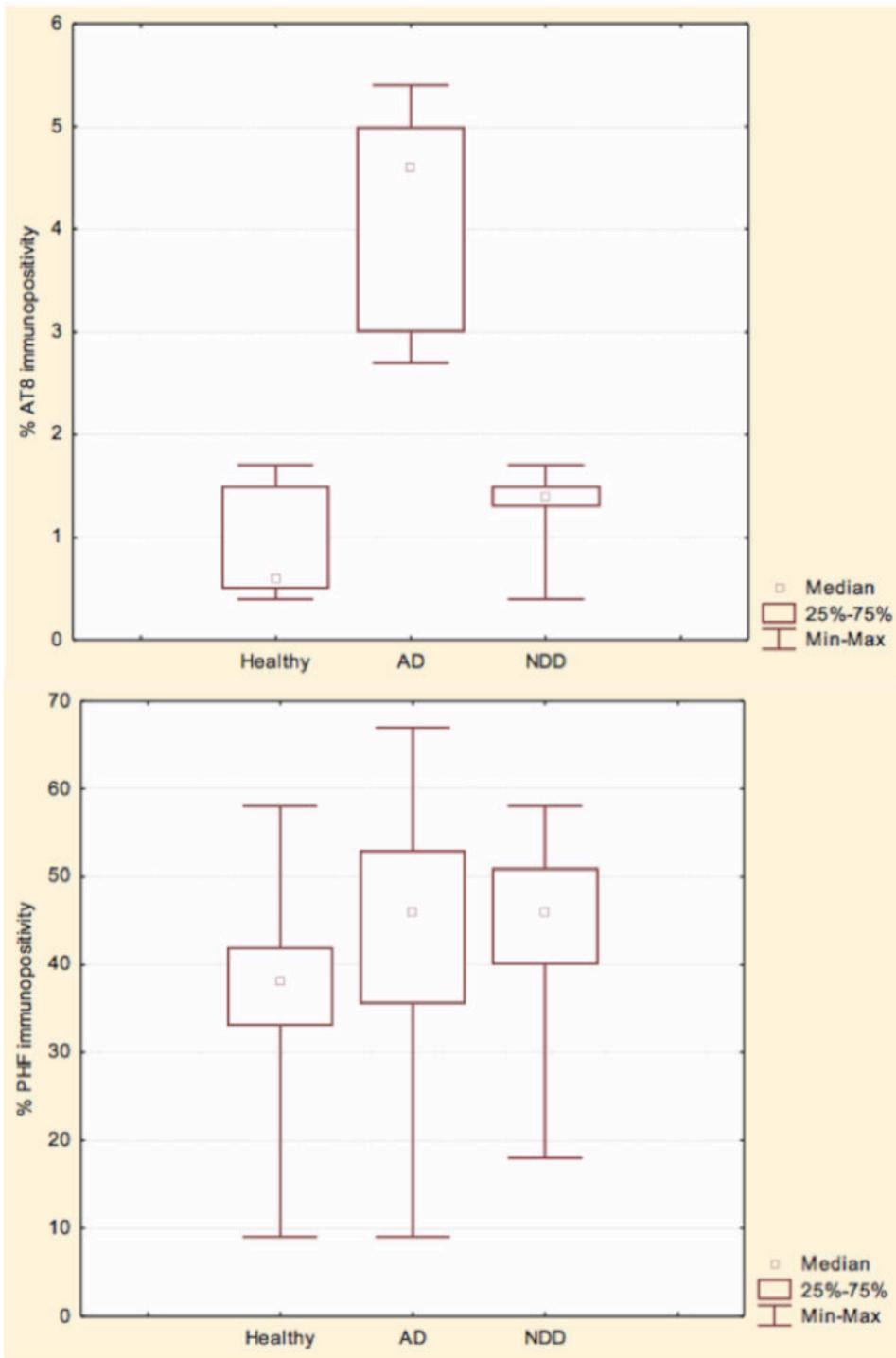


Figura 9. Inmunopositivity para AT8 y PHF expresada como porcentaje de inmunopositivity (píxeles / área total). La expresión de AT8 para el grupo EA en comparación con el grupo control fue significativamente mayor ($p < 0,001$), Existe una diferencia significativa entre el grupo de EA y el de DNND ($p < 0,001$). Las pruebas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney.

| Condición | Número de sujetos | Hombre/Mujer | Edad (años, media, \pm DE) | MMSE (puntos, Media \pm DE) | Porcentaje de inmunopositividad (mediana, min-max) | |
|-----------|-------------------|--------------|------------------------------|-------------------------------|--|----------------------------|
| | | | | | PHF | AT8 |
| Control | 17 | 6/11 | 72 \pm 14 | 29.4 \pm 1.4 | 38(9-58) | 0.6 (0.4-1.7) ^A |
| EA | 20 | 8/12 | 72 \pm 9 | 14.5 \pm 7.3 ^A | 46 (9-67) | 4.6 (2.7-5.4) |
| DND | 12 | 9/3 | 76 \pm 13 | 17.2 \pm 9.7 ^A | 46 (18-58) | 1.4 (0.3-1.7) ^B |

Tabla1. Encontramos diferencias significativas en la calificación del MMSE y en el % de inmunopositividad para AT8 con una $p < 0.001$ al comparar el grupo control con el de EA. Se realizaron ANOVA y prueba de Tuckey para comparar la edad y el MMSE. Se usó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la U de Mann-Whitney para los porcentajes de inmunopositividad.

La inmunopositividad a PHF fue similar en los 3 grupos de pacientes [H (2, N = 49) = 5,1, $p = 0,08$]. Por el contrario, el marcaje con el anticuerpo AT8 fue significativamente diferente entre los grupos [H (2, N = 49) = 35,8, $p < 0,001$]. El análisis mostró que entre los grupos de pacientes con EA presentaron una inmunopositividad significativamente mayor a AT8 que los controles y que los pacientes que sufren de DND ($p < 0,001$).

3.2 Presencia de Tau fosforilada y α -sinucleína en piel de pacientes con EP y PSP

En una segunda fase, se evaluó la presencia de Tau y α -sinucleína en sujetos control y pacientes con EP y PSP. Como se muestra en la Tabla 2, los pacientes y sujetos sanos tuvieron una media de edad similar. En la parte de evaluación clínica con un tiempo de evolución de enfermedad similar, tanto la prueba del MMSE como la Hohen-Yahr mostraron diferencias significativas entre los grupos EP y PSP respecto al grupo control, mientras que la prueba UDPRS arrojó resultados similares para ambos grupos. Además, en cuanto a deterioro

cognitivo evaluado por medio del MMSE, el grupo con PSP resultó significativamente más afectado que el EP ($p < 0.01$).

| | Control | EP | PSP |
|---|-------------|---------------------------|----------------------------|
| Hombres/ Mujeres | 11/6 | 13/4 | 3/7 |
| Edad, años (media \pm SD) | 71 \pm 14 | 68 \pm 9 | 71 \pm 8 |
| Tiempo de evolución (media \pm DE) | - | 6.1 \pm 3.8 | 5.7 \pm 3.1 |
| MMSE (media \pm DE) | 30 | 25 \pm 5 ^{A,B} | 16.7 \pm 7 ^A |
| Hoehn-Yahr (media \pm DE) | - | 3.5 \pm 0.8 | 4.3 \pm 0.9 ^b |
| UPDRS (media \pm DE) | - | 68 \pm 35 | 97 \pm 41 |

Tabla 2. Características generales de la población. Enfermedad de Parkinson (EP), Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP). A $p < 0.01$ vs controles, B $p < 0.01$ vs. EP, la prueba de ANOVA seguida de la prueba de Tuckey . $p < 0.05$ vs PD, t de Student.

La presencia de α -sinucleína se demostró primeramente en tejido cerebral proveniente de la pars compacta mesencefálica de un paciente con EP, con la presencia de cuerpos de Lewy (Figura 10C) y con positividad en las terminales nerviosas periféricas en la dermis. La presencia de Tau ya la habíamos corroborado previamente en la primera fase de nuestro estudio, y se demostró nuevamente en esta fase del estudio, agregando su expresión en terminales nerviosas periféricas (Figura 10). La expresión de Tau y α -sinucleína se comprobó mediante Western blot en cerebro y piel humana, así como en cerebro de rata (Figura 10).

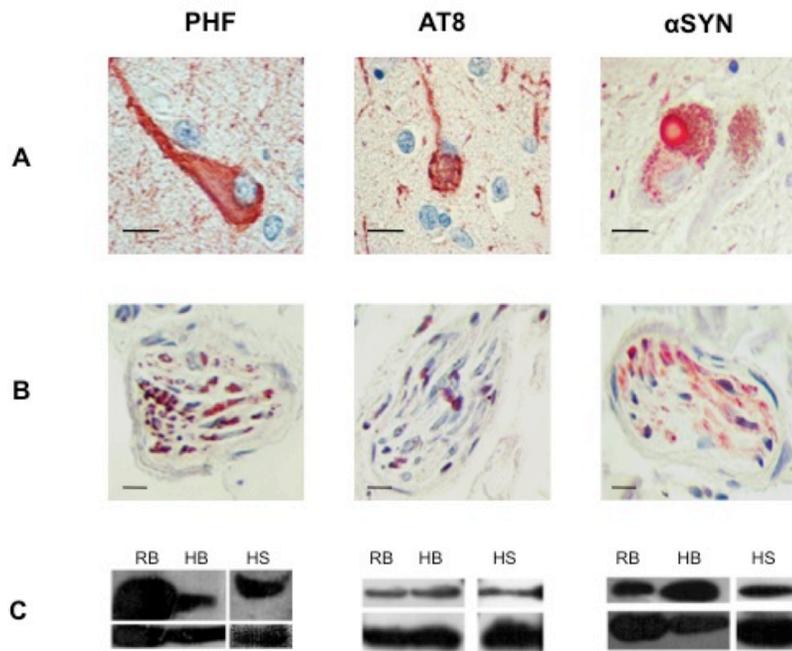


Figura 10. (A) 1 y 2, Identificación de las proteínas Tau y α -Syn. (A) Sistema nervioso central. Madejas neurofibrilares en neuronas del hipocampo. Anticuerpos PHF y AT8 en un paciente con EA (1000 y 400X).(A)-3. Cuerpos de Lewy en neuronas mesencefálicas de un paciente con EP (α -sinucleína, 1000X). Barra a escala: 20 μ m. (B) Nervios dérmicos con tinción positiva para Tau (PHF y AT8) y alfa sinucleína. Barra a escala: 10 μ m (C) Western-blot. Demostración de Tau (PHF y AT8) y α -sinucleína (arriba) en cerebro de rata (RB), cerebro humano (HB) y la piel humana (HS), Control: β -actina (abajo).

Usando la técnica de inmunohistoquímica y los anticuerpos validados, buscamos la presencia de PHF, AT8 y α -sinucleína en las biopsias de piel de los tres grupos a analizar en esta fase. La positividad para PHF se encontró presente en toda la epidermis, tanto en la capa de células basales como en los queratinocitos y su localización fue predominantemente citoplásmica (figura 11, columna de la izquierda). En contraste, la inmunopositividad para AT8 se encontró dentro o alrededor de núcleos de células de la epidermis en los grupos de PSP y EP, mientras que estaba casi ausente en el grupo de control (Figura 11, columna central). La inmunopositividad para α -sinucleína en el grupo control y de PSP estaba presente en las células basales de la epidermis en forma escasa y dispersa,

mientras que en el grupo de EP la inmunopositividad fue abundante e intensa en el estrato de células basales (Figura 11, columna derecha). Usando microscopía confocal (Figura 12), se observó una mayor expresión nuclear de AT8 en PSP y PD (F, J) y mayor inmunopositividad citoplasmática para α -sinucleína en EP (I). En comparación con los controles, la imagen PSP mostró mayor inmunopositividad para AT8 (H), mientras que hubo una clara sobre posición de para AT8 y α -sinucleína en la imagen del paciente con EP (L). La inmunopositividad con α -sinucleína también se observó en los queratinocitos.

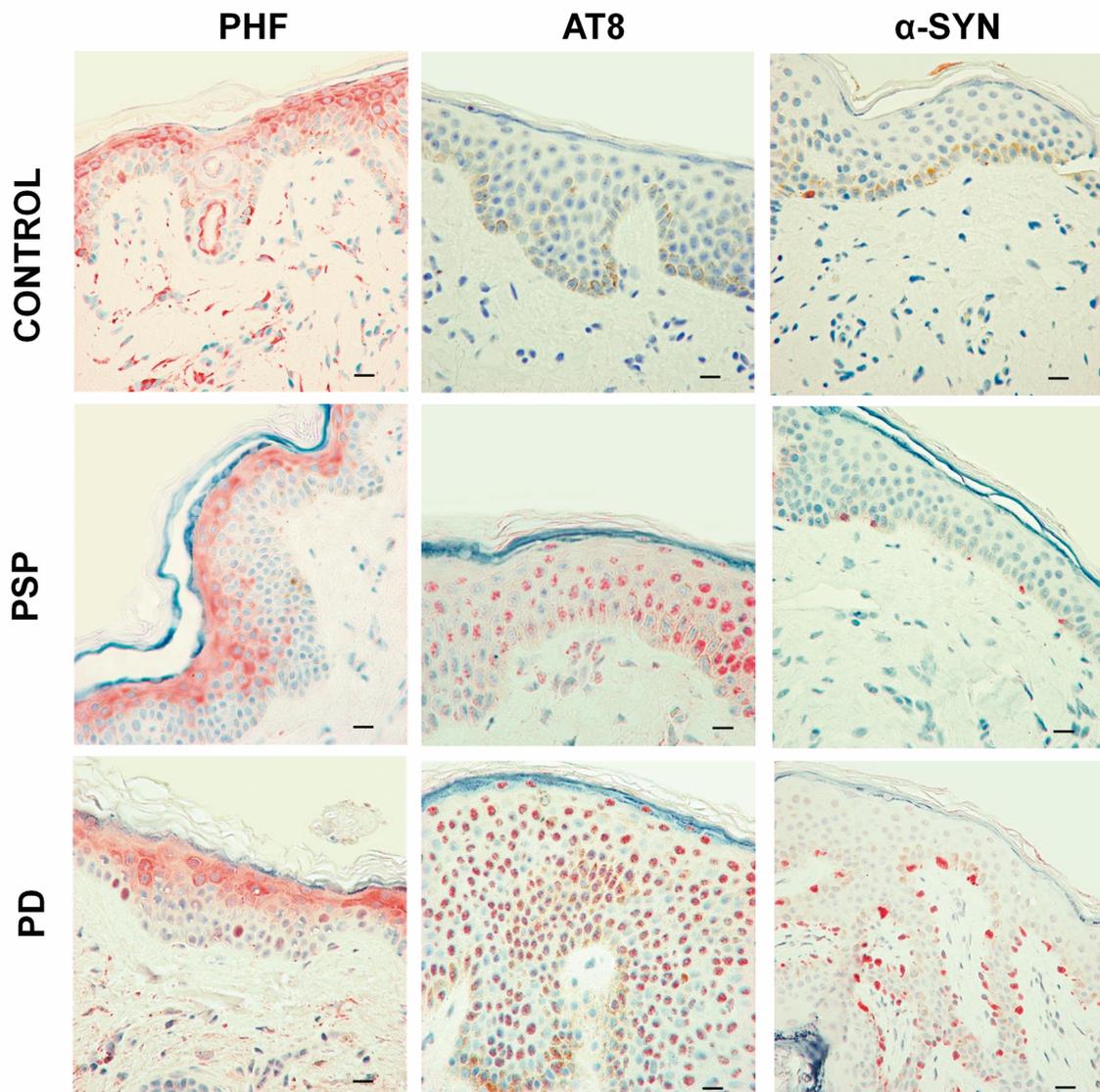


Figura 11. Se aprecia la inmunoreactividad en la epidermis en un sujeto control, paciente con PSP y un sujeto con EP con PFH, AT8 y anticuerpos α -sinucleína. Tinción con amino-etil-carbazol. Barra a escala: 10 μ m.

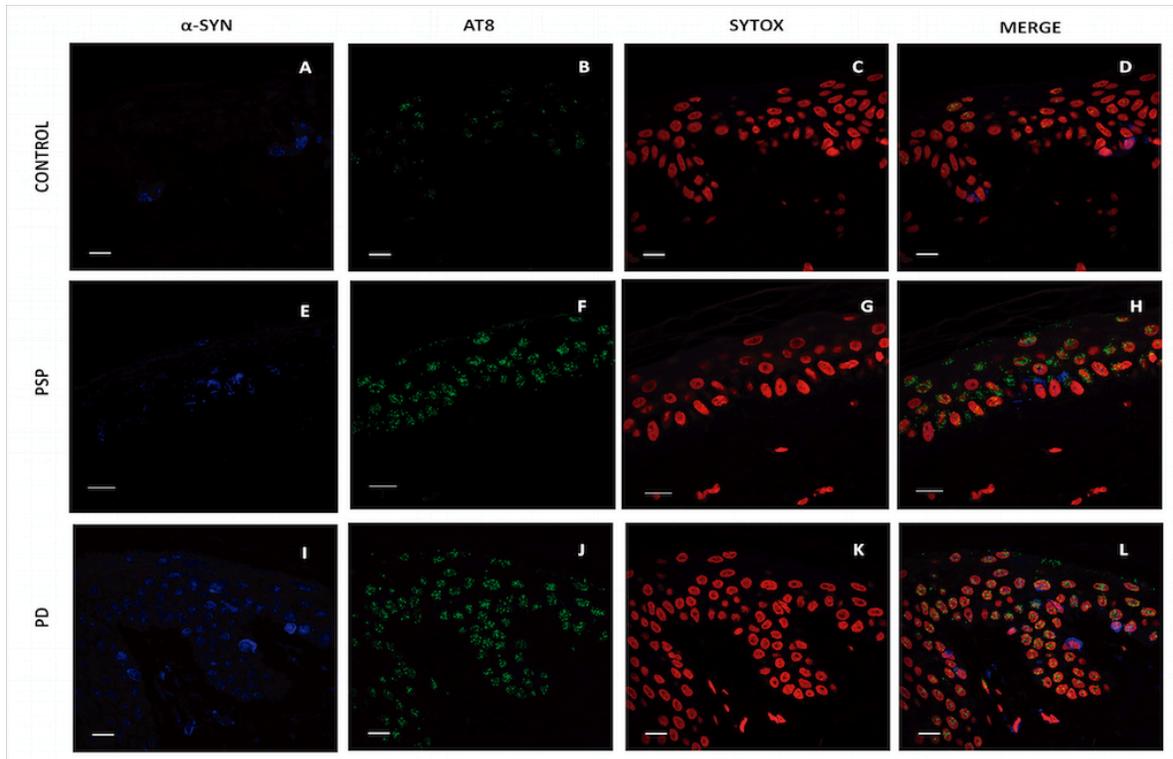


Figura 12. La inmunofluorescencia en la piel. Microscopía confocal. Anticuerpos para α -sinucleína (Cy5) y AT8 (Alexa Fluor 488). Sujeto control (A-D), paciente con PSP (E-H) y paciente con EP (I-L). Los núcleos de las células se tiñeron con Sytox. Barra a escala 10 μ m

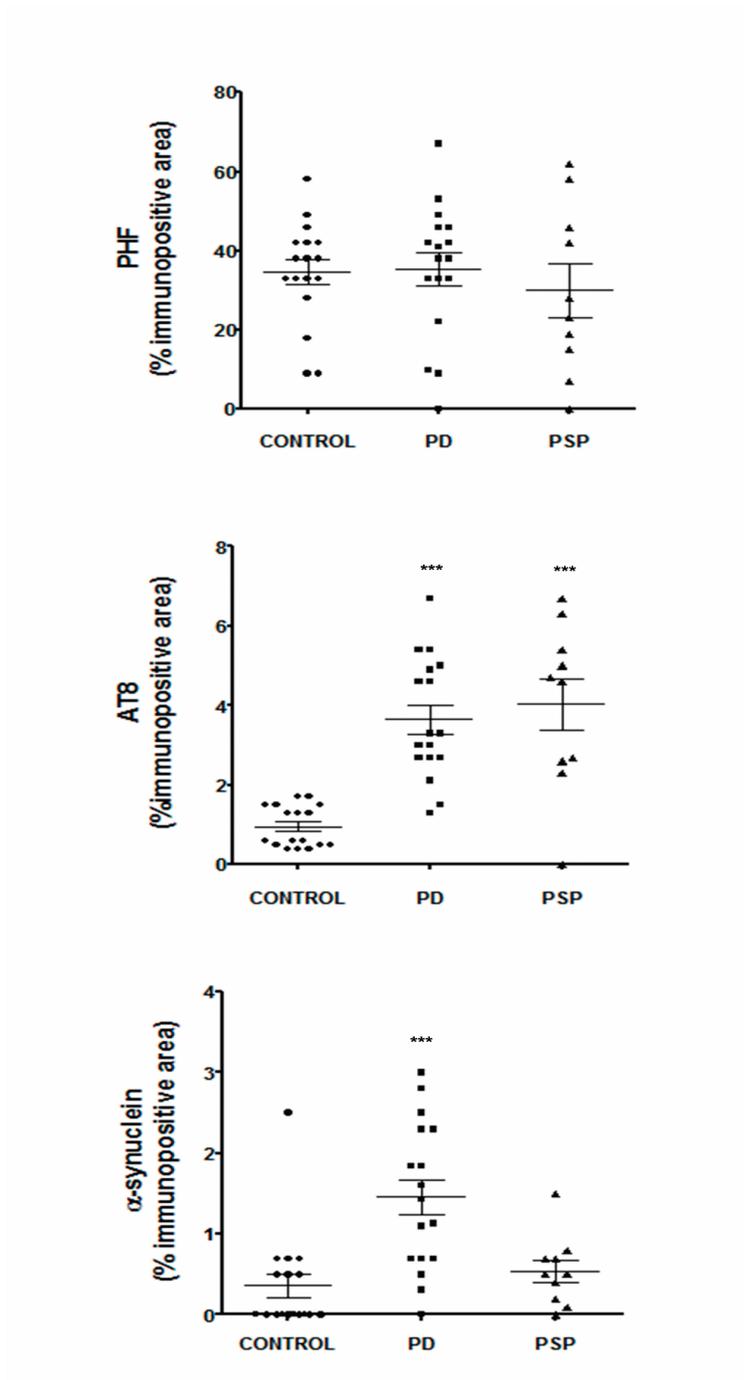


Figura 13. La inmunopositividad a PHF, AT8 y α -sinucleína expresados como porcentaje de píxeles/área total. El anticuerpo PHF mostró un patrón similar de expresión en todos los grupos ($p = 0,72$). La inmunorreactividad AT8 fue significativamente diferente en pacientes con PSP y EP en comparación con el grupo control ($p < 0,001$). α -sinucleína en el grupo EP fue significativamente diferente tanto al grupo control ($p < 0,001$), como a la población con PSP ($p < 0,01$). El análisis se hizo con las pruebas de Kruskal-Wallis seguida de la U de Mann-Whitney.

DISCUSIÓN

El estudio de la expresión de proteínas características de neurodegeneración en tejidos diferentes al tejido nervioso se basó en el novedoso reconocimiento de que éstas son enfermedades sistémicas y no exclusivas del cerebro (58). Usamos a la piel como un sitio para detectar la presencia de proteínas propias del tejido nervioso, dado que ambas estructuras tienen origen ectodérmico. Otros ya habían intentado encontrar la α -sinucleína expresada en la piel de pacientes con EP y en mucosa intestinal, pero solamente la habían localizado en forma discreta y exclusivamente en terminaciones nerviosas (59, 74, 85, 86, 87). Una vez demostrada la presencia de α -sinucleína en células de la piel de pacientes con EP (88); se inició la búsqueda de Tau fosforilada en la piel de enfermos con Alzheimer, con la idea de que el tejido cutáneo podría ser un espejo de lo que ocurre en el tejido nervioso (89,90). Las publicaciones generadas en este trabajo demostrando por primera vez en la literatura médica, que es posible evidenciar el depósito de las proteínas Tau y α -sinucleína en la epidermis de sujetos con enfermedades neurodegenerativas han atraído gran atención en el campo de la neurología (91-95).

Las razones para haber seleccionado la piel como tejido de estudio fueron varias: es un órgano extenso, accesible, altamente innervado, con el mismo origen embrionario (ectodermo) que el tejido nervioso y que ha demostrado expresar múltiples genes que producen varias proteínas que actúan en el sistema nervioso, incluyendo las catecolaminas, la sustancia P, la calcitonina, el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP), el factor de crecimiento neuronal (NGF), el péptido intestinal vasoactivo (VIP). También la piel ha mostrado sufrir cambios en la expresión de los genes que se localizan en sus células y esta expresión puede sufrir cambios con la edad; algunos genes involucrados en problemas neurológicos incluyendo APP, PSEN1, Tau y PARK2 que han sido asociados a las enfermedades que estamos estudiando (Alzheimer y Parkinson) pueden modificarse con la edad en su expresión cutánea de acuerdo a Makrantonaki y cols (96,97). Además, muchas enfermedades neurológicas, se manifiestan también a nivel cutáneo, incluyendo las de nuestro interés, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer se

asocia a una fisiología dérmica alterada y se ha demostrado una relación entre los niveles de presenilina 1 (PSEN1) y cáncer de piel, además de que los pacientes con este padecimiento neurodegenerativo sufren más de queratosis seborreica e inflamación cutánea (98). De igual manera la enfermedad de Parkinson se asocia a un incremento en la frecuencia de melanoma (tumor maligno asociado a la producción de melanina, que es la sustancia que pigmenta nuestra piel), ya que los genes de la pigmentación codifican para la tirosina y la hidroxilasa y están asociados ambos a enfermedad de Parkinson y a melanoma. Los melanocitos y las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra en su pars compacta a nivel mesencefálico comparten también el mismo precursor de la tirosina y producen tanto la melanina como la 3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA). Los pacientes con enfermedad de Parkinson pueden tener seborrea facial importante, antes de manifestar las alteraciones motoras clásicas (bradicinesia, rigidez, temblor de reposo e inestabilidad postural) de la enfermedad (99,100).

El proceso de fosforilación de las proteínas previamente normales y funcionales parece asociarse al proceso de enfermedad misma, pero aún no se logra entender si esto ocurre como un mecanismo de protección o es precisamente el elemento tóxico que provoca la disfunción neuronal y finalmente la apoptosis. PHF marca tanto a la Tau no fosforilada, como a la fosforilada; su expresión es predominantemente citoplásmica. PHF marca las estructuras fibrilares que se van acumulando en las neuronas del anciano y quizá por ello le encontramos en todos los sujetos estudiados con positividad para el anticuerpo dirigido al epítipo S-396. En cambio, la expresión de AT8 (S-202) que marca exclusivamente Tau fosforilada, en sujetos humanos adultos es anormal, es conocida como AT8 y marca ya un proceso neurodegenerativo que parece ser irreversible y que expresa una forma franca de la enfermedad. Hay que señalar, que los agregados de proteínas anormalmente plegadas las podemos encontrar a nivel nuclear, citoplasmático e intercelular. La explicación de su ubicación está relacionada a la función que parece tener Tau; por un lado la estabilización de los microtúbulos y por tanto del citoesqueleto celular y por otro la estabilización de la cromatina nuclear, ya que está ligada su actividad a la HP1P α (heterochromatin protein 1 α). Este proceso puede

ser importante en el entendimiento de la fisiopatogenia de la enfermedad y es posible que la Tau nuclear juegue un papel clave, en donde la fosforilación inadecuada y la agregación proteica se asocien a la pérdida de heterocromatina, con un aumento en la expresión de transcriptasas de ARN no codificantes para proteínas. Estos fenómenos se han relacionado a estrés oxidativo y térmico (101, 102).

Algo semejante parece ocurrir en la enfermedad de Parkinson en donde la identificación de genes asociados y sus posibles mutaciones relacionadas con la enfermedad, han permitido entender mejor las funciones de las proteínas para las cuales codifican. La alteración postraducciona de la α -sinucleína en la región terminal-C ha sido encontrada de manera consistente en el tejido cerebral de los pacientes con enfermedad de Parkinson, algunas variantes incluyen la Syn119, la Syn122 y la Syn123. Las mutaciones del gen LRRK2 (proteína kinasa 2, rica en repeticiones de leucina) son la principal causa de enfermedad de Parkinson familiar y esporádico e interesantemente asociado con frecuencia a una taupatía, (103).

La α -sinucleína ha sido objeto de publicaciones recientes acerca de la naturaleza priónica de sus agregados, teoría que ha ganado un apoyo importante desde el informe de Olanow y Prusiner sobre la presencia de la sinucleinopatía en las neuronas embrionarias dopaminérgicas trasplantadas previamente para el tratamiento de EP (104) Posiblemente el estrés oxidativo favorezca la producción de estos agregados proteicos anormales que parecerían tener un comportamiento priónico, al igual que en las taupatías, donde se teoriza que hay un sembrado de una neurona a otra mediante un mecanismo de exocitosis; las neuritas de Lewy y la NFT como exosomas serían atrapadas por la siguiente célula mediante endocitosis, con formación de vesículas con agregados de α -sinucleína o tau plegadas anormalmente. Una célula enferma, transmitiría la enfermedad a una célula sana de igual manera a como lo hace la proteína priónica en el Kuru (105,106).

Estos resultados apoyan plenamente la naturaleza sistémica de las enfermedades neurodegenerativas. Se ha descrito una amplia distribución de α -sinucleína fuera del SNC y se ha reportado también en las terminales nerviosas de

la piel (59, 107, 108), en el plexo mientérico, en el nervio vago (109), en glándulas salivales, en el páncreas (110), en la médula adrenal, la vejiga urinaria y en el epicardio (59). Anteriormente reportamos la expresión moderada en los queratinocitos (especialmente en la capa basal) y anexos cutáneos en pacientes con EP, una mínima expresión en pacientes con parkinsonismo y nula expresión en controles sanos (88). Varios modelos experimentales proponen que las sinucleinopatías podrían comenzar fuera del SNC. Se ha demostrado que la inoculación de α -sinucleína en el nervio ciático podría propagarse al SNC en ratones (111). También se ha propuesto, la propagación de la sinucleinopatía desde el intestino al SNC (112), apoyando la posibilidad del contagio de la proteína aplicada como un "huésped ante la aplicación del inóculo" (113). . El lanzamiento al espacio extracelular y la propagación también podría ampliarse para incluir en su contagio a otras células como los queratinocitos, aunque todavía no se sabe si los tipos de células no neuronales también son susceptibles al daño celular a través de agregados de α -sinucleína.

Puesto que ahora se sabe que la PSP es un taupatía, al igual que la EA, es posible que los agregados de tau anormalmente fosforilados pudieran estar presentes fuera del SNC al igual que ocurre en la EP (89, 114). Investigaciones previas a la nuestra han intentado demostrar la presencia de la proteína Tau en células distintas a las del tejido nervioso, Thurston demostró la presencia de Tau en fibroblastos y linfocitos con localización nuclear (115) y Sjöberg demostró la presencia nuclear en linfocitos y células HeLa (116). Es intrigante que en tipos de células no neuronales, como linfocitos, fibroblastos y células neoplásicas, Tau se expresa sobre todo en los núcleos celulares, mientras que en el cerebro, es una proteína citoplásmica asociada a microtúbulos relacionados con varias funciones celulares. Mientras, que en la EA la Tau se expresa en las llamadas "marañas neurofibrilares" que caracterizan esta enfermedad, mientras que en la PSP, Tau está mal plegada en NFT, inclusiones gliales globulares en los astrocitos ("astrocitos copetudos") y en el oligodendroglia ("cuerpos en espiral") en ambas regiones corticales y subcorticales. Los acúmulos AT8+ identificados en la epidermis mostraron una localización nuclear predominante que podría estar relacionado con

otras funciones de Tau en las células no neuronales, diferentes a formar parte del citoesqueleto celular (114, 117).

Otro punto clave es la superposición entre sinucleinopatía y taupatía, la que ya previamente había sido reconocida en algunas enfermedades, neurodegenerativas (118,119,120). Esto es relevante, puesto que en la clínica estos tres padecimientos (EP, PSP, EA) convergen en la presencia de deterioro cognitivo y parkinsonismo. Aunque en la teoría es fácil hacer una diferenciación clínica entre estos padecimientos, no siempre es sencillo precisamente por la sobreposición de manifestaciones clínicas. Parecería ocurrir algo similar en estas patologías a nivel molecular, en donde es posible que entre más deterioro cognitivo exista, más p-tau podría expresarse (121) y entre más parkinsonismo exista más sinucleinopatía se presente (122), encontrándose por tanto en la clínica y a nivel molecular una gamma de posibilidades. Es posible por tanto, que la presencia de demencia en la EP pueda correlacionarse con deterioro cortical y la asociación con la presencia de placas de β amiloide-Tau y especialmente de NFTs, lo que implica una interacción potencial entre PD y AD (123). Estudios post-mortem han mostrado una mayor acumulación de p-Tau en el cuerpo estriado de los pacientes con EP (124). Es por tanto de gran interés que se haya encontrado la presencia de ambas proteínas, α -sinucleína y p-Tau, en la piel de los pacientes con EP, lo cual podría apoyar los hallazgos in vitro sobre la sinergia entre la agregación y la propagación de ambas proteínas (125).

Por otro lado, la PSP es un taupatía reconocida y la EP es considerada tradicionalmente como una sinucleinopatía, sin embargo, cada vez es más claro que esta clasificación no podrá sostenerse por mucho tiempo, en base a hallazgos experimentales de superposición de proteinopatías. De hecho, las familias con mutaciones en los genes MAPT o SNCA pueden manifestar tanto demencia como parkinsonismo (125). A un nivel molecular, la expresión simultánea de ambas proteinopatías se traduce en EP y EA, así como otras patologías como DCL, la variante de Lewy de la EA, el complejo Guam ALS-Parkinson-demencia y el síndrome de Down (126), pero no en PSP. Por lo que valdría la pena considerar nuestro procedimiento como un método de diferenciación, dado que otros ya han

demostrado la diferencia en la expresión de α -sinucleína y tau en EP y PSP tanto para las formas esporádicas como familiares (120).

Además de que el análisis inmunohistoquímico de p-Tau y α -syn en la piel se pueda utilizar para distinguir EA de EP y esta de PSP, estos resultados también abren la posibilidad de que podamos estudiar la fisiopatología y la respuesta al tratamiento en las enfermedades neurodegenerativas mediante un análisis de la piel (88, 95). Los biomarcadores para las enfermedades neurodegenerativas se han desarrollado en los últimos años, y se basan en la neuroimagen funcional o en técnicas moleculares avanzadas. La mayoría de los sistemas de salud en el mundo, sin embargo, no pueden permitirse el realizar estos estudios para su uso cotidiano en la práctica clínica por la alta tecnología requerida y el alto costo de los mismos. Por lo tanto, las biopsias de piel representan una alternativa para apoyar el diagnóstico de las enfermedades neurodegenerativas, mediante la aplicación de inmunohistoquímica con anticuerpos disponibles comercialmente. Esto se puede hacer en forma rutinaria en el laboratorio de patología de hospitales en cualquier parte del mundo y aún en laboratorios clínicos. Además, debido a la facilidad de obtener 4 mm de piel por una biopsia por punch esta técnica se pudiera usar para diagnosticar a los pacientes antes de hacer estudios más costosos; la piel potencialmente podría también usarse como un biomarcador para monitorear la respuesta a terapias modificadoras de la enfermedad, agregándose al análisis de α -n y Tau en los fluidos corporales y los tejidos periféricos como un biomarcador potencial, aunque controvertido para el diagnóstico de EP, AE y PSP (103, 127).

Entre las principales limitaciones en nuestro estudio se encuentra la dispersión en los datos obtenidos, que no permite aún establecer un punto de corte entre expresión normal y patológica de las proteínas estudiadas en la piel. Este puede deberse por una parte a que el estudio se realizó con base en el diagnóstico clínico, no histopatológico del cerebro, y que por tanto, son posibles los valores atípicos, ya sea por un diagnóstico erróneo o hasta por una variación entre los diferentes lotes de anticuerpos comerciales utilizados, un problema común que ha ganado cada vez más la atención en los informes científicos (122, 128). Por otra parte, no será hasta que se tenga un mapeo de estas proteínas en la piel de un

número importante de sujetos en a diferentes edades y condiciones de salud que se llegará a delimitar el rango de expresión de las mismas; haciendo también necesario que otros corroboren nuestros resultados para darle robustez a este procedimiento. Lo anterior permitirá determinar la sensibilidad, la especificidad, el VPP (valor predictivo positivo), VPN (valor predictivo negativo) de estas pruebas.

La principal perspectiva para nuestra investigación es que este procedimiento se puede hacer en forma rutinaria en el mundo, de manera sencilla, accesible, poco costosa y con el potencial de ser un biomarcador estándar. Además de que la piel es un sitio idóneo para estudiar la fisiopatogenia de la enfermedad, podría ser un lugar de acceso para tener un antígeno específico, para la generación de vacunas para la prevención de padecimientos neurodegenerativos.

Las interrogantes ahora son múltiples, cuando nuestro cuestionamiento inicial era solo uno, si existía la presencia de estas proteínas en la piel. Entre estas interrogantes están: ¿ Es la proteinopatía un proceso que se presenta en el tejido dérmico antes o después que lo hace en el sistema nervioso central y periférico?, ¿Es un fenómeno paralelo al que está ocurriendo en el tejido nervioso?, ¿puede ser un predictor que nos sirva para hacer prevención?, ¿podemos mediante la piel demostrar la fisiopatogenia de la enfermedad?, ¿existe un fenómeno de prionosis en la piel afectada por una proteinopatía?, ¿son las proteinopatías realmente la causa o son la consecuencia de morbilidad en la neurodegeneración?, ¿Podría ser la proteinopatía un proceso reversible? Y si lo es ¿cuándo deja de serlo?, ¿existen factores ambientales que afectando a la piel, favorezcan la neurodegeneración?, ¿Si es una prionosis, hay posibilidades de contagio?

CONCLUSIONES

Este trabajo demostró por primera vez en la literatura médica, que es posible evidenciar el depósito de las proteínas Tau y α -sinucleína en la epidermis de sujetos con enfermedades neurodegenerativas en donde estas proteínas están

involucradas. Además, existe diferencia estadísticamente significativa entre sujetos enfermos con un proceso neurodegenerativo respecto a enfermos con una demencia no degenerativa y a sujetos sanos. Estos hallazgos permiten proponer a la biopsia de piel como un método mínimamente invasivo con un posible potencial predictivo de la enfermedad degenerativa del SNC y de monitorización de la progresión de la enfermedad y así como vigilancia de respuesta a tratamiento. Para lograr este propósito, será necesario ampliar en un futuro cercano esta investigación a grupos grandes y controlados de pacientes con neurodegeneración.

REFERENCIAS

1. Hindle JV. Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age Ageing*, 2010; 39 (2): 156-161.
2. Finch CE. Evolution of the human lifespan and diseases of aging: Roles of infection, inflammation, and nutrition. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2010; 107 (Supp:1): 1718-1724.
3. Bertram L, Tanzi RE. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 2005; 115(6): 1449-1457.
4. Brown RC, Lockwood AH and Sonawane BR. Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ Health Perspect* 2005; 113(9): 1250-1256.
5. Nussbaum RL, Christopher CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *NEJM* 2003; 348(14): 1356-1364.
6. Moore RA, Taubner LM, Priola SA. Prion protein misfolding and disease. *Curr Opin Struct Biol* 2009; 19:14-22.

7. Kretschmar H, Tatzelt J. Prion disease: a tale of folds and strains. *Brain Pathol.* 2013; 23: 321-332.
8. Michel G, Clavaguera F, Tolnay M. The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 2010; 33(7): 317-325.
9. Lee SJ, Lim HS, Masliah E, Lee HJ. Protein aggregate spreading in neurodegenerative diseases: problems and perspectives. *Neurosci Res* 2011; 70: 339-348.
10. Vanderweyde T, Yu H, Varnum M, Liu-Yesucevitz L, Citro A, Ikezu T, Duff K, Wolozin B. Contrasting pathology of the stress granule proteins TIA-1 and G3BP in tauopathies. *J. Neurosci* 2012; 32: 8270-8283.
11. Bentmann E., Haass C. and Dormann D. Stress granules in neurodegeneration-lessons learnt from TAR DNA binding protein of 43 kDa and fused in sarcoma. *FEBS J.* 2013; 280: 4348-4370.
12. Shea TB. Phospholipids alter tau conformation, phosphorylation, proteolysis, and association with microtubules: implication for tau function under normal and degenerative conditions. *Journal of Neuroscience Research*, 1997; 50(1): 114-122.
13. Tenreiro, S., Eckermann, K., & Outeiro, T. F. Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe?. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2014; 7.
14. Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2011; 1(1): a006189.

15. Braak, H., & Braak, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*, 1991; 82(4): 239-259.
16. Braak, H., & Braak, E. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiology of aging*, 1995; 16(3): 271-278.
17. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989; 3: 519-526.
18. Goedert M, Jakes R. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* 1990; 9: 4225-4230.
19. Sultan A, Nessler F, Violet M, Begard S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S, Colin M, Bonnefoy E, Buee L, Galas MC. Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J Biol Chem* 2011; 286: 4566-4575.
20. Sjoberg MK, Shestakova E, Mansuroglu Z, Maccioni RB, Bonnefoy E. Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci.* 2006; 119: 2025-2034.
21. Spillantini MG, Goedert M. Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol* 2013; 12: 609-22.
22. Stieler JT, Bullmann T, Kohl F, Toien O, Bruckner MK, Hartig W, Barnes BM, Arendt T. The physiological link between metabolic rate depression and tau phosphorylation in mammalian hibernation. *PLoS. One.* 2011; 6: e14530.

23. Braak H, Del TK. Where, when, and in what form does sporadic Alzheimer's disease begin? *Curr. Opin. Neurol.* 2012; 25: 708-714.
24. Clayton, D. F., & George, J. M. Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *Journal of Neuroscience Research*, 1999; 58(1): 120-129.
25. El-Agnaf, O. M., Salem, S. A., Paleologou, K. E., Cooper, L. J., Fullwood, N. J., Gibson, M. J. & Hardy, J. α -Synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *The FASEB Journal*, 2003; 17(13): 1945-1947.
26. Tokuda, T, Qureshi, M. M., Ardah, M. T., Varghese, S., Shehab, S. A. S., Kasai, T, & El-Agnaf, O. M. A. Detection of elevated levels of α -synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology*, 2010; 75(20): 1766-1770.
27. Bisaglia, M., Mammi, S., & Bubacco, L. Structural insights on physiological functions and pathological effects of α -synuclein. *The FASEB Journal*, 2009; 23(2): 329-340.
28. Murphy, D. D., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q., & Lee, VMY. Synucleins are developmentally expressed, and α -synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*, 2000; 20(9):3214-3220.
29. Vargas, K. J., Makani, S., Davis, T., Westphal, C. H., Castillo, P. E., & Chandra, SS. Synucleins regulate the kinetics of synaptic vesicle endocytosis. *The Journal of Neuroscience*, 2014; 34(28): 9364-9376.

30. Abeliovich, A., Schmitz, Y., Fariñas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., Castillo, P. E. & Hynes, M. (2000). Mice lacking α -synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, 2000; 25(1): 239-252.
31. Nemani, V. M., Lu, W., Berge, V., Nakamura, K., Onoa, B., Lee, M. K., et al & Edwards, R. H. Increased expression of α -synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron*, 2010; 65(1): 66-79.
32. Burré, J., Sharma, M., & Südhof, T. C. Systematic mutagenesis of α -synuclein reveals distinct sequence requirements for physiological and pathological activities. *The Journal of Neuroscience*, 2012; 32(43): 15227-15242.
33. Elkon, H., Don, J., Melamed, E., Ziv, I., Shirvan, A., & Offen, D. Mutant and wild-type α -synuclein interact with mitochondrial cytochrome C oxidase. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2002; 18(3): 229-238.
34. Junn, E., & Mouradian, M. M. Human α -synuclein over-expression increases intracellular reactive oxygen species levels and susceptibility to dopamine. *Neuroscience letters*, 2002; 320(3): 146-150.
35. Cookson, M. R., & van der Brug, M. (2008). Cell systems and the toxic mechanism (s) of α -synuclein. *Experimental Neurology*, 2008; 209(1): 5-11.
36. El-Agnaf, O. M., Salem, S. A., Paleologou, K. E., Curran, M. D., Gibson, M. J., Schlossmacher, M. G., & Allsop, D. Detection of oligomeric forms of α -synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *The FASEB Journal*, 2006; 20(3): 419-425.

37. Lee, H. J., Suk, J. E., Bae, E. J., Lee, J. H., Paik, S. R., & Lee, S. J. Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular α -synuclein. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008; 40(9): 1835-1849.
38. Bar - On, P., Crews, L., Koob, A. O., Mizuno, H., Adame, A., Spencer, B., & Masliah, E. Statins reduce neuronal α - synuclein aggregation in vitro models of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 2008; 105(5): 1656-1667.
39. Braak, H., Rüb, U., & Del Tredici, K. Cognitive decline correlates with neuropathological stage in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 2006; 248(1): 255-258.
40. Reitz, C., Brayne, C., & Mayeux, R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 2011; 7(3): 137-152.
41. Bird, T. D. (2014). Alzheimer disease overview.
42. Mattson, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 2004; 430(7000): 631-639.
43. Grant, W. B., Campbell, A., Itzhaki, R. F., & Savory, J. The significance of environmental factors in the etiology of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2002; 4(3): 179-89.
44. Braak, H., & Braak, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*, 1991; 82(4): 239-259.
45. Braak, H., & Braak, E. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiology of aging*, 1995; 16(3): 271-278.

46. Shea TB. Phospholipids alter tau conformation, phosphorylation, proteolysis, and association with microtubules: implication for tau function under normal and degenerative conditions. *Journal of Neuroscience Research*, 1997; 50(1): 114-122.
47. Einstein, G., Buranosky, R., & Crain, B. J. Dendritic pathology of granule cells in Alzheimer's disease is unrelated to neuritic plaques. *The Journal of Neuroscience*, 1994; 14(8): 5077-5088.
48. Pimplikar SW, Nixon RA, Robakis NK, Shen J, Tsai LH. Amyloid-independent mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci* 2010; 30 (45): 14946-14954.
49. Butters, M. A., Klunk, W. E., Mathis, C. A., Price, J. C., Ziolk, S. K., Hoge, J. A. & Meltzer, C. C. Imaging Alzheimer pathology in late-life depression with PET and Pittsburgh Compound-B. *Alzheimer disease and associated disorders*, 2008; 22(3): 261.
50. Bloudek, L. M., Spackman, D. E., Blankenburg, M., & Sullivan, S. D. Review and Meta-Analysis of Biomarkers and Diagnostic Imaging in Alzheimer's. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2011; 26: 1-5.
51. Marañón, G. *La medicina y nuestro tiempo*. 1969, Espasa-Calpe.
52. Gibb WR, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1988; 51(6):745-52.
53. Kalia LV, Kalia SK, McLean PJ, Lozano AM, Lang AE. α - Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Ann Neurol* 2013; 73(2): 155-169.

54. Xilouri, M., Vogiatzi, T., Vekrellis, K., Park, D., & Stefanis, L. Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PloS one*, 2009; 4(5): e5515.
55. Ross, CA., Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*. 2004; 10 Suppl: S10-7.
56. International Parkinson Disease Genomics Consortium. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *The Lancet*, 2011; 377(9766): 641-649.
57. Robeson, W., DaM, J. R., & Margouleff, D. (1995). Assessment of disease severity in parkinsonism with fluorine-18-fluorodeoxyglucose and PET. *J Nucl Med*. 1995; 36(3): 378-83.
58. Matsui, H., Udaka, F., Miyoshi, T., Hara, N., Tamura, A., Oda, M. & Kameyama, M. Brain perfusion differences between Parkinson's disease and multiple system atrophy with predominant parkinsonian features. *Parkinsonism & Related Disorders*, 2005; 11(4): 227-232.
59. Beach T. G., Adler, C. H., Sue, L. I., Vedders, L., Lue, L., White III, C. L. & Walker, D. G. (2010). Multi-organ distribution of phosphorylated α -synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathologica*, 2010; 119(6): 689-702.
60. Litvan, I., Mangone, C. A., McKee, A., Verny, M., Parsa, A., Jellinger, K., et al & Pearce, R. K. Natural history of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome) and clinical predictors of survival: a clinicopathological study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 1996; 60(6), 615-620.

61. Vanacore, N., Bonifati, V., Colosimo, C., Fabbrini, G., De Michele, G., Marconi, R., et al & Stocchi, F. Epidemiology of progressive supranuclear palsy. *Neurological Sciences*, 2001; 22(1), 101-103.
62. Höglinger, G. U., Melhem, N. M., Dickson, D. W., Sleiman, P. M., Wang, L. S., Klei, L., et al & van Swieten, J. C. Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy. *Nature genetics*, 2011; 43(7), 699-705.
63. Zhukareva, V., Joyce, S., Schuck, T., Van Deerlin, V., Hurtig, H., Albin, R., et al & Lee, V. M. Y. Unexpected abundance of pathological tau in progressive supranuclear palsy white matter. *Annals of neurology*, 2006; 60(3), 335-345.
64. Bigio, E. H., Brown, D. F., & White III, C. L. Progressive supranuclear palsy with dementia: cortical pathology. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 1991; 58(4): 359-364.
65. De Silva, R., Lashley, T., Gibb, G., Hanger, D., Hope, A., Reid, A., & Khan, N. Pathological inclusion bodies in tauopathies contain distinct complements of tau with three or four microtubule - binding repeat domains as demonstrated by new specific monoclonal antibodies. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2003; 29(3): 288-302.
66. Evidente, V. G. H., Adler, C. H., Sabbagh, M. N., Connor, D. J., Hentz, J. G., Caviness, J. N. & Beach, T. G. (2011). Neuropathological findings of PSP in the elderly without clinical PSP: possible incidental PSP?. *Parkinsonism & Related Disorders*, 2011; 17(5): 365-371.
67. Paviour, D. C., Price, S. L., Jahanshahi, M., Lees, A. J., & Fox, N. C. Regional brain volumes distinguish PSP, MSA - P, and PD: MRI - based clinical - radiological correlations. *Movement disorders*, 2006; 21(7): 989-996.

68. Berding, G., Odin, P., Brooks, D. J., Nikkhah, G., Matthies, C., Peschel, T., et al & Dengler, R. Resting regional cerebral glucose metabolism in advanced Parkinson's disease studied in the off and on conditions with [18F] FDG - PET. *Movement Disorders*, 2001; 16(6), 1014-1022.
69. Knopman, D. S., Petersen, R. C., Cha, R. H., Edland, S. D., & Rocca, W. A. (2006). Incidence and causes of nondegenerative nonvascular dementia: a population-based study. *Archives of Neurology*, 63(2), 218-221.
70. Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., Hoth, D. F., Oates, J. A. & Zeger, S. L. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. Biomarkers Definitions Working Group. *Clinical Pharmacol & Therapeutics*, 2001; 69: 89-95.
71. Marek, K., Jennings, D., Tamagnan, G., & Seibyl, J. Biomarkers for Parkinson's disease: tools to assess Parkinson's disease onset and progression. *Annals of Neurology*, 2008; 64(S2): S111-S121.
72. Morgan, J. C., Mehta, S. H., & Sethi, K. D. Biomarkers in Parkinson's disease. *Current neurology and neuroscience reports*, 2010; 10(6), 423-430.
73. Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388(6645), 839-840.
74. Donadio, V., Incensi, A., Leta, V., Giannoccaro, M. P., Scaglione, C., Martinelli, P., et al & Liguori, R. Skin nerve α -synuclein deposits A biomarker for idiopathic Parkinson disease. *Neurology*, 2014; 82(15), 1362-1369.

75. Clos, A. L., Kaye, R., & Lasagna-Reeves, C. A. (2012). Association of skin with the pathogenesis and treatment of neurodegenerative amyloidosis. *Front Neurol*, 3(5).
76. McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., & Stadlan, E. M. 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*, 1984; 34(7), 939-939.
77. Daniel, S. E., & Lees, A. J. (1992). Parkinson's Disease Society Brain Bank, London: overview and research. *Journal of neural transmission. Supplementum*, 39, 165-172.
78. LITVAN, I., et al. Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome) Report of the NINDS-SPSP International Workshop*. *Neurology*, 1996, vol. 47, no 1, p. 1-9.
79. Kato, N., Arai, K., & Hattori, T. (2003). Study of the rostral midbrain atrophy in progressive supranuclear palsy. *Journal of the neurological sciences*, 210(1), 57-60.
80. Mondragón-Rodríguez, S., Basurto-Islas, G., Santa-Maria, I., Mena, R., Binder, L. I., Avila, J., et al & García-Sierra, F. Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease. *International journal of experimental pathology*, 2008; 89(2), 81-90.
81. Van der Putten, H., Wiederhold, K. H., Probst, A., Barbieri, S., Mistl, C., Danner, S., et al & Lin, S. Neuropathology in mice expressing human α -synuclein. *The Journal of neuroscience*, 2000, 20(16), 6021-6029.
82. Mirra, S. S., Heyman, A., McKeel, D., Sumi, S. M., Crain, B. J., Brownlee, L. M., et al & Berg, L. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease

- (CERAD) Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*, 1991; 41(4), 479-479.146.
83. Giasson, B. I., Forman, M. S., Higuchi, M., Golbe, L. I., Graves, C. L., Kotzbauer, P. T., et al & Lee, V. M. Y. (2003). Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science*, 300(5619), 636-640.
84. Abraira, V. y Pérez, A. (1996). *Métodos multivariantes en bioestadística*. Madrid. CERA.
85. Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, et al. Lewy body pathology involves cutaneous nerves. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67 (10): 945-53.
86. Miki Y, Tomiyama M, Ueno T, et al. Clinical availability of skin biopsy in the diagnosis of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2010; 469(3): 357-59.
87. Donadio, V., Incensi, A., Piccinini, C., Cortelli, P., Giannoccaro, M. P., Baruzzi, A., & Liguori, R. Skin nerve misfolded α - synuclein in pure autonomic failure and Parkinson disease. *Annals of neurology*. 2015.
88. Rodríguez-Leyva, I., Calderón - Garcidueñas, A. L., Jiménez - Capdeville, M. E., Rentería - Palomo, A. A., Hernandez - z, H. G., Valdés - Rodríguez, R., et al & Jimenez-Capdevile, M. E. α - Synuclein inclusions in the skin of Parkinson's disease and parkinsonism. *Annals of clinical and translational neurology*, 2014; 1(7), 471-478.
89. Makrantonaki E, Brink TC, Zampeli V, Elewa RM, Mlody B, Hossini AM, Hermes B, Krause U, Knolle J, Abdallah M, Adajeye J, Zouboulis CC. Identification of Biomarkers of Human Skin Ageing in Both Genders. Wnt Signalling- A level of skin aging? *PLOS ONE* 2012, 7(11):e50393

90. Makrantonaki, Evgenia, et al. Skin and brain age together: The role of hormones in the ageing process. *ExpGerontol.* 2010; 45(10): 801-813.
91. Comi, C., Magistrelli, L., Oggioni, G. D., Carecchio, M., Fleetwood, T., Cantello, R., et al & Antonini, A. Peripheral nervous system involvement in Parkinson's disease: Evidence and controversies. *Parkinsonism & related disorders*, 2014; 20(12), 1329-1334.
92. Oliveira, L. M. A., Falomir-Lockhart, L. J., Botelho, M. G., Lin, K. H., Wales, P., Koch, J. C., et al & Schüle, B. Elevated α -synuclein caused by SNCA gene triplication impairs neuronal differentiation and maturation in Parkinson's patient-derived induced pluripotent stem cells. *Cell death & disease*, 2015; 6(11), e1994.
93. Rubino, G. Complex liaisons moving forward the Parkinson's disease? An appraisal. *Basal Ganglia*, 2015; 5(4), 77-87.
94. Hauw, J. J., Haïk, S., & Duyckaerts, C. La transconformation protéique, nouveau paradigme en neurologie. *Revue Neurologique*, 2015;. 171(12), 825-831.
95. Castanedo-Cazares, J. P., & Rodriguez-Leyva, I. Skin biomarkers for neurodegenerative disease: a future perspective. *Neurodegenerative disease management*, 2015; 5(6), 465-467.
96. Makrantonaki E, Brink TC, Zampeli V, Elewa RM, Mlody B, Hossini AM, Hermes B, Krause U, Knolle J, Abdallah M, Adajeye J, Zouboulis CC. Identification of Biomarkers of Human Skin Ageing in Both Genders. *Wnt Signalling- A level of skin aging? PLOS ONE* 2012, 7(11):e50393
97. Makrantonaki, Evgenia, et al. Skin and brain age together: The role of hormones in the ageing process. *ExpGerontol.* 2010; 45(10): 801-813.

98. Kelleher III, R. J., & Shen, J. γ -Secretase and Human Disease: The role of an enzyme in disease pathogenesis extends beyond Alzheimer's disease to a skin disorder. *Science (New York, NY)*, 2010; 330(6007), 1055.
99. Hughes, A. J., Daniel, S. E., Kilford, L., & Lees, A. J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 1992; 55(3), 181-184.
100. Pan T, Zhu J, Hwu WJ, Jankovic J. The role of alpha-synuclein in melanin synthesis in melanoma and dopaminergic neuronal cells. *PLoS One*. 2012;7(9):e45183.
101. Frost B, Jacks RL, Diamond MI. Propagation of Tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* 2009, 284 (19)12845-52.
102. Bukar Maina, M., Al-Hilaly, Y. K., & Serpell, L. C. (2016). Nuclear Tau and Its Potential Role in Alzheimer's Disease. *Biomolecules*, 6(1), 9.
103. Michell, A. W., L. M. Luheshi, and R. A. Barker. Skin and platelet alpha-synuclein as peripheral biomarkers of Parkinson's disease. *Neurosciencelett* 2005; 381(3): 294-8.
104. Olanow CW, Prusiner SB. Is Parkinson's disease a prion disorder? *PNAS* 2009;106(31):12571-12572.
105. Frost B, Diamond MI. The expanding realm of prion phenomena in neurodegenerative disease. *Prion*. 2009;3 (2): 74-7.
106. Tsike E, Moore DJ. Mechanisms of LRRK2-mediated neurodegeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2012, 12(3):251-60.

107. Malek N, Swallow D, Grosset KA, Anichtchik O et al. Alpha - synuclein in peripheral tissues and body fluids as a biomarker for Parkinson's disease—a systematic review. *Acta Neurol Scand*, 2014;130: 59-72.
108. Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, et al. Lewy body pathology involves cutaneous nerves. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67 (10): 945-53.
109. Phillips RJ, Walter GC, Wilder S L, Baronowsky, EA, et al. Alpha-synuclein-immunopositive myenteric neurons and vagal preganglionic terminals: autonomic pathway implicated in Parkinson's disease?. *Neuroscience* 2008; 153: 733-750.
110. Beach, TG, Adler, CH, Dugger, BN, et al. Submandibular gland biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2013; 72(2), 130-136.
111. Sacino, AN, Brooks M, Thomas MA, et al. Intramuscular injection of α -synuclein induces CNS α -synuclein pathology and a rapid-onset motor phenotype in transgenic mice. *PNAS* 2014; 111(29), 10732-10737.
112. Gray, M. T., Munoz, D. G., Gray, D. A., Schlossmacher, M. G., & Woulfe, J. M. Alpha - synuclein in the appendiceal mucosa of neurologically intact subjects. *Movement disorders*, 2014; 29(8), 991-998.
113. Recasens A, Dehay B. Alpha-synuclein spreading in Parkinson's disease. *Front Neuroanat*. 2014; 8:159- 167.
114. Ludolph AC, Kassubek J, Landwehrmeyer BG, et al. Tauopathies with parkinsonism: clinical spectrum, neuropathologic basis, biological markers, and treatment options. *Eur J Neurol* 2009; 16(3):297-309.
115. Thurston, V. C., Zinkowski, R. P., & Binder, L. I. Tau as a nucleolar protein in human nonneural cells in vitro and in vivo. *Chromosoma*, 1996; 105(1), 20-30.

116. Sjöberg, M. K., Shestakova, E., Mansuroglu, Z., Maccioni, R. B., & Bonnefoy, E. Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *Journal of cell science*, 2006; 119(10), 2025-2034.
117. Frost B, Hemberg M, Lewis J, Feany MB. Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation. *Nat Neurosci*. 2014; 17(3):357-66
118. Ishizawa T, Mattila P, Davies P, Wang Det al. Colocalization of Tau and alpha - synuclein epitopes in lewy bodies. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2003; 62: 389-397
119. Moussaud S, Jones DR, Moussaud-Lamodière EL, Delenclos M, Ross OA, McLean PJ. Alpha-synuclein and tau: teammates in neurodegeneration? *Molecular Neurodegeneration*. 2014; 9:43.
120. Morris, H. R., Vaughan, J. R., Datta, S. R., Bandopadhyay, R., De Silva, H. R., Schrag, A., et al & Daniel, S. Multiple system atrophy/progressive supranuclear palsy: α -synuclein, synphilin, tau, and APOE. *Neurology*, 2000; 55(12), 1918-1920.
121. Braak, H., Rüb, U., Steur, E. J., Del Tredici, K., & De Vos, R. A. I. Cognitive status correlates with neuropathologic stage in Parkinson disease. *Neurology*, 2005; 64(8), 1404-1410.
122. Irwin, D. J., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. Parkinson's disease dementia: convergence of [alpha]-synuclein, tau and amyloid-[beta] pathologies. *Nature Reviews Neuroscience*, 2013; 14(9), 626-636.

123. Violet M, Chauderlier A, Delattre L, Tardivel M et al. Prefibrillar Tau oligomers alter the nucleic acid protective function of Tau in hippocampal neurons in vivo. *Neurobiol Dis.* 2015; 82:540-551
124. Wills J, Jones J, Haggerty T, Duka V, Joyce JN, Sidhu A. Elevated tauopathy and alpha-synuclein pathology in postmortem Parkinson's disease brains with and without dementia. *Exp Neurol.* 2010; 225(1): 210-218.
125. Edwards, T. L., Scott, W. K., Almonte, C., Burt, A., Powell, E. H., Beecham, G. W., et al & Singer, C. Genome - wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease. *Annals of human genetics,* 2010; 74(2), 97-109.
126. Arima K, Hirai S, Sunohara N, Aoto I et al. Cellular co-localization of phosphorylated tau-and NACP/ α -synuclein-epitopes in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease and in dementia with Lewy bodies. *Brain Research* 1999; 843: 53-61.
127. Doppler, K., Volkmann, J., & Sommer, C. Skin biopsies in the differential diagnosis of Parkinsonism: are we ready for simplified protocols?. *Brain*, awv251. 2015.
128. Jellinger KA. Interaction between pathogenic proteins in neurodegenerative disorders. *J Cell Mol Med.* 2012; 16(6), 1166-1183.

ANEXO 1. Relación de participantes analizados. Número de registro de biopsia, edad, género, diagnóstico clínico y calificación del MMSE.

| SUJETO | EDAD | GENERO | DIAGNÓTICO | MMSE | IMAGEN |
|--------|------|--------|------------|------|--------|
| 10 | 49 | F | Control | 30 | NA |
| 55 | 82 | F | Control | 30 | NA |
| 105 | 86 | M | Control | 30 | NA |
| 108 | 73 | F | Control | 30 | NA |
| 112 | 48 | F | Control | 30 | NA |
| 121 | 82 | M | Control | 28 | NA |
| 124 | 68 | F | Control | 30 | NA |
| 125 | 48 | F | Control | 30 | NA |
| 128 | 54 | F | Control | 30 | NA |
| 130 | 77 | F | Control | 30 | NA |
| 135 | 73 | M | Control | 30 | NA |
| 139 | 69 | F | Control | 30 | NA |
| 141 | 80 | F | Control | 30 | NA |

| | | | | | |
|----------|----|---|---------|----|---|
| 143 | 83 | M | Control | 29 | NA |
| 146 | 87 | M | Control | 30 | NA |
| 148 | 75 | M | Control | 26 | NA |
| 149 | 92 | F | Control | 26 | NA |
| | | | | | |
| 129 | 81 | M | EA | 23 | Atrofia cortical, encefalopatía lacunar |
| 14 | 62 | F | EA | 9 | Atrofia hipocampal |
| 22 | 82 | F | EA | 8 | Atrofia cortical |
| 23 | 81 | F | EA | 17 | Atrofia hipocampal bilateral |
| 30 | 85 | M | EA | 13 | Atrofia cortico-subcortical |
| 45 | 62 | F | EA | 14 | Atrofia cortical, encefalopatía lacunar |
| 51 | 83 | F | EA | 16 | Atrofia cortical, encefalopatía lacunar |
| 61 | 82 | M | EA | 21 | Atrofia hipocampal bilateral |
| 73 | 78 | F | EA | 8 | Atrofia Cortical-subcortical |
| 83 | 72 | F | EA | 0 | Atrofia Cortical, higromas bilaterales |
| 86 | 93 | F | EA | 18 | Atrofia cortical, hemorragia amiloidea |
| 94 | 91 | F | EA | 10 | Atrofia cortical e hipocampal |
| 96 | 82 | M | EA | 1 | Atrofia hipocampal bilateral |
| 27 | 75 | M | EA | 14 | Atrofia hipocampal, hidrocefalia |
| 31 | 70 | M | EA | 23 | Encefalopatía multinfarto, atrofia hipocampal |
| 34 | 89 | M | EA | 24 | Atrofia hipocampal, encefalopatía lacunar |
| 37 | 88 | F | EA | 18 | Atrofia hipocampal, encefalopatía lacunar |
| 44 | 80 | F | EA | 12 | Atrofia hipocampal |
| 53 | 72 | M | EA | 27 | Atrofia hipocampal bilateral mayor derecha |
| 65 | 70 | F | EA | 14 | Atrofia hipocampal |
| | | | | | |
| 24 | 53 | M | EP | 29 | CT normal |
| 26 | 78 | M | EP | 7 | Hidrocefalia, infarto frontal derecho |
| 33 | 64 | M | EP | 24 | IRM normal |
| 38 | 76 | F | EP | 26 | Atrofia cortical, depósitos de hierro NB |
| 43 | 60 | M | EP | 27 | Atrofia cortico-subcortical |
| 47 | 66 | F | EP | 23 | No imagen |
| 49 | 73 | M | EP | 26 | Atrofia cortical, depósitos de hierro NB |
| 50 | 75 | F | EP | 26 | Atrofia cortical, hidrocefalia |
| 54 | 80 | F | EP | 25 | Atrofia cortical, depósitos de hierro NB |

| | | | | | |
|----------|----|---|-----|----|--|
| 60 | 78 | M | EP | 30 | Encefalopatía multifarto |
| 71 | 66 | M | EP | 21 | No imagen |
| 88 | 68 | M | EP | 30 | No imagen |
| 89 | 74 | M | EP | 27 | Atrofia cortical, hidrocefalia |
| 97 | 63 | M | EP | 30 | Mínima atrofia cortical |
| 102 | 73 | M | EP | 21 | Atrofia cortical, depósitos de hierro en NB |
| 113 | 75 | F | EP | 28 | Atrofia cortical, depósitos de hierro en NB |
| | | | | | |
| 120 | 86 | M | NTH | 26 | Hidrocefalia con edema intersticial |
| 25 | 65 | M | VD | 22 | Encefalopatía multifarto, atrofia cortical |
| 41 | 77 | M | VD | 27 | Leucoaraiosis |
| 52 | 82 | M | VD | 2 | Encefalopatía multifarto, atrofia cortical |
| 70 | 77 | M | VD | 17 | Atrofia cortical |
| 91 | 94 | M | PTD | 7 | Higroma bifrontal |
| 103 | 70 | M | VD | 5 | Hidrocefalia con edema intersticial |
| 106 | 82 | F | VD | 24 | Encefalopatía multifarto, atrofia cortical |
| 119 | 83 | F | VD | 21 | Atrofia cortical, enfermedad de pequeño vaso |
| 48 | 76 | M | SE | 22 | Esclerosis hipocámpica izquierda |
| 107 | 75 | F | PTD | 28 | Higroma fronto-temporal derecho |
| 117 | 42 | M | SE | 5 | Encefalopatía parietal izquierda |
| | | | | | |
| 114 | 82 | M | PSP | 22 | Atrofia frontal, "colibrí" |
| 153 | 71 | F | PSP | 3 | Atrofia mesencefálica |
| 154 | 60 | M | PSP | 6 | Atrofia fronto-temporal, "colibrí" |
| 157 | 62 | F | PSP | 17 | Atrofia pedúnculo superior, "colibrí" |
| 158 | 65 | M | PSP | 25 | Atrofia mesencefálica |
| 159 | 77 | M | PSP | 16 | Atrofia frontal y esencefálica |
| 161 | 71 | F | PSP | 15 | Atrofia fronto-temporal |
| 39 | 62 | F | PSP | 0 | Atrofia frontal, "colibrí" |
| 69 | 58 | F | PSP | 18 | Atrofia frontal, "colibrí" |
| 9 | 42 | M | PSP | 15 | Atrofia peduncular superior, "colibrí" |

EA: Enfermedad de Alzheimer, EP enfermedad de Parkinson, NTH: Hidrocefalia normotensa del adulto, VD: enfermedad vascular cerebral, DPT: demencia postraumática, SE: Epilepsia sintomática.

Anexo 2.

Mini Mental Status Exam (FOLSTEIN)

1. Orientación: (0- 10)

Temporal:

fecha (1)___ mes (1) ___ día (1) ___ año (1) ___ estación (1) ___

Espacial:

lugar (1)___ piso (1) ___ ciudad (1) ___ comuna (1) ___ país (1) ___

2. Repetición inmediata: (0-3)

“Le voy a nombrar 3 palabras. Quiero que las repita después de mí. Trate de memorizarlas, pues se las voy a preguntar en 1 minuto más.

CIGARRO_____, FLOR_____, PUERTA_____.

Número de repeticiones: _____(máximo 6 veces en total)

3. Atención y calculo: (0-5)

Serial 7: (100 – 7) 93- 86- 79- 72- 65 (dar un punto en c/ respuesta correcta) o

deletrear MUNDO al revés: O ___ D ___ N ___ U ___ M___

(*Anotar mejor puntaje)

4. Memoria (0-3)

Pedir que repita las 3 palabras, dar 1 punto por cada respuesta correcta.

5. Lenguaje (0- 9)

Nombrar al reconocer un LAPIZ ___ y un RELOJ ___

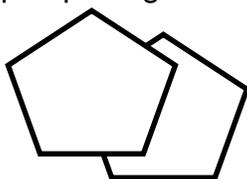
Repetir una frase “CONSTANTINO SE ENCUENTRA EN CONSTANTINOPLA”

Ejecución: “Tome este papel un su mano derecha, dóblelo por la mitad y déjelo en el suelo”

Leer y obedecer: “cierre los ojos”

Escribir una frase (sujeto, verbo, predicado)

Copiar pentágonos



= (0-2) ___ = (0-1) ___ = (0-3) ___ = (0-1) ___ = (0-1) ___ = (0-1) ___

Puntaje total: ___/30

ANEXO 3.

| ESTADIO | DESCRIPCIÓN | % sujetos | Duración promedio en años |
|---------|--|-----------|---------------------------|
| I | Unilateral sin o mínima discapacidad | 17 | 3 (7.1) |
| II | Bilateral, sin imposibilidad de balance | 29 | 6 (6.9) |
| III | Pérdida de reflejos posturales (pies juntos, ojos cerrados) | 23 | 7 (6.3) |
| IV | Severa discapacidad, requiere asistencia para caminar y sostenerse | 26 | 9 (7.2) |
| V | Confinado a la cama o a la silla de ruedas | 5 | 14 (3.4) |

Concentrado de los 183 pacientes reportados por los Drs. Hoehn y Yard, de acuerdo al estadio que ellos propusieron.

ANEXO 4.

Unified Parkinson Disease Rating Scale (UPDRS)

El UPDRS es un sistema de clasificación para seguir el curso longitudinal de la enfermedad del Parkinson . Consta de las siguientes secciones: 1) Estado mental, Conducta, y Humor, 2) AVD y 3) Sección Motora. Estas son evaluadas mediante una entrevista. Algunas secciones requieren múltiples grados asignados a cada extremidad. La cantidad total de puntos puede ser 199, donde 199 representa incapacidad total y 0 ninguna incapacidad.

I. Estado mental, conducta, humor

- **Afectación Intelectual**

0-Ninguna.

1-Leve (olvido con recuerdo parcial de algunos hechos sin otras dificultades)

2-Moderada pérdida de memoria con desorientación y moderada dificultad manejando problemas complejos.

3-Severa pérdida de memoria con desorientación temporal y a menudo espacial, severa dificultad con los problemas.

4-Severa pérdida de memoria con orientación sólo para personas, incapaz de juzgar o resolver problemas.

- **Trastorno del pensamiento**

0-Ninguno.

1-Sueño intenso.

2-Alucinaciones "benignas" con retención de las mismas.

3-Alucinaciones mas frecuentes sin retención, pueden interferir con la actividad diaria.

4-alucinaciones persistentes, ilusiones, o psicosis floridas.

- **Depresión**

0-No presente.

1-Periodos de tristeza o culpabilidad superiores a lo normal, nunca presentes durante más de unos días o una semana.

2-Depresión persistente durante más de 1 semana.

3-Síntomas vegetativos (insomnio, anorexia, abulia, pérdida de peso).

4-Síntomas vegetativos con tendencias suicidas.

- **Motivación/Iniciativa**

0-Normal.

1-Menos afirmativo, más pasivo.

2-Pérdida de iniciativa o desinterés en actitudes electivas.

3-Pérdida de iniciativa o desinterés en la rutina diaria.

4-Abandono, pérdida completa de motivación.

II. Actividades de la Vida Diaria

- **Lenguaje**

0-Normal.

1-Levemente afectado, sin dificultad para ser entendido.

2-Moderadamente afectado, puede ser preguntado para repetir las cosas.

3-Severamente afectado, se le pide frecuentemente que repita las cosas.

4-Ininteligible la mayor parte del tiempo.

- **Salivación**

0-Normal.

1-Leve.

2-Moderada excesiva salivación, babeo nocturno.

3-Marcado babeo.

- **Deglución**

0-Normal.

1-Obstrucción rara.

2-Obstrucción ocasional.

3-Requiere comida blanda.

4-Requiere intubación (sonda).

- **Escritura**

0-Normal.

1-Levemente pequeña o lenta.

2-Todas las palabras pequeñas pero legibles.

3-Severamente afectada, no son legibles todas las palabras.

4-mayoritariamente ilegibles

- **Cortar alimentos/Manejar Utensilios**

0-Normal.

1-Lento y poco hábil pero se vale solo.

2-Puede cortar la mayoría de alimentos, para lagunos necesita ayuda.

3-Le deben cortar la comida, pero puede alimentarse solo.

4-Necesita que lo alimenten

- **Vestir**

0-Normal.

1-Lento, pero sin ayuda.

2-Ocasionalmente necesita ayuda

3-Necesita considerable ayuda aunque puede hacer algunas cosas solo

4-Necesita ayuda completa

- **Higiene**

0-Normal

1-Lento pero sin ayuda

2-Necesita ayuda con la ducha o el baño o es muy lento en el cuidado de la higiene.

3-Necesita ayuda para lavarse, cepillarse los dientes, ir al baño.

4-Necesita ayuda completa.

- **Volverse en la Cama/ Ajustar las sábanas**

0-Normal.

1-Lento pero sin ayuda.

2-Puede volverse o ajustar las sábanas pero con gran dificultad.

3-No puede volverse o ajustarse las sábanas solo.

4-Necesita ayuda completa.

- **Caídas-Sin relación al 'Freezing'**

0-Ninguna.

1-Raras.

2-Ocasionales, menos de una por día.

3-Una por día de media.

4-Más de 1 por día.

- **'Congelamiento' ("freezing") al caminar**

0-Normal.

1-Raro, puede haber duda.

2-Caidas ocasionales por 'freezing'.

3-Frecuente freezing, caídas ocasionales.

4-Frecuentes caídas por 'freezing'.

- **Andar**

0-Normal.

1-Leve dificultad, arrastra las piernas o disminuye el balanceo de los brazos.

2-Moderada dificultad sin requerir ayuda.

3-Severa afectación que requiere asistencia.

4-No puede andar incluso con ayuda.

- **Temblor**

0-Ausente.

1-Leve e infrecuente, no molesta al paciente.

2-Moderado, molesto para el paciente.

3-Severo, interfiere con muchas actividades.

4-Marcado, interfiere con muchas actividades.

- **Molestias sensoriales relacionadas con el Parkinsonismo**

0-Ninguna.

1-Ocasionalmente tiene insensibilidad, hormigueo, y leve dolor.

2-Frecuente pero no estresante.

3-Sensación de dolor frecuente.

4-Dolor insoportable.

III. Examen Motor

- **Lenguaje**

0-Normal

1-Leve pérdida de expresión, dicción, volumen.

2-Monotono, mal articulado pero comprensible.

3-Marcada dificultad, difícil de entender.

4-Ininteligible.

- **Expresión Facial**

0-Normal.

1-Leve hipomimia.

2-Leve pero definida disminución anormal de la expresión.

3-Moderada hipomimia, labios separados parte del tiempo.

4-Cara fija, labios separados 1/2 cm o más con pérdida completa de expresión.

- **Temblor de Reposo**

- I. Cara**

0-Ausente.

1-Leve e infrecuente.

2-Leve y presente la mayor parte del tiempo.

3-Moderado y presente la mayor parte del tiempo.

4-Marcado y presente la mayor parte del tiempo.

II. Extremidad Superior Derecha (ESD)

0-Ausente.

1-Leve e infrecuente.

2-Leve y presente la mayor parte del tiempo.

3-Moderado y presente la mayor parte del tiempo.

4-Marcado y presente la mayor parte del tiempo.

III. EXTREMIDAD SUPERIOR IZQUIERDA

0-Ausente.

1-Leve e infrecuente.

2-Leve y presente la mayor parte del tiempo.

3-Moderado y presente la mayor parte del tiempo.

4-Marcado y presente la mayor parte del tiempo.

IV. EID

0-Ausente.

1-Leve e infrecuente.

2-Leve y presente la mayor parte del tiempo.

3-Moderado y presente la mayor parte del tiempo.

4-Marcado y presente la mayor parte del tiempo.

EXTREMIDAD INFERIOR IZQUIERDA

0-Ausente.

1-Leve e infrecuente.

2-Leve y presente la mayor parte del tiempo.

3-Moderado y presente la mayor parte del tiempo.

4-Marcado y presente la mayor parte del tiempo.

o Temblor Postural o de Acción

I. DERECHA

0-Ausente.

1-Leve, presente con acción.

- 2-Moderado, presente con acción.
- 3-Moderado, presente con acción y manteniendo la postura.
- 4-Marcado, interfiere con la alimentación.

II. EXTREMIDAD SUPERIOR IZQUIERDA

- 0-Ausente.
- 1-Leve, presente con acción.
- 2-Moderado, presente con acción.
- 3-Moderado, presente con acción y manteniendo la postura.
- 4-Marcado, interfiere con la alimentación.

o Rigidez

I. Cuello

- 0-Ausente.
- 1-Leve o sólo con actividad.
- 2-Leve/moderada.
- 3-Marcada, en todo el rango de movimiento.
- 4-Severa

II. DERECHA

- 0-Ausente.
- 1-Leve o sólo con actividad.
- 2-Leve/moderada.
- 3-Marcada, en todo el rango de movimiento.
- 4-Severa

III. EXTREMIDAD SUPERIOR IZQUIERDA

- 0-Ausente.
- 1-Leve o sólo con actividad.
- 2-Leve/moderada.
- 3-Marcada, en todo el rango de movimiento.
- 4-Severa

IV. EXTREMIDAD INFERIOR DERECHA

- 0-Ausente.
- 1-Leve o sólo con actividad.

- 2-Leve/moderada.
- 3-Marcada, en todo el rango de movimiento.
- 4-Severa

V. EXTREMIDAD INFERIOR IZQUIERDA

- 0-Ausente.
- 1-Leve o sólo con actividad.
- 2-Leve/moderada.
- 3-Marcada, en todo el rango de movimiento.
- 4-Severa

- **Tocarse la Punta de los Dedos**

I. Derechos

- 0-Normal.
- 1-Leve lentitud, y/o reducción en amplitud.
- 2-Moderada dificultad.
- 3-Severa dificultad.
- 4-Puede apenas realizarlos.

II. Izquierdos

- 0-Normal.
- 1-Leve lentitud, y/o reducción en amplitud.
- 2-Moderada dificultad.
- 3-Severa dificultad.
- 4-Puede apenas realizarlos.

- **Movimientos de la mano (abrir y cerrar las manos en rápida sucesión)**

I. Derecha

- 0-Normal.
- 1-Leve lentitud, y/o reducción en amplitud.
- 2-Moderada dificultad.
- 3-Severa dificultad.
- 4-Puede apenas realizarlos.

II. Izquierda

0-Normal.

1-Leve lentitud, y/o reducción en amplitud.

2-Moderada dificultad.

3-Severa dificultad.

4-Puede apenas realizarlos.

III. Movimientos Alternativos Rápidos (pronación y supinación de las manos)

I. Derecha

0-Normal.

1-Leve lentitud, y/o reducción en amplitud.

2-Moderada dificultad.

3-Severa dificultad.

4-Puede apenas realizarlos.

II. Izquierda

0-Normal.

1-Leve lentitud, y/o reducción en amplitud.

2-Moderada dificultad.

3-Severa dificultad.

4-Puede apenas realizarlos.

IV. Agilidad en la pierna (movimientos con el talón sobre el suelo, amplitud debería ser de 8 cm)

I. Derecha

0-Normal.

1-Leve lentitud, y/o reducción en amplitud.

2-Moderada dificultad.

3-Severa dificultad.

4-Puede apenas realizarlos.

II. Izquierda

0-Normal.

1-Leve lentitud, y/o reducción en amplitud.

- 2-Moderada dificultad.
- 3-Severa dificultad.
- 4-Puede apenas realizarlos.

V. Levantarse de una silla (con brazos cruzados)

- 0-Normal.
- 1-Lento, puede necesitar más de un intento.
- 2-Se empuja hacia arriba con los brazos o la silla.
- 3-Tiende a caer hacia atrás, puede necesitar muchos intentos pero puede levantarse sin ayuda.
- 4-Incapaz de levantarse sin ayuda.

VI. Postura

- 0-Normal erecto.
- 1-Levemente inclinado, podría ser normal para una persona mayor.
- 2-Anormal. Inclinado, puede que hacia algún lado.
- 3-Severa inclinación con escoliosis.
- 4-Marcada flexión con postura muy anormal.

VII. Marcha

- 0-Normal.
- 1-Anda lentamente.
- 2-Anda con dificultad, con poca o sin ayuda, algún balanceo, pasos cortos o propulsión.
- 3-Afectación severa, necesita ayuda frecuente.
- 4-No puede andar.

VIII. Estabilidad Postural (test de retropulsion)

- 0-Normal.
- 1-Se recupera sin ayuda.
- 2-Caería si no se coge.
- 3-Se cae espontáneamente.
- 4-Imposible mantenerse de pie.

IX. Bradicinesia/ Hipocinesia

0-Nada.

1-Minima lentitud, podría ser normal.

2-Leve lentitud y excasez de movimientos, definitivamente anormales, o disminuye la amplitud de movimientos.

3-Moderada lentitud, excasez de movimientos, o disminuye la amplitud de movimientos.

4-Marcada lentitud, excasez de movimientos, o disminuye la amplitud de movimientos.

ANEXO V

SISTEMA DE CUANTIFICACIÓN DE LA INMUNOPOSITIVIDAD MEDIANTE COLORIMETRÍA

Juan Carrizales Rodríguez

Ma. Esther Jimenez-Cadeville

Ildfonso Rodríguez Leyva

OBJETIVO

Desarrollar un método de cuantificación confiable, certero y reproducible que permita cuantificar la expresión de proteínas patógenas por inmunorreactividad en la piel de sujetos con enfermedades neurodegenerativas. Este método se basa en

la fotografía del área a evaluar (con parámetros específicos) y mediante la aplicación del sistema RGB calificar el área de positividad, permitiéndonos detectar sin sesgos la posible diferencia en las poblaciones a estudiar. Recientemente para hacer aun mas confiable el procedimiento hemos agregado a la valoración la medición de la intensidad, estimando ahora área e intensidad de la positividad a la reacción antígeno anticuerpo.

ANTECEDENTES

Las enfermedades neurodegenerativas son proteinopatías y su diagnóstico definitivo se basa en la determinación de su expresión en el tejido cerebral. Habiendo logrado demostrar que esta expresión puede detectarse también en la piel, requerimos de un método que nos permita cuantificar la presencia de estas proteínas en la piel de sujetos enfermos y determinar si existe un nivel de corte que diferencie a la posibilidad de su expresión en sujetos no enfermos.

Al lograr demostrar la presencia de las proteínas marcadoras de neurodegeneración en pacientes enfermos, utilizamos un método semi-cuantitativo que fuese similar al usado en neuropatología para cuantificar la presencia de placas neurofibrilares (proteína Tau fosforilada) en el tejido cerebral): CERAD, que mide en + escasa, ++ moderada y +++ frecuente la positividad. Este sistema de calificación, nos permitió detectar una diferencia significativa ($p < 0.001$) entre enfermos y sanos evaluados. Desafortunadamente, cuando intentamos publicar nuestros resultados, fuimos cuestionados sobre la confiabilidad de este sistema ante lo que decidimos evaluar contando el número de células, como lo hacen los histopatólogos para calificar la inmunopositividad. Para determinar la confiabilidad de este sistema se compararon los valores obtenidos por dos evaluadores diferentes, encontrando una correlación entre ellos del 95 %.

Como se ha visto, que el ojo humano es menos certero que el tener una cuantificación computarizada, utilizamos un método de colorimetría. Basados en los principios numéricos del modelo RGB (red, green, blue) y luminiscencia, logramos seleccionar y cuantificar los pixeles de color rojo que corresponden solo a la positividad expresada en el tejido estudiado y la comparamos con el resultado

obtenido por cuantificación celular. Concomitantemente se mide la intensidad de la reacción buscando encontrar una diferencia más clara en las poblaciones estudiadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El equipo utilizado en el proceso:

- a) Microscopio Óptico Nikon modelo LABOPHOT-T2 utilizando el objetivo de 40x.
- b) Cámara NIKON modelo COOLPIX S10 de 6 megapíxeles.

Cada muestra de tejido fue fotografiada en cinco áreas distintas (figura 1), cada toma se realizó con las mismas condiciones:

1. Balance de blancos automático
2. Zoom óptico máximo 10x.
3. Fuente de luz y apertura condensador máxima

Cada fotografía debe cumplir con las siguientes características que permita tener uniformidad en las mismas:

- a) Dimensión: 2816 x 2112 píxeles
- b) Resolución de 300 ppp
- c) Profundidad de 24 bits
- d) Modelo color sRGB.
- e) Formato JPEG

Cada imagen se cargo en el software Adobe Photoshop Cs 6 v. 12.0, donde se sometió a una corrección selectiva de color, tras lo cual pasa a un segundo procesamiento en el sistema Image Pro Plus 7.0 (Media cybernetics) donde se convierte una imagen en escala de grises, que nos permite tener un rango de 0 a 255 tonos, del blanco al negro, detectando en tonos más oscuros los

correspondientes específicos para la inmunopositividad. Sobre esta imagen se hace una recolorización para facilitarnos la cuantificación, se selecciona el área a evaluar, se cuantifica por píxeles, se transforma en un porcentaje del área de positividad, se obtienen valores numéricos correspondientes a cada fotografía, se exportan al software Microsoft Office Excel 2010, para tener la base de datos y finalmente se hace la estadística que nos permita detectar las diferencias de manera objetiva, confiable y sin sesgos (Tabla 1).

Como el aminocarbazol es un “cromógeno” que genera una coloración roja en los sitios en donde se ha unido el anticuerpo, puede ser detectado midiendo tanto la intensidad de la reacción como su distribución espacial .

PROCESO

Se toma la imagen original, se realiza una copia de la imagen para trabajar sobre esta., se hace una corrección selectiva con el programa Adobe Photoshop, filtrando y aclarando los tonos confusos (azul, cian, amarillos, neutros, blancos, verdes, negros), colocando sus valores de tinte negro componente en - 100% . Esto nos produce una imagen donde las únicas estructuras de color intenso (oscuro) corresponden a aquellas que expresan positividad. En Image Pro Plus 7.0 se aísla el canal verde del RGB, que nos ofrece una imagen en escala de grises de mayor contraste y definición, eliminando los canales rojo y azul. La re-colorización consiste en aplicar un “pseudocolor” que nos permite visualizar y clasificar en 6 categorías de color las estructuras de acuerdo a su luminiscencia, desde las más claras/ luminicentes (tonos de grises 0 al 42) que corresponden a intersticio/citoplasma carente de inmunopositividad y que se mostraran en rojo, hasta las estructuras más oscuras (tonos 238 a 255) que se mostraran en azul y corresponden a sitios de máxima positividad. Finalmente se delimita el área de medición e interés, se cuantifica mediante el “gotero”, seleccionando un punto de inmunopositividad representativo, que se medirá y el sistema nos cuantifica el total de píxeles con los mismos valores existentes en la imagen, y que corresponden a la expresión en el área de piel a calificar. Una vez obtenidos los valores, pueden ser calificados,

comparados y determinar si existe una diferente expresión de la inmunorreactividad en los tejidos evaluados (tabla 1).

La intensidad óptica integrada (IOD) nos permitirá además, medir la densidad de la positividad (aminoetilcarbazol que tiñe al anticuerpo) de la reacción midiéndola en pixeles al colocar una luz posterior a la muestra, mostrándonos que entre más oscuro sea el pixelaje más densa es la reacción y menos deja pasar a la luz. Para hacer mas evidente la IOD se aplica en siete tiempos de corrección selectiva para filtrar (bloquear) las estructuras que no son positivas y que pudieran generar ruido, dejando intactos los pixeles que componen la inmunopositividad (Figura 2)

RESULTADOS

Este método nos permitió detectar con claridad, diferentes niveles de área inmunopositiva en la población enferma respecto a la sana. La kappa al comparar la cuantificación por porcentaje de células que expresan inmunopositividad contra el área total de expresión fue de 0.8, lo que nos da la seguridad de que sea un método confiable y objetivo, con la ventaja de que al ser digitalizado disminuye considerablemente la posibilidad de error.

CONCLUSIÓN

La medición por colorimetría de la inmunopositividad en la piel mediante un sistema RGB digitalizado, es confiable, objetivo, medible y comparable, permitiéndonos detectar diferencias entre la expresión de positividad entre sujetos problema y control.

Aunque debe ser reproducido por otros laboratorios, este sistema nos permitirá por ahora detectar diferencias en la expresión de diferentes proteínas anormales en la piel de sujetos enfermos de distintos padecimientos neurodegenerativos, lo que potencialmente puede ayudarnos en vida de los pacientes a tener un diagnóstico más temprano (lo que se hacia previamente hasta tener tejido cerebral).

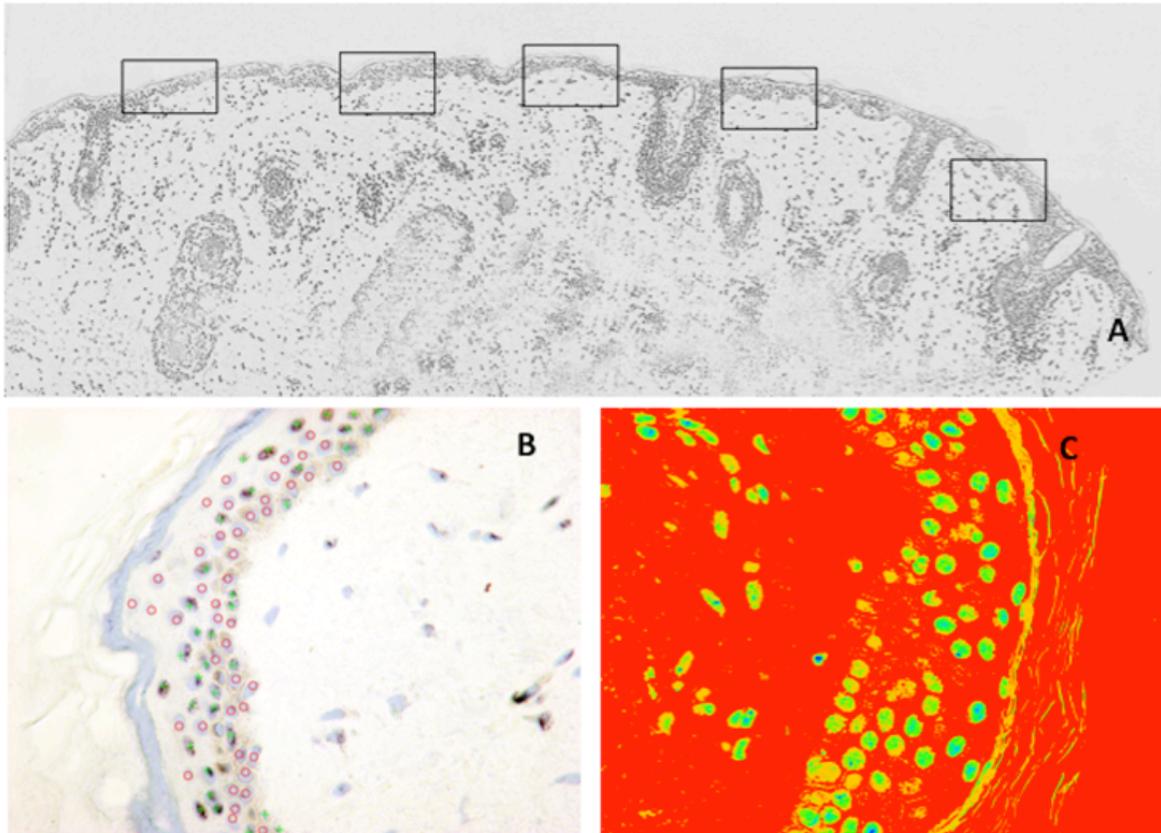


Figura 1.

De cada biopsia de piel se tomaron cinco fotografías (A). Se hizo una evaluación de células con inmunorreactividad por conteo, verdes positivas, rojas negativas (B) y una evaluación por colorimetría en el área seleccionada en la epidermis de cada toma fotográfica realizada (C).

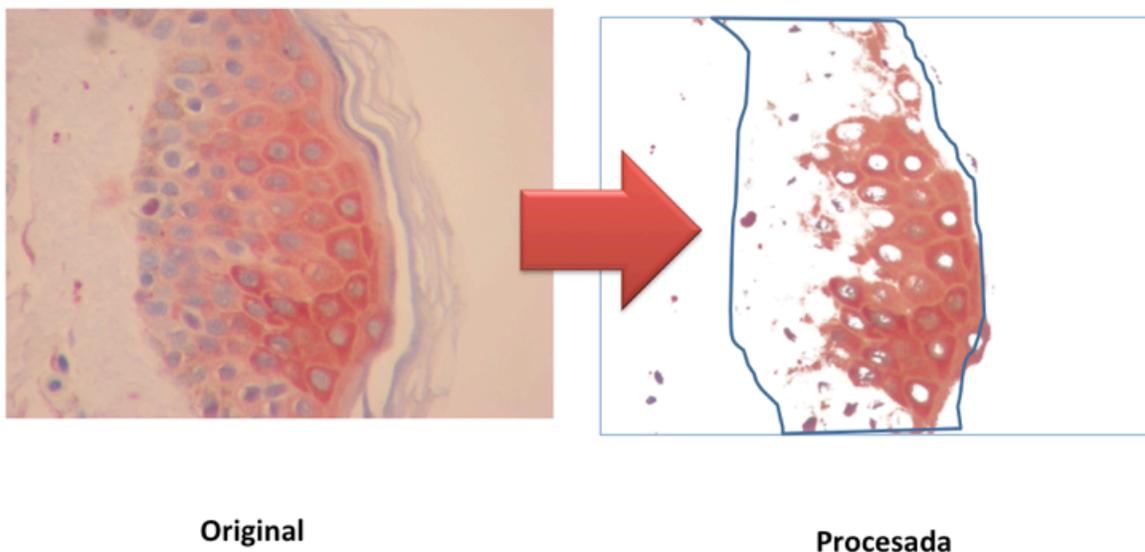


Figura 2. Medición de la intensidad mediante el filtraje de los pixeles en donde no hay positividad.

| Division | COLOR | RGB | Positividad | LIMITES | Divisiones operacionales |
|----------|----------------|-------------|--------------------|----------|--------------------------|
| 1 | AZUL | 0, 0, 255 | Granular máxima | 0 -42 | Granular |
| 2 | AZUL CLARO | 0, 170, 255 | Granular moderada | 43- 85 | |
| 3 | Verde ópalo | 0, 255, 97 | Granular mínima | 86 - 127 | |
| 4 | VERDE amarillo | 103, 255, 0 | Difusa | 128- 170 | Difusa |
| 5 | NARANJA | 255, 170, 0 | Negatividad oscura | 171- 237 | Negatividad |
| 6 | ROJO | 255, 0, 0 | Negatividad clara | 238- 255 | |

Tabla 1.

Sistema RGB. Azul expresa positividad máxima, azul claro moderada, verde ópalo mínima, verde amarillo una positividad difusa, naranja negatividad celular, rojo negatividad de fondo.

PRODUCTOS

1. Rodriguez-Leyva, I., Laura Calderon-Garciduenas, A., Arely Renteria-Palomo, A., Valdez-Rodriguez, R., Sepulveda, J., & Pablo Castanedo-Cazares, J. Alpha-Synuclein Expression in the Epidermis and Epithelial Tissue in Parkinsonism. In *ANNALS OF NEUROLOGY* 2012;(Vol. 72, pp. S104-S104). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY-BLACKWELL.
2. Rodriguez-Leyva, I., Renan-Perez, J., Calderon-Garciduenas, A. L., Santoyo, M. E., Chii, E., & Jimenez-Capdeville, M. E. Progressive Supranuclear Palsy: Diagnosis through Skin Biopsy. In *ANNALS OF NEUROLOGY* . 2013. Vol. 74, pp. S51-S51). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY-BLACKWELL.
3. Rodriguez-Leyva, I., Santoyo, M., Chii, E., Medina-Mier, V., Torres, B., Castanedo, J. P., & Jimenez-Capdeville, M. E. Presence of Phosphorylated Tau Protein in the Skin of Patients with Alzheimer Disease. In *ANNALS OF NEUROLOGY* . 2013; (Vol. 74, pp. S63-S63). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY-BLACKWELL.
4. Rodriguez-Leyva, I., Calderon-Garcidueñas, A., Santoyo, M., Chi, E., Medina-Mier, V., & Jimenez-Capdeville, M. Progressive Supranuclear Palsy (PSP): Diagnosis through Skin Biopsy (P1. 014). *Neurology*, 2014; 82(10 Supplement), P1-014.
5. Rodriguez-Leyva, I., Calderon-Garciduenas, A., Santoyo, M., Chi, E., Medina-Mier, V., & Jimenez-Capdeville, M. Presence of Phosphorylated Tau, alpha-Synuclein and Amyloid Protein in the Skin of Patients with Clinical Diagnosis of Alzheimer Disease (S38. 003). *Neurology*, 2014; 82(10 Supplement), S38-003.
6. Rodriguez-Leyva, I., Calderon Garciduenas, A. L., Santoyo, M. E., Medina Mier, V., Chii, E., JSegoviano, J. C., & Jimenez-Capdeville, M. E. The Skin, Like the Brain, Expresses Distinctive Proteins Altered in Neurodegenerative Diseases. In *ANNALS OF NEUROLOGY* . 2014; Vol. 76, pp. S119-S119). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY-BLACKWELL.
7. Rodríguez - Leyva, I., Calderón - Garcidueñas, A. L., Jiménez - Capdeville, M. E., Rentería - Palomo, A. A., Hernandez - Rodriguez, H. G., Valdés - Rodríguez, R., et al & Santoyo, M. E. α - Synuclein inclusions in the skin of Parkinson's disease and parkinsonism. *Annals of clinical and translational neurology*, 2014; 1(7), 471-478.
8. Carrizales-Rodriguez, J., Jimenez-Capdeville, M., Rodriguez-Leyva, I., & Chi, E. Description of a method: Assessment of phosphorylated Tau protein by immunohistochemistry in the skin of patients with neurodegenerative diseases (P5. 020). *Neurology*, 2015; 84(14 Supplement), P5-020.

9. Rodriguez-Leyva, I., Chi-Ahumada, E., Calderon-Garcidueñas, A., Medina-Mier, V., Martel-Gallegos, G., Zarazua, S., & Jimenez-Capdeville, M. Skin cells express altered proteins that characterize the most common neurodegenerative diseases (S33. 006). *Neurology*, 2015; 84(14 Supplement), S33-006.
10. Castanedo-Cazares, J. P., & Rodriguez-Leyva, I.. Skin biomarkers for neurodegenerative disease: a future perspective. *Neurodegenerative disease management*, 2015; 5(6), 465-467.
11. Ildfonso, R. L., Erika, C. A., Laura, C. G., Verónica, M. M., & Martha, S. (2015). Presence of Phosphorylated Tau Protein in the Skin of Alzheimers Disease Patients. *J Mol Biomark Diagn S*, 6, S6-005.
12. Ildfonso, Rodríguez-Leyva, Calderón-Garcidueñas Ana Laura, and Jiménez-Capdeville María. "Plegamiento Anormal de Proteínas y Neurodegeneración." *Revista Mexicana de Neurociencia*, 2015; 51-72.
13. Epigenética en la Enfermedad Neurológica. Jimenez Cataño Ma Esther, Rodriguez Leyva Ildfonso. *Clinicas Mexicanas de Neurología*. 2015; 155-162. ISBN: 978-607-8151-28-6
14. Rodriguez-Leyva I, Chi-Ahumada E, Calderon-Garcidueñas AL, Medina-Mier V, Santoyo M, Jimenez-Capdeville Ma E. (). Presence of Phosphorylated Tau Protein in the Skin of Alzheimers Disease Patients. *J Mol Biomark Diagn S* 6, 2015, S6-005.
15. Rodríguez-Leyva Ildfonso. Demencia es Devastadora. Demencias. Una visión panorámica. 2015: 21-32. ISBN: 97