

Alz-tau[®], biomarcador para detección temprana de la enfermedad de Alzheimer



Una innovadora tecnología de apoyo al diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer basado en un importante descubrimiento científico de variantes anómalas de tau en plaquetas humanas.

Biomarcador Alz-tau[®]



Biomarcador Alz-tau®

1 Resumen Ejecutivo

La enfermedad de Alzheimer (EA), como otros desordenes neurodegenerativos es el principal puzzle para la medicina moderna. En este contexto, **es crítico determinar la presencia de un proceso patológico que podría conducir a la enfermedad basado en aplicaciones diagnósticas cuantitativas y confiables.** Para conseguir este propósito, Neuroinnovation en conjunto con el Centro Internacional de Biomedicina ICC, han desarrollado un innovador y avanzado método de detección para EA, basado en biomarcadores moleculares.

Esta tecnología consiste en un procedimiento no-invasivo, en una muestra de sangre, que permite establecer de manera empírica la presencia y progresión de EA en los pacientes, como también la detección temprana de la enfermedad. El uso de este biomarcador para identificar personas con EA antes de los síntomas clínicos es esencial para el desarrollo de potenciales drogas para la intervención temprana. Por otra parte, la determinación de marcadores periféricos de la EA puede ayudarnos a entender la patofisiología del proceso neurodegenerativo en EA.

12 años de investigación llevados a cabo por nuestro equipo han probado que la presencia de la proteína tau oligomerizada en plaquetas humanas, discrimina entre pacientes de Alzheimer y controles saludables. Existe una estrecha correlación entre la presencia de esta proteína plaquetaria anómala con el grado de deterioro cognitivo en sujetos con la EA, evaluado mediante neurociología y más importante aún, con respecto a los cambios volumétricos en ciertas áreas del cerebro evaluados por neuroimágenes (MRI, imagen por resonancia magnética) [1].

Hemos aprovechado estas diferencias para desarrollar una herramienta altamente sensible y eficiente, permitiendo determinar la presencia y la progresión de EA en una gran población de pacientes. Cinco estudios clínicos diferentes han permitido la validación de la tecnología, cuatro de los cuales ya han sido publicados en revistas científicas, más uno que está siendo desarrollado.

Los cuatro estudios clínicos en 133 sujetos con EA y 91 controles sanos demostraron que la relación entre la variante de alto peso molecular de tau (HMWtau) y la tau normal (LMWtau), es significativamente más alta en sujetos EA con deterioro cognitivo que en sujetos controles saludables, y un estudio demuestra la asociación de tau con una atrofia en regiones específicas del cerebro.

Alz-tau® es un marcador molecular no-invasivo y no presenta riesgos en comparación con otros procedimientos tales como el marcador de líquido cefalorraquídeo (CSF), que son altamente invasivos, pese que su sensibilidad es adecuada. La tecnología patentada Alz-tau® es altamente innovadora porque se basa en un descubrimiento científico de alto impacto de nuestro laboratorio.

Considerando la necesidad de marcadores cuantitativos para esta enfermedad, y la ausencia de otras herramientas de diagnóstico certeras, la tecnología Alz-tau® es el primer biomarcador no invasivo basado en proteína tau que permite una detección temprana de EA y un diagnóstico riguroso de esta enfermedad.

2 La enfermedad de Alzheimer y la proteína tau

El descubrimiento por Alois Alzheimer de los ovillos neurofibrilares (NFTs) en el cerebro de pacientes con desordenes neurodegenerativos que llevan su nombre (EA), provocó un impulso fundamental para el estudio de sus sustratos moleculares [2]. El principal componente de NFTs, los filamentos helicoidales pareados (PHFs), son formados principalmente por el autoensamblaje de formas hiperfosforiladas de proteína tau [3]. Desde el descubrimiento de tau a mitad de los años 70, el equipo de Maccioni ha llevado a cabo numerosos estudios que han mejorado nuestro conocimiento sobre la hiperfosforilación de tau, y alteraciones del citoesqueleto neuronal; sin embargo, la base estructural precisa de la auto agregación patológica de tau aún queda por dilucidar.

La EA es un desorden multifactorial en que alteraciones de proteínas, estrés oxidativo, neuroinflamación, desregulación inmune, discapacidad en la comunicación neuro-glial, y agentes neurotóxicos aparecen como los principales factores conducentes a la degeneración neuronal, el balance entre estos parece variar de paciente en paciente. Aunque diversos, estos factores inducen señalización deletérea a través de diferentes conjuntos de receptores neuronales que convergen en la hiperfosforilación de tau [4].

Esto plantea la pregunta de qué gatilla exactamente a la fosforilación patológica. Basados en estudios estructurales, junto con la elucidación de las cascadas de señalización en la neurodegeneración, postulamos una hipótesis basada en el concepto que la *hiperfosforilación de tau constituye una vía común final en la patogénesis de EA*, sobre el cual converge una gran cantidad de mecanismos de señalización. La proteína tau de bajo peso molecular (LMWtau) es el principal componente de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) en axones, y juega un rol crítico en la estabilización de microtúbulos e inducción de su propio ensamblaje.



Biomarcador Alz-tau®

Una de las propiedades más intrigantes de este polipéptido cerebral es que, bajo condiciones patológicas, tau se auto agrega en filamentos helicoidales pareados (PHFs), que se convierten en ovillos neurofibrilares (NFTs), una de las características neuropatológicas de EA y tauopatías. Sin embargo, hoy sabemos que tau hiperfosforilada u oligómeros de tau ejercen los efectos patológicos, alterando los patrones normales de interacción de la red del citoesqueleto neuronal. Además, se ha evidenciado una relación entre la oligomerización de tau y el deterioro cognitivo [5].

3 El Biomarcador Alz-tau®

Hemos desarrollado un innovador método de detección para EA basado en el biomarcador Alz-tau® [1,6,7]. La presencia de variantes tau de alto (HMW) y bajo (LMW) peso molecular en plaquetas humanas y el significativo incremento de tau HMW/LMW en pacientes con EA es la base para esta tecnología. Por esta razón, la invención de Alz-tau® es un biomarcador altamente innovador, eficiente y no invasivo para el diagnóstico temprano de EA. Estos descubrimientos indican que los patrones de tau plaquetaria HMW/LMW pueden ser usadas como biomarcador para EA. También tiene implicaciones para el potencial desarrollo de biomarcadores para otras enfermedades neurodegenerativas basadas en tau [1,6,7,8].

La relación de tau plaquetaria se obtuvo para sujetos sanos y pacientes con EA como describió Neuman et al. 2011[7]. Análisis densitométricos de inmunoblots a través de ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA), muestran que la relación HMWtau/LMWtau es significativamente más alta en los grupos EA en relación con los controles (Fig. 3A, B). La formación de ovillos neurofibrilares (NFTs) ha sido identificado como el principal evento involucrado en neurodegeneración, debido a la conversión de tau soluble (LMWtau) u oligómeros (HMWtau) en filamentos insolubles. Este descubrimiento nos ofrece una tremenda oportunidad en el campo de los biomarcadores, dado que las vías de señalización alteradas están involucradas en la degeneración de las neuronas en EA [9,10].

Durante más de 40 años ha habido una alta cantidad de investigación en biomarcadores para detección de EA, todos ellos han fallado debido a blancos erróneos. Por ejemplo, la búsqueda de proteínas amiloides en sangre, saliva y orina no han tenido éxito. El único método utilizado para la detección precisa de EA se basa en mediciones de proteína tau en líquido cefalorraquídeo (CSF), el objetivo correcto, pero este método es altamente invasivo [11,12]. La existencia de un biomarcador confiable y altamente eficiente tal como Alz-tau® es relevante como una herramienta de apoyo al diagnóstico para la detección temprana de EA, como también para la búsqueda de nuevas drogas contra la enfermedad para una intervención temprana, en que la enfermedad pueda ser controlada. Los tratamientos actualmente disponibles alivian temporalmente algunos síntomas, pero no curan la patología.

Hasta ahora la tecnología Alz-tau® aparece como la mejor solución para el diagnóstico de EA, considerando su utilidad y que no hay otro método no-invasivo validado. Hoy en día, el diagnóstico de EA es realizado por neurosicología, ya que las neuroimágenes por sí solas no proporcionan un diagnóstico efectivo. Alz-tau® exhibe una sensibilidad de 75.7% y una especificidad de 73.7% (ver figura 2).

4 Estudios Experimentales y Metodología

El método está basado en el procesamiento y aislamiento de plaquetas desde muestras de sangre periférica obtenido de cada sujeto, resuspendido en una solución buffer a temperatura ambiente y luego centrifugada a 1600xg a 4°C, para evitar la activación de células, obteniéndose el pellet plaquetario que será lisado en presencia de inhibidores de proteasas. Se realiza un SDS-PAGE en el que múltiples muestras son sujetas a electroforesis seguido de un análisis por western blots utilizando el anticuerpo monoclonal anti-tau generado en nuestro laboratorio. Bandas inmunorreactivas son detectadas mediante el uso del sustrato quimioluminiscente que reacciona muy específicamente con el anticuerpo con afinidad a tau (ver figura 1). Las especies LMWtau son aquellas con peso molecular ≤ 70 kDa, mientras los oligómeros de tau entre 70 a 240 kDa son considerados HMWtau.

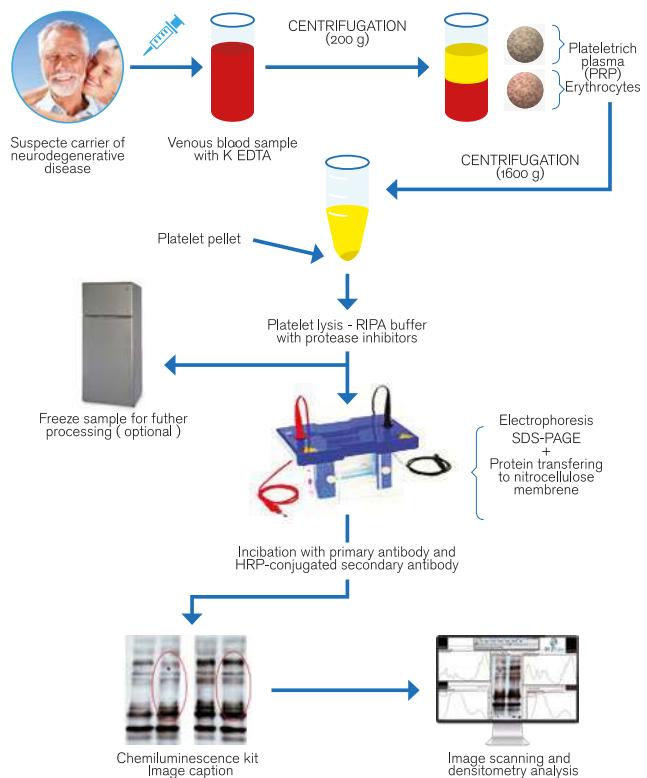


Figura 1: Procedimiento para usar el biomarcador plaquetario. Muestras obtenidas directamente de pacientes son procesadas en el laboratorio, las plaquetas separadas y la presencia de tau analizada por western blots mediante el uso del anticuerpo anti-tau (monoclonal que hemos generado contra tau plaquetaria humana).



5 Análisis estadístico y Resultados

Se realizaron análisis descriptivos y comparativos con la prueba t-student's para comparar los dos grupos, y la prueba de chi-cuadrado para variables categóricas. Además, los efectos de tamaño (estadístico de Cohen's) fueron determinados para evaluar diferencias entre los grupos. La asociación entre la relación tau HMW/LMW, variables demográficas, y escalas cognitivas fueron evaluadas con la correlación de Pearson's. Los análisis se realizaron a $p < 0.05$. Tau plaquetaria fue obtenida desde muestras de sangre de individuos de distintas edades entre 50 a 90 años. En los análisis de inmunoblots, la relación HMWtau/LMWtau, muestra una sensibilidad de 75.7% y una especificidad de 73.7% para discriminar entre sujetos EA y controles (Fig 2). En la figura 3A se muestra los inmunoblots representativos de tau plaquetaria marcadas con un anticuerpo específico para tau. Las bandas tau de alto peso molecular (HMW-tau) pueden ser apreciadas, con mayor inmunoreactividad en pacientes con EA comparado con controles (Fig. 3A).

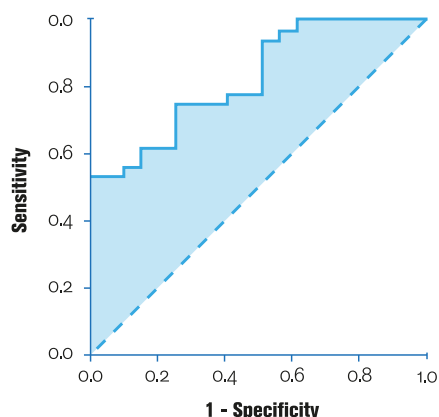


Figura 2. Curva ROC muestra la sensibilidad y 1-especificidad de la relación tau plaquetaria como un biomarcador para EA. Área bajo la curva corresponde a 0.824 (IC 95: 0.716-0.932).

La relación (HMWtau/LMWtau) se obtuvo para sujetos controles y EA, mediante un programa adecuado para determinar densitometría de cada patrón electroforético y fue estadísticamente analizado (Tabla 1 y figura 4). Para esto, se determinó dos áreas importantes de análisis que corresponden a HMWtau (rectángulo rojo) y LMWtau (rectángulo azul). Como muestra la figura 3B, al comparar ambos inmunoblots (sujetos saludables "C" y pacientes EA), vemos que los gráficos del rectángulo azul no muestran mayor diferencia en comparación a los dos gráficos de rectángulos rojos, ya que la derecha tiene mayor densidad

Tabla 1: Resultados demográficos y tabla resumen de cuatro estudios independientes realizados por el Centro Internacional de Biomedicina ICC y Neuroinnovation.

	Estudio 1 (H. Salvador)	Estudio 2 (H.C.U. Chile)	Estudio 3 (Barcelona)	Estudio 4 (H. Salvador)
Sujetos Controles	19	37	15	20
Hombre	5	13	6	4
Mujer	14	24	9	16
Edad (prom)	70	71	66	67,2
Nivel Educativo (años)	11	13	NI	14
GDS	1,15	1,25	1,53	1
Paciente EA	37	41	36	19
Hombre	21	24	7	4
Mujer	26	17	29	15
Edad (prom)	76	73	75	75,7
Nivel Educativo (años)	8	11	NI	12
GDS	5	4,73	3,97	4,68
Algoritmo Alz-tau® para Controles (prom)	0,89	1,52	1,15	1,02
Algoritmo Alz-tau® para EA (prom)	2,87	2,06	1,45	1,22
Sensibilidad	75,68%	61,25%	71,43%	68,42%
Especificidad	73,68%	52,00%	64,29%	75,00%

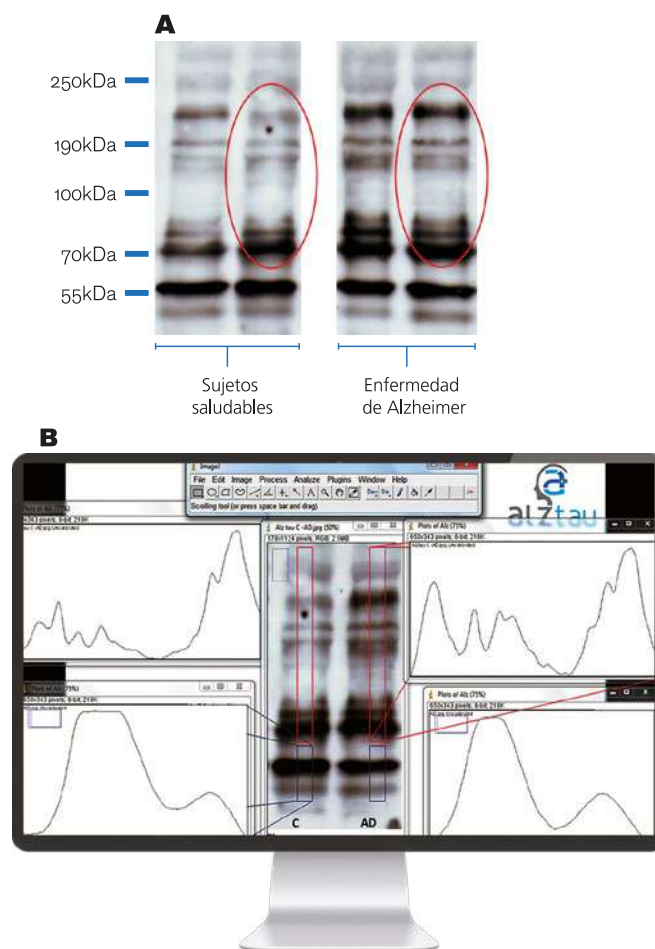


Figura 3. A) Inmunoblots representativos de tau plaquetaria con el anticuerpo anti tau. Bandas de alto peso molecular (≥ 70 kDa) pueden ser apreciadas, con mayor inmunoreactividad en pacientes con EA comparado con sujetos saludables. **B)** Análisis densitométrico mediante el programa computacional ImageJ para cuantificar la densidad de bandas, permitiendo así obtener la relación entre HMWtau versus LMWtau.

en sus bandas, comparado con sujetos sanos (C). Los valores obtenidos para cada paciente correlacionan con las pruebas neuropsicológicas como la escala de deterioro global (GDS) (Tabla 1 y figura 5).

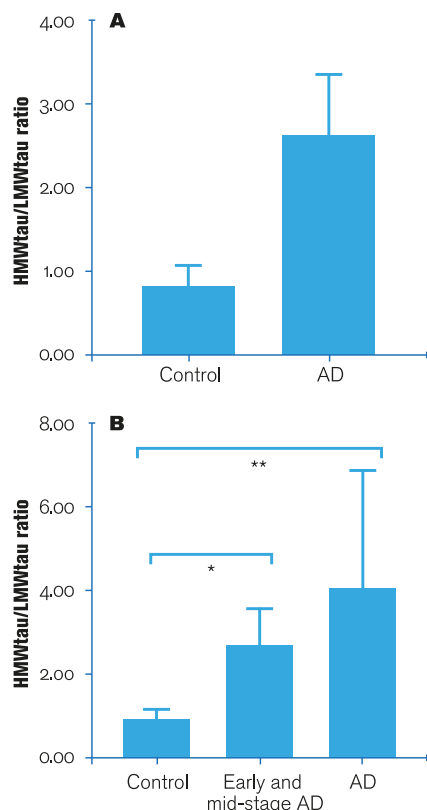


Figura 4: **A)** Relación HMWtau/LMWtau plaquetaria es elevada en muestras EA al comparar con muestras control ($p < 0.001$). **B)** Estas diferencias pueden ser apreciadas también cuando sujetos EA son agrupados en enfermedad leve a moderada ($p^* = 0.016$) y EA avanzada ($**p = 0.004$). Barras representan intervalos de confianza del 95%.

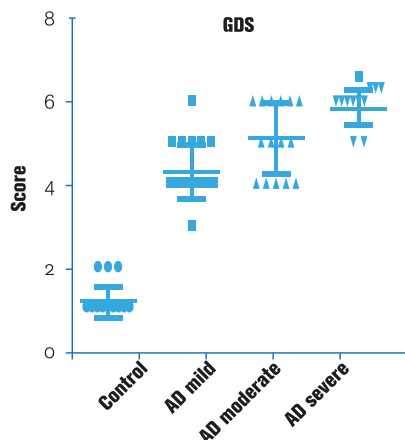


Figura 5: Gráfico de distribución de puntaje GDS para cada paciente participante en el estudio. Diferencias estadísticamente significativas entre sujetos saludables y EA, y entre cada estado observado de la enfermedad (leve, moderado y severo).

6 Propiedad Intelectual

- Patente N° US 9,012,237 B2 "Innovative Blood Platelets Biomarker for Early Diagnosis of Alzheimer's Disease".
- Registro de Marca Alz tau® y Know how de Neuroinnovation.

7 Referencias

- [1] Slachevsky A, Guzmán-Martínez L, Delgado C, Reyes P, Fariás GA, Muñoz-Neira C, Bravo E, Fariás M, Flores P, Garrido C, Becker JT, López OL, Maccioni RB (2017). Tau Platelets Correlate with Regional Brain Atrophy in Patients with Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 55, 1595-1603.
- [2] Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Psychiatr Psych gericht Med.* 64, 146-148.
- [3] Fariás G, Cornejo A, Jimenez J, Guzman L, Maccioni RB (2011) Mechanisms of tau self-aggregation and neurotoxicity. *Curr Alzheimer Res* 8, 608-614.
- [4] Morales I, Fariás G, Maccioni RB (2010) Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation* 17, 202-204.
- [5] Guzman-Martinez L, Fariás GA, Maccioni RB (2013) Tau Oligomers as Potential Targets for Alzheimer's Diagnosis and Novel Drugs. *Front Neurol* 4, 167.
- [6] Fariás G, Perez P, Slachevsky A, Maccioni RB (2012) Platelet tau pattern correlates with cognitive status in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 31, 65-69.
- [7] Neumann K, Fariás G, Slachevsky A, Perez P, Maccioni RB (2011) Human platelets tau: a potential peripheral marker for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 25, 103-109.
- [8] Guzman-Martinez L, Fariás GA, Maccioni RB (2012) Emerging noninvasive biomarkers for early detection of Alzheimer's disease. *Arch Med Res* 43, 663-666.
- [9] Guzmán-Martínez L, Maccioni RB, Fariás GA, Fuentes P, Navarrete LP. Biomarkers for Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2019;16(6):518-528.
- [10] Guzmán-Martínez L, Tapia JP, Fariás GA, González A, Estrella M, Maccioni RB. The Alz-tau biomarker for Alzheimer's Disease: Study in a Caucasian Population. *J Alzheimers Dis.* 2019; 67(4): 1181-1186.
- [11] Maccioni RB, Lavados M, Maccioni CB, Mendoza-Naranjo A (2004) Biological markers of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Curr Alzheimer Res* 1, 307-314.
- [12] R.B. Maccioni, M. Lavados, CB Maccioni, G. Fariás and P. Fuentes (2006) "Anomally phosphorylated tau protein and Abeta fragments in the CSF correlates with cognitive impairment in MCI subjects". *Neurobiol Aging* 27: 237-244.

8 ¿Dónde se realiza el examen Alz-tau ?

En el Laboratorio clínico IMALAB, ubicado al interior del Hospital Clínico de la Fuerza Aérea de Chile (Av. Las Condes 8631, Las Condes). Sólo se tomarán exámenes previa hora agendada.

Requisitos:

Contar con una orden médica solicitando el examen.
Comer liviano antes de la toma de muestra de sangre.
La edad para realizarse este examen debe ser definido por su médico tratante.

Mayor información y reserva de horas ingrese a la página web o llamando al fono +562 29536362 - www.alztau.cl - www.biomedicinaicc.cl





Teléfono: +56 2 29536362
e-mail: contacto@biomedicinaicc.cl
www.alzttau.cl - www.biomedicinaicc.cl

