



www.neurobiomarcadores.com

MÓDULO 2

Biomarcadores en la enfermedad de Parkinson

Lección 3 Laboratorio

Dr. Íñigo Ruiz Barrio

Servicio de Neurología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona

1. Introducción

1.1. Fases de la enfermedad de Parkinson y papel de los biomarcadores moleculares

El papel de los biomarcadores moleculares en el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson (EP) viene dado por la necesidad de definir las diferentes fases de la enfermedad y de aumentar la precisión diagnóstica en estadios precoces, que actualmente recae sobre todo en criterios clínicos. El diagnóstico clínico de la EP se realiza cuando han degenerado el 70% de las neuronas dopaminérgicas y la tasa de error diagnóstico oscila entre el 15 y el 25% ⁽¹⁾.

Trasladando los avances en otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, vemos que esta se clasifica en 3 estadios principales: una fase preclínica, donde el paciente está asintomático pero tenemos evidencia molecular y/o de neuroimagen a favor de un proceso fisiopatológico de amiloidosis y de neurodegeneración específica de enfermedad de Alzheimer; una fase prodrómica, donde el paciente muestra síntomas sutiles objetivables como el deterioro cognitivo leve y donde además hay evidencia fisiopatológica molecular y/o de neuroimagen de amiloidosis y de neurodegeneración específica de la enfermedad de Alzheimer; y la fase clínica, donde se realiza el diagnóstico de demencia y que no exige necesariamente una evidencia de biomarcadores ⁽²⁾.

Como vemos, los biomarcadores moleculares tienen un papel esencial en la enfermedad de Alzheimer no solo para definir la fase prodrómica, junto a parámetros clínicos, sino también para definir la fase preclínica de la enfermedad. Estos avances en la clasificación han permitido: aumentar la precisión diagnóstica de forma significativa en la práctica clínica habitual, conocer la historia natural de la enfermedad y la duración de cada fase y seleccionar pacientes candidatos a ensayos clínicos de fármacos modificadores de la enfermedad en estadios precoces.

Basándonos en la experiencia de la enfermedad de Alzheimer, podríamos aspirar a dividir la EP en un estadio preclínico, prodrómico y motor ⁽³⁾. La etapa prodrómica de la EP sería aquella con evidencia de proceso neurodegenerativo y síntomas que no llegan a cumplir los criterios clínicos definitorios de la EP ⁽⁴⁾. No obstante, para la EP no existen en la actualidad biomarcadores moleculares homologados con una

sensibilidad y una especificidad tan elevadas como los de la enfermedad de Alzheimer para detectar una fisiopatología de neurodegeneración específica de la enfermedad, ni tampoco se han estandarizado las muestras ni técnicas de laboratorio utilizadas para su detección. Esto hace que actualmente no pueda definirse una fase preclínica para la EP, ni tampoco una fase prodrómica apoyada por evidencia molecular del proceso fisiopatológico. No obstante, se han hecho diferentes intentos de definir la EP prodrómica, donde destacan los criterios de la International Parkinson and Movement Disorder Society (MDS), que se basan en 3 tipos de marcadores prodrómicos⁽⁵⁾:

- **Marcadores no motores:** trastorno de la conducta del sueño REM evidenciado por polisomnografía o por test de *screening*, disfunción olfatoria en test estandarizados, estreñimiento definido como requerimiento de tratamiento más de una vez por semana o frecuencia deposicional < 1 cada 2 días, somnolencia diurna excesiva, hipotensión ortostática sintomática, disfunción eréctil, disfunción urinaria y diagnóstico de depresión.
- **Marcadores motores:** Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) > 3 excluyendo temblor de acción o alteración > 1 desviación estándar en test motores cuantitativos evaluados por un experto en trastornos de movimiento.
- **Marcadores de neuroimagen:** tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) o tomografía por emisión de positrones (PET) de dopamina anormal.

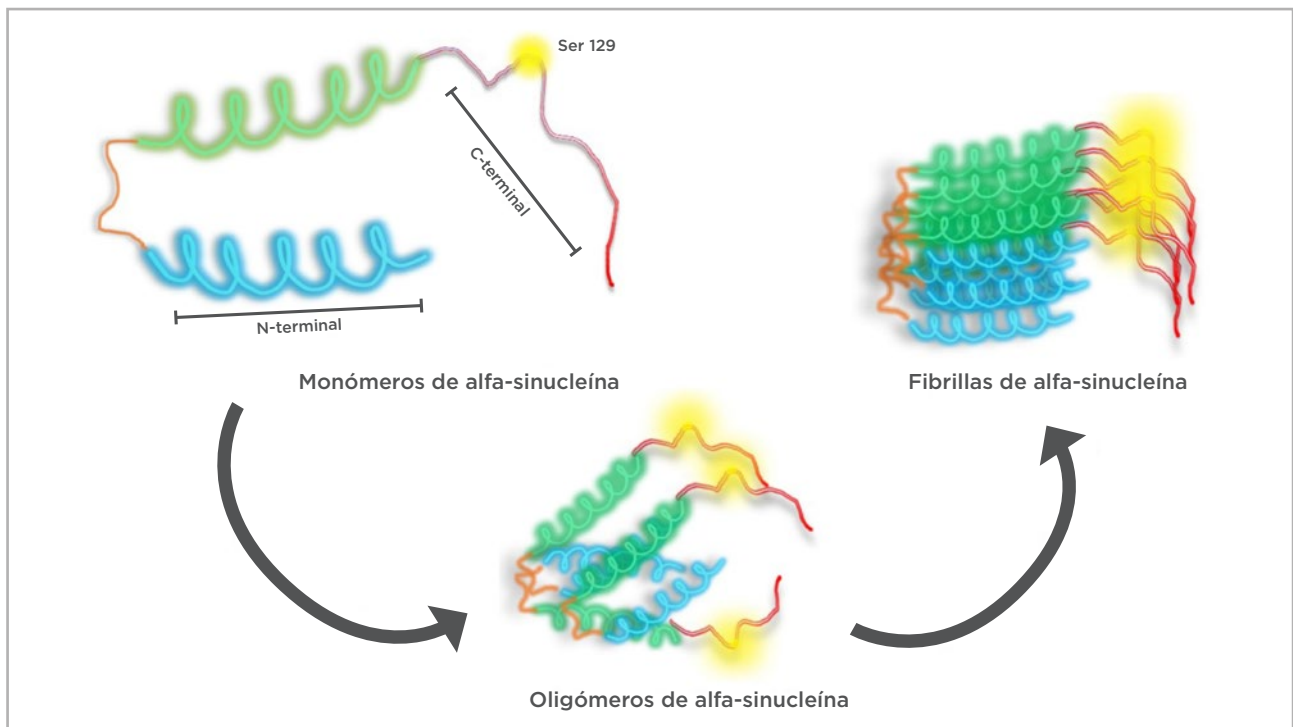
Combinando en un paciente la razón de verosimilitud de cada marcador prodrómico con los diferentes marcadores de riesgo que definen la probabilidad pretest (sexo, exposición a pesticidas o solventes, uso de cafeína, hábito tabáquico, genética y ecogenicidad de la sustancia negra), se establece la probabilidad estadística de un paciente para desarrollar EP, que si supera el 80%, se considera que cumple los criterios para EP prodrómica⁽⁶⁾. La MDS proporciona una calculadora *online* para aplicar estos criterios en pacientes individuales⁽⁵⁾. Se trata de un proceso complejo que requiere conocer muchas variables del paciente y que incluye gran cantidad de marcadores clínicos, con la imprecisión y la subjetividad que a menudo conllevan.

El desarrollo y la estandarización de biomarcadores moleculares permitirá mejorar la precisión y simplificar el proceso diagnóstico de la EP prodrómica, abrirá la puerta a la definición de EP preclínica y facilitará la realización de un diagnóstico fiable mucho menos dependiente de variables clínicas.

2. Alfa-sinucleína

La alfa-sinucleína es una proteína codificada por el gen *SNCA* del cromosoma 4q21. En su estructura primaria tiene en un extremo el dominio N-terminal, que le confiere estructura secundaria de hélice alfa y que será la principal zona de interacción con membranas. En el otro extremo está el dominio C-terminal, relacionado con la solubilidad e interacción con otras proteínas. Existen diferentes isoformas de alfa-sinucleína, a través de *splicing* alternativo en los exones 3 y 5, que se expresarán de manera diferencial en las regiones cerebrales según su función: α -syn98, α -syn112, α -syn126 y α -syn140. La isoforma más frecuente en el cerebro es α -syn140. Por otra parte, la alfa-sinucleína puede sufrir modificaciones postraduccionales ante diferentes estímulos, como la fosforilación en serina 129 (α -syn-pSer129).

Se trata de una proteína nativamente no plegada e intrínsecamente desestructurada, lo que significa que bajo condiciones fisiológicas no tiene una estructura terciaria estable al formar cadenas peptídicas, lo que le confiere gran flexibilidad conformacional para unirse a muchos ligandos. En determinadas condiciones patológicas, los monómeros no plegados de alfa-sinucleína se pueden agregar en pequeños oligómeros y después en protofibrillas y fibrillas insolubles (**Figura 1**). La alfa-sinucleína fosforilada en serina 129 tiene mayor predisposición a la agregación. Se cree que los oligómeros y fibrillas son los que se depositan en los cuerpos de Lewy y los que son tóxicos para la célula. Se sabe que los agregados de alfa-sinucleína pueden inducir neurotoxicidad por diferentes mecanismos: disfunción mitocondrial, daño lisosomal, alteración de membrana, estrés del retículo endoplasmático y disfunción sináptica ⁽⁷⁾.

**Figura 1.**

Los anticuerpos anti-sinucleína son el *gold standard* para la inmunotinción de los cuerpos de Lewy en el cerebro. Otro dato de interés es que a la alfa-sinucleína se le atribuyen propiedades *prion-like* ⁽⁸⁾, ya que puede inducir la polimerización de moléculas nativas de alfa-sinucleína vecinas, como se ha demostrado en diferentes experimentos en los que se produce afectación (en forma de cuerpos de Lewy, aunque sin clara pérdida neuronal) de neuronas embrionarias implantadas en la sustancia negra de pacientes con EP ^{(9) (10) (11) (12)}. En la misma línea, se ha encontrado evidencia de transporte transneuronal de alfa-sinucleína desde la periferia (intestinal, oral, peritoneal, intraglóctica, intravenosa e intramuscular) en los modelos animales ^{(13) (14) (15) (16) (17)}.

Sin embargo, actualmente está en discusión si la alfa-sinucleína es el elemento fundamental en el inicio y el desarrollo del proceso degenerativo. Esto se debe a que, por un lado, existen formas genéticas de EP con degeneración neuronal pero ausencia de cuerpos de Lewy y, por otra parte, las terapias de inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales anti-sinucleína como MEDI-1341, ABBV-0805, prasinezumab o cinpanemab no han alcanzado ningún objetivo primario de eficacia en los ensayos clínicos ⁽¹⁸⁾.

Independientemente del papel que tenga la alfa-sinucleína en el proceso neurodegenerativo de la EP, se considera que puede ser un marcador molecular útil para el diagnóstico y la clasificación de la enfermedad. Dado que las estructuras principalmente implicadas en el proceso degenerativo se encuentran en el sistema nervioso central (SNC), los esfuerzos en detectar la alfa-sinucleína se han dirigido principalmente hacia este fluido; no obstante, dado que la alfa-sinucleína también se acumula en tejido periférico, se están desarrollando técnicas que utilizan muestras del sistema nervioso periférico (SNP) u otros fluidos para la detección de la proteína⁽¹⁹⁾.

3. Biomarcadores moleculares en la enfermedad de Parkinson

3.1. Técnicas utilizadas para la detección de alfa-sinucleína

3.1.1. Inmunoensayo

3.1.1.1. Enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA)

ELISA es una técnica que se basa en anticuerpos para determinar y cuantificar la presencia de un ligando específico (habitualmente una proteína). Existen muchas variantes de esta técnica (ELISA directo, indirecto, de tipo sándwich...) y diferentes metodologías, pero todas tienen en común la fijación de un ligando y su detección mediante un anticuerpo (ELISA directo) o dos, uno primario y otro secundario (ELISA indirecto y sándwich).

Cuando se pretende detectar alfa-sinucleína en muestras biológicas mediante ELISA, hay que tener en cuenta los siguientes factores:

- Qué tipo de alfa-sinucleína se quiere detectar: monomérica, oligomérica/agregada o ambas (total). La mayor parte de las técnicas disponibles están pensadas para detectar la alfa-sinucleína total, pero también se han diseñado kits para la detección específica de oligómeros o agregados.

- Qué isoforma de alfa-sinucleína se quiere detectar: la mayoría de los anticuerpos reconocen el epítipo C-terminal codificado por el exón 5 del ARNm tras *splicing* alternativo. Por tanto, las isoformas 140 y 126 constituyen las dianas principales.
- Qué variante de alfa-sinucleína se quiere detectar: alfa-sinucleína no fosforilada o fosforilada. La forma fosforilada solo se encuentra presente en el suero, no se detecta en el líquido cefalorraquídeo (LCR) ⁽²⁰⁾.
- Qué combinación de anticuerpos se quiere utilizar: se necesita un anticuerpo de captura y otro de detección. Hay muchos tipos y casas comerciales, por lo que a menudo difieren entre investigadores y experimentos.

Para detectar y cuantificar formas monoméricas de alfa-sinucleína se utiliza el ELISA indirecto (porque solo hay un epítipo para la unión del anticuerpo) y para detectar formas oligoméricas, el de tipo sándwich (hay más epítipos que permiten la unión de 2 anticuerpos) (**Figura 2**). Los pasos básicos de un ELISA son el *coating* (fijación de un antígeno a los pocillos de un *microplate*), el *blocking* (tamponamiento de las zonas de pocillos libres de antígeno), los lavados y la detección.

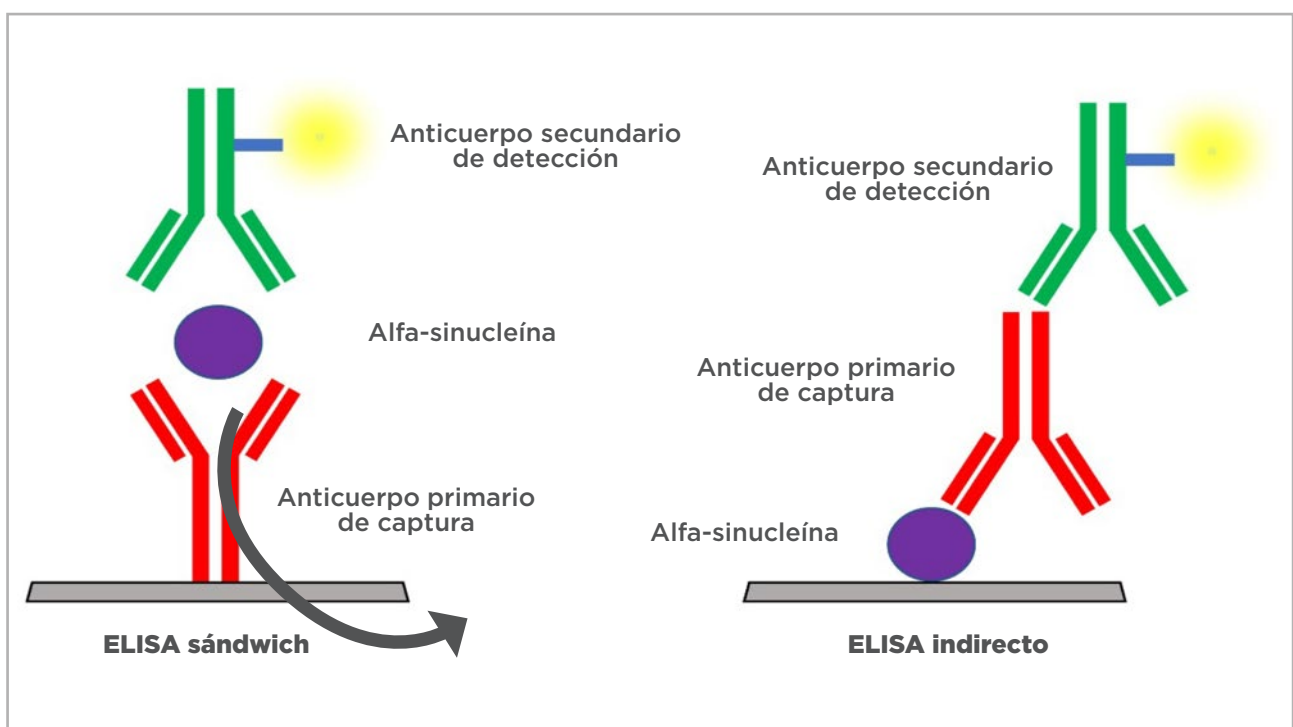


Figura 2.

En el ELISA de tipo sándwich para la detección de alfa-sinucleína oligomérica el *coating* se hace con un anticuerpo primario comercial anti-sinucleína que se denominará “anticuerpo de captura”. Los complejos proteicos como el anticuerpo se quedan anclados a cada pocillo del *microplate*. Se realiza un lavado para eliminar el resto de los componentes no anclados y a continuación se realiza el *blocking*, que consiste en bloquear las zonas del pocillo que no tienen antígenos anclados mediante un agente químico, para reducir las posibilidades de unión de un anticuerpo a sustratos no específicos (reacciones cruzadas). A continuación, se añade la muestra líquida a estudio (por ejemplo, suero, LCR, piel lisada... que pueda contener el antígeno de interés como la alfa-sinucleína) y que se unirá, si está presente, al anticuerpo de captura anclado al fondo del pocillo, formando un complejo. Se lavarán los pocillos y aquellos antígenos no unidos al anticuerpo de captura serán eliminados.

Después se utilizará un anticuerpo secundario llamado “anticuerpo de detección”, porque lleva ligada una enzima, que se unirá a los antígenos presentes (todos los antígenos presentes estarán unidos al anticuerpo de captura porque si no se habrían desprendido en el lavado previo). De esta manera, el antígeno queda entre dos anticuerpos, uno de captura anclado al pocillo y uno de detección (sándwich). Se realiza un nuevo lavado para eliminar los anticuerpos de detección no unidos al complejo anticuerpo de captura-antígeno y finalmente se añade un sustrato para la enzima que lleva el anticuerpo de detección (los anticuerpos de detección libres no unidos se habrían desprendido en el lavado previo y con ellos la enzima, por lo que no reaccionarán). La reacción generará un color en los pocillos que contengan el antígeno, los positivos. El grado de positividad (de colorante, que representa la cantidad del antígeno) se puede después cuantificar con un espectrofotómetro.

El ELISA indirecto sería similar pero el *coating* se realiza con la muestra del paciente que contiene el antígeno y después se añaden el anticuerpo de detección y el de captura ⁽²¹⁾.

Mediante diferentes variaciones de esta técnica se ha intentado cuantificar la presencia de alfa-sinucleína en suero, LCR, piel lisada y otros fluidos biológicos. Si bien algunos resultados pueden ser prometedores, los primeros estudios se caracterizaban por su baja sensibilidad diagnóstica, con superposición de valores de pacientes y controles, hallazgos discrepantes y formatos de ensayos muy diferentes. Otra de las principales limitaciones es que, al carecer de un marcador 100% específico, la capacidad diagnóstica tendrá gran variabilidad según las

poblaciones comparadas (EP vs. controles sanos, EP vs. parkinsonismos atípicos, EP vs. enfermedad de Alzheimer, etc.).

Rentabilidad de la técnica ELISA para diferentes muestras biológicas:

- **ELISA en LCR:** disminución de alfa-sinucleína total, con sensibilidad y especificidad para diferenciar EP vs. controles del 70-72 y el 52-83%, respectivamente ⁽²²⁾. No obstante, la detección específica de la forma oligomérica de alfa-sinucleína, junto a la alfa-sinucleína total estándar en forma de ratio, permite aumentar la sensibilidad hasta un 89,3% y la especificidad hasta un 90,6% para diferenciar pacientes con EP de controles ⁽²³⁾.
- **ELISA en plasma:** aumento de alfa-sinucleína oligomérica, con sensibilidad y especificidad para diferenciar EP vs. controles del 53 y el 85%, respectivamente ⁽²⁴⁾. No obstante, la detección de α -syn-pSer129 tendría una sensibilidad y una especificidad para distinguir entre EP vs. controles del 85,6 y el 95,8%, respectivamente ⁽²⁵⁾.
- **ELISA en saliva:** disminución de alfa-sinucleína total y aumento de oligómeros, con sensibilidad y especificidad para diferenciar EP vs. controles del 69,77 y el 95,16%, respectivamente, utilizando la ratio de oligómeros/alfa-sinucleína total ⁽²⁶⁾.

En definitiva, las técnicas de ELISA para la detección de alfa-sinucleína han sido fundamentales y pioneras, pero tienen limitaciones importantes y gran variabilidad en cuanto a su capacidad diagnóstica. Por este motivo, la irrupción de nuevas técnicas de detección más precisas como los *seed amplification assays* han ido reemplazado al ELISA en los últimos años.

3.1.2. Inmunoblot

Inicialmente se pensaba que era imposible detectar alfa-sinucleína mediante inmunoblot o *Western blot* (WB) debido a su baja concentración en las muestras, pero más adelante se demostró que la fijación de las proteínas con paraformaldehído permitía su detección ⁽²⁷⁾. Sirve para detectar tanto monómeros como oligómeros de alfa-sinucleína. En el WB, para separar las proteínas de la muestra líquida por

tamaño, se realiza un lisado de células mediante detergente y, tras centrifugado y calentado, se obtiene un sobranse en el que se cuantificará la concentración total de proteína con ensayo de ácido bicinonínico (BCA). Después se agrega a un gel de electroforesis y se transfiere a una membrana. Se añade paraformaldehído a la membrana y se bloquea. Para su visualización se añaden un anticuerpo primario y secundario, después las bandas se escanean con infrarrojo para su cuantificación.

Rentabilidad de la técnica WB para diferentes muestras biológicas:

- **WB en saliva:** aumento de oligómeros con sensibilidad y especificidad en EP vs. controles del 92 y del 86%, respectivamente ⁽²⁸⁾.
- **WB en plasma:** resultados inconsistentes por la gran variabilidad entre estudios. En algunos estudios se detecta disminución de oligómeros en pacientes con EP vs. controles mientras que en otros se detecta un incremento.

3.1.3. Luminex®

El método Luminex® permite cuantificar de manera simultánea varias proteínas en muestras líquidas, a través de microesferas (*beads*) magnéticas que se conjugan con reactivos específicos. Mediante la adición de anticuerpos de captura y de detección de alfa-sinucleína acoplados a las microesferas, permite detectar la proteína. La conjugación de los anticuerpos con diferentes microesferas permite el análisis de múltiples dianas en cada muestra y esto aumenta la sensibilidad y la eficiencia respecto a un ELISA y un WB en la detección de alfa-sinucleína total.

Rentabilidad de la técnica Luminex® para diferentes muestras biológicas:

- **Luminex® en LCR:** disminución de alfa-sinucleína total en EP respecto a controles, con sensibilidad y especificidad del 93 y el 39%, respectivamente, utilizando WB y Luminex® y cuantificando DJ-1 ⁽²⁹⁾.
- **Luminex® en plasma:** no se han encontrado diferencias significativas entre EP y controles.

3.1.4. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en tejidos

Los métodos de inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia (IF) permiten la visualización directa de los depósitos tisulares de alfa-sinucleína; en el caso de la IF, mediante marcado fluorescente.

Para la piel, la muestra más ampliamente utilizada, se realizan secciones de muestras cutáneas de un grosor determinado con un microtomo. Las secciones se transfieren a pocillos de un *microplate*, en los que después se añadirán dos anticuerpos primarios: uno para marcar la fibra nerviosa y otro para marcar alfa-sinucleína fosforilada. A continuación, se añaden los dos anticuerpos secundarios. Mediante un microscopio de fluorescencia o confocal se revelan los resultados: el marcado concomitante para fibra nerviosa y para alfa-sinucleína fosforilada se interpretará como positivo (**Figura 3**).

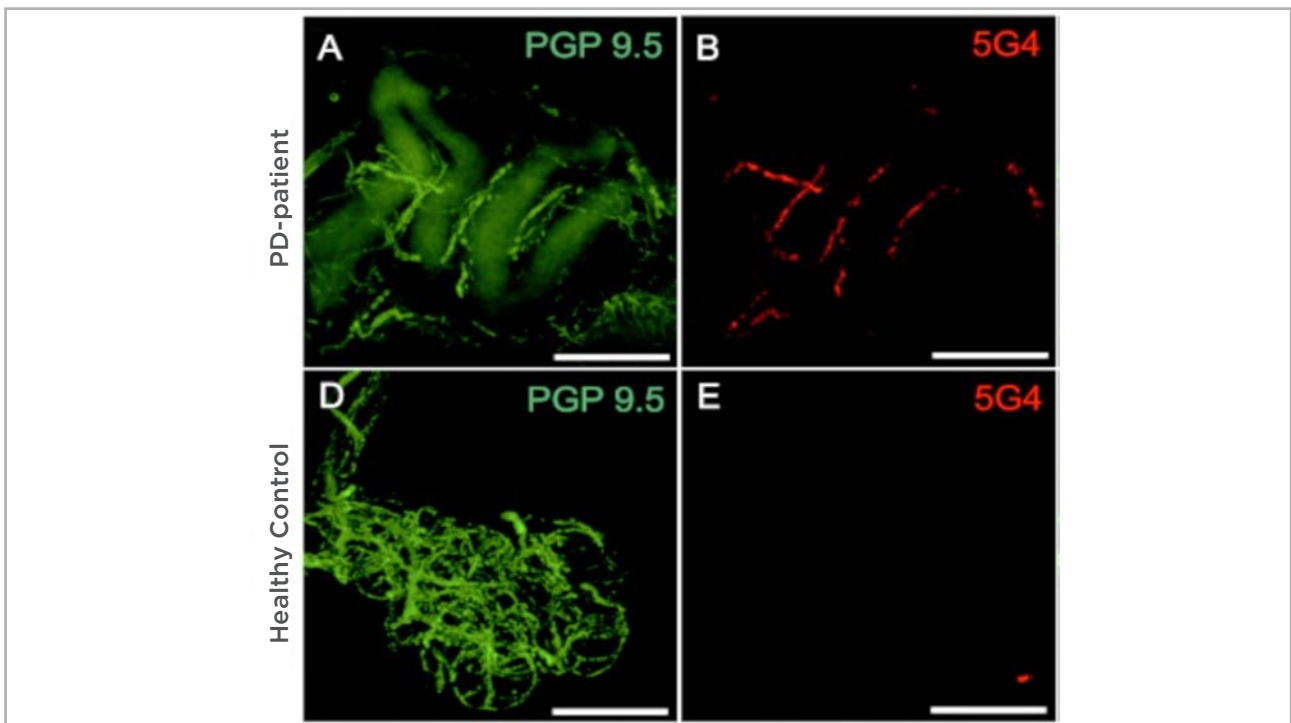


Figura 3. Ejemplo de inmunohistoquímica (IHQ) en piel. Marcado de fibras nerviosas mediante PGP 9.5 y marcado de alfa-sinucleína mediante 5G4 ⁽³⁰⁾.

La morfología de depósitos de alfa-sinucleína aparece como una señal punteada a lo largo de los axones dérmicos. También se puede detectar alfa-sinucleína total en vez de fosforilada, pero la especificidad de la forma fosforilada para sinucleinopatías ronda el 100%, ya que no está presente en el tejido cutáneo de sujetos sanos.

Rentabilidad de la IHQ para diferentes muestras biológicas:

- **IHQ/IF en piel:** sensibilidad y especificidad del 81 y el 86%, respectivamente. La alfa-sinucleína fosforilada tiene una sensibilidad del 70-90% y una especificidad cercana al 100% ^{(30) (31) (32)}.
- **IHQ/IF en tejido gastrointestinal:** en general tiene una sensibilidad elevada > 80%, pero la especificidad suele ser peor, en torno al 70%. La precisión diagnóstica depende de la capa de tejido estudiado; en general, la submucosa es la que contiene mayor depósito de alfa-sinucleína ⁽³³⁾.
- **IHQ/IF en glándula submaxilar, labial y mucosa olfatoria:** estudios pequeños con resultados muy variables ⁽³⁴⁾.

4. Biomarcadores moleculares en la fase prodrómica de la enfermedad de Parkinson

Se ha investigado la rentabilidad de algunos de estos biomarcadores en lo que se denominaría la fase prodrómica de la EP, cuando no hay síntomas motores o estos son mínimos. El marcador clínico no motor más utilizado en la selección de estos pacientes ha sido el trastorno de la conducta del sueño REM (TCSREM). Se ha visto que la determinación de alfa-sinucleína mal plegada mediante *real-time quaking-induced conversion* (RT-QulC) tiene una sensibilidad y una especificidad del 90% para predecir el desarrollo de EP o demencia con cuerpos de Lewy en cohortes con seguimiento a 10 años⁽³⁵⁾. En los pacientes con TCSREM e hiposmia, la determinación de alfa-sinucleína mal plegada por RT-QulC en la mucosa olfatoria predice con una sensibilidad del 73% el desarrollo de EP⁽³⁶⁾. La cuantificación de alfa-sinucleína por inmunocaptura de exosomas neuronales consigue predecir con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 93% la EP en pacientes con TCSREM⁽³⁷⁾.

4.1. Inmunocaptura

La inmunocaptura de exosomas neuronales en suero es una técnica novedosa que consigue aislar exosomas neuronales para cuantificar la alfa-sinucleína contenida. Los exosomas son pequeñas vesículas que se unen a células participando en el tráfico de proteínas agregadas y otras sustancias. Los exosomas neuronales representan el microambiente cerebral en cada momento, por lo que su aislamiento en un fluido periférico es un biomarcador del estado del tráfico de proteínas en ese momento particular.

La inmunocaptura de exosomas mediante anticuerpos anti-L1CAM y su posterior determinación con espectrometría en la fracción de densidad adecuada permite aislarlos de sangre periférica. Después se realiza un marcado de pSer129, clusterina y anti-sintenina 1 mediante anticuerpos de captura. La clusterina está elevada en procesos neurodegenerativos de tipo no-sinucleinopatías y la anti-sintenina 1 es un marcador control de la presencia de exosomas. Finalmente, se añaden los anticuerpos secundarios de detección y se revelan los resultados por electroquimioluminiscencia. La sensibilidad y la especificidad de este método para diferenciar EP vs. controles sanos es del 94 y el 96%, respectivamente⁽³⁷⁾.

4.2. Alpha-synuclein seed amplification assays (SAA)

4.2.1. Protein misfolding cyclic amplification (PMCA)

La técnica PMCA es análoga a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que se basa en la reacción cíclica a expensas de un sustrato, aunque con proteínas en vez de con nucleótidos, permitiendo la replicación de proteínas mal plegadas. También es muy similar a la RT-QuIC, pero se basa en la sonicación para promover la amplificación, mientras que RT-QuIC se basa en el *shaking*. La técnica consiste en ciclos de incubación y sonicación que incrementan de forma exponencial las *seeds* de alfa-sinucleína para su posterior agregación hasta niveles detectables por técnicas bioquímicas.

Se utilizan plásmidos portadores del gen de alfa-sinucleína humana para expresar la proteína en células. La proteína obtenida se purifica y se filtra. Se confirma que se han formado oligómeros mediante fluorescencia con tioflavina (ThT) u otros métodos alternativos. Para preparar las *seeds* de alfa-sinucleína a partir de la muestra del paciente (habitualmente LCR), se realiza incubación y sonicación para romper los agregados de alfa-sinucleína e incrementar los núcleos de crecimiento, que mediante *shaking* se volverán a agregar de manera creciente. Se añaden a cada pocillo de un *microplate*, que contiene los oligómeros de alfa-sinucleína, y se realiza una agitación cíclica, monitorizando la fluorescencia de ThT con espectrofluorómetro, para evaluar los diferentes parámetros cinéticos de agregación (tiempo hasta fluorescencia, tiempo hasta el 50% de fluorescencia máxima...) ⁽³⁸⁾.

Rentabilidad de la técnica PMCA para diferentes muestras biológicas:

- **PMCA en LCR:** la sensibilidad y la especificidad para diferenciar la EP de controles y otras enfermedades neurodegenerativas es del 88,5 y el 94%, respectivamente ⁽³⁸⁾.
- **PMCA en piel:** la sensibilidad y la especificidad para diferenciar la EP de controles es del 80-83 y el 90-100%, respectivamente ⁽³⁹⁾.

4.2.2. Real-time quaking-induced conversion

La técnica RT-QuIC, al igual que la PMCA, se basa en la amplificación y agregación de *seeds* de alfa-sinucleína sobre un sustrato de la proteína recombinante. A diferencia de la PMCA, no utiliza sonicación sino *shaking*, es metodológicamente mucho más simple y tiene una sensibilidad ligeramente más elevada.

Se prepara una reacción tamponante con alfa-sinucleína recombinante y ThT, que se transfiere a pocillos donde posteriormente se agrega la muestra (LCR, homogeneizados de tejido...) previamente centrifugada para remover componentes celulares. Se somete la mezcla a ciclos de *shaking* y posteriormente se mide la fluorescencia de ThT (**Figura 4**). Recientemente se han incorporado técnicas ultrasensibles que permiten mejorar aún más la rentabilidad diagnóstica.

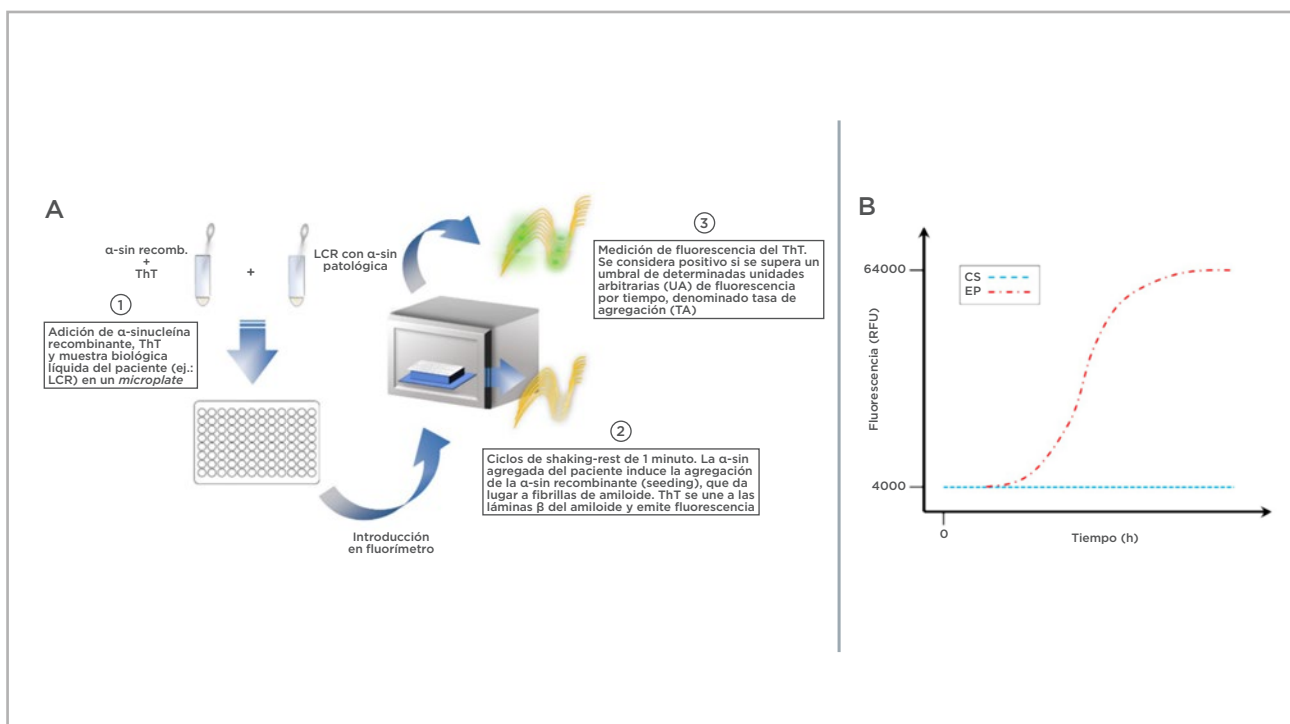


Figura 4. Técnica de real-time quaking-induced conversion (RT-QuIC) para la determinación de agregados de alfa-sinucleína en muestras biológicas (A) y exposición gráfica de los resultados (B).

- **RT-QulC en LCR:** sensibilidad y especificidad para diferenciar EP vs. controles del 80-90 y del 90-100%, respectivamente. Métodos ultrasensibles ya muestran una sensibilidad y una especificidad del 95,3 y el 98%, respectivamente ⁽⁴⁰⁾.
- **RT-QulC en piel:** sensibilidad y especificidad para diferenciar EP vs. controles del 96 y el 96%, respectivamente ⁽⁴¹⁾.
- **RT-QulC en saliva:** sensibilidad y especificidad para diferenciar EP vs. controles del 76 y el 94,4%, respectivamente ⁽⁴²⁾.
- **RT-QulC en glándula submaxilar:** la sensibilidad y la especificidad para diferenciar EP y cuerpos de Lewy incidentales de controles fue del 100 y el 94%, respectivamente ⁽⁴³⁾.
- **RT-QulC en mucosa olfatoria:** sensibilidad y especificidad para diferenciar EP vs. controles del 56-80 y el 89,8%, respectivamente ⁽³⁶⁾. En combinación con RT-QulC de LCR, especificidad cercana al 100% ⁽⁴⁴⁾.
- **RT-QulC en plasma:** no se puede realizar. De hecho, la presencia accidental de sangre en el LCR podría interferir en la determinación.

Tabla 1.

	LCR		Plasma/ Suero		Piel		Saliva		Gl. subm.		Mucosa olf.	
	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E
ELISA	71 (89,3) ^a	67,5 (90,6) ^a	53 (85,6) ^b	85 (95,8) ^b	69,8	95,1	69,8	95	-	-	-	-
Inmunoblot	Muy variable	-	-	92	96	-	-	-	-	-	-	-
Luminex [®]	93	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IHQ	-	-	-	-	81 (90) ^c	86 (100) ^c	-	-	-	-	-	-
Inmunocap.	-	-	94	96	-	-	-	-	-	-	-	-
PMCA	88,5	94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RT-QuIC	85 (95,3) ^d	95 (98) ^d	-	-	96	96	76	94,4	100	94	68	89,8

^a para la ratio alfa-sinucleína oligomérica/total; ^b para pSer129; ^c para pSer129; ^d para técnicas ultrasensibles
 ELISA: enzoinmunoanálisis de adsorción; IHQ: inmunohistoquímica; LCR: líquido cefalorraquídeo;
 PMCA: *protein misfolding cyclic amplification*; RT-QuIC: *real-time quaking-induced conversion*

Tabla 1. Rentabilidad de los diferentes biomarcadores en muestras biológicas.

5. Otros biomarcadores

La cadena ligera de neurofilamento (NfL) ha mostrado ser útil en el pronóstico y la monitorización de la enfermedad, pero no es un biomarcador válido para el diagnóstico, dada su baja especificidad ⁽⁴⁵⁾. Entre los nuevos biomarcadores derivados de los *omics*, encontramos la proteína DJ1 en LCR y sangre, y el estudio diferentes micro-ARN encargados de la regulación postranscripcional y detectados en diferentes fluidos y vesículas extracelulares: miR-132, miR-92a, miR-27a, miR-148a, miR-744, miR-532-5p, miR-7 o miR-153. La determinación plasmática de miR-1826, miR450b-3p, miR-626 y miR-505 ha conseguido una sensibilidad y una especificidad del 91 y el 100%, respectivamente, en un estudio ⁽⁴⁶⁾.

6. Limitaciones

A la hora de interpretar los resultados de los biomarcadores en enfermedades neurodegenerativas, deben tenerse en cuenta algunas limitaciones. Más allá de las limitaciones propias de las técnicas de laboratorio aplicadas a las diferentes muestras biológicas, existen limitaciones metodológicas del diseño del estudio que pueden generar variabilidad de resultados. Por ejemplo, la rentabilidad será diferente si se comparan pacientes con EP vs. controles sanos, o si se compara contra parkinsonismos atípicos de tipo taupatía, contra otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, etc.

Por otra parte, no debe olvidarse que son técnicas que tienen en común la detección de alfa-sinucleína y que esta proteína también está implicada en la fisiopatología de otros procesos como la atrofia multisistémica y la demencia con cuerpos de Lewy. Esto hace que no todas las técnicas descritas sirvan para diferenciar estos procesos y que en los métodos cuantitativos tengan que utilizarse puntos de corte diferentes. En los últimos años se están desarrollando métodos que quizás permitan en un futuro próximo diferenciar estas entidades con mayor precisión.

Finalmente, resulta de gran importancia metodológica el *gold standard* utilizado para determinar la rentabilidad de los diferentes biomarcadores. El *gold standard* ideal sería la confirmación neuropatológica de la EP; no obstante, a menudo no está disponible y en muchas ocasiones se utilizan criterios clínicos para comparar el resultado de los biomarcadores. Esta variabilidad entre estudios también influye en los resultados de los estudios de precisión diagnóstica de los biomarcadores moleculares.

Conclusiones

- La ausencia de un biomarcador molecular específico en la EP hace que, por el momento, los biomarcadores moleculares constituyan una herramienta más que, junto a biomarcadores clínicos o de neuroimagen, contribuya a incrementar la precisión diagnóstica y detectar la EP en fases precoces.
- Se espera que el futuro desarrollo y validación de biomarcadores pueda contribuir a la definición de las fases de la EP.
- La existencia de diferentes métodos y muestras biológicas hace que sea necesario homogeneizar las técnicas y la metodología para lograr resultados consistentes, con el objetivo de incorporar estos biomarcadores en la práctica clínica habitual.
- En cuanto a las diferentes técnicas, el método de ELISA fue pionero en la detección de alfa-sinucleína en diferentes muestras biológicas, pero actualmente ha quedado superado por los métodos SAA, sobre todo en el LCR.
- La inmunocaptura de exosomas neuronales en suero podría ser un biomarcador prometedor en un fluido biológico de fácil acceso; no obstante, aún se requieren futuros estudios y replicación de los resultados.
- Las técnicas de PMCA y RT-QulC se basan en los mismos fundamentos biológicos y tienen un rendimiento similar, pero la metodología de RT-QulC resulta técnicamente más sencilla, siendo más fácil su implementación en la práctica habitual.

Referencias bibliográficas

1. Beach TG, Adler CH. Importance of low diagnostic Accuracy for early Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2018 Oct;33(10):1551-4. [\[Pubmed\]](#)
2. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2011 May;7(3):280-92. [\[Pubmed\]](#)
3. Mahlknecht P, Seppi K, Poewe W. The Concept of Prodromal Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis.* 2015;5(4):681-97. [\[Pubmed\]](#)
4. Tolosa E, Garrido A, Scholz SW, Poewe W. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2021 May;20(5):385-97. [\[Pubmed\]](#)
5. Heinzel S, Berg D, Gasser T, Chen H, Yao C, Postuma RB; MDS Task Force on the Definition of Parkinson's Disease. Update of the MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2019 Oct;34(10):1464-70. [\[Pubmed\]](#)
6. Berg D, Postuma RB, Adler CH, Bloem BR, Chan P, Dubois B, et al. MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2015 Oct;30(12):1600-11. [\[Pubmed\]](#)
7. Gómez-Benito M, Granado N, García-Sanz P, Michel A, Dumoulin M, Moratalla R. Modeling Parkinson's Disease With the Alpha-Synuclein Protein. *Front Pharmacol.* 2020 Apr 23;11:356. [\[Pubmed\]](#)
8. Leak RK, Frosch MP, Beach TG, Halliday GM. Alpha-synuclein: prion or prion-like? *Acta Neuropathol.* 2019 Oct;138(4):509-14. [\[Pubmed\]](#)
9. Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med.* 2008 May;14(5):504-6. [\[Pubmed\]](#)
10. Kordower JH, Dodiya HB, Kordower AM, Terpstra B, Paumier K, Madhavan L, et al. Transfer of host-derived α synuclein to grafted dopaminergic neurons in rat. *Neurobiol Dis.* 2011 Sep;43(3):552-7. [\[Pubmed\]](#)
11. Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med.* 2008 May;14(5):501-3. [\[Pubmed\]](#)
12. Li JY, Englund E, Widner H, Rehnström S, Björklund A, Lindvall O, Brundin P. Characterization of Lewy body pathology in 12- and 16-year-old intrastriatal mesencephalic grafts surviving in a patient with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2010 Jun 15;25(8):1091-6. [\[Pubmed\]](#)
13. Peelaerts W, Bousset L, Van der Perren A, Moskalyuk A, Pulizzi R, Giugliano M, et al. α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature.* 2015 Jun 18;522(7556):340-4. [\[Pubmed\]](#)

14. Lohmann S, Bernis ME, Tachu BJ, Ziernski A, Grigoletto J, Tamgüney G. Oral and intravenous transmission of α -synuclein fibrils to mice. *Acta Neuropathol.* 2019 Oct;138(4):515-33. [\[Pubmed\]](#)
15. Van Den Berge N, Ferreira N, Gram H, Mikkelsen TW, Alstrup AKO, Casadei N, et al. Evidence for bidirectional and trans-synaptic parasympathetic and sympathetic propagation of alpha-synuclein in rats. *Acta Neuropathol.* 2019 Oct;138(4):535-50. [\[Pubmed\]](#)
16. Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Patel TP, Tanik SA, Riddle DM, Stieber A, et al. Exogenous α -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron.* 2011 Oct 6;72(1):57-71. [\[Pubmed\]](#)
17. Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VM. Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science.* 2012 Nov 16;338(6109):949-53. [\[Pubmed\]](#)
18. Nimmo JT, Kelly L, Verma A, Carare RO, Nicoll JAR, Dodart JC. Amyloid- β and α -Synuclein Immunotherapy: From Experimental Studies to Clinical Trials. *Front Neurosci.* 2021 Sep 1;15:733857. [\[Pubmed\]](#)
19. Simonsen AH, Kuiperij B, El-Agnaf OM, Engelborghs S, Herukka SK, Parnetti L, et al. The utility of α -synuclein as biofluid marker in neurodegenerative diseases: a systematic review of the literature. *Biomark Med.* 2016;10(1):19-34. [\[Pubmed\]](#)
20. Cariulo C, Martufi P, Verani M, Azzollini L, Bruni G, Weiss A, et al. Phospho-S129 Alpha-Synuclein Is Present in Human Plasma but Not in Cerebrospinal Fluid as Determined by an Ultrasensitive Immunoassay. *Front Neurosci.* 2019 Aug 22;13:889. [\[Pubmed\]](#)
21. Alhaji M, Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *StatPearls.* 2022 Feb 2. Disponible en: [\[Enlace\]](#)
22. Mollenhauer B, Locascio JJ, Schulz-Schaeffer W, Sixel-Döring F, Trenkwalder C, Schlossmacher MG. α -Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study. *Lancet Neurol.* 2011 Mar;10(3):230-40. Erratum in: *Lancet Neurol.* 2011 Apr;10(4):297. [\[Pubmed\]](#)
23. Parnetti L, Chiasserini D, Bellomo G, Giannandrea D, De Carlo C, Qureshi MM, et al. Cerebrospinal fluid Tau/ α -synuclein ratio in Parkinson's disease and degenerative dementias. *Mov Disord.* 2011 Jul;26(8):1428-35. [\[Pubmed\]](#)
24. El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Curran MD, Gibson MJ, Court JA, et al. Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J.* 2006 Mar;20(3):419-25. [\[Pubmed\]](#)
25. Lin CH, Liu HC, Yang SY, Yang KC, Wu CC, Chiu MJ. Plasma pS129- α -Synuclein Is a Surrogate Biofluid Marker of Motor Severity and Progression in Parkinson's Disease. *J Clin Med.* 2019 Oct 3;8(10):1601. [\[Pubmed\]](#)

26. Vivacqua G, Suppa A, Mancinelli R, Belvisi D, Fabbrini A, Costanzo M, et al. Salivary alpha-synuclein in the diagnosis of Parkinson's disease and Progressive Supranuclear Palsy. *Parkinsonism Relat Disord*. 2019 Jun;63:143-8. [\[Pubmed\]](#)
27. Sasaki A, Arawaka S, Sato H, Kato T. Sensitive western blotting for detection of endogenous Ser129-phosphorylated α -synuclein in intracellular and extracellular spaces. *Sci Rep*. 2015 Sep 18;5:14211. [\[Pubmed\]](#)
28. Cao Z, Wu Y, Liu G, Jiang Y, Wang X, Wang Z, Feng T. α -Synuclein in salivary extracellular vesicles as a potential biomarker of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2019 Mar 23;696:114-20. [\[Pubmed\]](#)
29. Hong Z, Shi M, Chung KA, Quinn JF, Peskind ER, Galasko D, et al. DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain*. 2010 Mar;133(Pt 3):713-26. [\[Pubmed\]](#)
30. Vacchi E, Pinton S, Kaelin-Lang A, Melli G. Targeting Alpha Synuclein Aggregates in Cutaneous Peripheral Nerve Fibers by Free-floating Immunofluorescence Assay. *J Vis Exp*. 2019 Jun 25;(148). [\[Pubmed\]](#)
31. Kim JY, Illigens BM, McCormick MP, Wang N, Gibbons CH. Alpha-Synuclein in Skin Nerve Fibers as a Biomarker for Alpha-Synucleinopathies. *J Clin Neurol*. 2019 Apr;15(2):135-42. [\[Pubmed\]](#)
32. Donadio V, Wang Z, Incensi A, Rizzo G, Fileccia E, Vacchiano V, et al. In Vivo Diagnosis of Synucleinopathies: A Comparative Study of Skin Biopsy and RT-QulC. *Neurology*. 2021 May 18;96(20):e2513-e2524. Erratum in: *Neurology*. 2022 Jul 5;99(1):40-42. [\[Pubmed\]](#)
33. Beach TG, Corbillé AG, Letournel F, Kordower JH, Kremer T, Munoz DG, et al. Multicenter Assessment of Immunohistochemical Methods for Pathological Alpha-Synuclein in Sigmoid Colon of Autopsied Parkinson's Disease and Control Subjects. *J Parkinsons Dis*. 2016 Oct 19;6(4):761-70. [\[Pubmed\]](#)
34. Malek N, Swallow D, Grosset KA, Anichtchik O, Spillantini M, Grosset DG. Alpha-synuclein in peripheral tissues and body fluids as a biomarker for Parkinson's disease - a systematic review. *Acta Neurol Scand*. 2014 Aug;130(2):59-72. [\[Pubmed\]](#)
35. Iranzo A, Fairfoul G, Ayudhaya ACN, Serradell M, Gelpi E, Vilaseca I, et al. Detection of α -synuclein in CSF by RT-QulC in patients with isolated rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a longitudinal observational study. *Lancet Neurol*. 2021 Mar;20(3):203-12. [\[Pubmed\]](#)
36. Stefani A, Iranzo A, Holzknecht E, Perra D, Bongianni M, Gaig C, et al.; SINBAR (Sleep Innsbruck Barcelona) group. Alpha-synuclein seeds in olfactory mucosa of patients with isolated REM sleep behaviour disorder. *Brain*. 2021 May 7;144(4):1118-26. [\[Pubmed\]](#)
37. Jiang C, Hopfner F, Katsikoudi A, Hein R, Catli C, Evetts S, et al. Serum neuronal exosomes predict and differentiate Parkinson's disease from atypical parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020 Jul;91(7):720-9. [\[Pubmed\]](#)

38. Shahnawaz M, Tokuda T, Waragai M, Mendez N, Ishii R, Trenkwalder C, et al. Development of a Biochemical Diagnosis of Parkinson Disease by Detection of α -Synuclein Misfolded Aggregates in Cerebrospinal Fluid. *JAMA Neurol.* 2017 Feb 1;74(2):163-72. [\[Pubmed\]](#)
39. Wang Z, Becker K, Donadio V, Siedlak S, Yuan J, Rezaee M, et al. Skin α -Synuclein Aggregation Seeding Activity as a Novel Biomarker for Parkinson Disease. *JAMA Neurol.* 2020 Sep 28;78(1):1-11. Erratum in: *JAMA Neurol.* 2021 Jan 1;78(1):120. [\[Pubmed\]](#)
40. Rossi M, Candelise N, Baiardi S, Capellari S, Giannini G, Orrù CD, et al. Ultrasensitive RT-QuIC assay with high sensitivity and specificity for Lewy body-associated synucleinopathies. *Acta Neuropathol.* 2020 Jul;140(1):49-62. Erratum in: *Acta Neuropathol.* 2020 Aug;140(2):245. [\[Pubmed\]](#)
41. Manne S, Kondru N, Jin H, Serrano GE, Anantharam V, Kanthasamy A, et al. Blinded RT-QuIC Analysis of α -Synuclein Biomarker in Skin Tissue From Parkinson's Disease Patients. *Mov Disord.* 2020 Dec;35(12):2230-9. [\[Pubmed\]](#)
42. Luan M, Sun Y, Chen J, Jiang Y, Li F, Wei L, et al. Diagnostic Value of Salivary Real-Time Quaking-Induced Conversion in Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. *Mov Disord.* 2022 May;37(5):1059-63. [\[Pubmed\]](#)
43. Manne S, Kondru N, Jin H, Anantharam V, Huang X, Kanthasamy A, Kanthasamy AG. α -Synuclein real-time quaking-induced conversion in the submandibular glands of Parkinson's disease patients. *Mov Disord.* 2020 Feb;35(2):268-78. [\[Pubmed\]](#)
44. Bongianini M, Catalán M, Perra D, Fontana E, Janes F, Bertolotti C, et al. Olfactory swab sampling optimization for α -synuclein aggregate detection in patients with Parkinson's disease. *Transl Neurodegener.* 2022 Jul 28;11(1):37. Erratum in: *Transl Neurodegener.* 2022 Aug 12;11(1):38. [\[Pubmed\]](#)
45. Mollenhauer B, Dakna M, Kruse N, Galasko D, Foroud T, Zetterberg H, et al. Validation of Serum Neurofilament Light Chain as a Biomarker of Parkinson's Disease Progression. *Mov Disord.* 2020 Nov;35(11):1999-2008. [\[Pubmed\]](#)
46. Doroszkiewicz J, Groblewska M, Mroczko B. Molecular Biomarkers and Their Implications for the Early Diagnosis of Selected Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2022 Apr 21;23(9):4610. [\[Pubmed\]](#)