

# DetECCIÓN MULTIPLEX DE CUATRO BIOMARCADORES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN EL LCR HUMANO UTILIZANDO UN NUEVO PANEL DE ENSAYOS MILLIPLEX®

## Introducción

Los trastornos neurodegenerativos progresivos, como la enfermedad de Alzheimer (EA), afectan a millones de personas en todo el mundo y son cada vez más frecuentes a medida que nuestra población envejece. Dos características neuropatológicas clave que ejemplifican la EA son las placas extracelulares de amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ) y los ovillos neurofibrilares intracelulares, compuestos por la proteína Tau anormalmente hiperfosforilada. Los cambios bioquímicos en  $A\beta$  y Tau reflejan los procesos patológicos de la EA en el cerebro.

La monitorización de  $A\beta$ , Tau y otros biomarcadores proteicos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con estos trastornos neurológicos puede ser muy beneficiosa para comprender los procesos patológicos implicados. Estudios anteriores en los que se monitorizaron varios biomarcadores proteicos mediante un panel multiplexado mostraron que el análisis de combinaciones de dos o más

biomarcadores del LCR (como la Tau fosforilada [Thr181] en combinación con  $A\beta$ 1-42) proporcionaba un diagnóstico más preciso de la EA que cualquier biomarcador del LCR por separado<sup>1,2</sup>.

Desarrollamos un nuevo panel de ensayo multiplexado, el panel de microesferas magnéticas MILLIPLEX® map Human Amyloid Beta and Tau (No. Catálogo HNABTMAG-68K), para cuantificar simultáneamente los niveles de  $A\beta$ 1-40,  $A\beta$ 1-42, Tau total y Tau fosforilada (Thr181) en el LCR humano. En comparación con otros paneles disponibles en el mercado que no incluyen  $A\beta$ 1-40, este panel de 4plex permite determinar la relación  $A\beta$ 1-40: $A\beta$ 1-42, que también se ha sugerido como crucial para la patogénesis de la EA<sup>3</sup>. De hecho, muchas mutaciones asociadas a la EA familiar aumentan la proporción  $A\beta$ 1-40: $A\beta$ 1-42.

## Materiales y métodos

Las muestras de LCR humano de individuos no diagnosticados (normales) y de EA se adquirieron de Discovery™ Life Sciences y Precision Medicine, respectivamente.

Los ensayos multiplex para los biomarcadores de la EA se realizaron en placas de 96 pocillos de acuerdo con las instrucciones del producto suministrado para el panel de microesferas magnéticas MILLIPLEX® map Human Amyloid Beta and Tau (No. Catálogo) HNABTMAG-68K.

## Resultados

Se comprobó la especificidad de este kit y no mostró ninguna reactividad cruzada ni ninguna diferencia significativa en las concentraciones de los analitos, independientemente de que cada analito se midiera en un formato single-plex o multiplex (kit completo

de 4 analitos) (Tabla 1). Además, la sensibilidad, la precisión intra e interensayo, la linealidad de la dilución y la recuperación de picos mostraron un excelente rendimiento analítico (Tabla 2).

Plex	4-plex	1-plex	4-plex	1-plex	4-plex	1-plex	4-plex	1-plex
Analyte	A $\beta$ 40	A $\beta$ 40	A $\beta$ 42	A $\beta$ 42	tTau	tTau	pTau (T181)	pTau (T181)
CSF1	1993	2060	189	172	843	805	21	20
CSF1	2136	2094	193	190	867	886	21	22
CSF2	3050	3090	400	392	915	898	28	29
CSF2	2900	3068	412	381	857	898	29	25
CSF3	1160	1178	95	93	547	508	29	28
CSF3	1240	1191	102	100	544	573	30	31
CSF4	2174	2208	260	252	919	859	27	27
CSF4	2170	2284	254	249	929	879	28	28

**Tabla 1.**

Comparación de la concentración de la muestra de LCR en single-plex vs. multiplex. Medición del valor de la muestra de LCR humano en perlas de single-plex y detección frente a perlas de 4-plex y detección por duplicado..

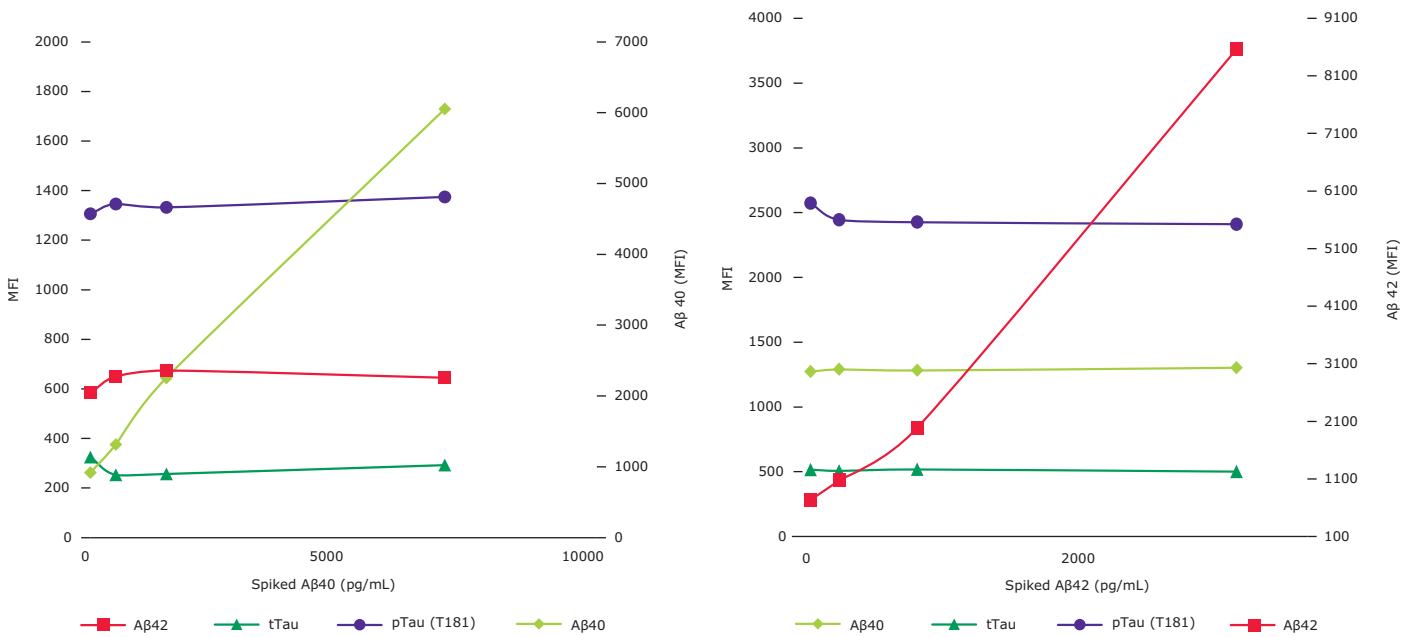
	A $\beta$ 1-40	A $\beta$ 1-42	Total Tau	Phosphorylated Tau (Thr181)
Intra-assay (%CV)	3.8	2.6	3.9	2.9
Inter-assay (%CV)	7.9	9.0	14.2	4.8
Spike recovery in buffer (%)	93	91	92	95
Spike recovery in CSF (%)	101	109	98	91
CSF dilution linearity (%)	96	101	105	112
Cross-reactivity (%)	A $\beta$ 40	< 2	0	< 0.8
	A $\beta$ 42	0.4	100	0
	Total Tau	0	0	100
	Phosphorylated Tau (Thr181)	0	0	0
MinDC +2 Std Dev	10.2	5.4	14.2	1.5

**Tabla 2.**

Características del rendimiento del ensayo. Los %CVs inter-ensayo y los %CVs intra-ensayo se calcularon usando controles positivos de diferentes ensayos. El porcentaje de recuperación de los picos se calculó a partir de las proteínas recombinantes introducidas en el tampón del ensayo y en las muestras de LCR. El porcentaje medio de linealidad se calculó a partir de tres muestras de LCR humano diluidas. El porcentaje de reactividad cruzada se realizó utilizando proteínas recombinantes individuales y purificadas con perlas multiplexadas y cócteles de detección. La concentración mínima detectable (MinDC) se calculó utilizando el software MILLIPLEX® Analyst 5.1 (No. Catálogo 40-087).

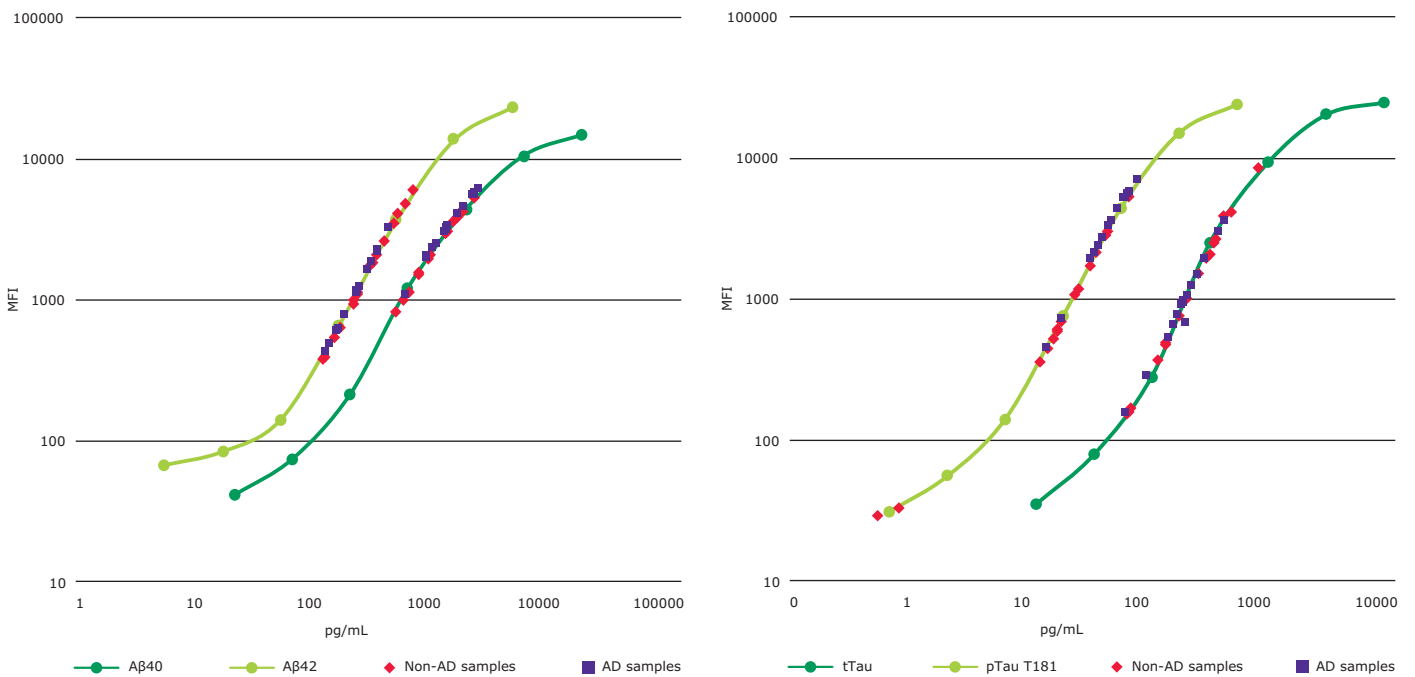
Dadas las características fisicoquímicas de los péptidos A $\beta$ , investigamos si la presencia de péptidos A $\beta$  interferiría con la detección o cuantificación de los otros biomarcadores proteicos cuando se miden simultáneamente. Realizamos una prueba de interferencia (Figura 1) en la que se introdujeron

concentraciones crecientes de proteínas recombinantes A $\beta$ 40 o A $\beta$ 42 en muestras de LCR humano. Las concentraciones medidas de los analitos no cambiaron, lo que indica que no había ninguna interferencia detectable de los péptidos A $\beta$ .



**Figura 1.**

MILLIPLEX® map Human Amyloid Beta y Tau Magnetic Bead Panel (No. Catálogo HNABTMAG-68K) prueba de interferencia. Concentraciones crecientes de proteínas recombinantes Aβ40 o Aβ42 en muestras de LCR humano (n=4). No se detectaron diferencias significativas en las concentraciones de las muestras.



**Figure 2.**

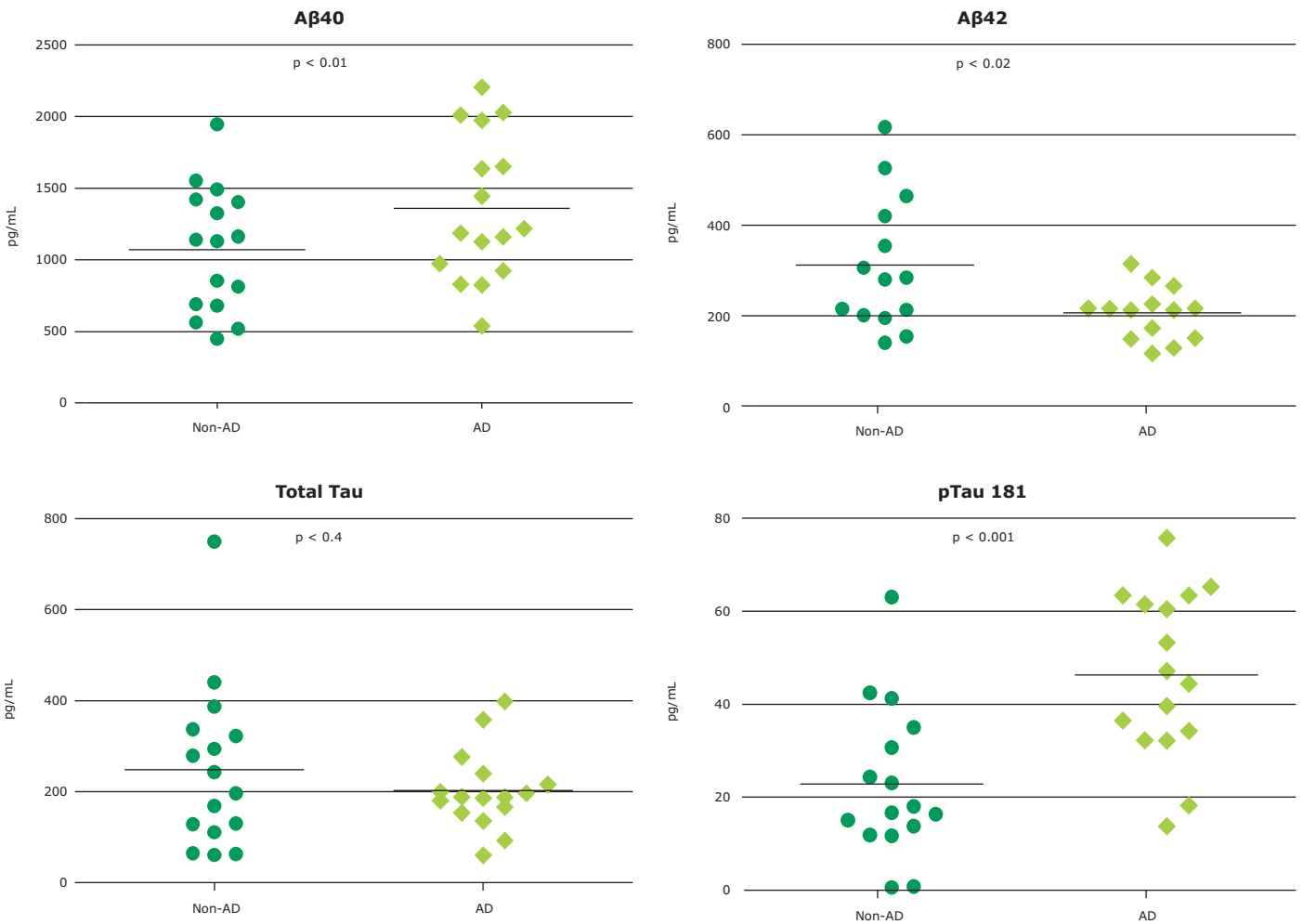
Valores de muestras de LCR trazados en curvas estándar utilizando el mapa MILLIPLEX® Panel de Amiloide Humano Beta y Tau. Las concentraciones de Aβ40, Aβ42, Tau total y Tau fosforilada Tau fosforilada (Thr181) de muestras de LCR humano se representan en las curvas estándar utilizando el MILLIPLEX® map Human Amyloid Beta y Tau Magnetic Bead Panel (No. Catálogo HNABTMAG-68K).

## Resultado (Continuación)

Utilizando el kit de inmunoensayo múltiple MILLIPLEX® map, se detectaron simultáneamente A $\beta$ 1-40, A $\beta$ 1-42, Tau total y Tau fosforilada (Thr181) en muestras de LCR humano emparejadas con la edad y sin EA (Figura 3), minimizando el uso de valiosas muestras de LCR (12,5  $\mu$ L/pocillo). La Tau fosforilada (Thr181) y el A $\beta$ 1-42 se correlacionaron significativamente con la presencia de un diagnóstico de EA (valor  $p < 0,01$  y valor  $p < 0,05$ ,

respectivamente). Ni la Tau total ni el A $\beta$ 1-40 mostraron una correlación significativa con el diagnóstico de EA en las muestras de LCR utilizadas en este estudio.

La proporción de Tau fosforilada (Thr181) sobre A $\beta$ 1-42 mejoró el valor  $p < 0,001$ . Este resultado fue coherente con los datos publicados que indican que la proporción de Tau fosforilada (Thr181) sobre A $\beta$ 1-42 se correlaciona con el deterioro cognitivo<sup>4</sup>.



**Figura 3.**

Medición multiplex de muestras humanas de LCR no AD y LCR AD. Se analizaron muestras de LCR no AD (n=16) y muestras de LCR AD (n=16) utilizando el panel de microesferas magnéticas MILLIPLEX® map Human Amyloid Beta and Tau (No. Catálogo HNABTMAG-68K).

## Conclusión

El panel de microesferas magnéticas MILLIPLEX® map Human Amyloid Beta and Tau (No. Catálogo HNABTMAG-68K) es ideal para la medición simultánea de A $\beta$ 1-40, A $\beta$ 1-42, Tau total y Tau fosforilada (Thr181) para biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas en LCR humano. Este ensayo es rápido, sensible, reproducible y requiere sólo 12,5  $\mu$ L o menos de muestra de LCR.

Es importante señalar que la presencia de A $\beta$ 1-40 o A $\beta$ 1-42 no interfiere con la detección o cuantificación de otros biomarcadores. La capacidad de determinar tanto la relación A $\beta$ 1-40:A $\beta$ 1-42 como la relación A $\beta$ 1-42:Tau fosforilada indica que este ensayo es una herramienta única y potente para estudiar las complejidades del sistema nervioso y los mecanismos de la patología en la EA y otros trastornos neurodegenerativos.

## Referencias

1. Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2010 Mar;6(3):131-44.
2. Herskovits AZ, Locascio JJ, Peskind ER, Li G, Hyman BT. A Luminex assay detects amyloid  $\beta$  oligomers in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. *PLoS One*. 2013 Jul 2;8(7):e67898.
3. Dolev I, Fogel H, Milshtein H, Berdichevsky Y, Lipstein N, Brose N, Gazit N, Slutsky I. Spike bursts increase amyloid- $\beta$  40/42 ratio by inducing a presenilin-1 conformational change. *Nat Neurosci*. 2013 May;16(5):587-95.
4. Bombois S, Duhamel A, Salleron J, Deramecourt V, Mackowiak MA, Deken V, Sergeant N, Pasquier F, Buée L, Sablonnière B, Schraen-Maschke S. A new decision tree combining Abeta 1-42 and p-Tau levels in Alzheimer's diagnosis. *Curr Alzheimer Res*. 2013 May 1;10(4):357-64.

## Para hacer un pedido



Para obtener una cotización o más información sobre nuestros productos y servicios ingrese **AQUÍ** o desde su celular escaneando el código QR.

Merck KGaA  
Frankfurter Strasse 250  
64293 Darmstadt  
Germany

## Información de pedido

MILLIPLEX® MAP Kits	Cat. No.
Human Amyloid Beta and Tau Panel	HNABTMAG-68K
Human Neuroscience Panel 1	HNS1MAG-95K
Human Neurodegenerative Disease Panel 1	HNDG1MAG-36K
Human Neurodegenerative Disease Panel 2	HNDG2MAG-36K
Human Neurodegenerative Disease Panel 3	HNDG3MAG-36K
Human Neurodegenerative Disease Panel 4	HNDG4MAG-36K
Human Neurological Disorders Panel 3	HND3MAG-39K
Human Neuropeptide Panel	HNP MAG-35K
Human Circadian Stress	HNC SMAG-35K

