

# BIOMARCADORES NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO Para o Diagnóstico Precoce de Doença de Parkinson

Andreia Gomes da COSTA, Miguel Fernandes GAGO, Carolina GARRETT

## RESUMO

O diagnóstico da Doença de Parkinson, na prática médica quotidiana, permanece essencialmente clínico o que determina que o diagnóstico seja realizado num estadio neuropatológico avançado. O objectivo deste estudo prende-se com a revisão dos potenciais biomarcadores proteicos no líquido cefalorraquidiano para o diagnóstico precoce da Doença de Parkinson.

Dado o seu envolvimento na patogénese da Doença de Parkinson hereditária, a  $\alpha$ -sinucleína e a DJ-1 têm sido os biomarcadores, no líquido cefalorraquidiano, mais extensamente investigados. Estas proteínas têm obtido resultados divergentes devido a diferentes técnicas laboratoriais de processamento, identificação e controlo. As novas técnicas proteómicas, direccionadas à detecção indiferenciada de múltiplas proteínas existentes no líquido cefalorraquidiano e com concentrações alteradas na Doença de Parkinson (ex. ceruloplasmina, cromogranina B, apoH), mostram-se promissoras.

O diagnóstico precoce de Doença de Parkinson é premente dado tratar-se de uma patologia neurodegenerativa progressiva que acarreta extensa morbilidade. O futuro da investigação centra-se na descoberta de fármacos neuroprotectores de Doença de Parkinson tornando extremamente relevante a definição de biomarcadores para o diagnóstico precoce de Doença de Parkinson.

A.C., M.G., C.G.: Serviço de Neurologia. Centro Hospitalar de São João EPE. Porto, Portugal

## SUMMARY

### CEREBROSPINAL FLUID BIOMARKERS

#### For the Early Diagnosis of Parkinson's Disease

In current medical practice, the diagnosis of Parkinson's disease remains essentially clinical. This practice determines that the diagnosis of Parkinson's disease is done in an already advanced neuropathological stage of the disease. The aim of this study is to review the validity of cerebrospinal fluid protein biological markers in the early diagnosis of Parkinson's disease.

The  $\alpha$ -synuclein and DJ-1 proteins, due to their role in the hereditary Parkinson's disease, have been the most widely studied cerebrospinal biomarkers. Nevertheless, they have had divergent results mostly owing to different processing, identification and control of laboratory techniques. The new proteomic techniques, directed to the detection of multiple undifferentiated proteins in cerebrospinal fluid (eg. ceruloplasmin, chromogranin B, apoH), are promising.

The early diagnosis of Parkinson's disease is imperious as it is a progressive neurodegenerative disorder that causes extensive morbidity. Most of current scientific research in Parkinson's disease is focused on the discovery of neuroprotective drugs. Thus, the definition of biomarkers for the early diagnosis of Parkinson's disease is highly relevant.

## INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP), *Paralísia Agitante*, foi descrita pela primeira vez em 1871 por James Parkinson<sup>1</sup>. Apesar dos avanços científicos, no que respeita à sua fisiopatologia e tratamento, a descrição semiológica feita por James Parkinson de seis casos clínicos de *Paralísia Agitante*, ainda permanece como central nos critérios de diagnóstico da DP: tremor de repouso, rigidez, acinesia, instabilidade postural, postura flectida e bloqueios da marcha<sup>2</sup>. Para além de alterações motoras, sabe-se hoje, que a DP é uma doença neurodegenerativa com disfunção do sistema nervoso autónomo bem como com alterações cognitivas, neurocomportamentais, alterações sensoriais e do sono<sup>3</sup>.

Actualmente, a DP é diagnosticada pela conjugação de manifestações clínicas, exames laboratoriais e neuroimagem<sup>4,5</sup>. A acuidade diagnóstica desta abordagem é de cerca de 82% em comparação com a confirmação neuropatológica<sup>6</sup>. Os sintomas motores da DP só se tornam clinicamente aparentes após a perda de mais de 70% dos neurónios<sup>7</sup>, o que implica um diagnóstico tardio e perda de vários anos de doença pré-sintomática. Para além disso, é essencial melhorar a especificidade diagnóstica da DP uma vez que esta apresenta sinais e sintomas comuns a outras doenças neurodegenerativas (Paralísia Supranuclear Progressiva, Atrofia de Múltiplos Sistemas, Parkinsonismo pós-encefálico, Demência de Alzheimer (DA) com Parkinsonismo, etc)<sup>6</sup>. Contudo, não existe até à data, um teste com especificidade absoluta para o diagnóstico da DP, sendo o diagnóstico definitivo neuropatológico<sup>8</sup>.

Em 1995, o *National Institute of Neurological Disorders and Stroke*, na sequência de um apelo do Congresso Americano, definiu como prioritária a identificação de biomarcadores na DP que permitissem um diagnóstico precoce, a monitorização da evolução da doença e da resposta às terapêuticas implementadas<sup>9</sup>.

Os biomarcadores são parâmetros biológicos objetivos, acessíveis e de fácil medição que se correlacionam quer com a presença quer com a gravidade da doença<sup>10</sup>. Podem ser marcadores genéticos, proteicos, imagiológicos ou ainda testes olfactivos ou do sono REM.

Idealmente, de um biomarcador proteico, espera-se que reflecta o processo degenerativo da doença subjacente<sup>10,11</sup>, sendo validado por diagnóstico neuropatológico, e que apresente uma sensibilidade e especificidade superiores a 80% para a diferenciação da DP de outros quadros similares propiciando valores preditivos positivos consistentes<sup>12</sup>. A não acessibilidade ao tecido afectado na DP, neurónios dopaminérgicos da *substância nigra compacta*, leva à necessidade de detectar biomarcadores nos fluidos corporais. Vários estudos têm-se debruçado na pesquisa de biomarcadores no sangue, soro, urina e líquido cefalorraquidiano (LCR)<sup>11,13</sup>. O LCR aparenta ser o fluido ideal

para a detecção dos biomarcadores na DP devido à sua proximidade ao encéfalo<sup>11</sup>.

A DP é descrita como uma doença com etiologia multifactorial integrando idade, hábitos dietéticos, factores ocupacionais e ambientais bem como factores genéticos<sup>13</sup>. Caracteriza-se por degeneração progressiva e primordial de neurónios dopaminérgicos com subsequente diminuição do neurotransmissor dopamina nos circuitos nigroestriatais cerebrais<sup>14</sup>, gliose astrocítica e presença de neuritos e corpos de Lewy nas células sobreviventes<sup>15</sup>. O constituinte principal dos corpos de Lewy é a  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -sin)<sup>16</sup>. A  $\alpha$ -sin é uma fosfoproteína lipofílica expressa em elevada quantidade nos neurónios. Deste modo, a DP é do ponto de vista fisiopatológico uma sinucleinopatia, tendo sido descrita a agregação da  $\alpha$ -sin em monómeros insolúveis como um dos factores etiológicos na patogénese da DP<sup>16</sup>. Por outro lado, os neurónios dopaminérgicos, aquando da síntese de catecolaminas, podem causar a acumulação de excesso de radicais livres e stress oxidativo com consequente disfunção mitocondrial<sup>17</sup> (figura 1). Os corpos de Lewy são um agregado complexo e por isso outros biomarcadores poderão, teoricamente, afigurar-se como alternativas para o diagnóstico de DP. A proteína DJ-1 tem sido associada ao stress oxidativo<sup>17</sup> e implicada na fisiopatologia da DP autossómica recessiva<sup>18</sup>.

Todos os potenciais biomarcadores, descritos até à actualidade, foram analisados individualmente quanto ao seu papel fisiopatológico e quanto ao seu potencial como biomarcadores no diagnóstico precoce de DP.

## MÉTODOS

Realizou-se uma pesquisa da produção científica na Pubmed® utilizando os termos MeSH *Biological Markers* e *Parkinson Disease* que remetiam para os seguintes termos *Biomarkers*, *Markers*, *Biologic*, *Markers*, *Clinical*, *Clinical Markers*, *Idiopathic Parkinson Disease*, *Paralysis Agitans*, *Parkinson Disease*, *Idiopathic*, *Parkinson's Disease*, entre outros.

Desta pesquisa foi obtida uma lista de 588 artigos publicados de 1971 a 2010. Com base na leitura do resumo destes artigos, foram seleccionados 127 artigos de várias línguas, que apresentavam resultados científicos de proteínas detectáveis nos fluidos corporais na DP. Estes 127 artigos foram lidos na íntegra, tendo sido seleccionados apenas os que abordavam o estudo de biomarcadores proteicos no LCR na DP. Obtiveram-se 12 artigos aos quais, por referência cruzada bibliográfica dos mesmos, se adicionaram 21 artigos. Utilizou-se o Endnote X4® como *software* de gestão bibliográfica.

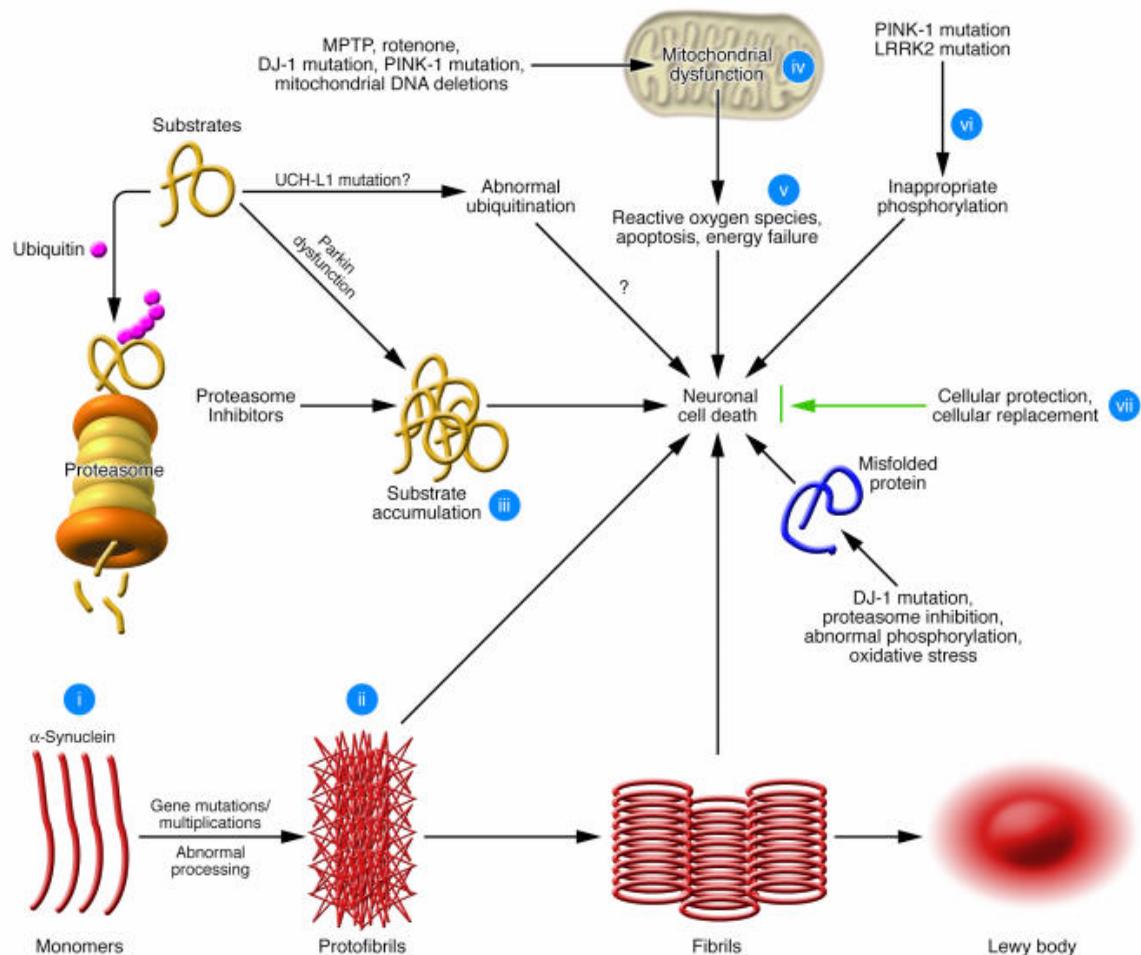


Fig. 1: Reproduzida com a permissão da American Society for Clinical Investigation: Savitt, J. M., V. L. Dawson, et al. (2006). Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J Clin Invest* 116(7): 1744-1754.

## DESENVOLVIMENTO

### Insulina

Jiménez et al.<sup>19</sup> em 2000, estudaram a insulina no LCR como possível biomarcador de DP e da sua gravidade. A ausência deste peptídeo e a consequente hiperglicemia tinham sido apontados como causa de diminuição da transmissão dopaminérgica no estriado e aumento da sensibilidade dos receptores sinápticos dopaminérgicos<sup>20</sup>. O mesmo estudo sugeriu que 50 a 80% dos doentes com DP sofriam de intolerância à glicose<sup>20</sup>. Jiménez et al.<sup>19</sup> verificaram que a concentração de insulina em jejum no LCR era semelhante nos controlos e nos doentes com DP, concluindo que não existe correlação entre a insulina no LCR e as manifestações clínicas da DP ou a terapêutica antiparkinsoniana.

### Complemento

Na sequência de diversos estudos que propunham que a activação do complemento estava na origem das doenças neurodegenerativas, Finehout et al.<sup>21</sup> compara-

ram os níveis das proteínas do complemento C3b, C4b, factor B e factor H e observaram uma maior diminuição dos níveis de diferentes proteínas do complemento no LCR nos doentes DP em comparação com os controlos. Comparando as diferentes doenças neurodegenerativas, as alterações quantitativas das diferentes proteínas do complemento permitiram o diagnóstico diferencial da DP e Esclerose Múltipla em relação à DA e Neurosífilis, mas não diferenciaram DP de Esclerose Múltipla.

### α-sinucleína

A α-sin é uma pequena proteína de 140 aminoácidos expressa em elevadas quantidades nas células neuronais<sup>22</sup>. Desde há alguns anos a α-sin tem sido implicada como tendo um papel na etiologia e patogénese da DP<sup>16</sup>. Foi identificada como o principal componente dos agregados intraneuronais, corpos de Lewy<sup>16</sup>. Foram identificadas mutações missense no gene SNCA que codifica a α-sin em doentes com DP autossómica dominante<sup>23</sup>. Borghi et al.<sup>24</sup> empreenderam um dos primeiros estudos que pretendia avaliar a presença e a concentração de α-sin

no LCR comparando 12 doentes com DP e 10 controlos. Concluíram, no entanto, que apesar de a  $\alpha$ -sin ser libertada pelos neurónios no espaço extracelular, não existiam diferenças entre DP e controlos, pelo que a  $\alpha$ -sin não parecia ser um biomarcador fiável para o diagnóstico de DP<sup>24</sup>. Em contrapartida, em 2006, utilizando uma nova técnica de ELISA de quantificação da  $\alpha$ -sin no LCR, verificaram-se concentrações de  $\alpha$ -sin significativamente mais baixas na DP que nos controlos, mesmo após ajuste para a idade e o sexo, o que foi atribuído a: (a) agregação intracelular e subsequente acumulação da  $\alpha$ -sin nos neurónios afectados; (b) redução da sua produção pelos neurónios patológicos; (c) e/ou redução da expressão do gene SNCA que levaria a uma diminuição da exocitose da  $\alpha$ -sin<sup>15</sup>. Mollenhauer et al.<sup>25</sup> em 2008 verificaram uma concentração inferior de  $\alpha$ -sin no LCR dos doentes com doenças neurodegenerativas do tipo sinucleinopatias. Posteriormente, Ohrfelt et al.<sup>26</sup> utilizaram uma nova técnica de ELISA (a colheita de LCR era realizada no dia em que iria ser processado e este era submetido a centrifugação seguida de armazenamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  até ser analisado) para detecção da  $\alpha$ -sin no LCR em concentrações  $<50$  pg/mL, comparando doentes com DA, DP, Demência com Corpos de Lewy e 55 controlos saudáveis. A concentração de  $\alpha$ -sin no LCR foi semelhante em todos os grupos excepto nos doentes com DA, os quais apresentavam concentrações bastante inferiores. Estes resultados opunham-se à hipótese de a  $\alpha$ -sin ser um biomarcador confiável para o diagnóstico de DP estando em desacordo com os dois estudos prévios<sup>15,25</sup> que sugeriam níveis reduzidos de  $\alpha$ -sin nos doentes com DP. Ohrfelt et al.<sup>26</sup> apontaram que o estudo de Tokuda et al.<sup>15</sup> necessitava de LCR concentrado (submetido a extensa manipulação com ciclos de revestimento, lavagem e incubação após a colheita, centrifugação e incubação do LCR), o que poderia resultar em medição inadequada, enquanto o estudo Mollenhauer et al.<sup>25</sup> requeria incubação extrema do LCR a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas (para que ocorresse o revestimento das placas com o anticorpo), o que poderia suscitar a oligomerização *in vitro* da proteína e conseqüente diminuição da sua concentração. Na sequência de um estudo de 2006<sup>27</sup> que demonstrou concentrações elevadas de oligómeros de  $\alpha$ -sin no plasma na DP, em 2010, Tokuda et al.<sup>28</sup> propuseram-se a investigar as concentrações de oligómeros da  $\alpha$ -sin e a razão oligómeros/ $\alpha$ -sin total no LCR de doentes com DP, Paralisia Supranuclear Progressiva, DA e controlos saudáveis ajustados para a idade usando para tal a técnica de ELISA (ligeiramente modificada) já por eles utilizada em 2006<sup>15</sup>. Concluíram que as concentrações de oligómeros de  $\alpha$ -sin e a razão oligómeros/ $\alpha$ -sin total no LCR estavam significativamente elevadas em doentes com DP em comparação com controlos saudáveis ajustados à idade e doentes com DA e Paralisia Supranuclear Progressiva<sup>28</sup>. Esta elevação dos oligómeros não se devia simplesmente à sobreexpressão de  $\alpha$ -sin já que os níveis

de  $\alpha$ -sin total estavam diminuídos na DP em comparação com os controlos. Em contraponto, doentes com DA com corpos de Lewy positivos e indivíduos muito idosos apresentavam níveis de oligómeros de  $\alpha$ -sin sobreponíveis aos da DP. A acuidade diagnóstica aumentou ao utilizar a razão oligómeros/ $\alpha$ -sin total. Os níveis de oligómeros de  $\alpha$ -sin também estavam aumentados nos estadios iniciais da DP sugerindo que os oligómeros de  $\alpha$ -sin poderiam ser biomarcadores precoces no diagnóstico pré-sintomático de DP<sup>28</sup> e que a razão oligómeros/ $\alpha$ -sin total poderia ser utilizada como ferramenta de rastreio de indivíduos com elevado risco de DP<sup>28</sup>.

### DJ-1

A DJ-1 é uma proteína multifuncional de 189 aminoácidos expressa amplamente no Sistema Nervoso central e periférico, que tem sido implicada na protecção contra o stress oxidativo<sup>29</sup>. As mutações “nonsense” do gene da DJ-1 são uma causa reconhecida de DP autossómica recessiva<sup>18</sup>. Waragai et al.<sup>30</sup>, utilizando técnicas quantitativas de *immunoblotting* no LCR, concluíram que as concentrações de DJ-1 no LCR de doentes com DP eram substancialmente mais elevadas que as dos controlos, especialmente na fase inicial da doença o que poderia advir de um efeito protector anti-oxidativo da DJ-1 nas fases precoces da DP.

### DJ-1 e $\alpha$ -sinucleína

Hong et al.<sup>31</sup> estudaram as concentrações de DJ-1 e de  $\alpha$ -sin no LCR como potenciais biomarcadores no diagnóstico precoce de DP utilizando uma técnica inovadora, Luminex®, que permitiu a quantificação das proteínas com maior sensibilidade associada a controlo de variáveis de confundimento como contaminação sanguínea, gradiente rostro-caudal no LCR, idade e sexo. Concluíram que as concentrações de DJ-1 e  $\alpha$ -sin no LCR são dependentes da idade e influenciadas pela contaminação sanguínea do LCR. Definiram também que os doentes com DP têm concentrações de DJ-1 e  $\alpha$ -sin diminuídas no LCR em comparação com doentes com DA e controlos quando se elimina o efeito da contaminação sanguínea. Assim, concluíram que, para determinadas concentrações de DJ-1 e  $\alpha$ -sin, nos indivíduos com  $\geq 65$  anos, se podem obter sensibilidades e especificidades diagnósticas de 90 e 70% para a DJ-1 e de 92 e 58% para a  $\alpha$ -sin, sendo que a combinação de ambos os marcadores não aumenta a acuidade diagnóstica.

### Biomarcadores em estudo

Vários estudos científicos, ao invés do estudo de detecção de proteínas específicas, desenvolveram técnicas proteómicas para detecção de um elevado número de proteínas no LCR, posteriormente analisando individualmente a sua importância na fisiopatologia e diagnóstico da DP<sup>8,11,32</sup>. Abdi et al.<sup>11</sup>, após a obtenção do LCR, submeteram-no a fraccionamento com o intuito de eliminar as inúmeras

Quadro 1: Biomarcadores, método utilizado e resultado clínico.

Biomarcador	Método	Resultado
Insulina <sup>19</sup>	Radioimunoanálise	Sem relação
Proteínas do complemento: C3b, C4b, factor B e factor H <sup>21</sup>		↓ na DP Diagnóstico diferencial entre DP/Esclerose Múltipla e DA/ Neurosífilis.
α-sin <sup>24</sup>	Imunoprecipitação e <i>Imunoblotting</i>	= na DP
α-sin <sup>15</sup>	ELISA	↓ na DP
α-sin <sup>25</sup>	ELISA	↓ na DP
α-sin <sup>26</sup>	ELISA	= na DP
oligómeros de α-sin	ELISA	↑ na DP
razão oligómeros/α-sin total <sup>28</sup>		↑ na DP
DJ-1 <sup>30</sup>	<i>Immunoblotting</i>	↑ na DP
DJ-1 <sup>31</sup>	Luminex®	↓ na DP
α-sin <sup>31</sup>		↓ na DP
apoC1, ApoH, cromogranina B, ceruloplasmina, fibrinogénio, haptoglobina, t-caderina, VDBP <sup>11</sup>	Multiplex (iTRAQ, cromatografia, espectrofotometria) + <i>Western blotting</i>	Diagnóstico diferencial DP, DA e Demência com corpos de Lewy Ceruloplasmina, cromogranina B e apoH na DP
Proteína tau, BDNF, IL-8, β-amilóide, β <sub>2</sub> -microglobulina, VDBP, apoH e apoE <sup>32</sup>	MAP	Proteína tau e β-amilóide permitem o diagnóstico diferencial entre DP e DA Restantes permitem o diagnóstico diferencial doença neurodegenerativa vs controlos.
Neuropentraxina, α-distroglicano e NCAM (8)	Análise proteómica + <i>Western blotting</i>	Potenciais marcadores de Doença Neurodegenerativa

DP – Doença de Parkinson, DA – Doença de Alzheimer, VDBP – *vitamin D binding protein*, BDNF – *brain derived neurotrophic factor*, ELISA – *enzyme linked immunosorbent assay*, iTRAQ – *isobaric tag for relative and absolute quantitation*, MAP – *proteomics-discovered multianalyte profile*

proteínas excedentárias (albumina, imunoglobulinas) que são fonte conhecida de viés. De seguida, empregaram um método proteómico quantitativo multiplex, *iTRAQ, isobaric Tagging for Relative and Absolute protein Quantification*, conjuntamente com cromatografia multifuncional seguida de espectrometria de massa aleatória e detectaram 72 alterações proteicas quantitativas no LCR dos doentes com DP e oito marcadores (apoC1, ApoH, cromogranina B, ceruloplasmina, fibrinogénio, haptoglobina, t-caderina, proteína de ligação da vitamina D), posteriormente confirmados por *Western blotting*. A conjugação de mais do que um destes marcadores permitiu distinguir a DA, DP e Demência com corpos de Lewy dos controlos com elevada sensibilidade para especificidades de 95%. Na DP apontaram a ceruloplasmina, cromogranina B e apoH como bons candidatos a biomarcadores <sup>11</sup>.

Zhang et al. <sup>32</sup> colheram o LCR na manhã da análise e armazenaram-no prontamente a -80°C até à aplicação da técnica de MAP, *proteomics-discovered multianalyte profile*. Obtiveram 8 proteínas (por ordem decrescente de contribuição: proteína tau, *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), interleucina 8, β-amilóide, β<sub>2</sub>-microglobulina, VDBP, apoH e ApoE) que permitiram o diagnóstico correcto de 95% dos controlos, 75% dos doentes com DA e 95% dos doentes com DP. Destas proteínas apenas a proteína tau e a β-amilóide permitiram diferenciar DA de DP (proteína tau aumentada e a β-amilóide diminuída na DA e inversamente na DP).

Yin et al. <sup>8</sup>, após colheita, centrifugação e armazenamento a -70°C do LCR, utilizaram um método combinado de análise proteómica confirmado por *Western blotting* identificando a neuropentraxina, o α-distroglicano e a

NCAM (*neural cell adhesion molecule*) como potenciais biomarcadores de doenças neurodegenerativas.

## CONCLUSÃO

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a Doença de Alzheimer constituindo um enorme problema de saúde pública <sup>32</sup> que afecta 1,8% dos adultos com mais de 65 anos <sup>33</sup>, causando extrema morbidade aos doentes e aos seus prestadores de cuidados de saúde <sup>12</sup> e constituindo fonte de elevadas despesas ao Sistema Nacional de Saúde. A identificação de biomarcadores na DP é um pré-requisito para um diagnóstico precoce abrindo espaço para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas modificadoras da doença <sup>12</sup>, nomeadamente fármacos neuroprotectores <sup>31,32</sup>.

A procura de biomarcadores na DP progrediu em múltiplas direcções, quer pela verificação da alteração no LCR de proteínas classicamente suspeitas utilizando diferentes técnicas de quantificação no LCR, quer pela pesquisa de novos biomarcadores através da análise de múltiplas proteínas no LCR.

No que respeita aos biomarcadores proteicos no diagnóstico precoce de DP as conclusões têm sido divergentes, sendo sugerido pelos próprios autores, a necessidade de realização de estudos em larga escala, prospectivos e controlados para diversas variáveis de confundimento <sup>11,15,28</sup>. A divergência entre estudos deve-se, essencialmente, a diferentes técnicas de detecção e quantificação das diferentes proteínas no LCR. Para além disso, a influência da idade e contaminação sanguínea do LCR, não são desprezíveis e podem influenciar os resultados <sup>8</sup>.

Os níveis de oligómeros de  $\alpha$ -sin estão aumentados nos estadios iniciais da DP podendo ser biomarcadores precoces no diagnóstico pré-sintomático de DP <sup>7</sup>. A acuidade no diagnóstico diferencial de DP com outras doenças neurodegenerativas parece aumentar ao utilizar a razão oligómeros de  $\alpha$ -sin/ $\alpha$ -sin total <sup>7</sup>.

A proteína DJ-1, implicada na protecção contra o stress oxidativo, é um produto genético de mutação conhecida de DP genética (PARK7). Foram observadas concentrações elevadas desta proteína no LCR da DP, especialmente na fase inicial da doença, apontando assim a DJ-1 como potencial biomarcador no diagnóstico precoce de DP <sup>14</sup>.

Através de novas técnicas laboratoriais de análise proteómica no LCR, a ceruloplasmina, a cromogranina B e a apoH surgem como novos potenciais biomarcadores de DP <sup>11</sup> carecendo, contudo, de mais investigação e re-certificação.

Os biomarcadores  $\alpha$ -sin e DJ-1, com papel documentado na fisiopatologia da DP, têm sido confirmados, nos estudos de análise de LCR convencional, como os biomarcadores mais consistentes no diagnóstico precoce

da DP. Em simultâneo, recaem enormes expectativas nos novos métodos de análise proteómica do LCR já que estes permitem o estudo transversal e simultâneo de várias proteínas do LCR num curto espaço de tempo. Contudo, a aplicabilidade destas novas técnicas à prática clínica diária, pela necessidade de aquisição de novos equipamentos de avultado preço e dificuldade de manuseio dos mesmos, poderão constituir entrave inicial à sua aplicabilidade.

### Conflito de interesses:

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

### Fontes de financiamento:

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

## REFERÊNCIAS

1. PARKINSON J. An essay on the shaking palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2002;14:223-36.
2. JANKOVIC J, editor. Pathophysiology and assessment of parkinsonian symptoms and signs. New York: Taylor and Francis Group, LLC; 2007.
3. JANKOVIC J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79:368-76.
4. NUSSBAUM RL, ELLIS, C.E. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2003;348(14):1356-64.
5. FORMAN MS, TROJANOWSKI, J.Q., LEE, V.M. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med*. 2004;10(10):1055-63.
6. HUGHES AJ DS, KILFORD L, LEES AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 1992;55:181-4.
7. LANG AL, AM; Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 1998;339 (15):1044-53
8. YIN GN, LEE HW, CHO JY, SUK K. Neuronal pentraxin receptor in cerebrospinal fluid as a potential biomarker for neurodegenerative diseases. *Brain Res*. 2009;1265:158-70.
9. GLASER V. Consensus on future directions in Parkinson's disease research. *Mol Med Today*. 1995;1(8):350
10. GASSER T. Genomic and proteomic biomarkers for Parkinson disease. *Neurology* 2009;72(7 Suppl):S27-31.
11. ABDI F, QUINN JF, JANKOVIC J et al. Detection of biomarkers with a multiplex quantitative proteomic platform in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis* 2006;9(3):293-348
12. SCHLOSSMACHER MG, MOLLENHAUER B. Biomarker research in Parkinson's disease: objective measures needed for patient stratification in future cause-directed trials. *Biomark Med*. 2010;4(5):647-50.
13. FORTE G, BOCCA B, SENOFONTE O et al. Trace and major elements in whole blood, serum, cerebrospinal fluid and urine of patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2004;111(8):1031-40
14. BRAAK H, BRAAK E. Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J Neurol* 2000;247(0):II3-II10.
15. TOKUDA T, SALEM SA, ALLSOP D et al. Decreased alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;349(1):162-6.
16. SPILLANTINI MG, SCHMIDT ML, LEE VM, TROJANOWSKI JQ, JAKES R, GOEDERT M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388(6645):839-40

17. HASHIMOTO M, ROCKENSTEIN E, CREWS L, MASLIAH E. Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuromolecular Med* 2003;4(1-2):21-36
18. BONIFATI V, OOSTRA B, HEUTINK P. Linking DJ-1 to neurodegeneration offers novel insights for understanding the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Molecular Med* 2004;82(3):163-74.
19. JIMENEZ-JIMENEZ FJ, MOLINA JA, VARGAS C et al. Normal cerebrospinal fluid levels of insulin in patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 2000;107(4):445-9.
20. SANDYK R. The relationship between diabetes mellitus and Parkinson's disease. *Int J Neurosci.* 1993 Mar-Apr;69(1-4):125-30
21. FINEHOUT EJ, FRANCK Z, LEE KH. Complement protein isoforms in CSF as possible biomarkers for neurodegenerative disease. *Dis Markers.* 2005;21(2):93-101
22. JAKES R, SPILLANTINI MG, GOEDERT M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett.* 1994 May 23;345(1):27-32
23. POLYMEROPOULOS MH, LAVEDAN C, LEROY E et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276(5321):2045-7
24. BORGHI R, MARCHESE R, NEGRO A et al. Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neurosci Lett* 2000;287(1):65-7
25. MOLLENHAUER B, CULLEN V, KAHN I et al. Direct quantification of CSF alpha-synuclein by ELISA and first cross-sectional study in patients with neurodegeneration. *Exp Neurol* 2008;213(2):315-25
26. OHRFELT A, GROGNET P, ANDREASEN N et al. Cerebrospinal fluid alpha-synuclein in neurodegenerative disorders-a marker of synapse loss? *Neurosci Lett.* 2009;450(3):332-5
27. EL-AGNAF OM, SALEM SA, PALEOLOGOU K et al. Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J.* 2006;20(3):419-25
28. TOKUDA T, QURESHI MM, ARDAH MT et al. Detection of elevated levels of {alpha}-synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology* 2010;75:1766-1772
29. TAIRA T, TAKAHASHI K, KITAGAWA R, IGUCHI-ARIGA SM, ARIGA H. Molecular cloning of human and mouse DJ-1 genes and identification of Sp1-dependent activation of the human DJ-1 promoter. *Gene.* 2001;263(1-2):285-92
30. WARAGAI M, WEI J, FUJITA M et al. Increased level of DJ-1 in the cerebrospinal fluids of sporadic Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345(3):967-72
31. 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.
32. ZHANG J, SOKAL I, PESKIND ER, QUINN JF et al. CSF multianalyte profile distinguishes Alzheimer and Parkinson diseases. *Am J Clin Pathol* 2008;129(4):526-9.
33. DE RIJK MC LL, BERGER K et al: Prevalence of Parkinson's disease in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. *Neurology.* 2000;54 (11 suppl 5):S21-3

