

**PROTEOMA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES SISTÉMICAS  
COMO POSIBLE TRAZADOR DIFERENCIAL Y CONVERGENTE DE  
NEUROINFLAMACIÓN EN ALZHEIMER**

**CAROLINA LÓPEZ MURILLO**

**Trabajo de grado para optar al título de Bióloga**

**Asesor  
Rafael Andrés Posada Duque  
Biólogo, M.Sc, PhD**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
EL CARMEN DE VIBORAL**

**2020**

## **Proteoma de vesículas extracelulares sistémicas como posible trazador diferencial y convergente de neuroinflamación en Alzheimer**

**Título abreviado:** Las EVs como trazadores de neuroinflamación en la AD

Carolina López-Murillo<sup>1,2</sup>, Juan Villar-Vesga<sup>1,2</sup>, Lara Barazzuol<sup>3</sup>, Rafael Andrés Posada-Duque<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Área de neurobiología celular y molecular, Grupo de Neurociencias de Antioquia, Universidad de Antioquia. <sup>2</sup>Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. <sup>3</sup>Department of Radiation Oncology, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, the Netherlands; Department of Biomedical Sciences of Cells and Systems, Section of Molecular Cell Biology, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, the Netherlands.

**Abreviaciones:** EVs, Vesículas extracelulares; AD, Enfermedad del Alzheimer; MVs, Microvesículas; IBA-1, La molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1; OX-42, Anticuerpo CD11b; SNC, Sistema nervioso central; ILV, Vesículas intraluminales; MVES, Endosomas multivesiculares; MBVs, Cuerpos multivesiculares; NVU, Unidad neurovascular; BBB, Barrera hematoencefálica; A $\beta$ , Péptido Beta-amiloide; PSEN1, Presenilina-1; PSEN2, Presenilina-2; APP, Proteína precursora amiloide; SAD, Alzheimer esporádico; FAD, Alzheimer familiar; CNT, Control; GM, Materia gris; PTM, Modificaciones post-traduccionales; SBSN, Suprabasina; GRHPR, Glioxilato e hidroxipiruvato reductasa; RIDA, Imina desaminasa A intermedia reactiva Homólogo; ADH1A, Alcohol deshidrogenasa 1A; HV70D, Inmunoglobulina pesada variable 2-70D; FBLN3, Proteína 1 de la matriz extracelular similar a la fibulina que contiene EGF; GSTO, Glutación S transferasa omega-1; ENOA, Alfa-enolasa; HV323, Inmunoglobulina pesada variable 3-23; HVC33, Inmunoglobulina pesada variable 3-30-3; PLAK, Placoglobina de unión; ALDOB, Fructosa-bisfosfato aldolasa B; GPX3, Glutación peroxidasa 3; BHMT1, Betaína - Homocisteína S - Metiltransferasa 1; H2B1L, Histona H2B tipo 1-L; HV320, Inmunoglobulina pesada variable 3-20; HV108, Inmunoglobulina pesada variable 1-8; KPRP, Proteína de queratinocitos rica en prolina; FAAA, Fumarylacetoacetasa; FRIL, Cadena ligera de ferritina; LV218, Inmunoglobulina lambda variable 2-18; PEPD, Dipeptidasa Xaa-Pro; TRFE, Serotransferrina; WFDC3, Dominio de núcleo de cuatro disulfuros WAP 3; CO2: Factor del complemento C2; HV205, Inmunoglobulina pesada variable 2-5; TSP1, Trombospondina 1; PLTP, Proteína de transferencia de fosfolípidos.

**Declaración de significancia:** La microglía, como marcador de neuroinflamación, está diferencialmente afectada en Alzheimer, específicamente FAD muestra mayor microgliosis en las capas II-III respecto a SAD; además, FAD presenta hipertrofia microglial mientras que SAD atrofia. Además, SAD presenta mayor hipertrofia de macrófagos mientras FAD mayor circularidad relacionada a la atrofia. La composición proteica de las EVs, mostró una expresión diferencial y convergente en los tipos Alzheimer. Específicamente, SAD presentó mayor diversidad de proteínas, de las cuales SBSN, GRHPR, RIDA, ADH1A y HV70D se expresaron como marcadores exclusivos del grupo. A su vez, PLAK, ALDOB, GPX3, BHMT1, H2B1L, HV320, HV108 y KPRP se expresaron en AD, especialmente, esta última se expresó en tres o más sujetos de cada grupo; con lo anterior, se sugieren como posibles son trazadores sistémicos convergentes en la AD. Adicionalmente, H2B1L, DHSO y TRFE presentaron modificaciones post-traduccionales (PTM) exclusivas para AD que podrían estar involucradas con la cascada de señalización en la enfermedad. Finalmente, la proteína PLTP podría estar implicada en la cantidad de EVs durante la inflamación sistémica en AD. Los presentes hallazgos dan luces al entendimiento de la composición proteica como trazador diferencial y convergente en la neuroinflamación del Alzheimer.

**Palabras clave:** EVs, microglía, proteínas vesiculares, biomarcadores, modificaciones post-traduccionales, neuroinflamación, Alzheimer.

## Resumen

Las vesículas extracelulares (EVs) son un mecanismo de comunicación celular dentro del sistema nervioso e inmune, tanto en contextos fisiológicos como patológicos. La enfermedad del Alzheimer (AD) es la mayor causa de demencia, y aún falta esclarecer el rol de EVs en la etiopatología de esta enfermedad. Existen dos formas de AD: una forma esporádica (SAD), con aparición tardía, influenciada por condiciones ambientales, envejecimiento y estilos de vida poco saludables y otra forma familiar (FAD), con aparición temprana, asociada con factores genéticos de causalidad. El estudio de la composición proteica de las EVs sistémicas de estas dos formas de AD, podría revelar una posible relación con la neuroinflamación. Por lo tanto, se determinó la composición proteica de las EVs como trazador sistémico de AD y la neuroinflamación tisular; encontrando procesos de microgliosis en las capas II - III de la corteza frontal, mayormente en FAD respecto a SAD. Se comparó la morfología de microglía y macrófagos en AD a través de parámetros de complejidad, tamaño, forma y área de influencia; SAD presentó microglía atrofiada mientras que FAD hipertrofiada. Por otra parte, SAD presentó hipertrofia de macrófagos en tanto que FAD atrofia. Se detectó el perfil de carga proteica como trazador diferencial y convergente para SAD y FAD. Específicamente, SAD presentó mayor diversidad de proteínas; y la suprabasina (SBSN), Glioxilato e hidroxipiruvato reductasa (GRHPR), Imina desaminasa A intermedia reactiva Homólogo (RIDA), Alcohol deshidrogenasa (ADH1A) e Inmunoglobulina pesada variable 2-70D (HV70D) fueron considerados como exclusivas para el grupo. Por otra parte, la placoglobina de unión (PLAK), Fructosa-bisfosfato aldolasa B (ALDOB), Glutatión peroxidasa 3 (GPX3), Betaína - Homocisteína S - Metiltransferasa 1 (BHMT1), Histona H2B tipo 1-L (H2B1L), Inmunoglobulina pesada variable 3-20 (HV320), Inmunoglobulina pesada variable 1-8 (HV108), y la proteína de queratinocitos rica en prolina (KPRP) son trazadores de EVs-sistémicas convergentes en la AD. A su vez, las proteínas de EVs de AD, DHSO, H2B1L y TRFE presentaron oxidaciones y acetilaciones como modificaciones post-traduccionales (PTM) que podrían estar implicadas en la cascada de señalización de inflamación en AD. Basado en un análisis de correlación, las proteínas del factor del complemento C2 (CO2), Inmunoglobulina pesada variable 2-5 (HV205), Trombospondina 1 (TSP1) y la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) mostraron estar relacionadas con la cantidad de EVs sistémicas. Nuestros hallazgos indican que la composición proteica de las EVs sistémicas en AD podrían ser utilizados como biomarcadores diferenciales y convergentes de neuroinflamación.

## Introducción

Las EVs son estructuras evolutivamente conservadas, compuestas por fragmentos membranosos secretados por las células [1]–[3]. Se clasifican en tres tipos basadas en el tamaño, biogénesis y contenido celular [4], [5]. Dos de éstas, son liberadas por células de manera constitutiva, como en respuesta a factores externos, y se clasifican como *exosomas* (30-100 nm de diámetro) y *MVs* (100-1000 nm de diámetro (también conocido como 'micropartículas' (MPs))). Un tercer tipo, que se liberan de las células durante la muerte celular programada se clasifican como los *cuerpos apoptóticos* (> 1000 nm) [6].

Las EVs desempeñan funciones en la comunicación intercelular, donde las células donadoras las secretan al medio extracelular para ser captadas por una célula diana [7], [8]. Por otra parte, las EVs están involucradas en la modulación de la respuesta inmunitaria, transducción de señales, homeostasis celular y el transporte de material genético [4], [5]. Adicionalmente, las EVs permiten la eliminación extracelularmente de material no deseado [8]. Debido a que las EVs son liberadas por diversas poblaciones celulares (células sanguíneas e inmunes, endoteliales, epiteliales, células del sistema nervioso central, células madre adultas, embrionarias, e incluso tumorales [9]–[12], y que pueden viajar largas distancias en los fluidos corporales, se han propuesto como posibles biomarcadores de diferentes condiciones patológicas [13]–[16]. Específicamente, las EVs empaquetan y transportan diferentes enzimas, moléculas de señalización, factores de transcripción, receptores de membrana, proteínas, lípidos, organelos como la mitocondria, mARN, ARN no codificante, ADN mitocondrial y genómico [4], [5], [17]. Notablemente, la cantidad y la composición de carga al interior de las EVs son altamente dependientes del tipo y contexto celular [18]. Por su parte, el contenido proteico de las EVs se deriva principalmente de la membrana plasmática, citosol y vesículas internas [15]. En recientes estudios se ha encontrado que las EVs pueden enriquecerse en proteínas asociadas con la progresión de diferentes enfermedades [19], [20]. Por lo cual un contenido alterado de proteínas en EVs sistémicas podría relacionarse con la neuroinflamación vista en AD.

Por otra parte, la capacidad fagocítica microglial juega un papel fundamental en el inicio y el progreso de la neuroinflamación en neurodegeneración [21], [22]. La activación microglial tiene por objetivo proteger el SNC; sin embargo, su sobreactivación crónica puede conducir al déficit cognitivo [23]. Se han realizado estudios donde se ha encontrado que varias mutaciones del receptor fagocítico microglial TREM2 está asociado con el incremento de la AD [24]. También, la microglía hiperreactiva es clave en la progresión de la AD, relacionada con la agregación del A $\beta$  y Tau hiperfosforilado [25]. De manera interesante, la microglía puede producir EVs [14], [26], [27]; y aunque el mecanismo de acción de las EVs derivadas de la microglía ha sido poco estudiado, se sabe que las EVs son uno de los

principales medios de comunicación intercelular, lo cual puede estar involucrado con el esparcimiento de patologías neurodegenerativas [28]. Aunque se han realizado pocos estudios de las EVs en el SNC y su relación con las de la periferia, se ha hipotetizado que los cambios en la biogénesis de las EVs tienen relación con la progresión de la AD [29] y las alteraciones de las proteínas vesiculares están potencialmente relacionadas con la propagación de la proteinopatía del AD [30]–[32].

La AD puede presentarse en dos formas: esporádica (SAD) o familiar (FAD). La primera es la forma más frecuente y se genera por factores ambientales, envejecimiento, estilos de vida poco saludables y en muchos casos se ha visto la implicación del gen de susceptibilidad APOE [33]. Por su parte, FAD explica el 0,5% de todos los casos de AD y se caracteriza por un inicio temprano ( $\leq 65$  años) y un rápido aumento de la gravedad [34]. Aproximadamente el 50% de los sujetos con FAD presentan una herencia autosómica dominante de mutaciones en uno de los tres genes asociados: PSEN1, PSEN2 y APP [35]. Aunque FAD y SAD comparten algunas características, no está claro si se trata de enfermedades equivalentes, por tal razón, se utilizan técnicas como proteómica, lipidómica y/o transcriptómica para identificar criterios diferenciales y convergentes para el diagnóstico de los tipos de AD [20], [36]. Aunque recientemente hemos mostrado un incremento en la producción de EVs sistémica en sujetos con FAD (PSN1 E280A, también llamado “gen paisa”) y esporádico SAD, las cuales proceden principalmente de plaquetas, células endoteliales y leucocitos [37] es necesario determinar la composición proteica de las EVs como posible trazador implicado en neuroinflamación de la AD. En este estudio, nosotros caracterizamos la composición proteica de EVs. Encontramos que el perfil alterado de las EVs sistémicas puede estar asociado con la activación microglial/macrófagos y por ende la neuroinflamación en AD. Esto indica que las EVs puede ser trazadores diferenciales y convergentes en los dos tipos de AD.

## **Materiales y métodos**

**Muestras humanas:** Este estudio fue aprobado por el comité de bioética para estudios de la Universidad de Antioquia, SIU, Acta 17-10-755. Todos los sujetos con la AD y los controles, proporcionaron consentimiento informado para la investigación y el uso de sus muestras. Se incluyeron muestras de sangre periférica y/o cerebro *post-mortem* de sujetos con un rango de edad entre los 38 y 94 años: n = 5 - 6 CNT, n = 5 - 9 SAD y n = 5 - 6 FAD (mutación en PSEN1 E280A) (*Tabla 1*), obtenidos del Banco de cerebros de la Universidad de Antioquia. Se incluyeron los siguientes datos: sexo, edad de inicio de la enfermedad y de muerte; índice *post-mortem*, (lapso de tiempo entre la muerte del sujeto y la toma de muestras); para clasificar el grado de AD la escala Consortium to Establish a Registry for Alzheimer’s Disease, CERAD; etapa Braak; Criterios NIA-RI, como diagnóstico

patológico de AD de “alta probabilidad”, una batería neuropsicológica desarrollada para el cribado de la AD; y las comorbilidades [34].

**Inmunohistoquímica:** Se obtuvieron muestras de la corteza del giro frontal medio con tiempos *post-mortem* muy bajos (media de 4,26 h). Inmediatamente después de la recolección, las muestras se fijaron con 4 % de paraformaldehído preparado en tampón de citoesqueleto durante 72 h a 4°C, renovando la solución cada 24 h. Posteriormente, las muestras se seccionaron en cortes coronales de 50 µm de espesor en un vibrátomo Leica. Antes de la inmunotinción, se realizó la recuperación del antígeno utilizando ácido fórmico al 98 % a 85°C durante 5 min. La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó mediante incubación con metanol-peróxido de hidrógeno. Para evitar la unión no específica de anticuerpos, las muestras se incubaron en 1 % de albúmina de suero bovino BSA (SigmaAldrich, A9647) durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Para detectar la microglía, las rebanadas se incubaron durante 72 h a 4°C en anticuerpo primario de conejo IBA1 (Wako; 019-19741; mouse,1: 500) y anticuerpo policlonal de cabra para macrófagos/microglía CD11b (OX-42) (abcam; ab62817; 1:500) diluido en una solución de anticuerpo de BSA al 0,3 %, Triton X al 0,3 % y buffer fosfato 1M (PB; pH: 7,4). Después de 20 min de lavar el exceso de anticuerpos, las rebanadas se incubaron durante 1 h a TA en la correspondiente solución de anticuerpo secundario con anti-mouse de rabbit biotinilado (Invitrogen; B-2770; 1: 250). Posteriormente, las rebanadas se lavaron 3 veces en PB 1M, 5 min cada una, seguido de 1 h de incubación con el kit de tinción estándar de peroxidasa avidina-biotina (Thermo Scientific; 32020; 1: 250) a TA, 5 min en tabletas 3,3'-diaminobencidina (Sigma-Aldrich; D5905) y posteriormente se almacenaron en solución de lavado para el montaje. Los tejidos se deshidrataron en etanol 70, 96, 100 % y xileno a TA. Finalmente, las rebanadas se montaron en portaobjetos de vidrio con Shandon Consul-Mount (Thermo Scientific; 9990440).

**Imágenes de tejidos completos:** Para el análisis de distribución del marcador de microglía IBA-1, los portaobjetos de vidrio fueron escaneados con un microscopio de escáner de tejidos en un campo brillante en NanoZoomer-XR (Hamamatsu), equipado con un objetivo 20X (NA 0,75; UPlanSApo; Olympus).

**Imágenes de microglía únicas:** La morfología de la microglía se evaluó a través de imágenes de campo brillante. Se registraron seis microglías por portaobjetos ubicados en la capa I-II de la GM de la corteza

frontal (300 - 900  $\mu\text{m}$  de profundidad), utilizando un microscopio Olympus CX35 equipado con un objetivo 100X en aceite de inmersión y una cámara Nikon DS-5M.

### **Procesamiento de imagen y análisis de cuantificación de imágenes en microscopía de campo**

**brillante:** Las imágenes resultantes de todo el tejido y los registros de microglía se segmentaron y analizaron utilizando el software FIJI (NIH ImageJ). Para el análisis de la distribución de los marcadores de microglía, la calibración del blanco de las imágenes se realizó mediante una macro de acceso abierto (código original de Vytas Bindokas), con el fin de obtener imágenes comparables en color. La eliminación de ruido se realizó utilizando la herramienta de resta de fondo con un tamaño de bloque de 50 px. Se realizaron gráficos de perfiles de intensidad de 8 bits en un área de 0,9  $\text{cm}^2$ , para determinar los niveles de expresión de la microglía promediando la intensidad de 100  $\mu\text{m}$  de ancho, a través de los primeros 900  $\mu\text{m}$  de profundidad de la GM. Para calcular el área teñida total, la segmentación de todas las imágenes se realizó mediante el umbral de intensidad. Antes de eso, se ecualizó el histograma con el propósito de mejorar el contraste. Para el análisis de morfología de la microglía, las imágenes se transformaron a 8 bits. Luego, los somas de la microglía se segmentaron manualmente mediante el uso de herramientas de pincel de selección. Para segmentar los procesos de la microglía se utilizó el plugin Neurite Simple Tracer (desarrollado por Tiago Ferreira). Posteriormente, se obtuvieron parámetros morfológicos del soma, procesos la microglía y microglías completas mediante el plugin FracLac (desarrollado por Karperien A.) y herramientas de FIJI. Finalmente, se analizaron los parámetros morfológicos relacionadas con la complejidad (rugosidad, densidad, compacidad y cantidad de filamentos); tamaño (área, perímetro, longitud y longitud promedio de los filamentos); forma (circularidad y relación de aspecto) y área de influencia (características de escala y forma del convex hull, feret, bounding rectangle y fit ellipse).

**Aislamiento y caracterización de la EVs:** Las muestras de sangre anticoagulada con citrato de sodio fueron colectadas de sujetos CNT, SAD y FAD para aislar las EVs del plasma por medio de la centrifugación que se realizó inmediatamente después de la recolección a 1800  $g$  durante 10 min a 21°C. El plasma se centrifugo a 3000  $g$  durante 20 min a 21°C para obtener plasma pobre en plaquetas. Posteriormente, se centrifugo a 16900  $g$  durante 1 h a 21°C para obtener las EVs. Los pellets de las EVs se congelaron inmediatamente en 100  $\mu\text{L}$  de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco filtrada (DPBS 1X, GibcoBRL) a -70°C hasta su uso. Finalmente, se evaluó la concentración por mililitro de EVs presentes en cada 100  $\mu\text{L}$  de plasma para obtener la cantidad de EVs presentes y el contenido proteico [37].



**LC-MS/MS:** Se cargaron muestras (25 µg) en un gel Run Blue bis tris prefabricado al 8 % (Expedeon) y se corrieron a 100 V durante 5 min. Los geles se tiñeron con Instant Blue Protein Stain (Expedeon) y posteriormente se lavaron con agua ultrapura. Se escindieron las bandas de gel y se trituraron en trozos pequeños y se separaron por completo utilizando  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  al 70 % 50 mM y acetonitrilo (ACN) al 30 %. La reducción y alquilación de las cisteínas se realizó añadiendo DTT 10 mM disuelto en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM y se incubó a 56°C durante 30 min. A continuación, se añadió yodoacetamida 55 mM en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM y se incubó durante 30 min en la oscuridad, a TA. Se retiró el líquido restante y se añadió ACN al 100 % y se incubó durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante y los trozos de gel se secaron durante 15 min a 56 ° C. Las proteínas se digirieron añadiendo 10 ng/µL de tripsina modificada con grado de secuenciación (Promega) en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM a los trozos de gel y se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, los péptidos se extrajeron usando ácido fórmico al 5% seguido de una segunda elución con ácido fórmico al 5 % en acetonitrilo al 66 %. Los extractos combinados se secaron en un SpeedVac y se disolvieron en 20 µL de ácido fórmico al 5 %. La LC-MS/MS de los péptidos tripticos se realizó con el sistema Ultimate 3000 HPLC acoplado en línea a un espectrómetro de masas Q-Exactive-Plus con una fuente NanoFlex (ambas de Thermo Fisher Scientific) equipada con un emisor de acero inoxidable. Se cargó 1 µL de digerido triptico en un tubo de 5 mm x 300 µm de d.i. atrapando la microcolumna empaquetada con PepMAP100 partículas de 5 µm (Dionex) en 0,1% de FA a un caudal de 20 µL/min. Después de cargar y lavar durante 3 min, los péptidos se eluyeron en contracorriente en un diámetro interno de 50 cm x 75 µm i.d. nanocolumna, empaquetada con partículas Acclaim C18 PepMAP100 de 2 µm (Dionex). El siguiente gradiente de fase móvil se administró a una velocidad de flujo de 300 nL/min: 2 - 50 % de disolvente B en 90 min; 50 - 80 % de B en 1 min; 80 % de B durante 14 min, y de nuevo, al 3 % de B en 1 min y se mantuvo al 2 % de B durante 24 min. El disolvente A era  $\text{H}_2\text{O}$ /acetonitrilo 100:0 (v/v) con ácido fórmico al 0,1 % y el disolvente B era  $\text{H}_2\text{O}$ /acetonitrilo 0:100 (v/v) con ácido fórmico al 0,1 %. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo dependiente de los datos para cambiar automáticamente entre MS y MS/MS, los 10 principales iones precursores con un estado de carga de 2–5+ se seleccionaron con un ancho de aislamiento de 1.8 m/z y fragmentados por HCD (resolución 17500, IT máx. = 110 ms) con un tiempo de exclusión de 20 s.

**Análisis proteómico:** Para el análisis proteómico de los datos obtenidos, se utilizó el software de – MaxQuant - Perseus (Versión 1.6.12.0). Inicialmente se realizaron filtros para eliminar información no válida y proteínas que fueron identificadas por un solo sitio peptídico. Para conocer la expresión diferencial de las proteínas (abundancia), se trabajó con la intensidad LFQ, que se usa para determinar

la cantidad relativa de proteínas en dos o más muestras biológicas; las intensidades se normalizan para excluir algunos valores atípicos y representar con confianza los cambios de proporción a través de las muestras. Para diseñar los diagramas de Venn se tuvieron en cuenta las intensidades LFQ de las proteínas expresadas por al menos un sujeto para el análisis de diversidad de proteínas y por todos los sujetos para PTM con el programa online interactiVenn [38].

**Análisis de diversidad de proteínas por grupos y de diferencias intraespecíficas de cada grupo:** El análisis bioinformático y estadístico del proteoma fue desarrollado con el software de Maxquant en la plataforma de Perseus (versión 1.6.12.0). Se cargó el documento .txt "ProteinGroups" obtenido con el software de Maxquant que contenía un total de 417 proteínas; la información fue clasificada teniendo en cuenta los datos principales; numéricos y categóricos; luego fueron filtrados por el texto, que contienen el nombre de las proteínas. Posteriormente se filtraron las proteínas inválidas o con identificaciones incorrectas como: proteínas identificadas por un solo sitio, reversas y contaminantes, para un total de 375 proteínas. Además la matriz se filtró dejando sólo las proteínas presentes en al menos un solo sujeto; con esto se obtuvieron 373 proteínas, que posteriormente se llevaron a escala logarítmica. Para el análisis de diversidad, cada sujeto fue agrupado con el nombre del grupo al cual pertenecían (CNT, SAD, FAD) para posteriormente sacar un promedio por grupo, obtener la información del diagrama de Venn, diseñar los dendrogramas y mapas de calor. Por su parte, para el análisis de diferencias intraespecíficas, se realizaron tres análisis por separado para cada grupo experimental donde se repitió el procedimiento anterior, quedando CNT con 271 proteínas totales, SAD con 337 y FAD 271. Finalmente se obtuvo la información para diseñar los diagramas de Venn para cada grupo los cuales se graficaron con el programa InteractiVenn. Para el análisis de exclusividad, se trabajó con la matriz obtenida para cada grupo, y se realizaron mapas de calor y dendrogramas para las proteínas y sus abundancias exclusivas en CNT, SAD FAD y AD (SAD - FAD).

**Análisis de PTM, exclusividad y LFQ de PTM:** Para este análisis se aplicaron los mismos filtros que fueron aplicados para el análisis anteriormente descrito, con la diferencia que se trabajó sobre el .txt "Oxidation" y se aplicó el último filtro para dejar solo las proteínas que estuvieron presentes en todos los 15 pacientes. Se obtuvieron 21 proteínas, las cuales presentaron varios sitios de modificación en la secuencia peptídica. Con esos datos se diseñó un mapa de calor para analizar las abundancias y se aplicó el ANOVA de una vía para encontrar significancias entre esas proteínas.

**Análisis de correlación de cantidad de EVs con intensidad LFQ de proteínas:** Para el análisis de correlación se analizaron 36 proteínas que en previos estudios mostraron diferencias discriminantes en todos los sujetos de los tres grupos experimentales [37]. Se realizó un análisis de correlación entre la cantidad de EVs presentes en 100  $\mu$ L de sangre periférica y la abundancia de las proteínas (intensidad LFQ). Las correlaciones de las proteínas con las EVs fueron representadas con los gráficos en Excel y con el software GraphPad Prism (versión 8.1) se comparó la intensidad LFQ entre los grupos.

**Análisis estadístico:** El análisis estadístico de los experimentos se realizó teniendo en cuenta la normalidad de los datos utilizando Shapiro-Wilk y/o Kolmogorov test. Se analizaron datos univariados paramétricos utilizando ANOVA de una vía y pruebas de comparación múltiple de Tukey. La prueba de comparación múltiple no paramétrica de Kruskal wallis con Dunns se realizó cuando cualquiera de los grupos no presentaba una distribución normal. Dado que no se intervino en los grupos experimentales, sino que describió las diferencias entre las poblaciones naturales enfermas, se realizaron comparaciones por pares con la prueba t de Student de dos colas no emparejada, cuando ambos conjuntos de datos se distribuían normalmente o Mann Whitney para datos no paramétricos. Se procesaron todas las muestras en paralelo para reducir la variación entre ensayos. Los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 8.1. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM de al menos cinco y máximo nueve (CNT, SAD y FAD) experimentos independientes. El tamaño de la muestra y el análisis estadístico utilizado para cada experimento se indican al final de la leyenda de las figuras. Los resultados se consideraron significativos en \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

## Resultados

### FAD presenta mayor microgliosis en las capas II-III respecto a SAD

La corteza frontal, como encargada de las funciones ejecutivas, es una de las regiones más afectadas en la AD [39], [40]. Se comparó el perfil reactivo de la microglía (Intensidad y área de expresión) en las primeras tres capas de la GM entre SAD y FAD. La cuantificación total del área teñida con IBA-1 obtenida por segmentación de imágenes (Fig. S1A) muestra que hay niveles de expresión diferencial de esa proteína entre los dos tipos de Alzheimer (Fig. 1A). El área y la intensidad celular aumentaron en los sujetos con AD, siendo FAD la que muestra un mayor aumento de la expresión del marcador de microglía IBA-1 (Fig. 1B y E). Para caracterizar la presencia de IBA-1 a lo largo de las tres primeras capas de la GM, se analizó el área, desde 0 hasta 900  $\mu$ m. Con la línea punteada (Fig. 1C), se observa que el

% promedio de área de la microglía mostró diferencias entre los grupos. Esto fue confirmado por la cuantificación y comparación del % promedio de área antes (capa I - Desde 0 hasta 300  $\mu\text{m}$ ) y después (capa II y III - desde 300 hasta 900  $\mu\text{m}$ ) donde se observa el aumento del % área de la microglía en cerebros con AD, mayormente en FAD (Fig. 1D). Los mismos resultados se observaron al medir la intensidad de la expresión de la microglía, donde se observa un aumento diferencial en las capas de la GM para los cerebros con AD (mayormente en FAD) después de 300  $\mu\text{m}$  de profundidad (Fig. 1F y 1G). En resumen, existe un aumento de microgliosis en los grupos con AD; el % promedio de área e intensidad de la microglía fueron significativamente diferentes en los tipos de AD, siendo FAD la que presentaba mayor microgliosis en las capas II - III de la GM.

### **FAD presenta hipertrofia microglial y atrofia de macrófagos, mientras que SAD atrofia microglial e hipertrofia de macrófagos**

La morfología de la microglía está relacionada con su función; sin embargo esta sufre cambios inducidos por la neuroinflamación en la AD [41]. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se examinó la morfología de la microglía de las capas II y III utilizando una variedad de parámetros de complejidad, tamaño, forma y área de influencia, sobre imágenes segmentadas para marcadores de microglía IBA-1 y macrófagos OX-42 (Fig. S1B, S1C). En la Fig. 2A se observan cambios en la morfología de la microglía y macrófagos entre los dos tipos de AD. Aunque ambos AD presentaron principalmente filamentos cortos (aparentemente más en SAD que en FAD); SAD presentó atrofia en términos de área, perímetro, circularidad, densidad, rugosidad, compactación y área, densidad y circularidad del soma; mientras que FAD hipertrofia en términos de área, perímetro, rugosidad, compactación, área y circularidad del soma (Fig. 2B, S2A). Por otra parte, SAD presentó hipertrofia en macrófagos en términos de área, perímetro y solidez; mientras que FAD presenta atrofia en términos de área y circularidad (Fig. 2C, S2B). Estos resultados sugieren que FAD presenta hipertrofia microglial mientras que SAD atrofia; y por su parte, los macrófagos de SAD presentan hipertrofia mientras que FAD atrofia en las capas II - III de la GM.

### **La composición proteica de EVs mostró una expresión diferencial y convergente para los tipos de AD, siendo SAD la que presentó mayor diversidad**

Las EVs sistémicas, compuestas por proteínas en su interior, posiblemente llevan información desde la SNC a la periferia y/o viceversa, con función homeostática, o con información de procesos de neuroinflamación [14]. Teniendo en cuenta lo anterior, se analizó la composición proteica vesicular de EVs periféricas, con el objetivo de encontrar posibles biomarcadores proteicos de inflamación

sistémica en la AD. Se identificaron 373 proteínas totales diferentes de los grupos experimentales (CNT, 271; SAD, 337; FAD, 271); específicamente SAD presentó mayor diversidad de proteínas (Fig. 3A). Un total de 229 proteínas fueron compartidas por los tres grupos, algunas proteínas fueron exclusivas para CNT, 13; SAD, 68; FAD, 15 y 19 para los tipos de AD (Fig. 3B). Estos resultados sugieren una composición proteica diferencial y convergente para los tipos de AD, siendo SAD la que presentó mayor diversidad. Al analizar las proteínas expresadas en cada grupo experimental por separado, se encontró que el grupo CNT presentó 126 proteínas compartidas en los 5 sujetos (Fig. 4A), SAD 125 (Fig. 4B) y FAD 139 (Fig. 4C). Es importante resaltar que el control Cp3, mostró mayor diversidad y exclusividad de proteínas, similar a los SAD, que quizá está relacionada con la comorbilidad de depresión (Tabla 1). En general, se observa una expresión diferencial y convergente inter e intragrupal de proteínas-EVs para los grupos de estudio.

#### **La expresión exclusiva de proteínas vesiculares en SAD podría ser utilizada como posibles biomarcadores sistémicos**

Dado que se encontró que existe una expresión diferencial de proteínas en las EVs, se analizaron las proteínas exclusivas de los grupos experimentales (Fig. 5). La expresión proteica exclusiva de CNT y FAD estaba representada en su gran mayoría, por un solo sujeto (Fig. 5A y 5C); es importante mencionar que la mayoría de proteínas exclusivas de FAD pertenecían al grupo de las Inmunoglobulinas. Por otra parte, de las proteínas exclusivas para SAD, Glioxilato e hidroxipiruvato reductasa (GRHPR), Imina desaminasa A intermedia reactiva Homólogo (RIDA), Alcohol deshidrogenasa (ADH1A) e Inmunoglobulina pesada variable 2-70D (HV70D), se expresaron en tres sujetos; de manera interesante, la suprabasina (SBSN) en 4 de los 5 (Fig. 5B). Con estos resultados se podría sugerir que esas cinco proteínas expresadas exclusivamente en SAD podrían ser utilizadas como posibles biomarcadores diferenciales de SAD.

#### **La composición proteica de las EVs como posibles biomarcadores convergentes entre SAD y FAD**

Además de analizar la composición proteica exclusiva de cada uno de los grupos experimentales también se analizaron las proteínas compartidas entre dos grupos (CNT - SAD, CNT - FAD y SAD - FAD). Se encontró que CNT y SAD compartían 21 proteínas, de las cuales, la proteína 1 de la matriz extracelular similar a la fibulina que contiene EGF (FBLN3); Glutación S transferasa omega-1 (GSTO), Alfa-enolasa (ENOA) y la Inmunoglobulina pesada variable 3-23 (HV323) se expresaron en tres o más sujetos SAD y en su mayoría en un CNT (Fig. 6A). Es importante resaltar que la proteína alfa-enolasa

(ENOA) se presentó en 4 individuos SAD y un CNT; el cual fue el único que presentó depresión como comorbilidad. Al analizar CNT y FAD, se obtuvieron 8 proteínas compartidas, de las cuales la inmunoglobulina pesada variable 3-30-3 (HVC33) se presentó en 3 FAD y un CNT; el cual fue el único que presentó, insuficiencia renal crónica y enfermedad pulmonar obstructiva crónica como comorbilidades (Fig. 6B). Por último, al analizar los grupos de AD en conjunto, se hallaron 19 proteínas compartidas (no presentes en CNT), de las cuales, la placoglobina de unión (PLAK), Fructosa-bisfosfato aldolasa B (ALDOB), Glutatión peroxidasa 3 (GPX3), Betaína - Homocisteína S - Metiltransferasa 1 (BHMT1), Histona H2B tipo 1-L (H2B1L), Inmunoglobulina pesada variable 1-8 (HV108) e inmunoglobulina pesada variable 3-20 (HV320) (con mayor intensidad en FAD) se expresaron en al menos cinco AD; interesantemente, la proteína de queratinocitos rica en prolina (KPRP) se expresó en siete de los diez AD (3 FAD y 4 SAD) (Fig. 6C); con esto se podría sugerir que esta proteína podría ser un posible biomarcador sistémico convergente en AD.

#### **Las PTM de H2B1L y DHSO fueron convergentes para los dos tipos de AD y TRFE mostró un incremento de oxidación en FAD**

Al analizar las PTM de las 373 proteínas totales se encontraron 99 con oxidaciones y acetilaciones (Fig. 7A), de las cuales, 91 fueron compartidas en los tres grupos por al menos un sujeto. Específicamente, la oxidación de Fumarylacetoacetasa (FAAA), Cadena ligera de ferritina (FRIL), Inmunoglobulina lambda variable 2-18 (LV218) y la acetilación de dipeptidasa Xaa-Pro (PEPD) fueron exclusivas de al menos un sujeto SAD; además, la oxidación de la histona H2B tipo 1-L (H2B1L) y la oxidación/acetilación de sorbitol deshidrogenasa (DHSO) fueron compartidas por SAD y FAD (Fig. 7B). Es importante remarcar que estas se expresaron en 3 o más sujetos SAD mientras que en FAD uno. Posteriormente se realizó el análisis por separado de las abundancias de las oxidaciones y acetilaciones (Fig 7C-E), que se presentaban en todos los individuos de los tres grupos; resultando sólo 21 proteínas con oxidaciones (algunas con más de una oxidación en algún sitio de la secuencia peptídica) en los quince sujetos (Fig. 7C). Sólo la abundancia de la oxidación de la serotransferrina (TRFE) mostró diferencias significativas para los sujetos con AD (mayor oxidación en FAD que en SAD) (Fig. 7D). En otro análisis de las acetilaciones de proteínas, se encontró que aunque la proteína dominio de núcleo de cuatro disulfuros WAP 3 (WFDC3) no presentaba diferencias significativas, mostraba variación entre los grupos (Fig. 7E). Con lo anterior, se infiere que la proteína H2B1L y DHSO presentan PTM que al ser convergentes de AD y el incremento en la oxidación de TRFE, podrían estar involucradas con la cascada de señalización en la inflamación de la enfermedad.

## **PLTP está relacionada con la cantidad de EVs**

Finalmente, basado en el análisis multivariado del proteoma de las EVs provenientes de sangre periférica [37], la abundancia de 36 proteínas mostraron diferencias discriminantes en todos los sujetos de los tres grupos experimentales. Entonces, se realizó un análisis de correlación entre el número de EVs presentes y la abundancia de las proteínas (intensidad LFQ); encontrando que el factor del complemento C2 (CO2), Inmunoglobulina pesada variable 2-5 (HV205), Trombospondina 1 (TSP1) presentaron diferencias significativas en los grupos de AD y la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) en SAD (Fig. 8). Dado lo anterior, se encontró que las primeras tres proteínas mostraron una baja correlación positiva (Fig. 8A, B y C); pero de manera interesante, la proteína PLTP presenta fuerte correlación negativa ( $R^2=0,903$ ,  $p=0,0132$ ) (Fig. 8D). Con esta información se puede deducir que la proteína PLTP mostró estar relacionada con una menor cantidad de EVs durante la inflamación sistémica en SAD.

## **Discusión**

Nosotros caracterizamos la composición proteica de EVs como trazador diferencial y convergente en los dos tipos de AD; los cuales podrían revelar una posible relación con el proceso de neuroinflamación tisular. La microgliosis de AD en las capas II - III de la corteza frontal fue más pronunciada en FAD; apoyada por una microglía hipertrofiada y macrófagos atrofiados. Por otra parte, SAD presentó una atrofia de microglía con una hipertrofia de macrófagos sugiriendo un fenómeno diferencial de neuroinflamación entre las FAD y SAD. Usando proteómica, detectamos el perfil de carga proteica de EVs, en el que las EVs de SAD presentaron mayor diversidad de proteínas; de las cuales resaltamos la SBSN, que se presentó de manera exclusiva en este grupo. Además, ENOA se expresó en 4 de 5 sujetos SAD y en el control Cp3, sujeto que presentó mayor diversidad y exclusividad de proteínas, similar a los SAD, que quizá está relacionada con la comorbilidad de depresión. Como trazadores convergentes de AD hubo ocho proteínas, de las cuales resaltamos PLAK, H2B1L y KPRP; esta última se expresó en 7 de los 10 sujetos con AD. Analizando las PTM de EVs, las oxidaciones y acetilaciones de DHSO y H2B1L fueron exclusivas de AD; y específicamente, la TRFE mostró mayor oxidación en FAD respecto a SAD. Por último, realizando un análisis de correlación, mostramos que la PLTP está relacionada inversamente con la cantidad de EVs sistémicas. Basado en nuestros hallazgos y revisión de la literatura se sugiere que la composición proteica de las EVs periféricas en AD podrían ser utilizados como posibles biomarcadores diferenciales y convergentes en neuroinflamación.

Las EVs, dependiendo del contenido que transfieran a otras células, tienen roles benéficos o patológicos en la neuroinflamación y progresión de algunas enfermedades neurodegenerativas [42]-[46]. En nuestra reciente investigación [37]: i. en la que se encontró un perfil de abundancia proteica diferencial en las EVs de SAD y FAD, principalmente implicadas en la cascada de coagulación, la inflamación y el metabolismo de los carbohidratos lipídicos, representadas por las proteínas PEBP1, CFD, C6 en SAD-EVs; y SORD, PLPT, IGGKV1D-33 a las FAD-EVs y ii. en la que las EVs, de los dos tipos de AD, indujeron la disrupción de la BBB, la hiperactivación de astrocitos, la muerte neuronal y la desregulación del calcio. En este estudio, nosotros detectamos que el proteoma de las EVs sistémicas provenientes de los dos tipos de AD, se podría sugerir como un trazador diferencial y convergente de neuroinflamación. Especialmente, SBSN como trazador sistémico exclusivo de SAD, KPRP como marcador convergente para AD, la oxidación aumentada de TRFE en FAD y PLTP implicada con la cantidad de EVs.

Paralelamente, en este estudio también comparamos la expresión y estado morfológico de la microglía y macrófagos/microglía en AD; específicamente FAD presentó una neuroinflamación mayoritariamente representada por la hipertrofia microglial y SAD una neuroinflamación de macrófagos/microglía; sugiriendo que FAD estuvo representada por una alteración principalmente del parénquima cerebral mientras que en SAD existe un mayor compromiso sistémico [37]. Un cambio morfológico de microglía en AD, conduce a un incremento en el metabolismo, expresión *de novo* de ciertas moléculas y reactividad microglial. Esta actividad se ha visto asociada a la exacerbación de la neurodegeneración [47]. La microglía, considerada la célula del sistema inmune innato del SNC; vigila continuamente el ambiente cerebral tratando de mantener la homeostasis y tienen la capacidad de interactuar con neuronas y células gliales regulando su actividad, además se activan en respuesta al daño, infección, envejecimiento o proceso neurodegenerativo [26], [27], [48]–[51]. Varios estudios han demostrado que la activación de la microglía, relacionado a su cambio morfológico, es un factor causal clave en la neuroinflamación y que puede contribuir con la progresión de enfermedades neurodegenerativas [21], [51], [52]. La microglía y los macrófagos son células altamente dinámicas con la capacidad de transformar su morfología de ramificada a ameboide y alterar sus fenotipos teniendo en cuenta el estado en que se encuentre; se pueden clasificar en dos morfotipos: la “M1” que conlleva a la producción de citoquinas pro-inflamatorias, disrupción de la BBB, y “Rolling” de células inflamatorias provenientes de la periferia contribuyendo al daño neuronal y la progresión de enfermedades neurodegenerativas; por el contrario, la “M2”, morfotipo ramificado, puede producir citoquinas anti-inflamatorias la cual inhibe la neuroinflamación mediada por M1 que contribuye a restaurar la homeóstasis en el SNC [21], [53]–[55]. Existe un amplio espectro de activación microglial; sin embargo es necesario mayor comprensión de las interacciones entre la microglía y otras células



del cerebro [56], [57]; específicamente, la relación que tiene la microglía con las EVs cerebrales y sistémicas [26], [27], ya que la microglía podría estar activándose en respuesta a estas EVs y además producir EVs. Debido a que no se ha caracterizado ampliamente las EVs liberadas de la microglía, su posible rol en la inflamación sistémica y consiguiente neuroinflamación y neurodegeneración en los dos tipos de AD es necesario investigarlo.

Recientes estudios han mostrado que las EVs tienen un papel en la propagación de la patología en las enfermedades neurodegenerativas [9], [32], [45], [37], [42], [58], [59]; específicamente, estudios que han realizado análisis proteómicos de las EVs liberadas por varios tipos de células, (incluida la microglía) han revelado una gran variedad de marcadores y alteración de la composición proteica [5], [60], [61], como son la expresión de CD13 y MCR-1 característicos de los exosomas microgliales [60]. Por su parte, las EVs cerebrales pueden estar en contacto con la periferia y viceversa, y al transferir su contenido (como DAMPs), la cual activa la microglía e induce una cascada de señales que genera la liberación de citoquinas en un proceso de neuroinflamación [18].

Pocos estudios se han realizado en base a la proteómica de EVs sistémica, a su vez, comparando los tipos de AD, aquí nosotros realizamos un análisis de la composición proteica de las EVs (abundancia y diversidad) proveniente de sangre periférica de sujetos con AD. Se encontraron varias proteínas que podrían ser sugeridas como posibles trazadores sistémicos diferenciales y convergentes en la neuroinflamación de SAD y FAD. Entre los trazadores sistémicos diferenciales para SAD, la proteína suprabasina (SBSN) se ha reportado que se expresa en las capas suprabasales como marcador diferencial del epitelio, lengua, estómago y epidermis [62]; sin embargo, también se ha implicado en el cáncer de pulmón, el carcinoma de células escamosas de esófago y en la distrofia endotelial de Fuch, expresándose principalmente en las células endoteliales tumorales [63], [64]. En otro estudio, se mostró que un anticuerpo anti-SBSN, expresado mayormente en pacientes con Lupus eritematoso sistémico neuropsiquiátrico (NPSLE) en comparación con lupus eritromatoso sistémico y esclerosis múltiple, genera la producción de IL-6 en astrocitos previamente con LPS e induce senescencia, autofagia y señalización de TGF- $\beta$ ; sugiriendo que el anticuerpo anti-SBSN y su complejo inmunológico son mecanismos importantes en la neuroinflamación [51], [65]. En otros estudios se ha mostrado que la suprabasina está implicada en neurodegeneración como en la enfermedad de Parkinson, donde se su baja expresión se relaciona con EVs de plasma [66].

Entre los trazadores convergentes encontrados en las EVs-AD se encuentra la proteína Alfa-enolasa 1 (ENOA1), la cual está involucrada en la glucólisis, control del crecimiento, tolerancia a la hipoxia y las respuestas alérgicas [68], [69]. Además, ENOA estimula la producción de inmunoglobulinas y actúa como receptor y activador del plasminógeno en la superficie celular de varios tipos celulares como en

leucocitos y neuronas; comprometiéndola en el sistema fibrinolítico intravascular-pericelular y neuroinflamación [69], [70]. Además la alteración de ENOA1 puede ocasionar disfunción cognitiva por la interrupción de la BBB, activación de la glía, aumento de la expresión intracerebral de IL-6 e incremento de la fosforilación de Tau en los dos tipos de AD; debido a la alterada glicólisis, aumentada promoviendo la oxidación, activación de MHC 1 y posterior pérdida de sinapsis y demás funciones cerebrales [71], [72].

Por otro lado, la proteína rica en prolina de queratinocitos (KPRP) se expresó en EVs-AD, su función tiene relación con la diferenciación de queratinocitos, la generación de la envoltura celular cornificada y desintoxicación de ROS [73]. Un estudio mostró el complejo polipeptídico rico en prolina (PRP) tiene un rol benéfico sobre la AD; este complejo afecta las primeras etapas de diferenciación y maduración de células fagocíticas; por tanto, se sugiere que el PRP, puede regular los procesos inflamatorios en los que participan los macrófagos y podría brindar protección a través del sistema inmunológico y neuroglial [74] [75]. En acuerdo con esta investigación, consideramos que la KPRP en EVs, requiere de un análisis detallado desde sus isoformas, la procedencia, las tasas de tejido/sistémicas y las consecuencias en pro-supervivencia e inflamación.

Por otro lado, la placoglobina de unión (PLAK), se expresó en EVs-AD, su función está relacionada con la unión en desmosomas a filamentos intermedios regulando la disposición y función del citoesqueleto del endotelio en la BBB [76]–[78]. Previamente se ha mostrado PLAK tiene funciones de supresión de tumorigénesis y metástasis mediante múltiples mecanismos, así como en la formación de placas amiloideas y Tau hiperfosforilado [79]; lo cual nos vincula directamente esta proteína con neurodegeneración.

Por otra parte, la histona H2B1L está implicada con la formación del nucleosoma para un correcto plegamiento del DNA; sin embargo, las histonas también están presentes en el citoplasma y los fluidos extracelulares que cumplen funciones de defensa del huésped y promueven respuestas inflamatorias [80]. Las PTM de histonas tienen efectos en la replicación, diferenciación, remodelamiento de la cromatina y la transcripción de genes, además de las funciones intranucleares, las histonas actúan como moléculas de patrón molecular asociadas al daño cuando se liberan en el espacio extracelular [81], [82]; en este estudio encontramos que H2B1L presenta oxidaciones; y se ha observado diferencias en la estructura de la cromatina del promotor de APP entre núcleos neocorticales afectados y no afectados por AD. Coherente con nuestros hallazgos, se sugiere que los procesos post-transcripcionales de los elementos reguladores, que se encuentran en otras partes del gen de APP, pueden ser importantes en la acumulación aberrante del A $\beta$  [83]. Así, las PTMs de histonas son un

elemento clave en la regulación epigenética de la expresión génica y se sabe que están asociadas con la patología de enfermedades neurodegenerativas [84].

Por otro lado, la proteína sorbitol deshidrogenasa (DHSO), que encontramos oxidada y acetilada en las EVs-AD, tiene función en el metabolismo de alcoholes; específicamente su alteración tiene una relación con la diabetes, y de manera interesante, se ha encontrado una relación de la diabetes con la AD, por lo que la glucosa es el sustrato generador de energía obligatorio en el cerebro, y en neuroinflamación es un factor clave que en muchas ocasiones conlleva al estrés oxidativo y metabólico [85], [86]. Este fenómeno metabólico e inflamatorio es generalmente peor en las regiones del cerebro con mayor deterioro tisular y molecular [87], [88].

Otra proteína que también presentó PTM es la serotransferrina (TRFE), que está involucrada en la regulación del hierro (que normalmente se encuentra en oligodendrocitos), se ha visto que tiene relación con la AD, la cual se distribuye homogéneamente alrededor de las placas seniles y aparentemente es extracelular, además, se expresa en los astrocitos de la sustancia blanca cortical cerebral del tejido de AD, en lugar de su distribución normal en los oligodendrocitos. Una fuerte inmunorreacción de ferritina acompaña a las placas seniles y a muchos vasos sanguíneos en el tejido cerebral del Alzheimer. Aunque muchos oligodendrocitos ferritina positivos están presentes en el tejido del Alzheimer, la mayoría de las células que contienen ferritina asociadas con placas seniles y vasos sanguíneos son microglía [89]. También se ha visto que la disminución del hierro plasmático en AD se debe a la desaturación de transferrina, esto sería un apoyo circunstancial para la hipótesis de radicales de oxígeno de la enfermedad degenerativa del cerebro ya que el hierro promueve la conversión de peróxido de hidrógeno en radical hidroxilo y, por lo tanto, puede contribuir al estrés oxidativo. [90] [91].

A su vez, la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP), es una proteína de transferencia de lípidos ampliamente expresada que participa en el transporte de colesterol y otros lípidos en el plasma y los tejidos periféricos [92], son expresadas principalmente por las células endoteliales cerebrovasculares que transfiere fosfolípidos, remodela la alta densidad de lipoproteínas y apoya la salida de colesterol celular [93]. Por otra parte, también se ha encontrado que los pacientes con AD presentan un incremento en esta proteína [94] y en comparación con otro estudio se ha mostrado que la eliminación de PLTP se asocia con una astrogliosis en el cerebro. Este fenotipo puede explicarse, al menos en parte, por un aumento del A $\beta$  a través de un aumento de la actividad fagocítica microglial y la expresión de NEP. Nuestros hallazgos sugieren que PLTP actúa como un determinante negativo de la eliminación de la placa amiloide y que a lo largo de la vida, la actividad elevada de PLTP podría conducir a una mayor carga de A $\beta$  en el cerebro [95].

Con lo anterior, las proteínas contenidas en EVs de AD de sangre periférica se relacionaron con la unión de las células endoteliales de la BBB, la progresión, las funciones en defensa inmunológica, el correcto plegamiento de la cromatina, con el metabolismo de azúcares, el transporte de hierro, el transporte de lípidos; lo cual ha sido previamente discutido en neurodegeneración.

En conclusión, las EVs, podrían ser sugeridos como trazadores sistémicos en AD, y que posiblemente estén relacionados con la neuroinflamación diferencial de FAD y SAD; principalmente la SBSN como trazador exclusivo de SAD, KPRP como marcador convergente en AD, y las PTM de H2B1L, DHSO y TRFE como diferenciales. El perfil diferencial de proteínas se puede asociar con la neuroinflamación detectada en la afectación microglial. Por ende, investigar la respuesta de la microglía a las EVs podría precisar mejor esta relación. Además de entender el papel de las EVs liberadas por la microglía en el perfil diferencial visto en las EVs sistémicas. Aunque nuestros hallazgos indican que la composición proteica de las EVs periféricas en AD podrían ser utilizados como biomarcadores diferenciales y convergentes de neuroinflamación, sería muy interesante replicar este análisis ampliando la muestra, analizar las EVs de microglía y macrófagos/microglía para corroborar nuestra conclusión.

## Referencias

- [1] R. L. Hamilton, J. S. Wong, L. S. S. Guo, S. Krisans, and R. J. Havel, "Apolipoprotein E localization in rat hepatocytes by immunogold labeling of cryothin sections," in *Journal of Lipid Research*, 1990.
- [2] K. D. Patel, G. A. Zimmerman, S. M. Prescott, and T. M. McIntyre, "Novel leukocyte agonists are released by endothelial cells exposed to peroxide," *J. Biol. Chem.*, 1992.
- [3] D. S. Choi, D. K. Kim, Y. K. Kim, and Y. S. Gho, "Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes," *Mass Spectrometry Reviews*. 2015, doi: 10.1002/mas.21420.
- [4] E. R. Abels and X. O. Breakefield, "Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake," *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2016, doi: 10.1007/s10571-016-0366-z.
- [5] G. Van Niel, G. D'Angelo, and G. Raposo, "Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018, doi: 10.1038/nrm.2017.125.
- [6] L. Doyle and M. Wang, "Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis," *Cells*, 2019, doi: 10.3390/cells8070727.
- [7] G. Fuhrmann, I. K. Herrmann, and M. M. Stevens, "Cell-derived vesicles for drug therapy and diagnostics: Opportunities and challenges," *Nano Today*. 2015, doi: 10.1016/j.nantod.2015.04.004.
- [8] M. P. Zaborowski, L. Balaj, X. O. Breakefield, and C. P. Lai, "Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study," *BioScience*. 2015, doi: 10.1093/biosci/biv084.
- [9] V. Zappulli, K. Pagh Friis, Z. Fitzpatrick, C. A. Maguire, and X. O. Breakefield, "Extracellular vesicles and intercellular communication within the nervous system," *Journal of Clinical Investigation*. 2016, doi: 10.1172/JCI81134.
- [10] G. Raposo and W. Stoorvogel, "Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends," *Journal of Cell Biology*. 2013, doi: 10.1083/jcb.201211138.
- [11] M. Yáñez-Mó *et al.*, "Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions," *Journal of Extracellular Vesicles*. 2015, doi: 10.3402/jev.v4.27066.
- [12] D. Toy and U. Namgung, "Role of Glial Cells in Axonal Regeneration," *Exp. Neurobiol.*, 2013, doi:

10.5607/en.2013.22.2.68.

- [13] M. M. Holm, J. Kaiser, and M. E. Schwab, "Extracellular Vesicles: Multimodal Envoys in Neural Maintenance and Repair," *Trends in Neurosciences*. 2018, doi: 10.1016/j.tins.2018.03.006.
- [14] C. C. Bavisotto *et al.*, "Extracellular vesicle-mediated cell–cell communication in the nervous system: Focus on neurological diseases," *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, doi: 10.3390/ijms20020434.
- [15] D. S. Choi, J. Lee, G. Go, Y. K. Kim, and Y. S. Gho, "Circulating extracellular vesicles in cancer diagnosis and monitoring: An appraisal of clinical potential," *Mol. Diagnosis Ther.*, 2013, doi: 10.1007/s40291-013-0042-7.
- [16] V. Combes, G. J. Guillemin, T. Chan-Ling, N. H. Hunt, and G. E. R. Grau, "The crossroads of neuroinflammation in infectious diseases: Endothelial cells and astrocytes," *Trends in Parasitology*. 2012, doi: 10.1016/j.pt.2012.05.008.
- [17] C. Tricarico, J. Clancy, and C. D'Souza-Schorey, "Biology and biogenesis of shed microvesicles," *Small GTPases*. 2017, doi: 10.1080/21541248.2016.1215283.
- [18] S. H. Ramirez, A. M. Andrews, D. Paul, and J. S. Pachter, "Extracellular vesicles: Mediators and biomarkers of pathology along CNS barriers," *Fluids and Barriers of the CNS*. 2018, doi: 10.1186/s12987-018-0104-7.
- [19] A. de Gassart, C. Géminard, D. Hoekstra, and M. Vidal, "Exosome secretion: The art of reutilizing nonrecycled proteins?," *Traffic*. 2004, doi: 10.1111/j.1600-0854.2004.00223.x.
- [20] D. S. Choi, D. K. Kim, Y. K. Kim, and Y. S. Gho, "Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes," *Proteomics*. 2013, doi: 10.1002/pmic.201200329.
- [21] R. M. Ransohoff, "How neuroinflammation contributes to neurodegeneration," *Science*. 2016, doi: 10.1126/science.aag2590.
- [22] D. J. DiSabato, N. Quan, and J. P. Godbout, "Neuroinflammation: the devil is in the details," *J. Neurochem.*, 2016, doi: 10.1111/jnc.13607.
- [23] D. Davalos *et al.*, "ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo," *Nat. Neurosci.*, 2005, doi: 10.1038/nn1472.
- [24] L. F. Lue, C. Schmitz, and D. G. Walker, "What happens to microglial TREM2 in Alzheimer's disease: Immunoregulatory turned into immunopathogenic?," *Neuroscience*. 2015, doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.09.050.
- [25] A. L. Hemonnot, J. Hua, L. Ulmann, and H. Hirbec, "Microglia in Alzheimer disease: Well-known targets and new opportunities," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2019, doi: 10.3389/fnagi.2019.00233.
- [26] R. C. Paolicelli, G. Bergamini, and L. Rajendran, "Cell-to-cell Communication by Extracellular Vesicles: Focus on Microglia," *Neuroscience*. 2019, doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.04.003.
- [27] T. Trotta, M. A. Panaro, A. Cianciulli, G. Mori, A. Di Benedetto, and C. Porro, "Microglia-derived extracellular vesicles in Alzheimer's Disease: A double-edged sword," *Biochemical Pharmacology*. 2018, doi: 10.1016/j.bcp.2017.12.020.
- [28] U. Jonavičė, V. Tunaitis, K. Kriaučiūnaitė, A. Jarmalavičiūtė, and A. Pivoriūnas, "Extracellular vesicles can act as a potent immunomodulators of human microglial cells," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2019, doi: 10.1002/term.2810.
- [29] L. Urbanelli *et al.*, "Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate," *Genes*. 2013, doi: 10.3390/genes4020152.
- [30] E. Eitan, C. Suire, S. Zhang, and M. P. Mattson, "Impact of lysosome status on extracellular vesicle content and release," *Ageing Research Reviews*. 2016, doi: 10.1016/j.arr.2016.05.001.
- [31] L. S. Watson, E. D. Hamlett, T. D. Stone, and C. Sims-Robinson, "Neuronally derived extracellular vesicles: An emerging tool for understanding Alzheimer's disease," *Molecular Neurodegeneration*. 2019, doi: 10.1186/s13024-019-0317-5.
- [32] A. Schneider and M. Simons, "Exosomes: Vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders," *Cell and Tissue Research*. 2013, doi: 10.1007/s00441-012-1428-2.
- [33] I. Piaceri, B. Nacmias, and S. Sorbi, "Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease," *Front. Biosci. - Elit.*, 2013, doi: 10.2741/e605.
- [34] J. G. Villamil-Ortiz, A. Barrera-Ocampo, J. D. Arias-Londoño, A. Villegas, F. Lopera, and G. P. Cardona-Gómez, "Differential Pattern of Phospholipid Profile in the Temporal Cortex from E280A-Familial and Sporadic Alzheimer's

- Disease Brains," *J. Alzheimer's Dis.*, 2018, doi: 10.3233/JAD-170554.
- [35] T. D. Bird, *Early-Onset Familial Alzheimer Disease*. 1993.
- [36] S. Lista *et al.*, "Biomarkers in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease," *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015, doi: 10.3233/JAD-143006.
- [37] J. Villar-Vesga *et al.*, "Differential Profile of Systemic Extracellular Vesicles From Sporadic and Familial Alzheimer's Disease Leads to Neuroglial and Endothelial Cell Degeneration," *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 12. p. 383, 2020.
- [38] H. Heberle, V. G. Meirelles, F. R. da Silva, G. P. Telles, and R. Minghim, "InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams," *BMC Bioinformatics*, 2015, doi: 10.1186/s12859-015-0611-3.
- [39] C. A. Davies, D. M. A. Mann, P. Q. Sumpter, and P. O. Yates, "A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease," *J. Neurol. Sci.*, 1987, doi: 10.1016/0022-510X(87)90057-8.
- [40] D. Neary, J. S. Snowden, B. Northen, and P. Goulding, "Dementia of frontal lobe type," *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1988, doi: 10.1136/jnnp.51.3.353.
- [41] M. del M. Fernández-Arjona, J. M. Grondona, P. Granados-Durán, P. Fernández-Llebrez, and M. D. López-Ávalos, "Microglia morphological categorization in a rat model of neuroinflammation by hierarchical cluster and principal components analysis," *Front. Cell. Neurosci.*, 2017, doi: 10.3389/fncel.2017.00235.
- [42] T. Malm, S. Loppi, and K. M. Kanninen, "Exosomes in Alzheimer's disease," *Neurochemistry International*. 2016, doi: 10.1016/j.neuint.2016.04.011.
- [43] L. Pulliam, B. Sun, M. Mustapic, S. Chawla, and D. Kapogiannis, "Plasma neuronal exosomes serve as biomarkers of cognitive impairment in HIV infection and Alzheimer's disease," *J. Neurovirol.*, 2019, doi: 10.1007/s13365-018-0695-4.
- [44] D. Kapogiannis *et al.*, "Association of Extracellular Vesicle Biomarkers with Alzheimer Disease in the Baltimore Longitudinal Study of Aging," *JAMA Neurol.*, 2019, doi: 10.1001/jamaneurol.2019.2462.
- [45] M. K. Sun *et al.*, "Extracellular Vesicles Mediate Neuroprotection and Functional Recovery after Traumatic Brain Injury," *J. Neurotrauma*, 2020, doi: 10.1089/neu.2019.6443.
- [46] S. Keshtkar, N. Azarpira, and M. H. Ghahremani, "Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Novel frontiers in regenerative medicine," *Stem Cell Research and Therapy*. 2018, doi: 10.1186/s13287-018-0791-7.
- [47] A. Guimerà, X. Gironès, and F. Cruz-Sánchez, "Actualización sobre la patología de la enfermedad de Alzheimer," *Rev Esp Patol*, 2002.
- [48] C. Béchade, Y. Cantaut-Belarif, and A. Bessis, "Microglial control of neuronal activity," *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2013, doi: 10.3389/fncel.2013.00032.
- [49] M. È. Tremblay, B. Stevens, A. Sierra, H. Wake, A. Bessis, and A. Nimmerjahn, "The role of microglia in the healthy brain," *J. Neurosci.*, 2011, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4158-11.2011.
- [50] M. T. Heneka, M. P. Kummer, and E. Latz, "Innate immune activation in neurodegenerative disease," *Nature Reviews Immunology*. 2014, doi: 10.1038/nri3705.
- [51] Y. Nakagawa and K. Chiba, "Diversity and plasticity of microglial cells in psychiatric and neurological disorders," *Pharmacology and Therapeutics*. 2015, doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.06.010.
- [52] L. I. Labzin, M. T. Heneka, and E. Latz, "Innate Immunity and Neurodegeneration," *Annu. Rev. Med.*, 2018, doi: 10.1146/annurev-med-050715-104343.
- [53] R. M. Ransohoff and V. H. Perry, "Microglial physiology: Unique stimuli, specialized responses," *Annual Review of Immunology*. 2009, doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132528.
- [54] K. Helmut, U. K. Hanisch, M. Noda, and A. Verkhratsky, "Physiology of microglia," *Physiol. Rev.*, 2011, doi: 10.1152/physrev.00011.2010.
- [55] Y. Yang, A. Boza-Serrano, C. J. R. Dunning, B. H. Clausen, K. L. Lambertsen, and T. Deierborg, "Inflammation leads to distinct populations of extracellular vesicles from microglia," *J. Neuroinflammation*, 2018, doi: 10.1186/s12974-018-1204-7.

- [56] R. M. Ransohoff, "A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist," *Nature Neuroscience*. 2016, doi: 10.1038/nn.4338.
- [57] R. Masgrau, C. Guaza, R. M. Ransohoff, and E. Galea, "Should We Stop Saying 'Glia' and 'Neuroinflammation'?" *Trends in Molecular Medicine*. 2017, doi: 10.1016/j.molmed.2017.04.005.
- [58] A. Gupta and L. Pulliam, "Exosomes as mediators of neuroinflammation," *Journal of Neuroinflammation*. 2014, doi: 10.1186/1742-2094-11-68.
- [59] C. Quek and A. F. Hill, "The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases," *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.090.
- [60] I. Potolicchio *et al.*, "Proteomic Analysis of Microglia-Derived Exosomes: Metabolic Role of the Aminopeptidase CD13 in Neuropeptide Catabolism," *J. Immunol.*, 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.4.2237.
- [61] A. Mallia, E. Gianazza, B. Zoanni, M. Brioschi, S. S. Barbieri, and C. Banfi, "Proteomics of extracellular vesicles: Update on their composition, biological roles and potential use as diagnostic tools in atherosclerotic cardiovascular diseases," *Diagnostics*. 2020, doi: 10.3390/diagnostics10100843.
- [62] G. T. Park, S. E. Lim, S. I. Jang, and M. I. Morasso, "Suprabasin, a novel epidermal differentiation marker and potential cornified envelope precursor," *J. Biol. Chem.*, 2002, doi: 10.1074/jbc.M205380200.
- [63] D. Gaykalova *et al.*, "Dose-dependent activation of putative oncogene SBSN by BORIS," *PLoS One*, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0040389.
- [64] J. Zhu *et al.*, "Overexpression of Suprabasin is Associated with Proliferation and Tumorigenicity of Esophageal Squamous Cell Carcinoma," *Sci. Rep.*, 2016, doi: 10.1038/srep21549.
- [65] N. Aibara *et al.*, "Proteomic approach to profiling immune complex antigens in cerebrospinal fluid samples from patients with central nervous system autoimmune diseases," *Clin. Chim. Acta*, 2018, doi: 10.1016/j.cca.2018.05.026.
- [66] M. Sancandi, P. Uysal-Onganer, I. Kraev, A. Mercer, and S. Lange, "Protein deimination signatures in plasma and plasma-evs and protein deimination in the brain vasculature in a rat model of pre-motor parkinson's disease," *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, doi: 10.3390/ijms21082743.
- [67] G. W. Armstrong *et al.*, "Retinal Imaging Findings in Carriers With PSEN1-Associated Early-Onset Familial Alzheimer Disease Before Onset of Cognitive Symptoms," *JAMA Ophthalmol.*, Nov. 2020, doi: 10.1001/jamaophthalmol.2020.4909.
- [68] S. Feo, D. Arcuri, E. Piddini, R. Passantino, and A. Giallongo, "ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: Relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1)," *FEBS Lett.*, 2000, doi: 10.1016/S0014-5793(00)01494-0.
- [69] T. Sugahara, H. Nakajima, S. Shirahata, and H. Murakami, "Purification and characterization of immunoglobulin production stimulating factor-II $\beta$  derived from Namalwa cells," *Cytotechnology*, 1992, doi: 10.1007/BF00570890.
- [70] R. López-Alemaný *et al.*, "Inhibition of cell surface mediated plasminogen activation by a monoclonal antibody against  $\alpha$ -enolase," *Am. J. Hematol.*, 2003, doi: 10.1002/ajh.10299.
- [71] Y. Lu *et al.*, "Experimental evidence for alpha enolase as one potential autoantigen in the pathogenesis of both autoimmune thyroiditis and its related encephalopathy," *Int. Immunopharmacol.*, 2020, doi: 10.1016/j.intimp.2020.106563.
- [72] D. A. Butterfield and M. L. B. Lange, "Multifunctional roles of enolase in Alzheimer's disease brain: Beyond altered glucose metabolism," *Journal of Neurochemistry*. 2009, doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06397.x.
- [73] W. P. Vermeij, A. Alia, and C. Backendorf, "ROS quenching potential of the epidermal cornified cell envelope," *J. Invest. Dermatol.*, 2011, doi: 10.1038/jid.2010.433.
- [74] A. Kubis, E. Marcinkowska, M. Janusz, and J. Lisowski, "Studies on the mechanism of action of a proline-rich polypeptide complex (PRP): Effect on the stage of cell differentiation," *Peptides*, 2005, doi: 10.1016/j.peptides.2005.04.001.
- [75] N. Khalaji, J. Sarkissian, V. Chavushyan, and V. Sarkisian, "Protective effects of proline-rich peptide in a rat model of alzheimer disease: An electrophysiological study," *Basic Clin. Neurosci.*, 2017, doi: 10.15412/J.BCN.03080101.
- [76] M. A. Petty and E. H. Lo, "Junctional complexes of the blood-brain barrier: Permeability changes in neuroinflammation," *Progress in Neurobiology*. 2002, doi: 10.1016/S0301-0082(02)00128-4.

- [77] M. G. Lampugnani *et al.*, "The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: Differential association of plakoglobin,  $\beta$ -catenin, and  $\alpha$ -catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin)," *J. Cell Biol.*, 1995, doi: 10.1083/jcb.129.1.203.
- [78] S. Tietz and B. Engelhardt, "Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions," *Journal of Cell Biology*. 2015, doi: 10.1083/jcb.201412147.
- [79] Z. Aktary, M. Alaei, and M. Pasdar, "Beyond cell-cell adhesion: Plakoglobin and the regulation of tumorigenesis and metastasis," *Oncotarget*. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.15650.
- [80] M. Hoeksema, M. Van Eijk, H. P. Haagsman, and K. L. Hartshorn, "Histones as mediators of host defense, inflammation and thrombosis," *Future Microbiology*. 2016, doi: 10.2217/fmb.15.151.
- [81] R. Lardenoije *et al.*, "The epigenetics of aging and neurodegeneration," *Progress in Neurobiology*. 2015, doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.05.002.
- [82] R. Chen, R. Kang, X. G. Fan, and D. Tang, "Release and activity of histone in diseases," *Cell Death and Disease*. 2014, doi: 10.1038/cddis.2014.337.
- [83] J. Theuns *et al.*, "Promoter mutations that increase amyloid precursor-protein expression are associated with Alzheimer disease," *Am. J. Hum. Genet.*, 2006, doi: 10.1086/504044.
- [84] J. S. Rao, V. L. Keleshian, S. Klein, and S. I. Rapoport, "Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients," *Transl. Psychiatry*, 2012, doi: 10.1038/tp.2012.55.
- [85] S. Rosales-Corral, D. X. Tan, L. Manchester, and R. J. Reiter, "Diabetes and Alzheimer disease, two overlapping pathologies with the same background: Oxidative stress," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015, doi: 10.1155/2015/985845.
- [86] W. Ahmad, B. Ijaz, K. Shabbiri, F. Ahmed, and S. Rehman, "Oxidative toxicity in diabetes and Alzheimer's disease: Mechanisms behind ROS/ RNS generation," *Journal of Biomedical Science*. 2017, doi: 10.1186/s12929-017-0379-z.
- [87] A. Tramutola, C. Lanzillotta, M. Perluigi, and D. A. Butterfield, "Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease," *Brain Research Bulletin*. 2017, doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.06.005.
- [88] H. Zheng, J. Wu, Z. Jin, and L.-J. Yan, "Protein Modifications as Manifestations of Hyperglycemic Glucotoxicity in Diabetes and Its Complications," *Biochem. Insights*, 2016, doi: 10.4137/bci.s36141.
- [89] J. R. Connor, S. L. Menzies, S. M. St. Martin, and E. J. Mufson, "A histochemical study of iron, transferrin, and ferritin in Alzheimer's diseased brains," *J. Neurosci. Res.*, 1992, doi: 10.1002/jnr.490310111.
- [90] D. J. Hare *et al.*, "Decreased plasma iron in Alzheimer's disease is due to transferrin desaturation," *ACS Chem. Neurosci.*, 2015, doi: 10.1021/cn5003557.
- [91] D. A. Loeffler *et al.*, "Transferrin and Iron in Normal, Alzheimer's Disease, and Parkinson's Disease Brain Regions," *J. Neurochem.*, 1995, doi: 10.1046/j.1471-4159.1995.65020710.x.
- [92] Y. Tong *et al.*, "Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency accelerates memory dysfunction through altering amyloid precursor protein (APP) processing in a mouse model of Alzheimer's disease," *Hum. Mol. Genet.*, 2015, doi: 10.1093/hmg/ddv262.
- [93] A. P. C. Manavalan *et al.*, "Phospholipid transfer protein is expressed in cerebrovascular endothelial cells and involved in high density lipoprotein biogenesis and remodeling at the blood-brain barrier," *J. Biol. Chem.*, 2014, doi: 10.1074/jbc.M113.499129.
- [94] S. Vuletic, L. W. Jin, S. M. Marcovina, E. R. Peskind, T. Möller, and J. J. Albers, "Widespread distribution of PLTP in human CNS: Evidence for PLTP synthesis by glia and neurons, and increased levels in Alzheimer's disease," *J. Lipid Res.*, 2003, doi: 10.1194/jlr.M300046-JLR200.
- [95] M. Mansuy *et al.*, "Deletion of plasma Phospholipid Transfer Protein (PLTP) increases microglial phagocytosis and reduces cerebral amyloid- $\beta$  deposition in the J20 mouse model of Alzheimer's disease," *Oncotarget*, 2018, doi: 10.18632/oncotarget.24802.



## Leyenda de la tabla

**Tabla 1: Descripción de las muestras *post-mortem*:** Datos clínicos de los sujetos que participaron en los experimentos con las muestras de sangre periférica y/o tejido de corteza frontal *post-mortem*. F, Femenino; M, Masculino. NAP, no aplicable. 0, sin evidencia histológica de la AD; A, los hallazgos histológicos proporcionan evidencia INCIERTA de la AD; B, hallazgos histológicos SUGIEREN el diagnóstico de la AD; C, los hallazgos histológicos INDICAN el diagnóstico de la AD. NR: No registro.

## Leyendas de las figuras

**Figura 1: FAD presenta mayor microgliosis en las capas II-III respecto a SAD. (A)** IHC representando los patrones de expresión diferencial de microglía para cada grupo experimental a través de las primeras tres capas de la GM (0 a 900  $\mu\text{m}$  de profundidad). La regla del lado izquierdo indica la profundidad en micrómetros de la superficie de la corteza frontal. **(B)** El porcentaje promedio de área revela diferentes niveles de cobertura microglial en AD, con un aumento en FAD comparado respecto a SAD. **(C)** Los perfiles de área a través de diferentes profundidades de la GM muestran diferencias en la expresión de la microglía en SAD y FAD después de 300  $\mu\text{m}$  de profundidad (capa II - III), siendo FAD el que mayor área presenta. **(D)** Los niveles promedio de área de la microglía en la capa I (0 a 300  $\mu\text{m}$  de profundidad) y capa II - III (300 a 900  $\mu\text{m}$  de profundidad) evidencian que SAD y FAD difieren tanto antes como después de 300  $\mu\text{m}$  de profundidad. **(E)** El promedio de intensidad revela diferentes niveles de expresión de la microglía entre los tipos de AD, mayormente en FAD. **(F)** Los perfiles de intensidad a través de diferentes profundidades de la GM muestran diferencias en la expresión microglial entre SAD y FAD después de 300  $\mu\text{m}$  de profundidad (capa II - III) siendo FAD el que mayor intensidad presenta. **(G)** Los niveles promedio de expresión de la microglía en la capa I (0 a 300  $\mu\text{m}$  de profundidad) y capa II - III (300 a 900  $\mu\text{m}$  de profundidad) evidencian que SAD y FAD difieren tanto antes como después de 300  $\mu\text{m}$  de profundidad. FAD presenta mayor microgliosis respecto a SAD. El eje Y de los gráficos C, D, F y G corresponden a unidades de área e intensidad de imágenes de 8 bits cuyos valores van de 0 a 255  $\mu\text{m}$ . Barra de la escala 250  $\mu\text{m}$ . Los datos están presentados con la media  $\pm$  SEM de CNT, n = 6; SAD, n = 9; y FAD, n = 6. Se realizó un ANOVA One-way, t-test y un test Tukey's para comparaciones múltiples. Los niveles de significancia se establecieron en \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

**Figura 2: FAD presenta hipertrofia microglial y atrofia de macrófagos, mientras que SAD atrofia microglial e hipertrofia de macrófagos. (A)** Las imágenes de IHC representativas de la microglía IBA-1 y macrófagos OX-42 de la segunda y tercera capa de la GM de la corteza frontal (Desde 300 hasta 900

$\mu\text{m}$ ) muestran variaciones de la morfología en los tipos de AD. **(B - C)** La evaluación de parámetros morfológicos relacionados con la complejidad, el tamaño, la forma y el área de influencia de la **(B)** microglía IBA-1 y **(C)** macrófagos OX-42 muestran diferencias entre los tipos de AD. **(B)** SAD presenta atrofia en términos de área, perímetro, circularidad, densidad, rugosidad compactación y área, densidad y circularidad del soma; mientras que FAD hipertrofia en términos de área, perímetro, rugosidad, compactación, área y circularidad del soma; aunque ambos presentan mayor cantidad de filamentos, pero con menor longitud. Por otra parte, **(C)** SAD presenta hipertrofia en macrófagos en términos de área, perímetro y solidez; mientras que FAD presenta atrofia en términos de área y circularidad. El eje Y de los gráficos de barras corresponde a unidades de intensidad de imágenes de 8 bits cuyos valores van de 0 a 255  $\mu\text{m}$ . Barra de la escala: 20  $\mu\text{m}$ . Los datos están presentados con la media  $\pm$  SEM de CNT, SAD y FAD; cada grupo experimental contaba con un  $n = 6$ . Se realizó un ANOVA One-way, t-test y un test Tukey's para comparaciones múltiples. Los niveles de significancia se establecieron en \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

**Figura 3: La composición proteica de EVs mostró una expresión diferencial y convergente para los tipos de AD, siendo SAD la que presentó mayor diversidad. (A)** Número de proteínas diferentes expresadas en cada una de las muestras de los grupos experimentales, siendo SAD el más diverso. **(B)** Diagrama de Venn que representa la superposición de 373 proteínas vesiculares expresadas en los tres grupos experimentales. Los datos fueron filtrados y analizados con el software MaxQuant - Perseus obteniendo sólo las proteínas expresadas por uno o más sujetos. Los datos están presentados con la media  $\pm$  SEM de CNT, SAD y FAD; cada grupo experimental contaba con un  $n = 5$ . Se aplicó el test Mann Whitney para datos no normales. Los niveles de significancia se establecieron en \*  $p < 0.05$ .

**Figura 4: La expresión diferencial de proteínas vesiculares refleja variación inter e intragrupal. (A - C)** Diagramas de Venn que muestran la superposición de las 373 proteínas expresadas entre los sujetos de **(A)** CNT con un total de 126 proteínas compartidas por los cinco sujetos **(B)** SAD con 135 y **(C)** FAD con 139. Los datos fueron filtrados y analizados con el software MaxQuant - Perseus obteniendo las proteínas expresadas por uno o más sujetos. Cada grupo experimental contaba con un  $n = 5$ .

**Figura 5: La expresión exclusiva de proteínas vesiculares en SAD podría ser utilizada como posibles biomarcadores de inflamación sistémica. (A - C)** Mapas de calor con la intensidad de las proteínas vesiculares exclusivas para cada grupo experimental. **(A)** Mapa de calor con las 13 proteínas exclusivas de CNT, aunque fueron expresadas por un solo sujeto. **(B)** Mapa de calor con las 68 proteínas exclusivas de SAD, las proteínas GRHPR, RIDA, ADH1A y HV70D se expresaron en tres sujetos y la SBSN estuvo presente en cuatro de los cinco sujetos. **(C)** Mapa de calor con las 15 proteínas exclusivas de FAD, aunque estas proteínas fueron expresadas en su mayoría por un solo sujeto, principalmente

inmunoglobulinas. Los datos fueron filtrados y analizados con el software MaxQuant - Perseus obteniendo sólo las proteínas expresadas por uno o más sujetos. Cada grupo experimental contaba con un n = 5.

**Figura 6: La composición proteica de las EVs como posibles biomarcadores convergentes entre SAD y FAD. (A - C)** Mapas de calor con las proteínas vesiculares compartidas entre dos grupos experimentales. **(A)** Mapa de calor con las 21 proteínas compartidas de CNT con SAD, siendo las proteínas FBLN3, GSTO1, ENOA y HV323 las que se expresaron en tres o más sujetos SAD. **(B)** Mapa de calor con las 8 proteínas compartidas de CNT con FAD, estando HVC33 expresada en tres sujetos FAD. **(C)** Mapa de calor con las 19 proteínas compartidas de FAD con SAD, siendo PLAK, ALDOB, GPX3, BHMT1, HV108, H2B1L y HV320 las que se expresaron en 5 sujetos con AD; y la proteína KPRP se expresó en 7/10, por lo que podría ser un posible biomarcador de la AD. Los datos fueron filtrados y analizados con el software MaxQuant - Perseus obteniendo sólo las proteínas expresadas por uno o más sujetos. Cada grupo experimental contaba con un n = 5.

**Figura 7: La composición proteica de las EVs como posibles biomarcadores convergentes entre SAD y FAD. (A)** Diagrama de Venn que muestra 99 de las 373 proteínas que presentan PTM (oxidaciones y acetilaciones). **(B)** FAH, FTL, LV218 y PEPD; proteínas exclusivas de SAD presentan PTM; igualmente, IFITM3 de CNT con SAD y HVC33 en CNT con FAD y de manera interesante, H2B1L y DHSO estaban compartidas en 4-5 sujetos con AD. **(C)** Mapa de calor con proteínas que presentaron PTM (oxidaciones) de las cuales, **(D)** TRFE presentó significancia en los grupos de AD. Y aunque no presentaba diferencias significativas, **(E)** WFDC3 presentó diferentes niveles de expresión siendo los grupos experimentales. Los datos fueron filtrados y analizados con el software MaxQuant - Perseus obteniendo sólo proteínas identificadas por los 15 sujetos de los tres grupos experimentales para el apartado C. Los datos están presentados con la media  $\pm$  SEM de CNT, SAD y FAD; cada grupo experimental contaba con un n = 5. Se realizó un ANOVA One-way, t-test y un test Tukey's para comparaciones múltiples. Los niveles de significancia se establecieron en \*  $p < 0.05$ .

**Figura 8: PLTP está relacionada con la cantidad de EVs. (A - D)** Análisis de correlación entre la intensidad LFQ y el número de EVs para las proteínas que presentaron significancia en los tipos de AD. **(A)** CO2, **(B)** HV205 y **(C)** TSP1 muestran correlación positiva y a su vez, están mayormente expresadas en FAD. Mientras que **(D)** PLTP que presentó significancia en SAD, muestra correlación negativa. Cada grupo experimental contaba con un n = 5. Los niveles de significancia se establecieron en \*  $p < 0.05$ .

**Figura suplementaria 1: Proceso de segmentación de imágenes de IHC para marcadores de microglía IBA-1 y OX-42. (A)** Imágenes representativas mostrando el proceso de la segmentación realizada en las imágenes IBA-1 y O-42 utilizadas para el análisis de la **(A)** Fig. 1, **(B y C)** Fig. 2. La segmentación se

realizó en imágenes escaneadas de diapositivas completas basadas en la intensidad del marcador después de los procesos de normalización de intensidad y balance de blancos. La segmentación se realizó utilizando herramientas de dibujo manuales del software FIJI y el complemento Neurite Simple Tracer. Barra de la escala: A: 250  $\mu\text{m}$ ; B y C: 20 micras

**Figura suplementaria 2: Análisis complementario de la morfología de la microglía IBA-1 y OX-42. (A - B)** Gráficos complementarios del análisis de los parámetros morfológicos mostrados en la Fig. 2B y C, relacionados con la complejidad, el tamaño, la forma y el área de influencia de microglía **(A)** IBA-1 y **(B)** OX-42. Los datos están presentados con la media  $\pm$  SEM de CNT, SAD y FAD. Se realizó un ANOVA One-way, t-test y un test Tukey's para comparaciones múltiples. Los niveles de significancia se establecieron en \*  $p < 0.05$ .

**Tabla 1.**

Case	Label	SEX	Age of Onset	Age of Death	Postmortem Index (h)	CERAD	Braak	Thal	NIA-AA	Analysis	Comorbidities
CNT	C01	F	49	62	4	NR	NR	NR	NR	IHC	NR
CNT	C02	F	NAP	84	4.3	B	1	2	A1, B1, C2	IHC	Hypertension, type II diabetes mellitus, pancreatitis.
CNT	C03	F	NAP	67	3.8	0	1	0	A0, B1, C0	IHC	Hypertension, Hypothyroidism
CNT	C04	F	NAP	75	14.8	0	0	0	A0, B0, C0	IHC	Hypertension
CNT	C05	M	NAP	69	6.8	A	1	2	A1, B1, C1	IHC	Hypertension, Chronic venous insufficiency
CNT	C06	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	IHC	NR
CNT	C2	M	NAP	61	5.3	0	0	0	A0, B0, C0	EVs proteomics	Hypertension, type II diabetes mellitus
CNT	C3	M	NAP	46	6	0	1	0	A0, B1, C0	EVs proteomics	None
CNT	C8	M	NAP	84	3	0	3	0	A0, B2, C0	EVs proteomics	Hypertension, Chronic renal insufficiency, Chronic obstructive lung disease
CNT	C4	M	NAP	38	3.4	0	0	0	A0, B0, C0	EVs proteomics	None
CNT	Cp3	F	NAP	44	4.4	0	0	0	A0, B0, C0	EVs proteomics	Depression
SAD	S01	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	IHC	NR
SAD	S02	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	IHC	NR
SAD	S03	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	IHC	NR
SAD	S04	F	50	63	4.9	C	6	5	A3, B3, C3	IHC	Hypothyroidism, Chronic venous insufficiency
SAD	S05	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	IHC	NR
SAD	S06 - S8	F	81	94	4	B	4	5	A3, B2, C2	IHC - EVs proteomics	Hypertension, type II diabetes mellitus, breast cancer
SAD	S07	M	67	75	4.0	0	3	0	A0, B2, C0	IHC	NR
SAD	S08 - S10	F	79	90	3,3	C	4	4	A3, B2, C3	IHC - EVs proteomics	Hypertension, Dyslipidemia
SAD	S09	M	49	59	5	C	6	5	A3, B3, C3	IHC	Dyslipidemia, alcoholism
SAD	S6	F	75	85	3.3	B	5	5	A3, B3, C2	EVs proteomics	Hypertension, Hypothyroidism, Congestive heart failure
SAD	S11	F	59	73	3.5	C	5	4	A3, B3, C3	EVs proteomics	Dyslipidemia, Depression
SAD	S17	F	92	98	4.3	A	3	3	A2, B2, C1	EVs proteomics	Hypertension
FAD (E280A)	F01	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	IHC	NR
FAD (E280A)	F02	F	51	65	3.8	B	5	5	A3, B3, C2	IHC	Type II diabetes mellitus, Dyslipidemia, Hypothyroidism
FAD (E280A)	F03	F	NAP	44	4.4	0	0	0	A0, B0, C0	IHC	Depression
FAD (E280A)	F04	F	82	90	3.2	C	3	3	A2, B2, C3	IHC	NR
FAD (E280A)	F05	M	NAP	38	3.4	0	0	0	A0, B0, C0	IHC	None
FAD (E280A)	F06	F	74	86	3.3	B	5	4	A3, B3, C2	IHC	NR
FAD (E280A)	F5	M	46	62	4.3	C	6	5	A3, B3, C3	EVs proteomics	Hypertension, alcoholism, Traumatic brain injury
FAD (E280A)	F9	M	43	49	11.9	C	5	5	A3, B3, C3	EVs proteomics	Congenital valvular disease, Hypothyroidism
FAD (E280A)	F13	M	42	53	2.8	C	6	5	A3, B3, C3	EVs proteomics	None
FAD (E280A)	F15	M	58	69	5.1	B	5	5	A3, B3, C2	EVs proteomics	Hypertension
FAD (E280A)	F16	F	41	56	5.0	C	5	5	A3, B3, C3	EVs proteomics	Hypertension

Figura 1.

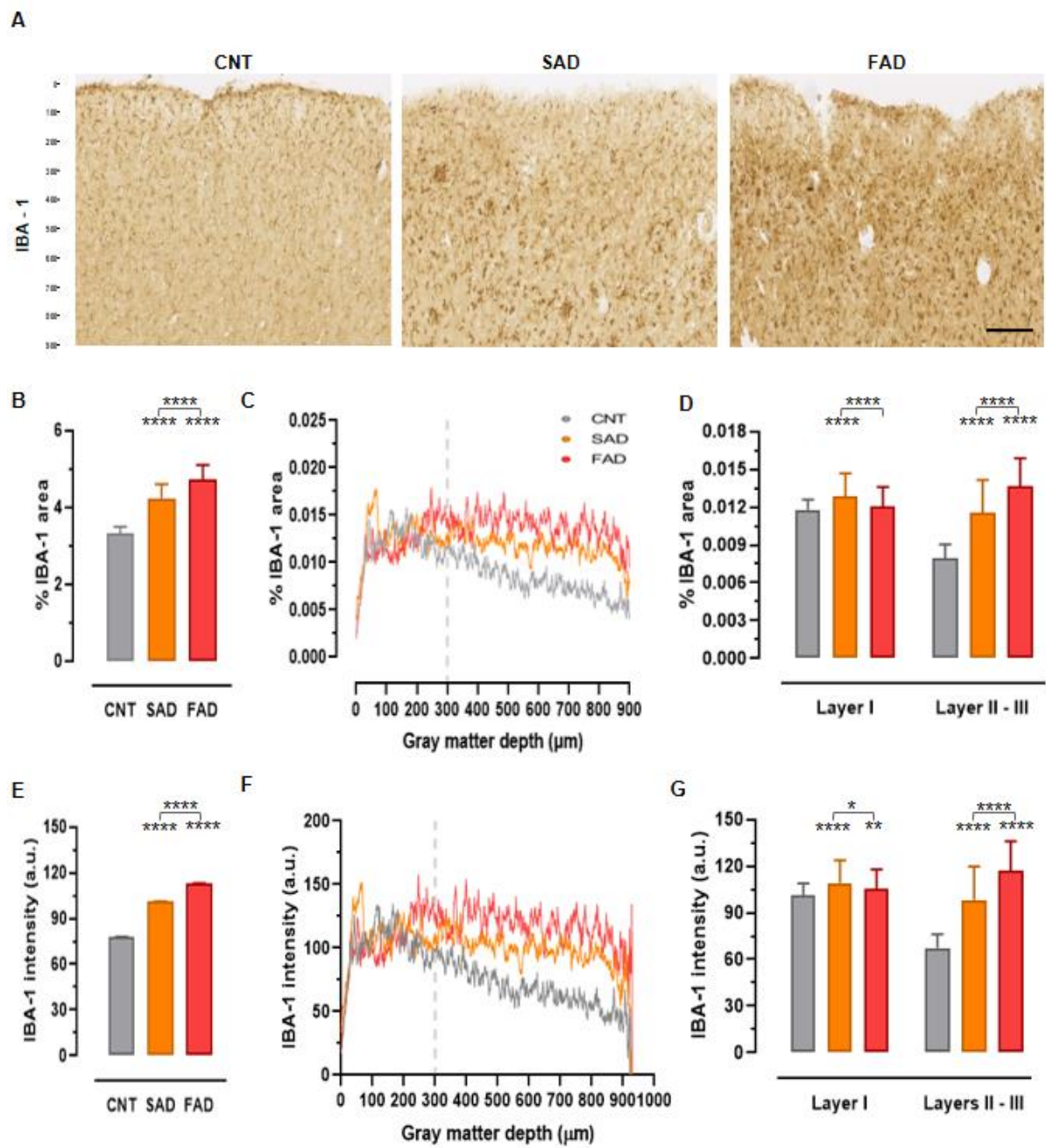


Figura 2.

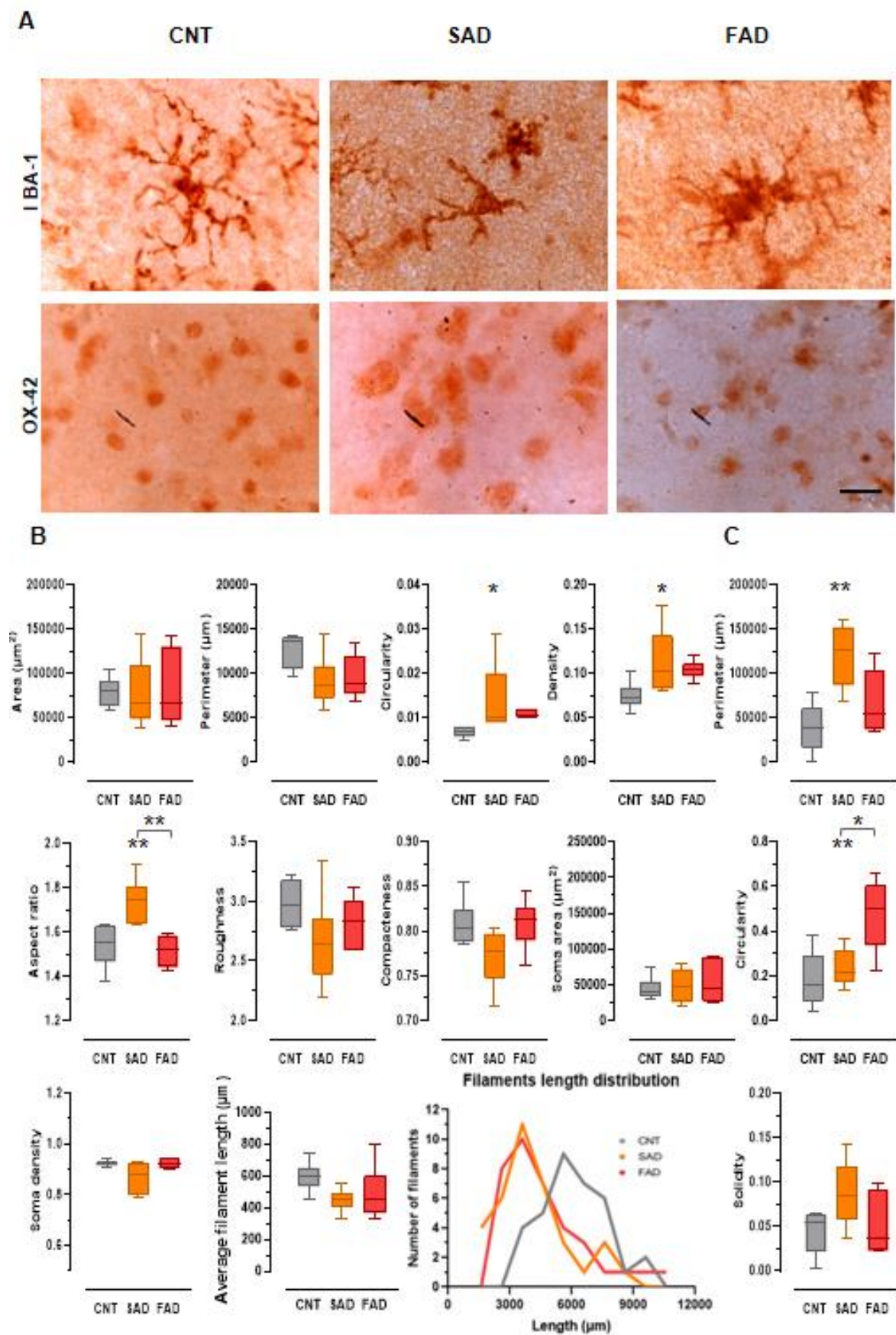
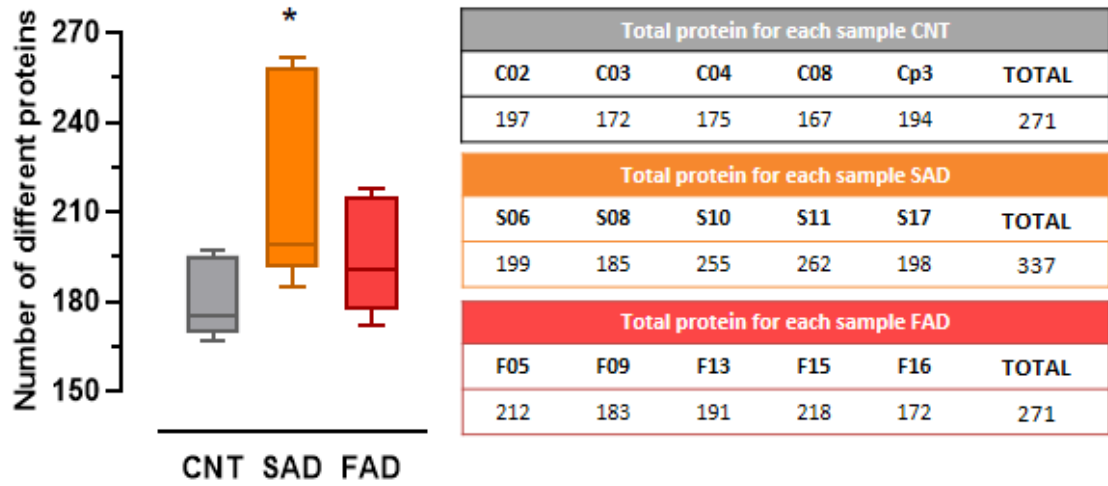


Figura 3.

A



B

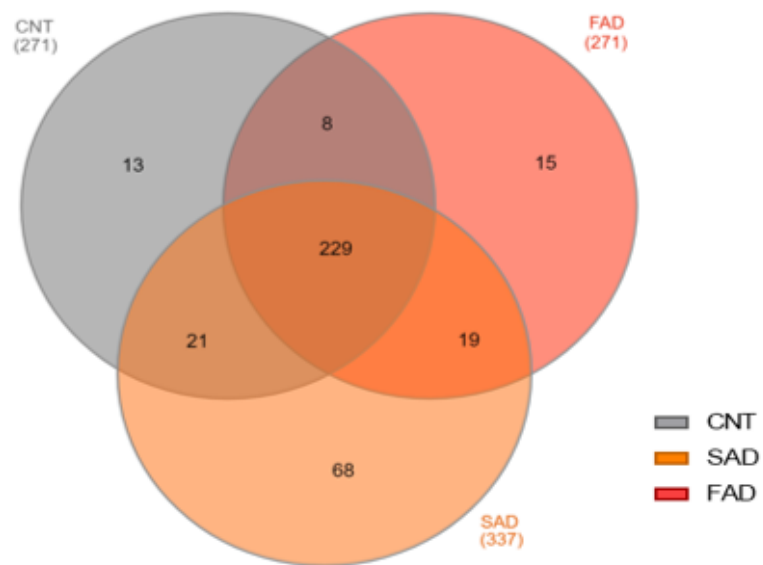




Figura 4.

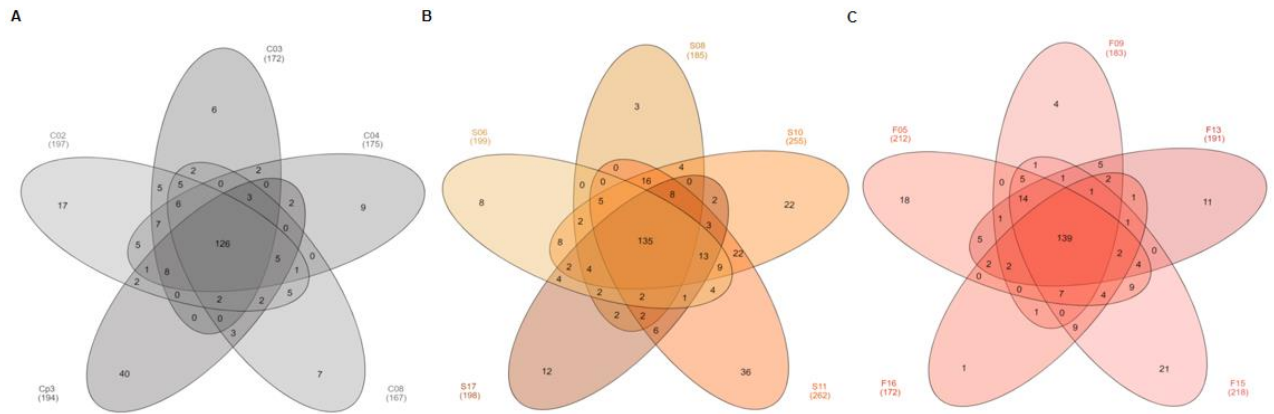
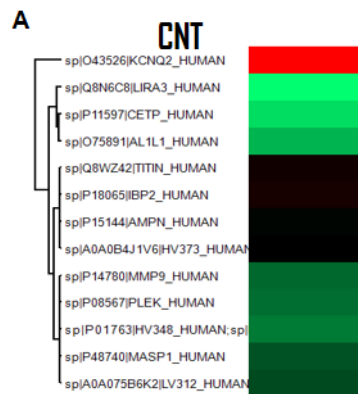


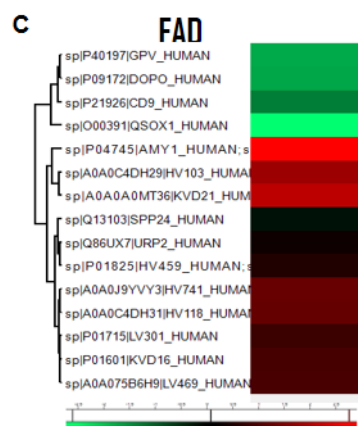
Figura 5.



CNT (13)	Protein name	Sample
<b>KCNQ2</b>	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 2	CD2
<b>LIRA3</b>	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 3	CD2
<b>CETP</b>	Cholesteryl ester transfer protein	CD8
<b>AL1L1</b>	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	Cp3
<b>TITIN</b>	Titin	CD3
<b>IBP2</b>	Insulin-like growth factor-binding protein 2	CD4
<b>AMPN</b>	Aminopeptidase N	CD2
<b>HV373</b>	Immunoglobulin heavy variable 3-73	CD2
<b>MMP9</b>	Matrix metalloproteinase-9	CD2
<b>PLEK</b>	Pleckstrin	Cp3
<b>HV348</b>	Immunoglobulin heavy variable 3-48	CD8
<b>MASP1</b>	Mannan-binding lectin serine protease 1	CD4
<b>LV312</b>	Immunoglobulin Lambda Variable 3-12	CD2



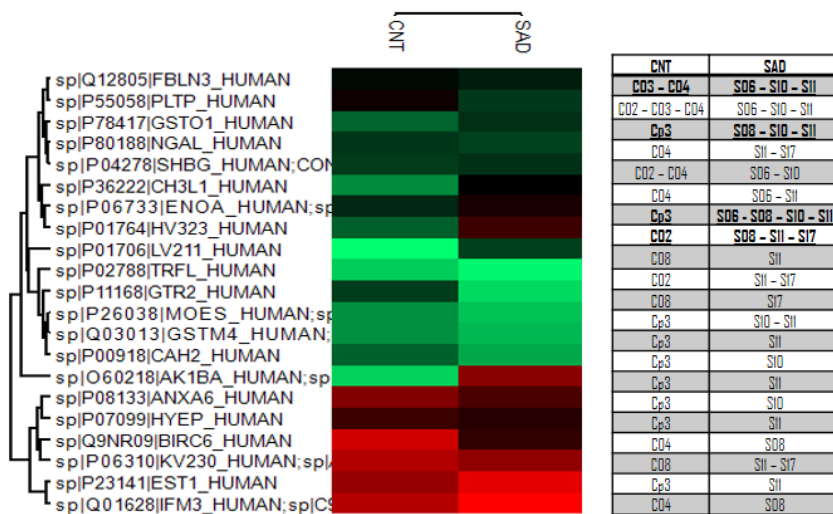
SAD (68)	Protein name	Sample	SAD (68)	Protein name	Sample
<b>CPSM</b>	Carbamoyl-phosphate synthase, mitochondrial	SII	<b>BIP</b>	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	SII
<b>PDIA1</b>	HUMAN Protein disulfide-isomerase	SII	<b>RIDA</b>	<b>Reactive Intermediate Imins Deaminase A Homolog</b>	S08 - S10 - S11
<b>LV218</b>	Immunoglobulin lambda variable 2-18	SII	<b>FIGP1</b>	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	S10 - S11
<b>EF2</b>	Elongation factor	S10	<b>AATM</b>	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	SII
<b>SBSN</b>	<b>Suprabasin</b>	S08 - S10 - S11 - S17	<b>UGPA</b>	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	S10 - S11
<b>HYES</b>	Bifunctional epoxide hydrolase 2	S10 - S11	<b>GABT</b>	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial	SII
<b>PEPD</b>	Xaa-Pro dipeptidase	S10 - S11	<b>ARLY</b>	Argininosuccinate lyase	S10 - S11
<b>PRDC</b>	Vitamin K-dependent protein C	S06	<b>LV144</b>	Immunoglobulin lambda variable 1-44	SII
<b>PXDC2</b>	Plexin domain-containing protein 2	S06	<b>PTGRI</b>	Prostaglandin reductase 1	S10 - S11
<b>TYMH</b>	Thymidine phosphorylase	SII	<b>QOR</b>	Quinone oxidoreductase	SII
<b>GGPI</b>	Glucose-6-phosphate isomerase	S10	<b>PROXI</b>	Peroxi-redoxin-1	S10 - S11
<b>STIA2</b>	Sulfotransferase 1A2	S10	<b>ADXA</b>	Aldehyde oxidase	S10 - S11
<b>GRHPR</b>	<b>Glyoxylate and hydroxypyruvate reductase</b>	S10 - S11 - S17	<b>TKT</b>	Transketolase	S10 - S11
<b>AKI1</b>	Aldo-keto reductase family 1 member A1	S10	<b>GPIX</b>	Platelet glycoprotein IX	S17
<b>HV439</b>	Immunoglobulin heavy variable 4-39	SII	<b>PGK1</b>	Phosphoglycerate kinase 1	S10 - S11
<b>ADHX</b>	Alcohol dehydrogenase class-3	S10	<b>AK1C3</b>	Aldo-keto reductase family 1 member C3	S10 - S11
<b>THMT</b>	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	SII	<b>MDHM</b>	Malate dehydrogenase, mitochondrial	SII
<b>ACOC</b>	Cytoplasmic aconitate hydratase	S10 - S11	<b>UGDH</b>	UDP--glucose 6--dehydrogenase	SII
<b>EPB42</b>	Erythrocyte membrane protein band 4.2	S17	<b>VS164</b>	V-set and immunoglobulin domain-containing protein 4	SII
<b>SODM</b>	Superoxide dismutase (Mn), mitochondrial	SII	<b>DOCK1</b>	Dedicator of cytokinesis protein 1	S17
<b>H33</b>	Histone H3.3	SII	<b>ANK1</b>	Ankyrin-1	S17
<b>FRIL</b>	Ferritin light chain	S10	<b>PGAM2</b>	Phosphoglycerate mutase 2	SII
<b>THIM</b>	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	SII	<b>ADH6</b>	Alcohol dehydrogenase 6	S10
<b>CALR</b>	Calreticulin	SII	<b>OTC</b>	Ornithine carbamoyltransferase, mitochondrial	SII
<b>AATC</b>	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	S10 - S11	<b>PSA6</b>	Proteasome subunit alpha type-6	SII
<b>DHE4</b>	Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial	SII	<b>GPIBB</b>	Xaa-Pro dipeptidase	S06
<b>SPY4</b>	Serine--pyruvate aminotransferase	SII	<b>ARGI1</b>	Arginase-1	S10 - S11
<b>FAAA</b>	Fumarylacetoacetase	S10 - S11	<b>FTCD</b>	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	S08 - S10
<b>DEF3</b>	Neutrophil defensin 3	S17	<b>ADH1A</b>	<b>Alcohol dehydrogenase 1A</b>	S08 - S10 - S11
<b>NAMPT</b>	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	S10	<b>ENPL</b>	Endoplasmic	SII
<b>HV321</b>	Immunoglobulin heavy variable 3-21	SII	<b>ARK73</b>	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3	S10
<b>SPTAI</b>	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	S17	<b>HV70D</b>	<b>Immunoglobulin heavy variable 2-70D</b>	S08 - S10 - S11
<b>THIL</b>	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	SII	<b>CBR3</b>	Carbonyl reductase [NADPH]	S10
<b>DESP</b>	Desmoplakin	S08 - S17	<b>LVX54</b>	Immunoglobulin lambda variable 10-54	S17



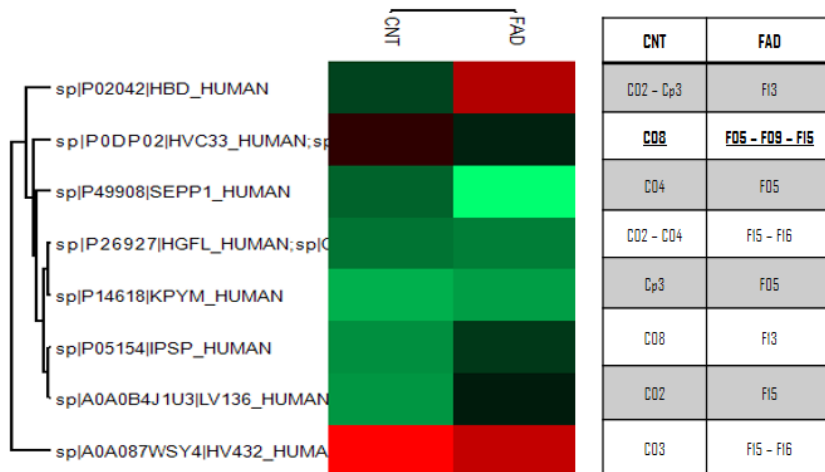
FAD (15)	Protein name	Sample
<b>GPV</b>	Platelet glycoprotein V	F13
<b>DDPD</b>	Dopamine beta-hydroxylase	F05
<b>CD9</b>	CD9 antigen	F05
<b>QSOX1</b>	Sulfhydryl oxidase 1	F05 - F15
<b>AMY1</b>	Alpha-amylase 1	F15
<b>HV103</b>	Immunoglobulin heavy variable 1-3	F09
<b>KVD21</b>	Immunoglobulin kappa variable 6D-21	F15
<b>SPP24</b>	Secreted phosphoprotein 24	F15
<b>URP2</b>	Fermitin family homolog 3	F05
<b>HV459</b>	Immunoglobulin heavy variable 4-59	F09 - F13
<b>HV741</b>	Immunoglobulin heavy variable 7-4-1	F09
<b>HV118</b>	Immunoglobulin heavy variable 1-18	F05
<b>LV301</b>	Immunoglobulin lambda variable 3-1	F05
<b>KVD16</b>	Immunoglobulin kappa variable 1D-16	F05
<b>LV469</b>	Immunoglobulin lambda variable 4-69	F09

Figura 6.

A



B



C

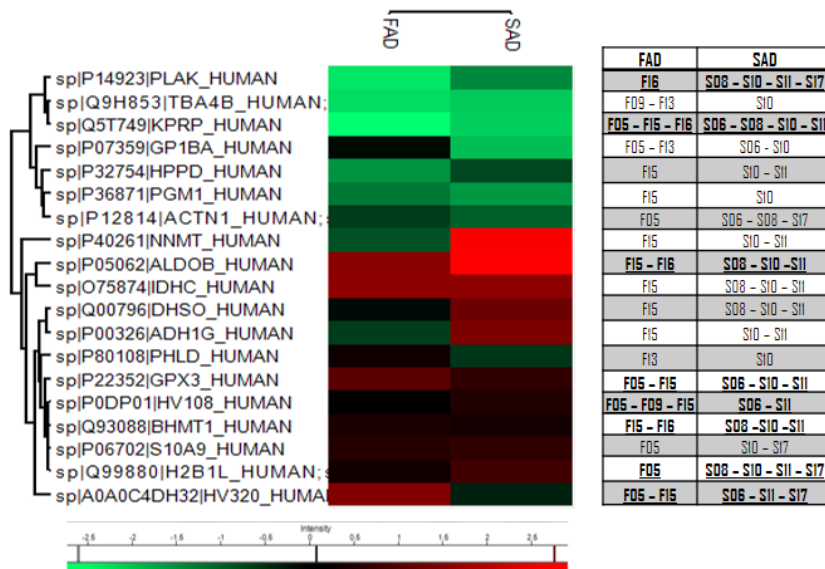


Figura 7.

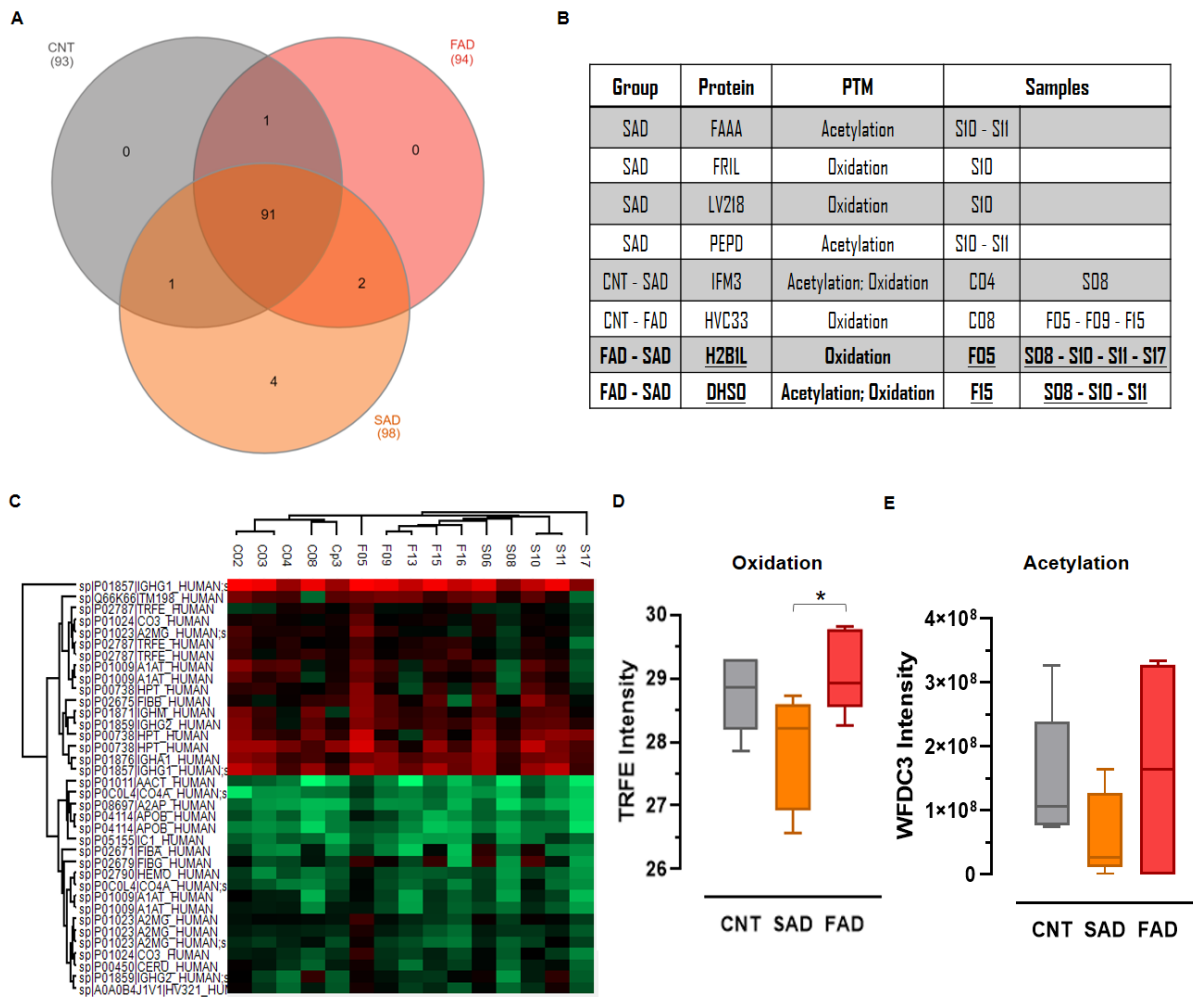


Figura 8.

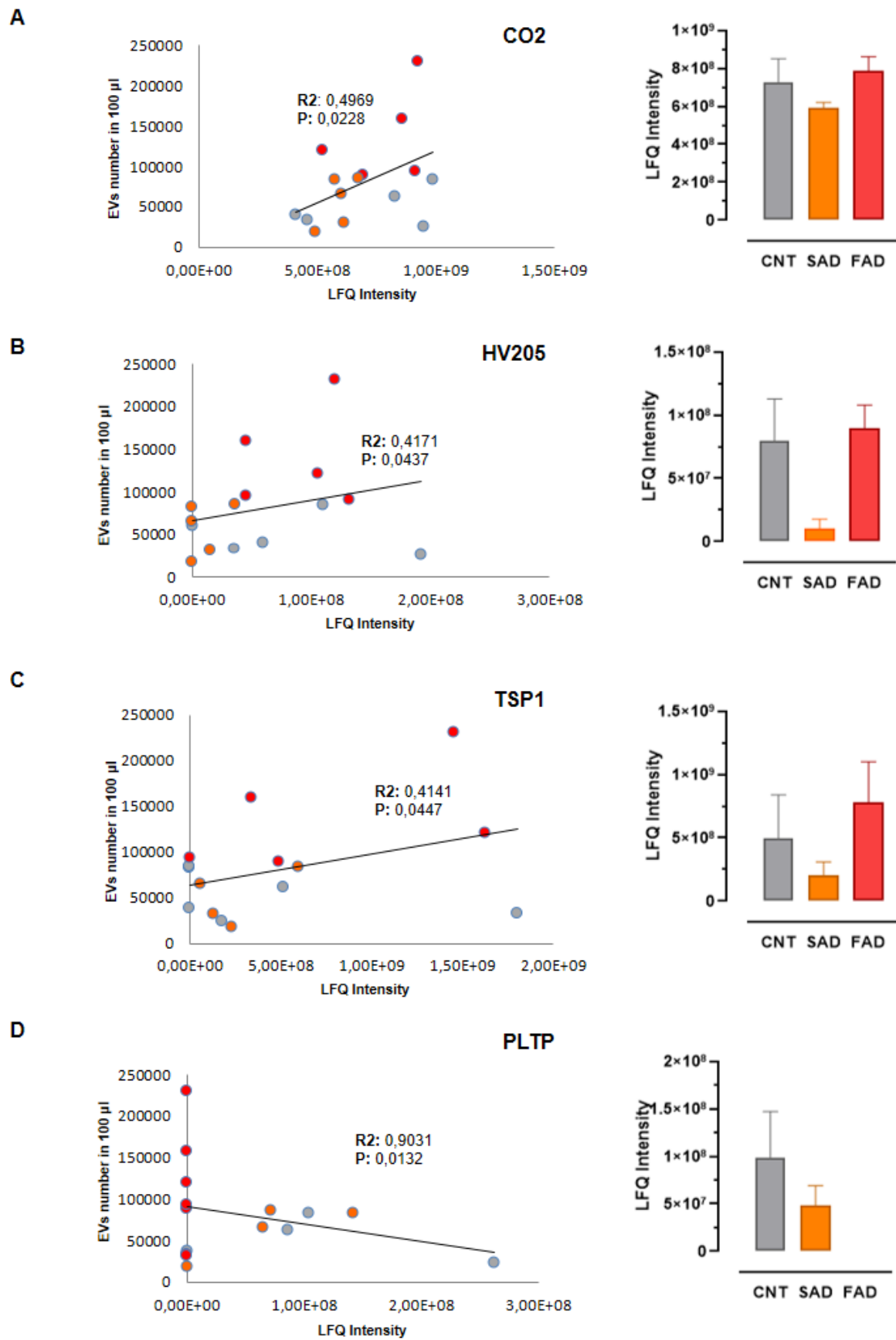
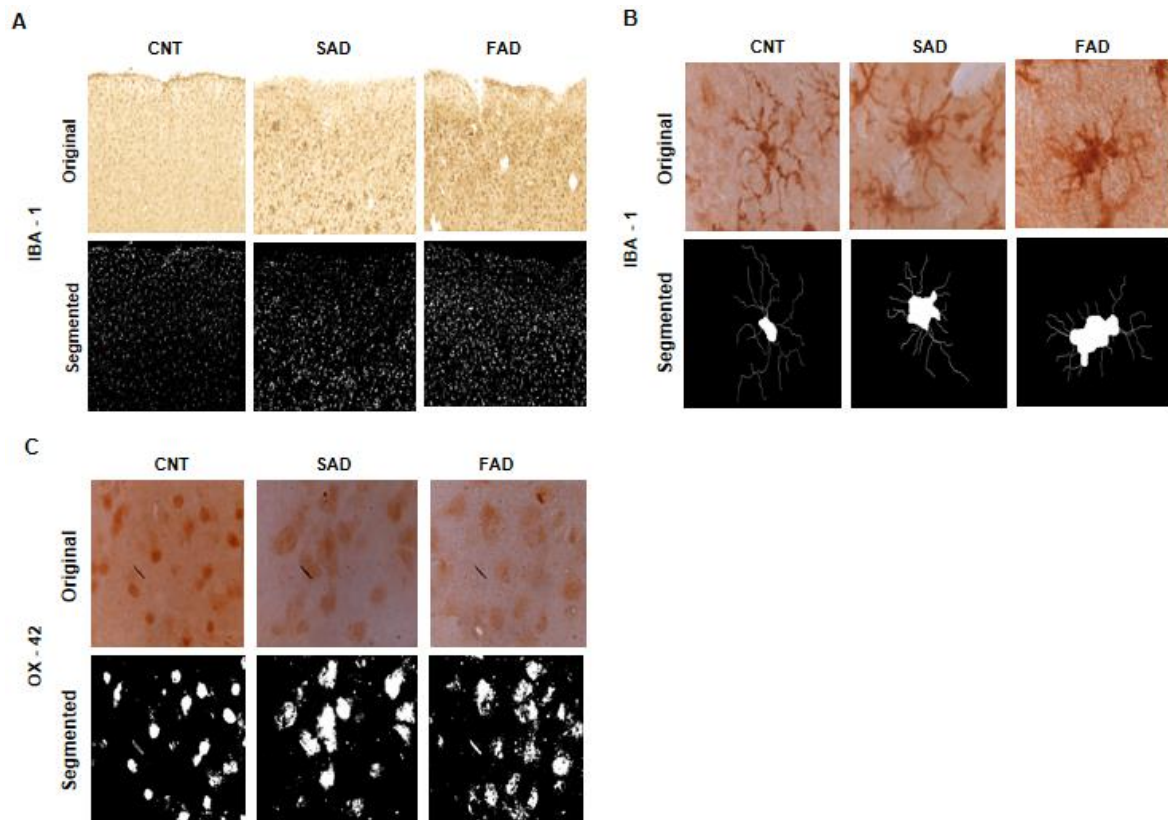


Figura suplementaria 1.



**Figura suplementaria 2.**

