

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
Programa de Doctorado en Fisiología



IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES PERIFÉRICOS DE DETERIORO COGNITIVO LEVE Y DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

TESIS DOCTORAL presentada por:

PALOMA MONLLOR TALTAVULL

Y dirigida por:

Dr. José Viña Ribes

Dra. Ana Lloret Alcañiz

Dra. Esther Giraldo Reboloso

Valencia. 2017

Prof. D. José Viña Ribes, Catedrático del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València

Profa. Dña. Ana Lloret Alcañiz, Profesora Titular del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València

Dra. Dña. Esther Giraldo Reboloso, Miembro del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico INCLIVA

CERTIFICAN:

Que Dña. Paloma Monllor Taltavull, Licencia en Bioquímica por la Universidad de València y Máster en Fisiología por la misma Universidad, ha realizado bajo su dirección para la obtención del título de Doctor la presente Tesis Doctoral titulada:

“IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES PERIFÉRICOS DE DETERIORO COGNITIVO LEVE Y DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER”

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación en Valencia en el año 2017.

Dña Ana Lloret
Alcañiz

D.José Viña Ribes

Dña Esther Giraldo
Reboloso

AGRADECIMIENTOS

Cuando en la vida llegas a los puntos importantes es necesario mirar hacia atrás para darte cuenta de que mucha gente ha estado empujándote hasta ese punto. Me parecería totalmente injusto no dedicarles unas líneas a todas esas personas que me han ayudado de alguna manera a llegar hasta aquí.

A Pepe, por sus ideas y por su visión del trabajo. Gracias por ser un maestro. A Ana, por enseñarme que el paso a paso siempre te lleva al objetivo. A Esther, por su paciencia infinita conmigo. Gracias a los tres por dirigirme durante este camino.

A mi familia que nunca me dejaron rendirme: a mi padre Diego por enseñarme que la vida es *carpe diem* y que la mejor filosofía del mundo es *sempre avant*. También a mi madre Paloma, por contagiarme la investigación y por demostrarme que no hay enemigo pequeño pero que si se quiere, se puede. A mi hermana, Bárbara, por su comprensión, por hacerme reír hasta que duela, por ayudarme a desconectar de los malos ratos y por pintar los espejos de casa.

Por supuesto, a los que ya no están mis abuelos Juan, Manola y Fernando y especialmente a mi tía Mari; esta pica en Flandes va por todos vosotros. También va por la abuela más fuerte del mundo: Itas. Gracias por tu alegría. Gracias también a mi familia por los días de escritura en Morales, en el Escorialet, en la playa, en casa. Gracias por

entender que a veces, comer está sobrevalorado. Especialmente, gracias al enano de Álvaro, esa ilusión tuya es contagiosa.

No puedo no mencionar a la pequeña familia de los martes, que semana a semana representaba mi válvula de escape. Gracias Andrés, Alonso, Ainhoa, Bárbara, Bruno, Jordi, Luso y María.

También quiero acordarme de todos aquellos que formaron parte de mi pequeña cancha de baloncesto; gracias especialmente a Marina y a Anita por demostrarme que las ganas pueden con todo.

En estas líneas también quiero agradecer a mis bioquímicas por empezar el camino de la ciencia conmigo, sufrirlo y sobretodo emocionarse con él. Gracias Susana, Cris, Luci y Silvia por ser un ejemplo de superación. Por supuesto, gracias a mis compañeros médicos: Maria, Dani, Álvar, Pablo, Josep, Anabel, Ana, Najoua, Raquel y Vicente. Gracias por aceptarme como una más pese a mis largos períodos de ausencia mientras escribía.

A mis todos mis compañeros y compañeras del Viña's Lab. Gracias por haber invertido vuestro tiempo en enseñarme la ciencia de bata. También gracias por demostrar que la ciencia no está reñida con pasarlo bien; he aprendido mucho de vosotras. Especiales gracias al Lloret's group: Tanja, Esther, Raquel y Noelia. En las bancadas no solo se hacen experimentos.

A toda la Filà Nottingham: Óscar, Inés, Ángela, Bordera y Sirvent: gracias por las casitas, las bajadas a la playa y los "¿Qué problema hay?".

A todos los amigos que me han sacado sonrisas en los momentos más duros: a Paco por mostrarme la valentía, a Sergio por ser ejemplo de constancia, a Luso por caminar conmigo desde siempre y a María por las risas y por todos sus conocimientos de gramática. Gracias por ayudarme a llegar.

A Albita y a Bea, por demostrar que la distancia no existe. Especialmente a Bea; por ilustrar la portada y por crear todo el arte que hay en esta tesis. Gracias por aprender como son las neuronas. Gracias también a Tania, por tener siempre cinco minutos para mí, incluso cuando no parece posible.

Por último, a ti, Jordi. Gracias por ser y por estar. Gracias por aguantar lo inaguantable y por confiar en que lo conseguiría.

Este reto está acabado. Vamos a por el siguiente.

“El arte es “yo”; la ciencia es
“nosotros”

Claude Bernard.

ÍNDICE

Índice general

Índice de abreviaturas.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Introducción a la Enfermedad de Alzheimer.....	11
1.2. Epidemiología de la EA.....	12
1.3. Etiología y Fisiopatología de la EA.....	16
1.3.1. Anatomía patológica y biología molecular de la EA...	16
1.3.2. Genética de la EA.....	42
1.4. Clínica, diagnósticos y primeros tratamientos.....	53
1.4.1. Clínica de la EA	53
1.4.2. Criterios diagnósticos clásicos y nuevos criterios	54
1.4.3. Aproximaciones terapéuticas.....	61
1.5. Biomarcadores	65
1.5.1. Diagnóstico mediante imagen.....	66
1.5.2. Biomarcadores en líquido cefalorraquídeo.....	70
1.5.3. Visión global y dinámica de los biomarcadores.	73
1.5.4. Biomarcadores periféricos	80
2. OBJETIVOS.....	97
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	103
3.1. Materiales	103
3.1.1. Aparatos	103
3.1.2. Reactivos	104
3.1.3. Material fungible.....	106
3.2. Métodos	106
3.2.1. Selección de sujetos	106
3.2.2. Test cognitivos.....	108
3.2.3. Obtención de las muestras.....	110

3.2.4.	Ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA)	
	111	
3.2.5.	Métodos estadísticos	114
4.	RESULTADOS	131
4.1.	Descripción de la muestra	131
4.2.	Determinación de biomarcadores en LCR.....	135
4.2.1.	Determinación de la concentración de A β en LCR...	135
4.2.2.	Determinación de la concentración de tau en LCR..	137
4.2.3.	Determinación de la concentración de p-tau en LCR	
	140
4.3.	Determinación de biomarcadores en suero	142
4.3.1.	Determinación de la concentración de clusterina en	
	suero	143
4.3.2.	Determinación de la concentración de RAGE en suero	
	144
4.3.3.	Determinación de la concentración de RCAN1 en suero	
	146
4.3.4.	Determinación de la concentración de PKR en suero	
	147
4.3.5.	Determinación de la concentración de TGF- β 1 e IL-6	
	149
4.3.6.	Determinación de la concentración de calcineurina	149
4.3.7.	Determinación de la concentración de α 1 β	
	glicoproteína	150
4.4.	Correlaciones entre Biomarcadores.....	150
4.4.1.	Correlaciones entre biomarcadores en LCR.....	151
4.4.2.	Correlaciones entre biomarcadores periféricos.....	152
4.5.	Estudio de la especificidad y sensibilidad de los	
	biomarcadores determinados.....	153

4.5.1.	Estudio de la especificidad y sensibilidad de los biomarcadores determinados en LCR	153
4.5.2.	Estudio de la especificidad y sensibilidad de los biomarcadores determinados en suero	156
4.6.	Obtención de un set de biomarcadores	160
4.6.1.	Análisis de componentes principales como método de unión de biomarcadores	160
4.6.2.	Set de Biomarcadores	165
4.6.3.	Caracterización de la muestra según los set de biomarcadores y el grupo de diagnóstico	167
4.7.	Estudio de la capacidad predictiva de los biomarcadores determinados en suero	170
5.	DISCUSIÓN	177
5.1.	Relevancia de los biomarcadores determinados en la fisiopatología de la EA	178
5.1.1.	Biomarcadores determinados en LCR	179
5.1.2.	Biomarcadores determinados en suero	182
5.2.	Capacidad predictiva de los biomarcadores determinados	194
5.3.	Relevancia clínica y limitaciones del estudio	197
6.	CONCLUSIONES	205
7.	ANEXOS	211
8.	BIBLIOGRAFÍA	223

Índice de abreviaturas

4HNE= 4 hidroxinonal

AA= Alzheimer's Association

ABCA= ATP-binding cassette

ADI= Alzheimer's Disease International Association

ADNI= Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative

ADRDA= the Alzheimer's disease and Related Disorders Association

AICD= APP Intracellular Domain.

ApoE= Apolipoproteína E

APP= Proteína precursora amiloidea.

APPL= Amyloid precursor protein-like

ATP= Adenosín Trifosfato

A β = Péptido amiloide

BACE= Beta-site APP cleaving enzyme

BHE= Barrera hematoencefálica

CA1= Cuerno de Amón 1

DCL= Deterioro cognitivo leve

DSM-IV= Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders fourth edition

EA= Enfermedad de Alzheimer

EEG= electroencefalograma

EMA=European Medicines Agency

FDA= Food and drug administration

FDG= Fluorodesoxiglucosa

GWAS= Genome-Wide Association Study

IgA= Inmunoglobulina A

IgG= Inmunoglobulina G

IGW= International Working Group for New Research Criteria for the Diagnosis of Alzheimer's Disease

IL6= Interleuquina 6

LCR= Líquido cefalorraquídeo

LTD= Long Term Depression

LTP= Long Term Potentiation

MDA= Malondialdehído

MMP= metaloproteinasas

MRI= Imagen de resonancia magnética

NIA= National Institute on Aging

NINCDS= United States National Institute for Communicative Disorders and Stroke

OMS= Organización Mundial de la Salud ver también WHO

PET= Tomografía por emisión de positrones

PiB= Compuesto B de Pittsburgh

PIB= Producto Interior Bruto

PKR= Proteína quinasa dependiente de RNA de doble cadena

PSEN1 y PSEN2= Presenilinas 1 y 2.

p-tau= proteína tau hiperfosforilada

RAGE= Receptor for advanced glycation endproducts

RCAN1= proteína reguladora de la calcineurina.

RNA= Ácido ribonucleico

SNC= Sistema nervioso central

SPECT= tomografía computarizada de emisión monofotónica (en inglés *single photon emission computed tomography*)

TAC= Tomografía Axial Computerizada

TGF β -1= factor de crecimiento transformante β

WHO= World Health Organization ver también OMS

“Todos somos muy ignorantes. Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas.”

Albert Einstein.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción a la Enfermedad de Alzheimer

La Enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita por el doctor Alois Alzheimer en el año 1907. Este médico alemán describió por primera vez las lesiones histopatológicas que aparecen en la enfermedad que ahora lleva su nombre y, de alguna manera, fundamentó el diagnóstico de esta patología.

En el artículo original el Dr. Alzheimer habla sobre una mujer de 51 años, Auguste D, que padecía un proceso patológico que recuerda a las principales características de las demencias seniles (Maurer *et al.* 1997). En el análisis *post mortem*, presentaba dos clases de lesiones histopatológicas nunca descritas anteriormente. Las primeras eran pequeñas placas delgadas y muy pegajosas, definidas en aquel momento como *miliary foci* y hoy conocidas como placas amiloides. Las segundas eran los ovillos neurofibrilares (Alzheimer, 1907), unas formaciones intracelulares.

Hoy en día sabemos que la EA es una demencia, un síndrome clínico adquirido, crónico y progresivo que se caracteriza por un proceso neurodegenerativo asociado a la edad que causa pérdida progresiva de las funciones mentales superiores. Lo primero afectado es fundamentalmente la memoria y, *a posteriori*, la capacidad lingüística, lo cual acaba condicionando de forma rotunda la vida autónoma del individuo. La supervivencia media de los pacientes es de 8 años, pero esto puede variar entre sujetos dependiendo de la persona y del entorno (R. Alberca 2002).

Actualmente, tras más de 100 años desde su descripción, la EA es uno de los campos donde la investigación básica y la clínica se entrelazan para tratar de comprender su origen y poder proporcionar un tratamiento para la misma. A lo largo de esta introducción repasaremos los aspectos más básicos de esta enfermedad (epidemiología, genética, factores de riesgo y el concepto actualizado de etiología), los métodos de diagnóstico que se emplean hoy en día y el prometedor futuro de los biomarcadores.

1.2. Epidemiología de la EA

El aumento de la esperanza de vida, debido en parte a los avances en este último siglo de la medicina moderna, da como resultado una mayor población de adultos mayores en nuestra sociedad. De hecho, en el año 2015 la población mundial de personas mayores de 60 años era de 900 millones según la Alzheimer's Disease International Association (ADI) (Prince *et al.* 2015). Este dato contrasta enormemente con la cantidad de personas en este rango de edad de las que hay constancia para el año 2000: unos 600 millones según la Organización Mundial de la Salud (OMS). El contraste es todavía mayor si tenemos en cuenta que en 1950 solo había 205 millones de personas mayores de 60 años (World Health Organization Statistics, 2009).

Junto a este aumento de la esperanza de vida, han aparecido enfermedades asociadas al envejecimiento, de entre las cuales destacan las demencias.

Las demencias despiertan una gran preocupación en la sociedad mundial, tanto por la carga familiar que suponen como por las grandes inversiones por parte de los estados para cubrir los gastos sanitarios relacionados con estas patologías. Según la OMS la mayoría de los países europeos gastan un 1% del PIB en demencias, especialmente en personas internadas o en residencias para ancianos (2012 WHO report “Dementia: a health priority”, Batsch y Mittelman 2015). Además, las demencias son las principales causas de dependencia, incapacidad y muerte en los adultos mayores (Reitz 2011, Cornutiu 2015). De hecho, la EA es la sexta causa de muerte en Estados Unidos según la Alzheimer’s Association (AA) (2009).

La EA es la causa más común de demencia primaria seguida por la demencia vascular, la demencia por Cuerpos de Lewy y la demencia frontotemporal. El principal problema para determinar la prevalencia real de la EA en la población es la falta de consenso entre las instituciones para fijar una unidad de expresión; así se pueden encontrar datos de afectados respecto a 1000 habitantes, 100.000 habitantes o directamente encontrar el porcentaje de afectados en un área geográfica concreta (Cornutiu 2015). Por ello, todo este apartado sobre estudios demográficos se ha elaborado teniendo en cuenta los números sobre demencias.

En el estudio Delphi de *Ferri et al.* (2005) se expone que 24 millones de personas padecían una demencia en ese momento en el mundo (año 2005) y los autores estimaron que esta cantidad se duplicaría cada 20 años hasta alcanzar la cifra de 81.1 millones de afectados en el año 2040 siguiendo la situación actual. Se estimaba entonces un total de

4.6 millones de casos nuevos al año (Ferri *et al.* 2005). Estos datos se confirman con cierta desviación por los mismos autores en un meta análisis con los datos de la literatura existente hasta ese momento (Prince *et al.* 2013) siendo los cálculos finales de 65.7 millones de afectados en 2030 y de 115.2 millones de afectados por una demencia en 2050.

La OMS coincide con estos datos en su informe sobre la EA y otras demencias del año 2013 y añade que la EA es la demencia con mas presencia en los casos arriba estimados, con un 50-75% de afectados y siendo más común en los rangos de edad más elevados (Ferri *et al.* 2005, Duthey 2013). Sin embargo, la ADI publica su informe del año 2015 y sus estimaciones son ligeramente diferentes: según este organismo, el número total de personas que padecían demencia en ese momento era de 46.8 millones de personas y para el año 2030 la estimación de personas con demencia era ligeramente superior que la ya mencionada (74.7 millones de personas).

Es también destacable el aumento de la incidencia en los rangos de edad superiores a 60 años, que se incrementa cada década. Se observa en la figura 1 como la incidencia de las EA (en particular) aumenta rápido con la edad y que cada cinco años se dobla, siendo de 1.98 en el rango de edad entre 50-59 y de 39.31 para personas mayores de 80 hasta el año 2006 para Europa (Cornutiu, 2015). Finalmente, es muy relevante ver las diferencias entre ambos sexos. Los estudios EuroDem y EuroCoDe comparan la prevalencia de las demencias en personas de ambos sexos. En las conclusiones presentan que en hombres y mujeres de 60 años la prevalencia es similar, rondando un 0.4% mientras que a

los 90 años hay una brecha con un 22.1% en hombres y 30.8% en mujeres (figura 2).

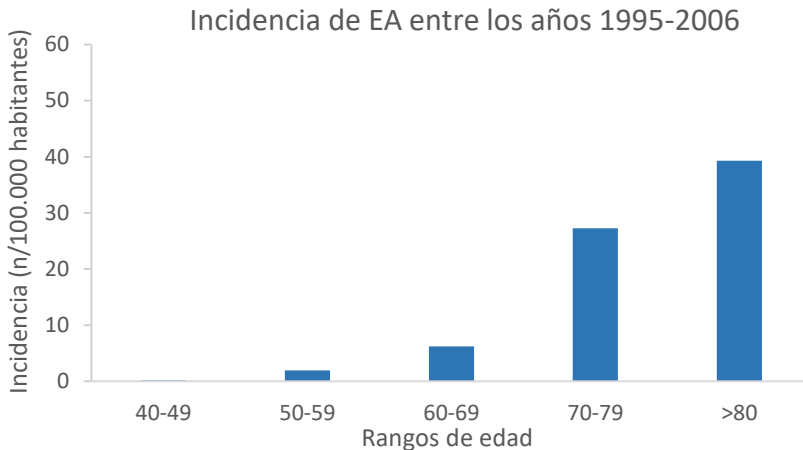


Figura 1: incidencia de EA mundial entre los años 1995 y 2006. Gráfico realizado a partir de los datos de Cornutiu (2015).

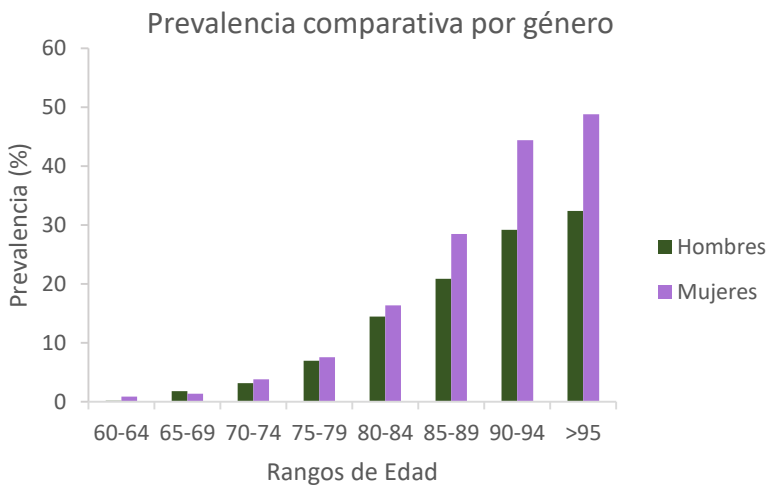


Figura 2: prevalencia de las demencias en Europa en función del rango de edad comparada por sexos. Gráfico realizado con datos del estudio EuroDem y EuroCoDe, disponible en (<http://www.alzheimer-europe.org/EN/Media/Images/Article-Images/Prevalence-Rates/Eurodem>).

Sin embargo, el incremento de prevalencia en las mujeres no puede ser atribuido a la mayor longevidad de éstas frente a hombres entre los rangos de 60-80 años, porque la tasa de mortalidad en ambos sexos no es lo suficientemente elevada como para ser un factor determinante (Viña y Lloret, 2010). Una posible explicación de la mayor prevalencia de demencias en mujeres es su mayor incidencia de diabetes y obesidad, además de que los efectos protectores de los estrógenos han disminuido tras la menopausia (Viña y Borrás, 2010). De hecho, se ha demostrado que los estrógenos poseen una capacidad protectora en las mujeres pre-menopáusicas, ya que los estrógenos influyen sobre las enzimas colinérgicas y sobre el factor de crecimiento neuronal, además de actuar como antioxidantes (Kölsch y Rao 2002; Vina y Borrás 2010).

1.3. Etiología y Fisiopatología de la EA

1.3.1. Anatomía patológica y biología molecular de la EA

A nivel macroscópico encontramos que la estructura cerebral se encuentra afectada por una degradación bilateral (normalmente simétrica) que permite avanzar a los ventrículos y evidencia la disminución del espesor de las circunvoluciones cerebrales. También se aprecia un aumento en la profundidad de los surcos y disminución del peso y volumen cerebral. Todos estos cambios aparecen en la figura 3, que muestra un corte seccional de un cerebro normal y otro con EA.

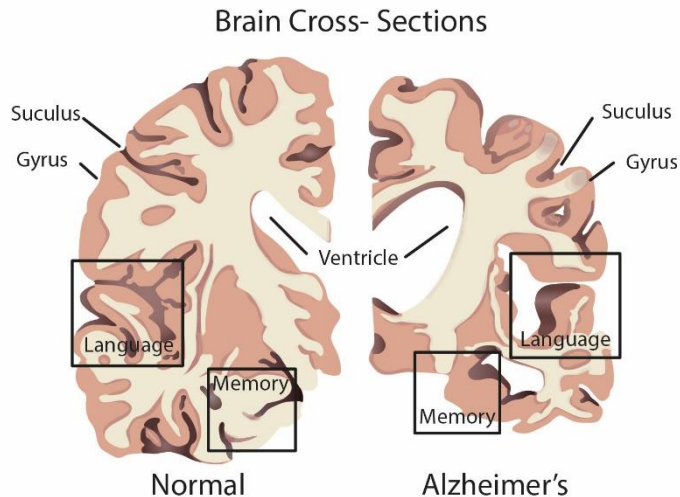


Figura 3: esquema de un corte seccional de un cerebro sano a la izquierda y un cerebro con Alzheimer a la derecha. Resalta la amplitud del ventrículo, la profundización de los surcos y la degeneración de zonas encargadas de la memoria y del lenguaje. Tomado de <http://www.brightfocus.org>.

La anatomía patológica subyacente a la EA se ha estudiado de forma muy intensa en los últimos 30 años. Hoy en día sabemos que esta enfermedad se caracteriza por dos lesiones definitorias y definitivas en el parénquima cerebral: las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares.

Dado su diferente origen bioquímico y sus dispares mecanismos moleculares que contribuyen por separado a esta enfermedad, ambas lesiones se tratan a continuación por separado y se analizan desde su formación hasta sus efectos patológicos.

a) β -amiloide y la formación de placas amiloides

Antes de profundizar en el apartado, es conveniente remarcar que el término “placas seniles” se emplea en ciencia como sinónimo de “placas amiloides” ya que ambas se refieren a lesiones que aparecen en forma de acumulaciones extracelulares de elementos de diferente naturaleza. Entre ellos abunda la deposición de un péptido corto de 40 ó 42 aminoácidos de longitud llamado péptido beta-amiloide (o también péptido A β o simplemente A β).

Las placas amiloides son lesiones de forma esférica y de 10-120 μ m de diámetro (Morgan *et al.* 2004). Están constituidas por un núcleo central de péptido A β rodeado de restos de neuronas degeneradas, lo que se conoce como la parte neurítica de la lesión (Duyckaerts *et al.* 2009) y que histológicamente forma una especie de corona alrededor del núcleo de la placa amiloide. Entre estas neuritas distróficas, se pueden distinguir restos de astrocitos y microglia activada (Hampel *et al.* 2010).

Se han descrito diferentes formas de deposición de este péptido en el parénquima cerebral (Morgan *et al.* 2004; Duyckaerts *et al.* 2009). En primer lugar se distinguen los depósitos difusos, los cuales no contienen un núcleo sólido de A β , pero sí presentan algunas fibras de este péptido que no se tiñen con los tintes específicos mencionados previamente, porque se encuentra en forma de fibras aisladas. Así pues, este tipo de depósito se asocia a un estado muy inicial de la formación de placas, puesto que no correlaciona con ningún aspecto

clínico y se ha encontrado en sujetos cognitivamente normales (Selkoe 2001; Morgan *et al.* 2004; Duyckaerts *et al.* 2009).

Una categoría superior serían los depósitos focales que ya contienen restos celulares (especialmente de microglía) y, finalmente, las placas amiloides mencionadas previamente.

Aunque el componente fundamental de las placas es el A β , también se han encontrado otros componentes que colocalizan en los depósitos amiloides como son: mucopolisacáridos, α 1-antiquimiotripsina, inmunoglobulinas (especialmente IgA E IgG), factores del complemento, fibrinógeno, apolipoproteína E (ApoE), colesterol, apolipoproteína J (o clusterina) situada en la zona de la corona, presenilinas, elementos extracelulares como moléculas ICAM1 o heparán sulfato y diversos metales como hierro, zinc y cobre (Bohrmann *et al.* 1999).

Se ha estudiado el comportamiento de estas moléculas que se localizan en las placas seniles con el fin de ver si favorecen o dificultan la deposición de fibras de A β y cómo afectan a la formación de placas. A continuación aparece una tabla-resumen (tabla 1) en la que se recogen algunas de las diferentes moléculas que colocalizan en las placas amiloides, así como su papel en la agregación del A β según la referencia consultada.

Tabla 1: diferentes moléculas que afectan a la agregación del A β .

Molécula	Efecto sobre la agregación de Aβ	Referencia
ApoJ o Clusterina	Inhibidor/Estimulador	(Nuutinen <i>et al.</i> 2009)
ApoE	Inhibidor/Estimulador (dependiendo del genotipo)	(Selkoe 2001)
Cu	Estimulador	(Morgan <i>et al.</i> 2004)
α_1antiquimiotripsina	-	(Fraser <i>et al.</i> 1993)
α_1antitripsina	Inhibidor	(Bohrmann <i>et al.</i> 1999)
Fe	Estimulador	(Morgan <i>et al.</i> 2004)
IgA e IgG	Inhibidor	(Bohrmann <i>et al.</i> 1999)

En cuanto a la localización de las placas a nivel histológico, la mayoría de los depósitos de A β se localizan en la sustancia gris aunque se pueden ver depósitos difusos de A β en la sustancia blanca (Duyckaerts *et al.* 2009). En una visión global es remarcable el hecho de que las placas se encuentran repartidas por todo el encéfalo, predominando en hipocampo, corteza entorrinal y neocórtex. Esta localización es dependiente de la fase de la enfermedad en la que se encuentra el sujeto, apareciendo en un primer momento en la corteza entorrinal. (Morgan *et al.* 2004).

Parece ser que la deposición de A β en forma de placas se debe a un desequilibrio entre su producción y su aclaramiento o degradación (Mawuenyega *et al.* 2010). No obstante, la deposición de A β en el parénquima cerebral no es indicativa inmediata de una EA. Se ha visto que a causa del envejecimiento también aparecen estas lesiones histopatológicas sin que lleven asociadas trastornos neurológicos (Selkoe, 2001; Haass y Selkoe 2007).

b) Aspectos moleculares de A β : proteína precursora, procesado, agregación y degradación

El péptido amiloide tiene su origen en una proteína llamada proteína precursora del péptido amiloide (por sus siglas en inglés se le denominará de forma abreviada: APP), cuyo gen está localizado en el cromosoma 21, concretamente en el locus 21q21.2. Es una proteína con un único motivo transmembrana. Su dominio extracelular contiene el extremo N-terminal y un corto dominio citoplasmático contiene su extremo C-terminal (Morgan *et al.* 2004).

Se ha visto que el gen APP contiene 19 exones separados por regiones no codificantes, por lo que existen diferentes isoformas de APP que se generan por *splicing* alternativo, las tres más frecuentes contienen 695, 751 y 770 aminoácidos (Karch *et al.* 2014). El gen de la APP aparece en la figura 4 así como los dominios a los que codifica. Se puede observar que la secuencia del péptido A β se encuentra mayoritariamente en el dominio extracelular y parcialmente en el dominio transmembrana.

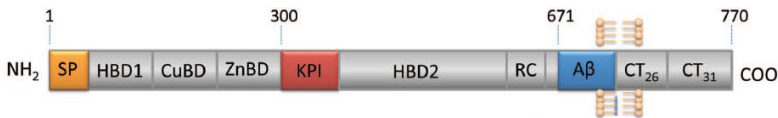


Figura 4: ilustración del gen de la APP y sus principales dominios proteicos. SP_ péptido señal, HBD1 y 2 son dominios de unión a heparina, CuBD y ZnBD son lugares de unión a estos dos metales. KPI es el dominio inhibidor de proteasas tipo Kunitz. RC es una región de cola. A β es la región que codifica al péptido amiloide. CT: cola citoplasmática de diferente longitud dependiendo del punto de corte. Modificado de Zhou *et al.* 2011.

Se ha observado que las proteínas que contienen 751 y 770 aminoácidos se expresan mayoritariamente en células no neuronales, mientras que la APP con 695 residuos se expresa, también en su mayoría, en neuronas. La diferencia entre estas isoformas de la APP reside en un pequeño péptido de 56 aminoácidos que otorga una función especial haciéndolas capaces de inhibir proteínas con actividad serina proteasas, como la tripsina y la quimiotripsina (ilustrado como KPI en la figura 4). Esto es especialmente relevante en la coagulación de la sangre y de hecho se ha visto que estas dos isoformas más largas se encuentran principalmente en las plaquetas

(son capaces de inhibir específicamente el factor XI_a de la cascada de coagulación) y están ausentes en el tejido nervioso (Selkoe 2001).

Además de la variabilidad que otorga el splicing alternativo del RNA mensajero, hay que tener en cuenta las modificaciones post-traduccionales que ocurren en el transcrito primario (N-glicosilación, O-glicosilación) que son fundamentales para alargar su vida media, que suele ser de unos 45-60 minutos (Selkoe 2001). Una vez localizada en la bicapa lipídica, la APP es procesada.

La APP es una proteína de expresión constitutiva en humanos y contiene proteínas homólogas en *Drosophila* (gen *APPL*, *amyloid precursor protein-like*), lo que indica una conservación a lo largo de la evolución de este gen (Selkoe 2001). De hecho, diversos autores defienden que la APP tiene funciones fisiológicas importantes: se ha visto que tiene un papel relevante en la supervivencia neuronal, en la regulación del crecimiento de neuritas (Zhou *et al.* 2011) y en la plasticidad sináptica (Young-Pearse *et al.* 2007).

En la figura 5 se ilustra el procesamiento de APP, que se lleva a cabo por unas enzimas llamadas α , β y γ secretasas en función del sitio de corte en la proteína. Existen dos vías de procesamiento de APP: la amiloide que genera el A β y la no amiloide, que libera una proteína (s-APP α) con funciones fisiológicas.

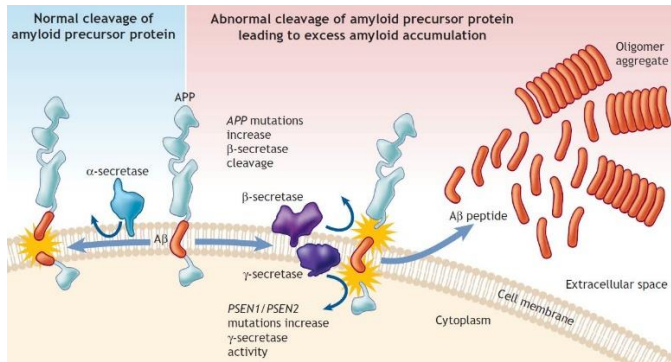


Figura 5: procesamiento de la proteína APP, originaria del péptido amiloide. A la izquierda se observa el procesamiento no amiloidogénico de la APP mediante α -secretasa. A la derecha se observa el procesamiento amiloidogénico llevado a cabo por la β -secretasa y la γ -secretasa. Tomado de (Patterson *et al.* 2008).

Por un lado, la vía no amiloide se inicia con un corte en la APP por la α -secretasa, una metaloproteínasa que libera al espacio extracelular al péptido s-APP α . A este péptido se le atribuyen funciones importantes como la regulación de la excitabilidad neuronal y efectos neuroprotectores (Zhou *et al.* 2011). También se cree que tiene funciones en la activación de receptores muscarínicos (Nitsch *et al.* 1992; Mattson 2004) y existen evidencias que apuntan a que s-APP α puede unirse a las células de la zona subventricular (SVZ), uno de los lugares del sistema nervioso adulto con potencial para la neurogénesis, con una función no conocida todavía (Caillé *et al.* 2004).

Tras el corte de la α -secretasa, el péptido que permanece anclado en la membrana es un péptido de 83 aminoácidos con el extremo C-terminal, que va a ser procesado por un enzima común a las vía amiloide y a la no amiloide. En la vía no amiloide la γ -secretasa genera el llamado péptido AICD (del inglés *APP intracellular domain*) que parece tener un papel como factor de transcripción en la inhibición de

la neurogénesis (Zhou *et al.* 2011). Además, se genera un péptido soluble, corto y extracelular, llamado P3 (Selkoe 2008).

Por otro lado, la vía amiloidogénica requiere de dos enzimas que secuencialmente corten la APP. Cuando el corte inicial de la proteína precursora amiloide tiene lugar por la β secretasa también llamada “*Beta-site APP Cleaving Enzyme*” (BACE) en lugar de por la α -secretasa, se libera una proteína extracelular similar a s-APP α pero 16 aminoácidos más corta llamada s-APP β (Patterson *et al.* 2008; Hampel *et al.* 2010). En este momento hay un péptido de 99 aminoácidos unido a la membrana plasmática, que empieza por el primer residuo del péptido amiloide.

El posterior corte por la γ -secretasa libera por un lado el péptido A β (de 40 o 42 aminoácidos) y por otro una porción AICD al interior de la célula (Zhou *et al.* 2011). Hay que destacar que la γ -secretasa es un complejo multiproteico conformado por 4 proteínas diferentes: presenilinas (1 y 2), nicastrina, *anterior pharynx defective-1* (Aph-1) y *presenilin enhancer-2* (Pen-2). Estas proteínas parecen afectadas y son susceptibles de ser transmitidas genéticamente en la forma de Alzheimer familiar. De hecho, existen mutaciones en los genes que codifican las presenilinas 1 y 2 que aumentan la actividad de la γ -secretasa, incrementando de forma directa la producción de A β (Patterson *et al.* 2008).

Hasta principios de este siglo se consideraba que la liberación del péptido A β era un evento patológico causado por la γ -secretasa. Sin

embargo el uso de anticuerpos específicos contra A β demostró que este evento ocurre de una forma totalmente fisiológica (Selkoe 2001).

Tras la formación del A β , el péptido forma una estructura secundaria en forma de hoja β plegada (Walsh *et al.* 1999), la cual es muy pegajosa y tiende a agregarse con otros péptidos de la misma naturaleza de una manera ordenada. Incluso si existen péptidos de longitud diferente, éstos tienden a plegarse en consonancia con los otros péptidos hasta formar una placa (Haass y Selkoe 2007).

Una vez procesado, el A β puede permanecer en el espacio extracelular formando placas- como ya se ha descrito- o bien puede entrar al interior de las células. El camino intracelular que siguen todos los péptidos A β está todavía por dilucidar. Según Hartmann y colaboradores la ruta endosoma-lisosoma tiene un papel importante en la internalización de muchos péptidos, entre ellos el péptido amiloide (Hartmann *et al.* 1997).

Finalmente, la degradación del A β es un proceso casi de igual relevancia que su formación para la EA. Ésta se realiza por varias enzimas, como por ejemplo la neprilysina y la enzima degradadora de insulina, que cataboliza los monómeros de A β pero no los oligómeros ya agregados (Haass y Selkoe 2007; Duyckaerts *et al.* 2009). Otros estudios también apuntan a que la enzima convertidora de angiotensina (ECA) o los activadores del plasminógeno también podrían ser proteínas que degradasen A β (Tucker *et al.* 2000; Hu *et al.* 2001). Además, el A β en su forma soluble y no depositada es aclarado

desde el tejido cerebral al líquido intersticial (Cirrito *et al.* 2003; Bero *et al.* 2011).

También está documentada la salida del A β por la barrera hematoencefálica (BHE) hacia la sangre empleando transportadores como LRP-1 (del inglés low density lipoprotein receptor-related protein 1) y la P-glicoproteína (Pflanzner *et al.* 2011). En relación con la primera proteína, se ha visto que el péptido AICD es capaz de regular negativamente la expresión de LRP-1 (Liu *et al.* 2007). Igualmente existen evidencias de que LRP1 sería capaz de actuar como transportador bidireccional de A β (Pflanzner *et al.* 2011).

Hay que señalar que la BHE es una estructura dinámica que separa el sistema nervioso central (SNC) de la circulación periférica de una manera física y metabólica (Huber *et al.* 2001). Entre sus múltiples funciones destacan la regulación de la permeabilidad celular; la cual limita el paso de iones, moléculas y compuestos metabólicos al tejido cerebral. Su principal virtud es el hecho de regular la entrada y salida de nutrientes, iones, oxígeno y moléculas; además de servir de protección ante toxinas gracias a las uniones estrechas que se encuentran en las células endoteliales (Obermeier *et al.* 2013). La BHE, por tanto, proporciona un ambiente protector que permite un buen funcionamiento de las neuronas.

Por consiguiente, para permitir la salida y/o entrada de diferentes moléculas entre el tejido nervioso y otros tejidos es necesario que esta BHE tenga proteínas transportadoras específicas para dicho fin.

Existe un flujo de A β hacia el líquido cefalorraquídeo (LCR) desde la sangre que atraviesa la BHE mediante transportadores como RAGE (del inglés, *receptor for advanced glycation endproducts*) (Kook *et al.* 2013). La interacción entre el A β y RAGE es una fuente de moléculas pro-oxidantes que acaban por incrementar el estrés oxidativo en la célula pero también contribuye a la respuesta inflamatoria generada por la microglia (De Strooper y Karran 2016).

c) Toxicidad mediada por A β

Dos de las disfunciones celulares más asociadas al envejecimiento son el incremento del estrés oxidativo y el funcionamiento deficiente del metabolismo energético. En el Alzheimer estos dos fenómenos se cumplen de forma absoluta y son favorecidos por el A β , como aparece en la figura 6.

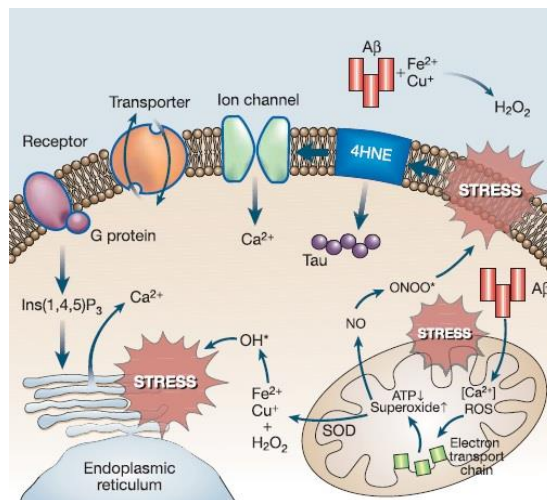


Figura 6: esquematización del proceso de estrés oxidativo inducido por el A β en la célula. Tomado de Mattson (2004).

Entendemos por estrés oxidativo al estado de desequilibrio entre los agentes oxidantes celulares -siendo los más abundantes las especies reactivas de oxígeno- y los antioxidantes (Sies, 1986).

Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio, demostraron que el A β induce un aumento de la producción de radicales libres en mitocondrias aisladas y que, además, provoca la agregación mitocondrial y la salida de citocromo C de la mitocondria que, a su vez, conduce a la apoptosis de la célula (Lloret *et al.* 2008). Esto coincide con lo que afirman (Reddy *et al.* 2005; Wang *et al.* 2013+), ya que según ellos el A β es capaz de entrar al interior de la célula y producir estrés oxidativo en las mitocondrias, desacoplando la cadena transportadora de electrones y dañando así a la célula al reducir la cantidad de ATP que se sintetiza y aumentando la generación de radicales libres. Además, está documentado que fuera de la célula, durante la agregación de oligómeros de A β , se produce H₂O₂. Este proceso está muy favorecido por la presencia de iones reducidos que pasan a su forma oxidada como Fe⁺² y Cu⁺ (Zhao y Zhao, 2013).

Cuando el A β se agrega en las inmediaciones de la membrana celular promueve la peroxidación de lípidos formando malondialdehído (MDA) o 4-hidroxinonenal (4HNE) entre otros (Wang *et al.* 2013). Los lípidos peroxidados afectan a las proteínas de membrana y son capaces de modificar residuos de lisina, histidina o arginina (Mattson 2004; Carrillo-Mora *et al.* 2014). Esto afecta al funcionamiento de los canales iónicos dependientes de ATP (como la bomba Na⁺/K⁺), de los transportadores GLUT [especialmente al GLUT 3, presente en el cerebro y principal encargado de permitir la entrada de glucosa a la

célula nerviosa, (Guyton y Hall, 2006)], de las proteínas G (que resultan modificadas por la unión covalente irreversible del 4HNE) y, finalmente, de los transportadores de glutamato (comprometiendo, así, la vía de reciclaje de las vesículas sinápticas) (Wang *et al.* 2013). Estos procesos hacen que la célula esté expuesta a excitotoxicidad y la abocan a la apoptosis.

Hay que destacar que la principal fuente de energía de las células nerviosas proviene de la glucosa, por lo que la función deficitaria de los transportadores GLUT reduce la cantidad de moléculas disponibles para el metabolismo. Además, se ha visto que en cerebros de pacientes de EA la actividad de enzimas claves para el metabolismo, como el complejo piruvato deshidrogenasa y la citocromo C oxidasa, se encuentran muy reducida (Blass 2001, Wang *et al.* 2013).

Cuando las células nerviosas tienen déficit de glucosa, pueden alternativamente emplear cuerpos cetónicos e introducirlos en el ciclo de Krebs para obtener energía. En el caso de la EA, se ha visto que el complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa tiene una actividad menor que la fisiológica, anulando también esta vía del metabolismo energético en la enfermedad (Blass 2001).

El A β también causa desregulación de la homeostasis del calcio, aumentando su concentración intracelular, ya que inactiva las bombas de Ca⁺² de la membrana por lo que este ión entra a través de canales dependientes de voltaje, pero no sale (Wang *et al.* 2013). Además, hay evidencias que prueban que proteínas clave en la regulación del Ca⁺² como la calmodulina o la calpaína están sobre-expresadas en la EA

(Wang *et al.* 1999). Esta elevada concentración intracelular de Ca^{+2} causa mayor estrés en el retículo endoplasmático y en la mitocondria, llevando a una menor producción de ATP y a un déficit de función del mismo. Finalmente, el péptido A β es capaz de interactuar con iones metálicos reducidos (Cu, Zn, Fe) y unirlos a su estructura, afectando la actividad de éstos que está muy implicada en la funcionalidad neuronal (Zhao y Zhao 2013, Carrillo-Mora *et al.* 2014).

Todos estos procesos llevan a la apoptosis de la célula mediada por la ruta de las caspasas que culmina con la liberación del citocromo C por parte de la mitocondria al espacio intracelular (Alberts *et al.* 2008; Lloret *et al.* 2008). Curiosamente, se ha visto que la exposición de neuronas en cultivo a A β induce la cascada apoptótica y aumenta la expresión de p53, Bax y Par-4 (Zhang *et al.* 2002).

Un aspecto del metabolismo que todavía no ha sido mencionado, pero que es de especial relevancia, es el metabolismo lipídico, especialmente el metabolismo del colesterol. El cerebro es un órgano rico en colesterol (Hirsch-Reinshagen *et al.* 2009) y a nivel celular este lípido se localiza formando parte de las membranas celulares y, de forma especial, en las vainas de mielina. Casi todo el colesterol del cerebro está sintetizado *in situ*, puesto que no puede cruzar la BHE desde la circulación periférica. Sin embargo, dada la incapacidad de las células nerviosas para degradar el colesterol, este es convertido a 24-S-hidroxicolesterol que sí atraviesa la BHE y sale del tejido nervioso.

Numerosos transportadores de la familia de los ABC intervienen en la regulación de la homeostasis del colesterol en todos los tejidos y, entre

ellos, los de las clases ABCA y ABCG son especialmente abundantes en el cerebro. ABCA1 es un transportador que permite la salida de proteínas transportadoras de colesterol y una molécula lipídica a las lipoproteínas (Kanekiyo *et al.* 2014).

Dentro del sistema nervioso central los lípidos en general son transportados por lipoproteínas bioquímicamente similares a las HDL (high density lipoprotein) (Kanekiyo *et al.* 2014), que se conocen como apolipoproteínas. La principal de todas ellas es la Apolipoproteína E o ApoE.

La ApoE se sintetiza principalmente en los astrocitos. Es capaz de unirse a péptidos A β y existen evidencias en la literatura de que puede actuar como chaperona en la polimerización de las placas seniles, pero también tiene un rol en su degradación (Zhong y Weisgraber, 2009). La relación entre ApoE y los transportadores ABCA es uno de los objetivos de muchos proyectos de investigación, puesto que se ha visto que una ApoE con pocos residuos lipídicos unidos es capaz de promover la deposición del A β (Chouraki y Seshadri, 2014).

Son de especial interés los estudios sobre la disposición en RAFTs lipídicos del colesterol. Estos microdominios son lugares donde intervienen múltiples proteínas y se conoce que la β y la γ -secretasa, es decir, la vía amiloidogénica de la APP actúan en estos microdominios. Por su parte la α -secretasa o, vía no amiloidogénica, lo hace fuera de éstos. Por tanto, a mayor colesterol en la membrana celular más se favorece la producción de A β (Hirsch-Reinshagen *et al.* 2009). Según Kanekiyo y colaboradores el alelo 4 de la ApoE promueve

la agregación de A β en las placas seniles, dado que es capaz de interactuar con el péptido. También se ha visto que ApoE4 reduce el aclaramiento extraneuronal del péptido y es capaz de introducir A β en la neurona mediante sus receptores de membrana LDLR (*Low density lipoprotein receptor*) (Kanekiyo *et al.* 2014).

Asimismo se ha visto un incremento en las cantidades de colesterol y ceramidas en cerebros de pacientes de EA respecto a controles (Mattson 2004). En la misma línea, la exposición de neuronas a A β provoca un aumento del colesterol en ellas.

Otro fenómeno patológico relacionado con A β y que se da en la EA es la alteración sináptica. Diferentes estudios describen una reducción de proteínas sinápticas y post sinápticas en pacientes con EA respecto a controles. Además, los oligómeros de A β pueden actuar inhibiendo fenómenos implicados en la plasticidad sináptica como el LTP y promoviendo otros como el LTD (Wang *et al.* 2002; Shankar *et al.* 2008).

El fenómeno conocido como LTP (del inglés, *Long Term Potentiation*), también llamado potenciación a largo plazo en nuestro idioma, es un aumento de la amplitud del potencial de acción excitatorio que se establece entre dos neuronas, tal y como lo definen Purves y colaboradores (Purves *et al.*, 2001). Los mismos autores definen al LTD (*long time depression*) o depresión a largo plazo, como un fenómeno que debilita las conexiones sinápticas reduciendo los potenciales de acción disparados por las neuronas.

La acción del A β sobre la sinapsis es especialmente llamativa ya que las áreas cerebrales en las que hay mayor actividad de LTP son las regiones CA1, CA3 y la zona del giro dentado; todas ellas en el hipocampo. Casualmente, son estas zonas las primeras en ser afectadas por los depósitos amiloides en las fases más tempranas de la enfermedad (Frisoni *et al.* 2010).

d) Tau fosforilada, ovillos neurofibrilares y EA

La otra lesión insignia de la EA son los ovillos neurofibrilares. Éstos están constituidos por filamentos helicoidales dobles, los cuales están compuestos fundamentalmente por la proteína tau y neurofilamentos anormalmente fosforilados, que corresponden a proteínas que forman parte del citoesqueleto neuronal (Alberts *et al.* 2008).

La proteína tau actúa de forma multimérica estabilizando los microtúbulos de las neuronas al formar puentes entre las fibras de tubulina. Principalmente se encuentra en células del tejido nervioso como las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Alberts *et al.* 2008). En la EA esta proteína se hiperfosforila y conduce a un ensamblaje y desensamblaje alterado de los microtúbulos, dando lugar a un bloqueo en el transporte de orgánulos y proteínas en el citoplasma neuronal, en los axones y en las dendritas con su consecuente disfunción y degeneración (Ballard *et al.* 2011). Esto aparece ilustrado en la figura 7.

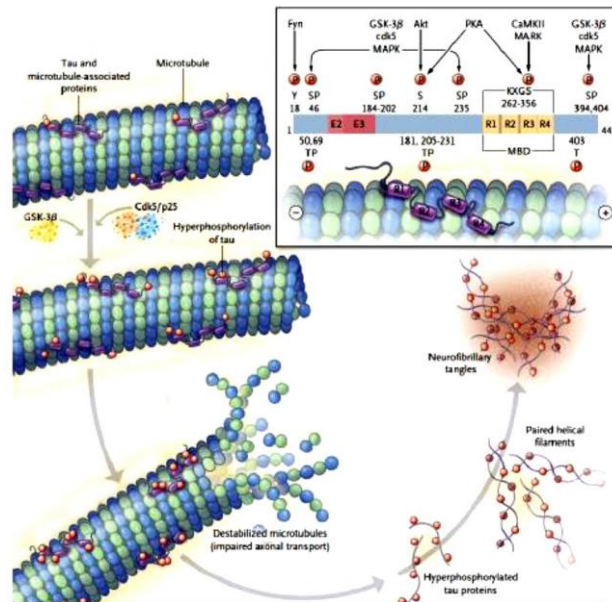


Figura 7: Esquemática de cómo la hiperfosforilación de tau impide el transporte por los microtúbulos y acaba dando lugar a los ovillos neurofibrilares. Fuente: <http://flipper.diff.org/app/items/info/5017>

Existen evidencias que describen filamentos constituidos por tau hiperfosforilada dentro de las neuronas en degeneración que se sitúan cerca de placas amiloides y también en células gliales que no se co-localizan con placas seniles (Alvarez *et al.* 2002).

Por tanto, la proteína tau hiperfosforilada situada en los axones y dendritas forma agregados intraneuronales que, a medida que se entrelazan con filamentos celulares, aumentan de tamaño y generan ovillos que inducen a la apoptosis celular. Estos ovillos que insolubles y se presentan como uno de los principales marcadores tisulares de la enfermedad (Ballard *et al.* 2011).

Otros componentes de los ovillos neurofibrilares son: la proteína Alz-50, neurofilamentos fosforilados, proteínas asociadas a microtúbulos,

vicentina, actina y ubiquitina. También hay moléculas asociadas al ciclo celular como la ciclina B y la quinasa dependiente de ciclina (CDK5) (Duyckaerts *et al.* 2009). Esto último está avalado por trabajos que describen que las neuronas intentan entrar en el ciclo celular en la EA y al no poder completarlo entran en apoptosis (Nagy *et al.* 1998).

Existen proteínas que están estrechamente vinculadas en la conversión de tau a p-tau y que también aparecen alteradas en la EA. Una de ellas es la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β) que es una quinasa que se encuentra implicada en gran variedad de procesos celulares como la apoptosis (Turenne y Price 2001) y la estabilidad del citoesqueleto (Anderton *et al.* 2001).

Estudios recientes ponen de manifiesto que GSK3 β interviene en la hiperfosforilación de la proteína tau (Asuni *et al.* 2006), en el aumento de producción de A β (Phiel *et al.* 2003) y también se relaciona con la disminución de síntesis de acetilcolina (Hooper *et al.* 2008). Se ha encontrado GSK3 β en las neuritas distróficas y en los ovillos neurofibrilares. Además, se ha detectado un aumento de su actividad en la corteza frontal de los sujetos con EA. A nivel periférico se ha encontrado un aumento de la expresión de esta enzima en los linfocitos de sujetos con EA y con deterioro cognitivo leve (Hye *et al.* 2004). Todos estos hallazgos sugieren que la actividad de GSK3 β se encuentra incrementada en la EA.

Otras dos proteínas muy estudiadas en relación a la hiperfosforilación de la tau son la calcineurina y su proteína reguladora (RCAN1). La calcineurina es una fosfatasa de serinas/treoninas, dependiente del

sistema calcio-calmodulina, que está muy expresada en el tejido cerebral y está asociada con procesos como el aprendizaje y la memoria. Se sabe que además media en la regulación de la fosforilación/defosforilación de proteínas, entre ellas la proteína tau (Porta *et al.* 2007).

Volviendo a la lesión anatómo-patológica, está documentado que las regiones con más afectación son hipocampo, corteza entorrinal, neocórtex, amígdala y núcleos del prosencéfalo basal (Duyckaerts *et al.* 2009). La localización de estos ovillos neurofibrilares fue objeto de estudio por Braak y Braak (1995) que describieron un patrón de cómo progresa la localización de los mismos a medida que avanza la enfermedad. Así, ellos describen seis etapas en el desarrollo de los ovillos neurofibrilares que se prolongan en el tiempo más de 50 años (excepto si se trata de una forma familiar de la EA, que será mencionada más adelante) y que están ilustradas en la figura 8.

En las dos primeras etapas (I y II) hay un inicio de daño en la región transentorrinal, localizada entre el hipocampo y el neocórtex, a nivel del lóbulo temporal medio. Esto es coherente con lo observado por (Braak y Del Tredici 2011), ya que ellos describen que los ovillos neurofibrilares se pueden encontrar en sujetos jóvenes de entre 40 y 50 años y cognitivamente sanos.

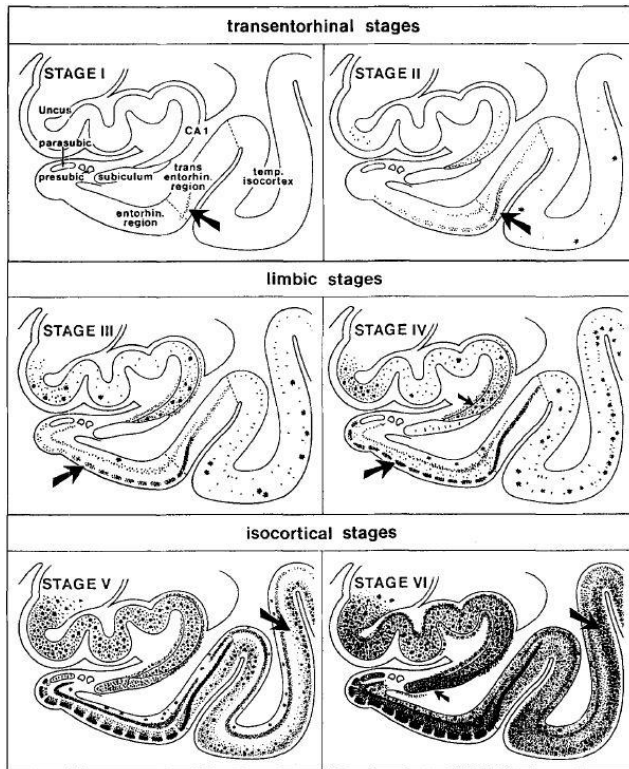


Figura 8: estadios revelados mediante inmunotinción que reflejan las tres etapas de la histopatología de tau. Distinguimos seis fases comprendidas en tres grandes etapas (etapa transentorrinal, etapa límbica y etapa neocortical). Fuente: (Braak y Braak 1995).

Durante las etapas III y IV existen daños propagados a nivel del córtex entorrinal y de la región transentorrinal que llegan a la zona CA1 del hipocampo (Braak y Braak 1995). Existe una importante destrucción de las capas entorrinales responsables de la transmisión de información entre neocorteza e hipocampo. Al final de las etapas se difunde el proceso de destrucción tisular hacia la amígdala.

Finalmente, las etapas V y VI corresponden con los criterios histopatológicos empleados por la NINCDS-ADRDA para diagnosticar

clínicamente a un enfermo de Alzheimer (ver capítulo 4). En ellas se aprecian grandes cantidades de ovillos neurofibrilares en la mayoría de las divisiones del córtex cerebral y es especialmente severo el daño que se puede observar en las áreas asociativas neocorticales, que dejan poco afectadas a las áreas sensoriales primarias y a los campos motores primarios (Braak y Braak 1995).

Para concluir este apartado, hay que destacar que los ovillos tienen una fuerte relación con el deterioro cognitivo y la pérdida de sinapsis, pero resulta destacable el hecho de que una mutación en la proteína tau no produce EA, sino demencia frontotemporal (Spiers-Jones y Hyman 2014).

Dadas todas las evidencias, cabe mencionar que existen dos teorías respecto al origen molecular de la EA. Por un lado, la teoría de la cascada amiloide defiende que la base de la EA es el péptido A β y que las alteraciones de tau, así como la formación de ovillos neurofibrilares, están causados por los efectos tóxicos del A β (Ballard *et al.* 2011). Por otro lado, la teoría defendida por los llamados tauístas defiende que en el centro del comienzo de la EA se encuentra tau.

e) Mecanismos compensadores en la EA

Con todos los conceptos explicados previamente, resulta interesante considerar una visión de conjunto donde se tengan en cuenta todas las rutas moleculares que surgen a partir de las alteraciones que ocurren en la EA.

A lo largo del presente capítulo, podía entenderse de forma sutil que todos los daños mediados por A β siguen la lógica de que una mayor

cantidad de este péptido genera un daño cada vez mayor. Dicho de otra forma, el daño que produce A β se contempla cuantitativamente. Sin embargo, De Strooper y Karran (2016) argumentan que si este proceso fuera únicamente cuantitativo, la disminución de péptido A β y de placas amiloides sería suficiente para detener la progresión de la EA.

Existen estudios inmunológicos que prueban que mediante el uso de anticuerpos es posible reducir la formación de A β y aumentar el aclaramiento del mismo (Janus *et al.* 2000; Morgan *et al.* 2000). Estos estudios se iniciaron en ratones transgénicos APP y en ellos se demostró no sólo que estos anticuerpos cruzan la barrera hematoencefálica (especialmente los anticuerpos de isotipo IgG), sino que son efectivos eliminando péptido A β . Además, en aquellos animales en los que se eliminó A β , hubo una mejora en la función cognitiva (Boche y Nicoll, 2008).

Dados los buenos resultados en los modelos animales, se iniciaron varios estudios clínicos para comprobar si esta estrategia de inmunización podía ser llevada a cabo en pacientes. Los resultados muestran que no hay una recuperación cognitiva sustancial ni tampoco una prevención del deterioro neurológico asociado a la EA. No obstante, hay que destacar que el diseño experimental en pacientes es mucho más complicado que en ratones y que son pocos los ensayos clínicos llevados a cabo hasta ahora, la mayoría de los cuales han tenido que ser interrumpidos por dificultades asociadas al tratamiento. Además, los diferentes ensayos clínicos encontrados en la literatura no son homogéneos, puesto que el título de anticuerpos

usado en los sujetos varía entre los diferentes estudios (Janus *et al.* 2000; Boche y Nicoll, 2008; Hampel *et al.* 2010).

Si tenemos en cuenta que la EA no es sólo una enfermedad de causa única, sino que es multicomponente, el A β ejercería como principal causante y detonador directo de múltiples alteraciones celulares, previamente mencionadas, al igual que de otros tantos procesos fisiológicos que faltan por mencionar. Esto podría otorgarle al A β un papel más cualitativo que cuantitativo, entendiendo, pues, que la sola presencia de A β es causa suficiente para iniciar estos efectos (Karran *et al.* 2011). Esto puede ser concebido así siempre que el A β exista a concentraciones capaces de provocar agregación en placas amiloides y desarrollar paralelamente su citotoxicidad intracelular.

Si el A β tiene solo un papel cualitativo, la EA debería de tener una manifestación más o menos inmediata, mientras que múltiples estudios defienden que la EA es una enfermedad subyacente, que muestra los primeros síntomas casi 20 años después de su inicio real (Jack y Holtzman 2013; Dubois *et al.* 2014). Este retraso en el inicio de la sintomatología puede ser debido a la existencia de mecanismos compensadores que retrasan la manifestación de la enfermedad (Lazarczyk *et al.* 2012).

En relación a esta idea, las respuestas fisiológicas pueden ser dependientes o no de las células afectadas (principalmente nerviosas). Estas respuestas pueden centrarse en mantener la homeostasis principalmente mediante mecanismos pro-inflamatorios o bien en poner en marcha rutas que favorezcan la plasticidad sináptica en las

cuales la astrogli a est a muy implicada (De Strooper y Karran 2016). Cuando el primer mecanismo se vuelve crónico e irreversible, la compensación se ve comprometida y la enfermedad avanza. La cronicidad del proceso inflamatorio es un proceso que, si bien puede estar iniciado por A β (y por tau), no parece ser dependiente de estos marcadores patológicos en su evolución.

Además, la microgli a se activa a causa de los depósitos de A β (Hampel *et al.* 2010) e inicia la vía clásica del complemento. Así, se libera interleuquina-1B y varias citoquinas, que activan inmediatamente a los astrocitos que rodean las placas amiloides los que, a su vez, promueven la cascada inflamatoria previamente mencionada (Selkoe, 2001). También se activan proteínas de la fase aguda, como la α 1-antiquimiotripsina (McGeer y McGeer 1995; Rogers *et al.* 1996).

Cuando la reacción celular y molecular no puede mantener la homeostasis y se ve superada por los procesos patológicos, aparece la fase clínica de la EA (De Strooper y Karran 2016).

Todos estos mecanismos compensadores actúan en la fase preclínica de la enfermedad con la finalidad de mantener la función cognitiva reordenando las redes neuronales y resistiendo las agresiones cerebrales que se producen (Bookheimer *et al.* 2000).

1.3.2. Genética de la EA

Durante los últimos años la investigación también se ha centrado mucho en la etiología de la EA y en sus posibles factores de riesgo. Hoy en día sabemos que existen dos formas de desarrollo de la EA: una forma temprana (con un origen genético, que corresponde apenas a

un 5% de los casos totales) y una forma esporádica (95% de los casos totales (van der Flier *et al.* 2011, Carrillo-Mora *et al.* 2014). Ambas vías confluyen en el aumento del A β como se puede ver en la figura 9.

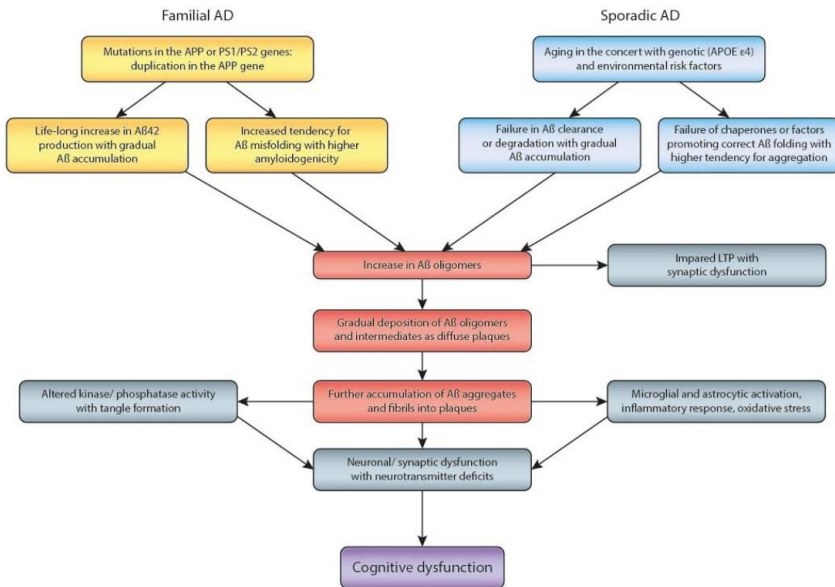


Figura 9: diagrama que explica el desarrollo de la EA según si el sujeto padece la forma familiar o la esporádica. Tomado de Hampel *et al.* (2010).

a) EA genéticamente determinada

La forma de Alzheimer familiar viene dada por tres mutaciones que segregan de forma autosómica dominante y que son capaces de predisponer al individuo a padecer EA. Dos de estas mutaciones ocurren en proteínas componentes de la γ -secretasa que procesa la APP. Dichas proteínas son la presenilina 1 y la presenilina 2. Además, también existen mutaciones en la propia APP que la predisponen a ser procesada por la β -secretasa en lugar de por la α -secretasa (Zhou *et al.* 2011; Song *et al.* 2015; Scheltens *et al.* 2016).

La forma mutada de la APP incrementa los niveles de A β hasta el doble de lo normal, ya que el procesamiento amiloidogénico de esta proteína se encuentra favorecido por mutaciones *missense* (Karch *et al.* 2014). Estas mutaciones se colocan estratégicamente dentro de la proteína, bien en los dos aminoácidos que preceden el lugar de corte de la BACE1, bien poco después del corte de la α -secretasa (Selkoe 2001). Estas alteraciones se encuentran en unas pocas familias en todo el mundo, pero su penetrancia es completa. Asimismo, este procesamiento alterado de la APP que ocurre en la forma familiar de la EA tiene como efecto colateral una disminución del péptido s-APP α , hecho que condiciona los efectos neuroprotectores, haciendo más vulnerables a las neuronas.

Las presenilinas 1 y 2 se localizan en diferentes lugares del genoma. Ambas presenilinas son proteínas componentes de la γ -secretasa junto con la nicastrina, Aph-1 y Pen-2, y se situarían en el centro catalítico de la misma (Selkoe 2001; Karran *et al.* 2011; Scheltens *et al.* 2016). En su forma mutada, estas proteínas causan errores en el procesamiento de la APP y tienden a favorecer la generación de un A β mucho más hidrofóbico, y por tanto, con mayor poder de agregación.

Finalmente, hay que remarcar que la edad de aparición de la EA genética es considerablemente más baja que la EA esporádica, anterior a los 65 años (Chouraki y Seshadri 2014).

b) Factores de riesgo en la EA: ApoE

Existen, además, ciertos factores denominados “de riesgo” que están relacionados con un desarrollo tardío de EA (Jack *et al.* 2010). Uno de

estos factores y, seguramente el de mayor riesgo, es ser portador de una o dos copias del alelo ϵ 4 de la apolipoproteína E (ApoE).

La ApoE es una glicoproteína de 299 aminoácidos y con un peso molecular de aproximadamente 34 kDa que forma parte de varias lipoproteínas como los quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad y lipoproteínas de alta densidad (Strittmatter *et al.* 1993). Su principal función fisiológica es el transporte de colesterol entre las células, vía los diferentes receptores situados en la membrana celular. En el cerebro los astrocitos, la microglía y las células de músculo liso vascular expresan ApoE constitutivamente, mientras que las neuronas solo lo hacen bajo condiciones de estrés (Kanekiyo *et al.* 2014).

Por un lado, a nivel molecular, la ApoE contiene diferentes dominios de interés. En el extremo N-terminal (de 167 aminoácidos) existe un dominio de unión a receptores (residuos 136 al 150). Por otro lado existe un dominio de unión a lípidos que está localizado en el extremo C-terminal y otros dos dominios de unión a heparina. Es notable que el A β es capaz de unirse tanto a los dominios de unión a lípidos como a los dominios de unión a heparina.

El gen de la ApoE se encuentra en el cromosoma 19 y presenta tres alelos (Apo ϵ 2, Apo ϵ 3 y Apo ϵ 4), las principales diferencias entre ellos es el tipo de residuo que se encuentra en las posiciones 112 y 158. Se ha visto que aquellos individuos con una dotación de una o dos copias de ApoE4 tienen un mayor riesgo de desarrollar EA prematuramente (Corder *et al.* 1993). Este hecho sugiere que una alteración en la

homeostasis lipídica podría jugar un papel importante en la EA como se ha discutido previamente.

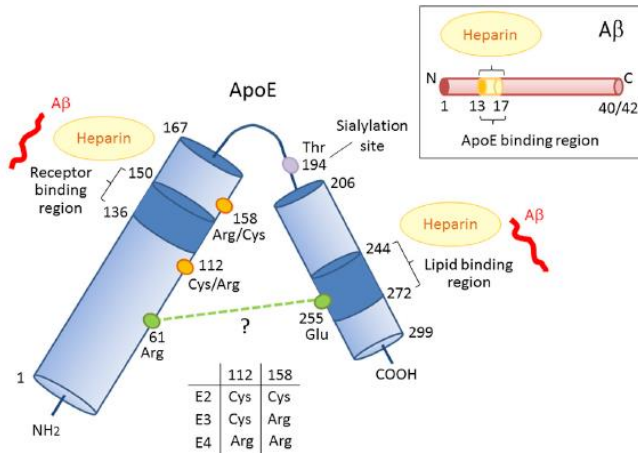


Figura 10: esquematización de la estructura del gen de la ApoE, así como de los diferentes residuos modificados en función de su isoforma y de su interacción con el péptido amiloide. Tomado de Kanekiyo *et al.* (2014).

Como puede verse en la figura 10, la Apo E4 tiene dos argininas en las posiciones 112 y 158. En las isoformas E2 y E3, la Arg 61 forma un puente de hidrógeno con la Thr 194 y el Glu 255 forma un puente salino con la Lys 95, manteniendo los residuos más polares escondidos en el interior de la proteína gracias al plegamiento. Sin embargo, en el caso de la isoforma E4, la Arg 112 forma un puente salino con un residuo más próximo a ella exponiendo la Arg 61 que interacciona con el Glu 255 (en verde), provocando una interacción entre los dos dominios C-terminal y N-terminal (Strittmatter *et al.* 1993; Roses 1996).

Otro aspecto relevante respecto a la biología molecular de la ApoE es que las isoformas E2 y E3 se comportan como proteínas HDL, mientras

que la isoforma E4 tiende a comportarse como LDL y VLDL. De hecho, si se reemplaza el residuo Arg 61 y el Glu 255, la proteína resultante tiende a unir lípidos de alta densidad, como sus alelos homólogos (Kanekiyo *et al.* 2014).

La importancia sobre el tipo de lípidos que transporta la ApoE es que una ApoE con pocos residuos lipídicos es capaz de promover la deposición del A β (Hirsch-Reinshagen *et al.* 2009). La ApoE tiene como función el transporte lipídico entre las células contribuyendo, así, a la renovación de las membranas y a la sinaptogénesis. ApoE 4 es la isoforma menos efectiva en esta función, produciéndose una disminución en los dos procesos, a la par que un aumento de colesterol oxidado en las membranas celulares con la consecuente facilitación de la vía amiloidogénica de la APP (Hirsch-Reinshagen *et al.* 2009).

Dejando a un lado los aspectos moleculares, son numerosos los estudios que refrendan que la presencia de un alelo o dos de ApoE4 incrementan el riesgo de padecer EA. Es más, en los mismos estudios se describe que la presencia de un alelo 4 de ApoE (o dos) rebaja la edad de inicio de la enfermedad (Corder *et al.* 1993, Jack *et al.* 2010, van der Flier *et al.* 2011).

Este hecho se ve muy claro en la figura 11. Entre los homocigotos del alelo 4 de la ApoE, la frecuencia de padecer EA varía entre el 20 y el 90% dependiendo de la edad. La edad de inicio de la sintomatología siendo portador del genotipo 4/4 es de aproximadamente 68 años y la probabilidad de padecer EA es del 20%. A medida que una persona con

este genotipo avanza en la vida, su probabilidad de padecer EA se incrementa hasta el límite del 90% con 84 años.

La presencia de un único alelo de la Apoε4 implica un riesgo del 10% con 68 años de padecer EA y aumenta hasta un 47% con una edad de 84 años. La edad media de inicio de los síntomas es de 76 años. Asimismo, la ausencia de un alelo Apoε4 da una probabilidad del 20% de padecer EA, con una edad de 84 años para el inicio de los síntomas (Corder *et al.* 1993; Roses, 1996). En cuanto a la distribución por sexos, el riesgo de padecer EA sin una copia de Apoε4 es del 11% para hombres y del 14% para mujeres (Karch *et al.* 2014).

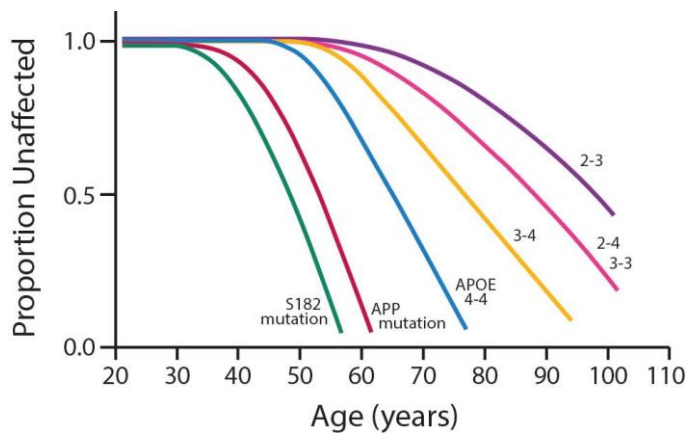


Figura 11: representación de la edad de inicio de los síntomas clínicos de EA aproximada para un sujeto en función del genotipo de ApoE que tenga o de si tiene o no una mutación familiar. Se aprecia que la media de edad para el inicio de la enfermedad en los sujetos ApoE 4/4 es de menos de 70 años, mientras que aquellos con un genotipo ApoE 2/3 es de más de 90 años. Tomada y modificada de Roses (1996).

Según Roses, la deposición de placas de Aβ está relacionada con ApoE4, ya que sujetos con EA homocigotos para este alelo presentan una mayor deposición de Aβ en un tiempo similar a la de sujetos

homocigotos ApoE3 (Roses 1996). Igualmente, en un estudio reciente, se muestra que aquellos sujetos portadores de ApoE 4, además de presentar una mayor carga amiloide a una edad más temprana también presentan un mayor daño neuronal respecto a los sujetos con EA que no portan ninguna copia de ApoE4. Del mismo modo, las MRI realizadas a estos pacientes mostraban una disfunción clínica mucho antes que los no portadores de ApoE4, como se ve en la figura 12 (Jack *et al.* 2010).

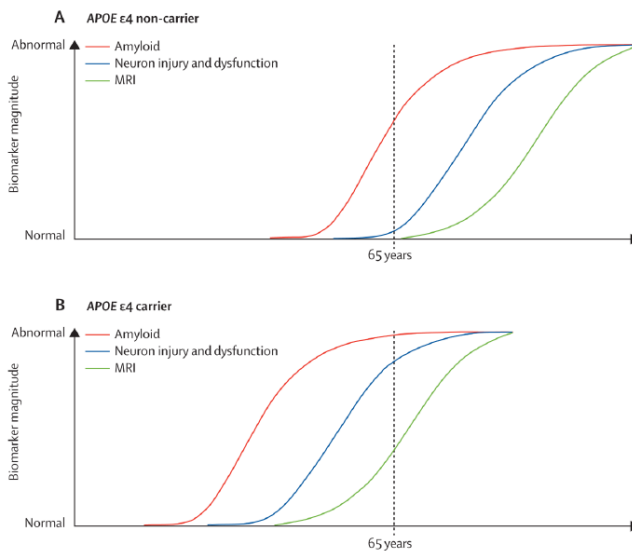


Figura 12: inicio del cuadro clínico de la EA de acuerdo con sujetos portadores del genotipo ApoE 4 y aquellos no portadores de ninguna copia de este alelo. Se observa un desplazamiento hacia la izquierda de la disfunción neuronal y de los daños medidos por imagen en el caso de los portadores. Tomado de Jack *et al.* (2010).

También se ha visto que sujetos con deterioro cognitivo y sujetos con quejas subjetivas de memoria que eran portadores del alelo Apoε4 presentan una mayor reducción del metabolismo cerebral, al igual que una mayor atrofia del lóbulo temporal medial (Ballard *et al.* 2011). Sin

embargo, la supervivencia de los sujetos, que tiene una estrecha relación con el momento de inicio de la enfermedad no parece tener relación con la mayor carga de A β causada por la presencia de ApoE4 (Roses 1996).

En relación con ApoE, resultados previos de nuestro grupo, mostraron que individuos sanos portadores de al menos un alelo 4 de la ApoE ya presentaban una sobreexpresión de proteínas involucradas en la fisiopatología de la EA. Algunas de estas proteínas son la ya mencionada GSK3 β , p-tau y RCAN. También existen otras proteínas sobreexpresadas en estos individuos sanos que se tratarán más adelante como PKR, por ser de interés para la presente tesis doctoral (Badia *et al.* 2013).

c) Otros genes como factores de riesgo de la EA

Gracias a los avances actuales, numerosos estudios GWAS (del inglés, *genome-wide association study*) se han llevado a cabo para detectar genes que en un principio no parecían conectados con una enfermedad concreta. Los GWAS comparan la frecuencia de los alelos presentes en las poblaciones entre casos y controles y dibujan una distribución diferente o no, dependiendo del resultado (Chouraki y Seshadri 2014; Karch *et al.* 2014).

La intensa investigación en el campo de la EA hizo que los GWAS no se hicieran esperar demasiado y múltiples polimorfismos fueron descubiertos en diferentes genes como posibles factores de riesgo de una aparición tardía de esta enfermedad. Polimorfismos en genes como CLU (clusterina), PICALM (proteína ensambladora de clatrina y

transportadora de fosfatidilinositol), CR1 (receptor del complemento 1) o CD33 fueron descubiertos en los primeros GWAS y todos parecen relacionados con formas tardías de EA dada su implicación en el procesamiento de la APP y la eliminación del A β (Chouraki y Seshadri 2014; Karch *et al.* 2014; Song *et al.* 2015).

Recientemente, Ballard y colaboradores propusieron al gen SorL1 como factor de riesgo, ya que su proteína interacciona con APP y es sustrato de la γ -secretasa (Ballard *et al.* 2011). Parece ser que la unión de esta proteína con APP reduce la producción de A β (Alexopoulos *et al.*, 2012). De hecho, la OMS incluye en su informe específico de la EA del año 2013 a muchos de estos genes y detalla si aumentan el riesgo de aparición de la enfermedad tardía o temprana. Algunos de ellos aparecen a continuación en la tabla 2. La lista completa de genes se encuentra en la página web de Alzgene.

Tabla 2: principales genes identificados que pueden contribuir al riesgo de desarrollar EA. Datos recopilados de www.alzgene.org, (Ballard et al. 2011, Karch et al. 2014).

GEN	ALTERACIÓN	EFECTO	MECANISMO
APP	Mutación	Promueve procesamiento amiloidogénico	Autosómica Dominante, Aparición temprana
PRESENILINA 1	Mutación	Procesa APP	Autosómica Dominante, Aparición temprana
PRESENILINA 2	Mutación	Procesa APP	Autosómica Dominante, Aparición temprana
APOE	Diferentes alelos	Rol en aclaramiento/ deposición de A β	Alelo 4 influye en aparición temprana

SORL1	Variante común	Implicado en el tráfico de APP	Influye en aparición temprana
CLU (CLUSTERINA)	Variante común	Rol en aclaramiento de A β	Aparición esporádica y tardía
PICALM	Variante común	Rol en el reciclado de las vesículas sinápticas	Aparición esporádica y tardía
CR1	Variante común	Implicado en aclaramiento de A β	Aparición esporádica y tardía

d) Factores de riesgo no genéticos de la EA

Como ya se ha mencionado a lo largo de la presente introducción, la EA se desarrolla a lo largo de varios años (Bateman *et al* 2012). En su informe de 2013 la OMS da una lista de aquellos factores que pueden influir en un riesgo de desarrollo de EA.

Existen ciertos factores de riesgo, como la edad y los antecedentes familiares, que son capaces de predisponer a una persona a padecer EA. Los accidentes cerebro-vasculares como el ictus isquémico también son considerados un factor de riesgo puesto que la hipoxia y la hipoperfusión son dos eventos importantes en el mantenimiento de la BHE. De hecho se ha visto que cuando la BHE está comprometida a causa de la ausencia de O₂ los procesos que se desencadenan a continuación precipitan la aparición de EA a medio y largo plazo (De Strooper y Karran 2016).

Por un lado, existen ciertos riesgos, modificables en la vida diaria, que predisponen a padecer EA y que se han relacionado con la forma esporádica de la enfermedad mediante varias meta-análisis (Norton *et al.* 2014, de Bruijn *et al.* 2015). Estos factores son la diabetes, la

hipertensión, la obesidad, la vida sedentaria y el tabaco y todos ellos aumentan la probabilidad de padecer EA. Por otro lado, los niveles altos de educación, el ejercicio físico y la dieta saludable (Mattson 2004) son protectores, puesto que disminuyen el riesgo de padecer EA (Batsch y Mittelman 2015).

1.4. Clínica, diagnósticos y primeros tratamientos

1.4.1. Clínica de la EA

La forma clínica más típica de EA es aquella en la que el paciente presenta amnesia. Los principales síntomas de la EA son la pérdida de memoria y el declive intelectual progresivo (Galton *et al.* 2000; Murray *et al.* 2011).

Es especialmente relevante la afectación intensa y muy rápida de la memoria secundaria o a corto plazo y concretamente de la memoria episódica, ya que ambas dependen de la integridad del lóbulo temporal medial y del circuito límbico (R. Alberca 2002). Esta afectación de la memoria a corto plazo impide el aprendizaje, puesto que todo lo aprendido de forma reciente no puede ser retenido. Además, la memoria semántica, la autobiográfica y la atención elemental se van a conservar en los estadios iniciales de la EA (Murray *et al.* 2011).

Otros trastornos cognitivos aparecen, principalmente, afectando al lenguaje (el sujeto tiene dificultades para encontrar palabras a la hora de expresarse y/o para comprender el lenguaje escrito) y a la capacidad de realizar actividades de la vida diaria. Son especialmente relevantes la desorientación (temporal al inicio y espacial más tardía)

y la incapacidad de reconocer objetos (apraxia) y caras (prosopagnosia) (R Alberca, 2002).

También está documentado que los pacientes de EA padecen insomnio, trastornos en la alimentación e incontinencia de los esfínteres. Igualmente padecen trastornos en el ánimo (irritabilidad o ansiedad), hecho que, añadido al resto de síntomas, provocan una alta carga en familiares, cuidadores y en el ámbito asistencial (R. Alberca 2002).

Existe un estado previo a la EA, denominado deterioro cognitivo leve (DCL) en el que los fallos de memoria no repercuten en la vida diaria del sujeto. Es en esta fase donde debe distinguirse si el funcionamiento cognitivo es debido a un envejecimiento normal o a una demencia (Petersen *et al.* 2001). Los criterios diagnósticos establecidos en el año 2001 para esta fase aparecen en el Anexo 1. Hay que destacar en este punto, que recientemente se han propuesto nuevos criterios al hilo de la aparición de los biomarcadores que serán tratados posteriormente (Albert *et al.* 2011).

1.4.2. Criterios diagnósticos clásicos y nuevos criterios

Los criterios diagnósticos empleados por los profesionales para determinar la existencia de EA no tienen un origen común, pese a que la mayoría de éstos emplean las directrices establecidas por la *United States National Institute for Communicative Disorders and Stroke* y *The Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) (Tierney *et al.* 1988). No obstante, hay que destacar que estos

criterios, pese a ser los más empleados por los profesionales, no son únicos debido a la falta de consenso para dicho diagnóstico.

La EA se diagnostica también según los criterios dados por la DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders fourth edition) y la NINCDS-ADRDA. Mediante los criterios del NINCDS-ADRDA se obtiene un diagnóstico de probabilidad de EA que se clasifica en tres posibles estadios: EA probable, EA posible o EA definitiva. Sin embargo no hay un diagnóstico definitivo hasta que se confirma histopatológicamente *post-mortem* (Mckhann *et al.* 1984; Dubois *et al.* 2007).

Los criterios del DSM-IV, aprobados por la American Psychiatric Association (First, 1994), contemplan que una persona padece EA cuando sufre una deficiencia de memoria y un impedimento extra en otro factor cognitivo que interfiere con su actividad diaria. Al igual que los primeros criterios, no se puede confirmar la existencia de EA hasta que no se hace por técnicas histopatológicas.

Ambos criterios aparecen en los Anexos 2 y 3.

A la luz de los avances científicos que han dilucidado la fisiopatología de la EA, al igual que sus aspectos moleculares y estructurales, los criterios de las organizaciones previamente mencionadas muestran ciertas deficiencias a la hora de cubrir específicamente el diagnóstico de EA y de confirmarlo. La especificidad de los criterios diagnósticos de la NINCDS-ADRDA y del DSM-IV tiene un amplio rango, ya que varía entre el 65 y el 96%. La sensibilidad de los mismos también es muy variable y se encuentra entre el 23 y el 86%. Esto se debe a que existen

otras demencias además de la EA (demencia por cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal y demencia vascular) que no son excluidas en estos criterios diagnósticos (Varma *et al.* 1999; Dubois *et al.* 2007).

En un intento de ir más allá de las directrices propuestas por la NINCDS-ADRDA&DSM-IV, Dubois y colaboradores conforman el *International Working Group for New Research Criteria for the Diagnosis of Alzheimer's Disease* (IGW) y revisando estos criterios proponen unos nuevos para diagnosticar la EA (Dubois *et al.* 2007). Esta nueva visión de diagnóstico pretende detectar la EA en etapas tempranas sin que se tenga que identificar primero un síndrome de demencia. Además, los autores basan su revisión en que el conocimiento sobre los mecanismos moleculares de la EA, así como su fisiopatología, está mucho más desarrollado que en el año de publicación de los criterios previos.

La totalidad de los criterios diagnósticos propuestos por Dubois y colaboradores (Dubois *et al.* 2007) aparece a continuación:

1. Criterio principal

a. Fallo de memoria episódica precoz

1. Cambio gradual y progresivo en la memoria al inicio de la enfermedad referida por los propios pacientes o familiares durante un periodo de más de 6 meses.
2. Evidencias objetivas de memoria episódica significativamente dañada mediante diferentes test.

3. El daño de la memoria episódica puede presentarse de forma aislada o asociada con otros cambios cognitivos al comienzo de la EA o a medida que esta avanza.

2. Criterios de apoyo

- a. Atrofia de estructuras temporales mesiales mediante imágenes de resonancia magnética (MRI).
- b. Anormalidad de biomarcadores en LCR
- c. Patrón metabólico específico que se evidencia mediante métodos de neuroimagen (PET)
- d. Mutaciones genéticas familiares autosómicas dominantes en los cromosomas 21, 14 y 1.

3. Criterios de exclusión

- a. Aparición repentina o precoz de demencia.
- b. Aparición de lesiones neurológicas como hemiparesia, pérdida de sensibilidad, pérdida de campo visual, alteraciones en la marcha o convulsiones.
- c. Presencia de otros trastornos que puedan justificar la pérdida de memoria o síntomas relacionados como depresión, enfermedad cerebrovascular, enfermedades metabólicas, demencia por cuerpos de Lewy u otro tipo de demencias no EA.

Apoyan al diagnóstico pruebas más funcionales que reflejan el metabolismo de las distintas áreas cerebrales como son el SPECT y el PET cerebral, que miden la cantidad de flujo sanguíneo o el consumo

de glucosa respectivamente, siendo sugestivo de EA un patrón de hipocaptación parieto-temporal (Craig-Schapiro *et al.* 2009).

Es también importante la información que pueda obtenerse mediante imágenes de resonancia magnética (MRI) que fundamentalmente se centra en observar la integridad y/o la pérdida de volumen del hipocampo o la corteza entorrinal entre otras estructuras temporales mesiales en pacientes con EA (Frisoni *et al.* 2010).

Asimismo, la anormalidad de ciertos marcadores biológicos en LCR, como el A β y tau también apoyan al diagnóstico de EA. El uso de biomarcadores en LCR se emplea hoy en día para identificar la EA cuando se quiere confirmar el diagnóstico clínico (Jack *et al.* 2010). Además, estos biomarcadores ayudan al diagnóstico prematuro de la enfermedad, así como a diferenciarla de otras demencias (Craig-Schapiro *et al.* 2009).

La relevancia de los criterios propuestos por Dubois, Feldman *et al.* (2007) reside en que por primera vez se incluyen en el diagnóstico clínico de la EA criterios basados en los avances fisiológicos y biológicos de los últimos años. De hecho, aunque el diagnóstico principal de la EA es obviamente clínico, el papel diagnóstico de la dimensión biológica de la enfermedad cobra plena importancia y se acuña un término muy importante en la clínica de la EA que es el concepto de biomarcador.

Así, por primera vez se propone que la EA no empieza en el momento en el que se manifiestan los primeros síntomas, sino varios años antes, mientras las estructuras del lóbulo temporal medial empiezan a ser afectadas. De la misma manera, y dado el incremento en la búsqueda

de un fármaco que pueda funcionar en la EA, los autores sostienen que un diagnóstico precoz de la misma puede ser el mejor diagnóstico posible a la hora de tratar a un sujeto, ya que cuando la demencia está demasiado avanzada (la carga de A β cerebral y la hiperfosforilación de tau es mucho mayor) el tratamiento no es eficaz (Dubois *et al.* 2007).

Los mismos autores plantean que el estado previo a la EA, conocido como DCL, y los criterios diagnósticos para detectarlo en un sujeto ocupan un rango demasiado heterogéneo. Por tanto, dentro de un diagnóstico DCL pueden incluirse sujetos que no evolucionen a una EA. De hecho, la sensibilidad y la especificidad de dichos criterios varían (respectivamente 47-88% y 37-90%) (Dubois *et al.* 2007). Es por ello por lo que se acuñan nuevos nombres para denominar las diferentes fases de la EA.

De esta forma, la EA preclínica se describe como el periodo asintomático en el que se dan las primeras lesiones cerebrales y termina cuando aparecen los primeros síntomas de quejas subjetivas de memoria en aquellos pacientes que *a posteriori* desarrollan una EA (Dubois *et al.* 2010). Asimismo la EA prodrómica se describe como un periodo sintomático, donde el sujeto ya sufre de los primeros fallos de memoria episódica, pero cuyos síntomas no son lo suficientemente severos como para catalogar el diagnóstico como demencia. Además, los autores señalan que la EA prodrómica se incluye dentro del estado DCL, aunque este concepto no se ha instalado completamente en el lenguaje técnico. Después de estas dos fases, el diagnóstico de demencia tipo EA se da cuando el paciente desarrolla toda la

sintomatología propia de la enfermedad (Dubois *et al.* 2010, Dubois *et al.* 2014).

Los nuevos criterios diagnósticos propuestos por Dubois y colaboradores (Dubois *et al.* 2007) establecen un fenotipo clínico muy específico de la EA y no emplean el diagnóstico de exclusión utilizado hasta el momento. De esta forma, proponen como criterio diagnóstico principal el fallo de memoria episódica que aparece de forma precoz y añaden un número de pruebas de apoyo señalando que cuando una de ellas sea positiva el diagnóstico será de EA probable, a falta de un criterio totalmente específico de EA. Cabe destacar, que las formas atípicas de EA fueron introducidas *a posteriori* en los siguientes trabajos del IGW.

Por su lado, después de la publicación de los nuevos criterios de Dubois, Feldman *et al.* (2007), el *National Institute on Aging* americano (NIA) y la AA revisaron los criterios diagnósticos de la NINCDS-ADRDA, concluyendo que el uso de los biomarcadores tiene una dimensión muy relevante en clínica (Jack *et al.* 2011; McKhann *et al.* 2011; Sperling *et al.* 2011). En dichos trabajos, previamente a especificar los diagnósticos de la EA, los autores definen los criterios centrales de demencia que incluyen otros tipos de deterioros cognitivos además de la EA. Además, destacan que todos los pacientes que cumplan los criterios para la EA probable propuestos por la NINCDS-ADRDA, también cumplen los criterios para la EA probable que ellos proponen.

Del mismo modo, la NIA-AA aporta nuevos criterios diagnósticos para DCL (Albert *et al.* 2011). Es necesario destacar que un diagnóstico de

DCL es muy complejo y que un individuo tiene que ser evaluado varias veces antes de poder emitir un diagnóstico y, aún en ese caso, este no será totalmente sólido. También hay que tener en cuenta que el deterioro cognitivo de un sujeto debe de ser corroborado por un informador (familiar cercano) o por la historia clínica si la primera opción no fuese posible.

Los criterios NIA-AA de ambas patologías aparecen en los Anexos 4 y 5 y en ellos puede observarse un cambio de dirección hacia la implantación de los biomarcadores.

Ambos grupos (NIA-AA y el IWG) exponen en un trabajo en común diferentes aspectos sobre la patología, el diagnóstico clínico de la EA y el uso de biomarcadores; cuyo objetivo es asentar y aclarar los conceptos de biomarcadores, formular recomendaciones para su uso clínico, así como reforzar la idea de que la EA es una enfermedad de inicio asintomático y que tiene una etapa asintomática (Dubois *et al.* 2016).

Dada la relevancia de los biomarcadores en la presente tesis doctoral, estos se tratarán de forma exhaustiva en el siguiente capítulo.

1.4.3. Aproximaciones terapéuticas

Dada la gravedad de la EA, la búsqueda de un fármaco que pueda revertir o paliar los efectos de esta condición es un hecho que todavía hoy en día sigue vigente. La EA es una enfermedad crónica y, como tal, tiene una red muy amplia de aspectos moleculares que pueden ser diana de diversos fármacos. Sin embargo es precisamente su amplitud la que hace que encontrar un tratamiento contra ella sea tan

complicado (Hardy y Selkoe 2002). Desde que se inició la profundización en los aspectos más moleculares de la EA, algunos fármacos han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) Americana y por la EMA (*European Medicines Agency*) Europea para su utilización en pacientes con EA avanzada.

En las últimas décadas el tratamiento contra la EA se centraba en incrementar los niveles de los neurotransmisores que resultan afectados en la enfermedad y que desaparecen inexorablemente. Todos estos fármacos se basan principalmente en la transmisión colinérgica, que está comprometida a causa de la pérdida progresiva de los receptores nicotínicos a lo largo del progreso de la EA (Schelterns y Feldman, 2003).

Se ha visto que los inhibidores de la colinesterasa tienen efectos beneficiosos ante los diferentes síntomas de la EA. Algunos de los fármacos anticolinesterásicos aprobados por la FDA son la tacrina [fármaco agonista colinérgico retirado del mercado por su elevada hepatotoxicidad (Qizilbash *et al.* 1998)], el donepezilo [empleado como tratamiento paliativo al inicio de los síntomas de la EA pero con efectos secundarios gastrointestinales (Birks y Harvey 2003)], la rivastigmina (también aprobada por la EMA) y la galantamina (Schelterns y Feldman 2003). No obstante, el beneficio terapéutico de estos fármacos es escaso en pacientes con EA avanzado y, además, provocan una gran cantidad de efectos secundarios. Por lo tanto, no son fármacos ideales para su uso, aunque son los que más se emplean hoy en día por falta de alternativa.

Otro fármaco de diferente mecanismo molecular aprobado por la EMA es la memantina (Schelterns y Feldman 2003). Este fármaco se basa en el mecanismo del glutamato como neurotransmisor excitatorio. Los receptores NMDA activados permiten la entrada de calcio al interior de las neuronas como parte del LTP explicado en anteriores capítulos. En la patogénesis de la EA existe un incremento de glutamato extracelular que provoca una activación excesiva de los receptores NMDA y, con ello, un mayor influjo de Ca^{+2} al interior de la célula, provocando su apoptosis mediante diversas rutas (Fuchsberguer *et al.* 2016). Así, la memantina es un antagonista del NMDA: disminuye su activación y puede proteger a las neuronas de esta excitotoxicidad mediada por el glutamato (Reisberg *et al.* 2003). No obstante, se ha visto que el efecto de la memantina reduce el deterioro clínico en la EA muy avanzada, pero, obviamente, no es capaz de revertir sus efectos.

Diversas aproximaciones centradas en múltiples dianas moleculares han intentado reducir los devastadores efectos de la EA. Por ejemplo existen ensayos clínicos que intentan inhibir las β y γ -secretasas. Especialmente relevante es un ensayo clínico que llegó hasta fase III con un inhibidor de la γ -secretasa llamado *Semagacestat* y que no superó dicha fase, puesto que su inhibición de la vía Notch provocaba pérdidas de peso, vómitos y problemas cutáneos que hicieron empeorar a los sujetos con EA enrolados en el estudio (Doody *et al.* 2013; De Strooper 2014).

Otros estudios se centran en la búsqueda de una vacuna contra el $\text{A}\beta$, terapias centradas en evitar la agregación del $\text{A}\beta$. Otros, tienen como

objetivo desarrollar nuevos fármacos antiinflamatorios. Otros, emplean quelantes de metales como el Cu^+ y el Zn^+ como estrategia farmacológica. También hay ensayos en los que se intenta reducir el colesterol, especialmente el oxidado (Schelterns y Feldman 2003, Gillette-Guyonnet *et al.* 2013).

Hoy en día, gracias a los avances en la inmunoterapia, los fármacos en los que mas esperanzas hay puestas son los anticuerpos específicos contra $\text{A}\beta$ o tau (Hampel *et al.* 2010). Entre ellos destaca el *Aducanumab*, un anticuerpo monoclonal IgG1 que actualmente se encuentra en fase III (<https://clinicaltrials.gov> código 221AD301). El *Aducanumab* parece unirse al $\text{A}\beta$ agregado en las placas amiloides, situado en el parénquima cerebral, y es capaz de iniciar una cascada para su degradación de una forma dependiente de la dosis y del tiempo de administración. De hecho, como defienden Sevigny y colaboradores (Sevigny *et al.* 2016), dosis mensuales intravenosas de este anticuerpo en pacientes con EA reducen la carga amiloide cerebral.

A la vista de que cada uno de estos fármacos se centran en una única ruta molecular y de que la EA es una enfermedad multifactorial, existen algunas aproximaciones basadas exclusivamente en la nutrición y en el suplemento vitamínico que tiene como objetivo reducir el avance de la EA adaptando ciertos hábitos de efecto sistémico. Diferentes estudios (Gillette-Guyonne *et al.* 2013; Bredesen 2014; Nelson y Tabet 2015) proponen que el ejercicio físico moderado acompañado de una dieta muy estricta, con suplementos de ciertas vitaminas (B12, B6, E, D), el uso de antioxidantes naturales (como el

resveratrol y algún derivado de la soja) y el complemento con *Ginkgo Biloba* y curcumina como antiinflamatorios naturales permite detener el deterioro cognitivo y mejorar las condiciones de vida.

Cabe destacar que muchas de las aproximaciones más novedosas solo son posibles si el diagnóstico de la EA se realiza de forma prematura, por lo que los criterios de Dubois y colaboradores previamente mencionados adquieren una relevancia mayor a la hora de buscar una aproximación terapéutica para combatir la EA.

1.5. Biomarcadores

Los nuevos criterios propuestos por Dubois y colaboradores (Dubois *et al.* 2007) introducen el concepto de biomarcador en la EA. Entendemos como biomarcador específico de la EA a aquella variable fisiológica, bioquímica o incluso anatómica que puede ser medida *in vivo* y que varía a lo largo del progreso de la EA, caracterizando los cambios patológicos subyacentes a la enfermedad.

El uso de biomarcadores específicos permite el diagnóstico de la EA con mayor eficacia e incluso posibilita su determinación antes de que la enfermedad inicie los síntomas. De hecho, la idea que se afianza hoy en día es que los principales procesos fisiopatológicos que derivan en la EA tienen su origen mucho antes de que se realice el diagnóstico de EA prodrómica, es decir, cuando el sujeto es normal cognitivamente (Dubois *et al.* 2016).

Los biomarcadores más estudiados en la EA son cinco y se dividen a continuación. Cada uno de ellos es un indicador de un proceso fisiopatológico concreto, por lo que es importante observar el

conjunto de los mismos. Además, todos ellos se correlacionan con la severidad de la enfermedad.

1.5.1. Diagnóstico mediante imagen

a) Depósitos de A β mediante PET

Se puede estimar la agregación del A β y su deposición mediante la tomografía por emisión de positrones o PET (del inglés, *Positron Emission Tomography*), empleando el compuesto B de Pittsburg (PiB) que se une a las placas ya agregadas de A β en el tejido. De hecho, este compuesto se emplea como una medida directa de la carga de placas amiloides (Lockhart *et al.* 2007). Hay que destacar que este compuesto solo se une al péptido no soluble ya depositado en placas amiloides (Dubois *et al.* 2010; Jack *et al.* 2010)

De hecho, el uso del compuesto PiB permite la visualización *in vivo* de la disposición física del A β (Ballard *et al.* 2011). Una mayor retención de este compuesto implica una mayor cantidad de A β depositado en el parénquima cerebral. A estos sujetos que retienen una mayor cantidad de PiB se les denomina “PiB positivos”, mientras que los que no retienen dicho compuesto son categorizados como “PiB negativos” (Hampel *et al.* 2010). Así, dado que el A β se deposita en momentos muy tempranos de la enfermedad, el uso de PiB-PET puede funcionar como biomarcador temprano de la enfermedad.

De hecho, la conversión de un sujeto PiB negativo en PiB positivo es marcadora de un riesgo de desarrollo de EA en un futuro (Mintun *et al.* 2006). Además, la carga cerebral de placas amiloides, visibles

mediante PiB-PET, está inversamente relacionada con los niveles de A β medidos en LCR (Fagan *et al.* 2006).

No obstante, la estimación del riesgo que tiene un sujeto de desarrollar EA no debe basarse exclusivamente en el hecho de ser PiB positivo o no, puesto que no es despreciable el hecho de que la intensidad de la señal de fluorescencia presente puede subdividir la población de PiB positivos en “PiB de elevada intensidad y PiB de baja intensidad” (Lazarczyk *et al.* 2012, Villemagne *et al.* 2013). Así, individuos con una baja intensidad de fluorescencia presentarían un menor riesgo de desarrollar una demencia tipo EA que aquellos con una mayor intensidad de señal, superando ambos grupos el umbral positivo para esta prueba.

Tampoco es despreciable el hecho de que el factor tiempo es relevante en la acumulación de placas amiloides. De esta forma, aquellos sujetos que presentaran una variación rápida desde un estado PiB bajo a un estado PiB de alta intensidad tendrían un riesgo mucho mayor de desarrollar una demencia tipo EA que aquellos que no presentan tal variación (Craig-Schapiro *et al.* 2009).

Finalmente, algunos estudios ponen de manifiesto que existen personas cognitivamente normales que dan una señal PiB positiva. Es por ello por lo que el uso del PiB se emplea cuando hay otras evidencias clínicas de demencia (Fagan *et al.* 2006, Dubois *et al.* 2016).

b) FDG PET

La técnica PET también se emplea para estimar daño neuronal, midiendo la incorporación de fluorodesoxiglucosa (FDG) (2-desoxi-

2[¹⁸F] fluoro-D-glucosa) como estimador del metabolismo de la glucosa en el tejido nervioso (Schwartz, Smith *et al.* 1979). Esto se considera también estimador del metabolismo cerebral y de los niveles de actividad sináptica. Así, la captación de FDG se relaciona inversamente con el deterioro cognitivo (Dubois *et al.* 2010).

De hecho, en enfermos de EA se detecta una menor entrada de FDG en el cerebro que refleja una menor toma de glucosa y por ende, un menor metabolismo que correlaciona con un mayor daño neuronal (Dubois *et al.* 2014). Mediante la FDG-PET se puede detectar un patrón de distribución específico del metabolismo cerebral (Fiandaca *et al.* 2014). Una reducción de captación de FDG a nivel bilateral en las regiones temporales y parietales y de forma especial en el córtex cingular es el atributo más descrito para sujetos que padecen de EA (Ballard *et al.* 2011, Scheltens *et al.* 2016).

Actualmente, el FDG-PET se emplea como marcador de progresión clínica en la EA, puesto que diferentes estudios, uno llevado por la ADNI (*Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative*) (Toledo *et al.* 2013) y otro independiente (Ewers *et al.* 2014), indican que la captación de FDG reducida en sujetos mayores predice la progresión clínica de la enfermedad con sensibilidad y especificidad superiores al 80%.

c) Imagen de MRI

La atrofia de las estructuras temporales mesiales, causada por la pérdida de dendritas y la muerte de las neuronas de esta zona, puede ser medida en pacientes mediante MRI estructural (Ballard *et al.* 2011). De hecho, muchos estudios defienden este marcador como

medio fiable de diagnóstico (Frisoni *et al.* 2010) y como marcador de neurodegeneración (Fiandaca *et al.* 2014; Scheltens *et al.* 2016).

Concretamente, la MRI estructural es la técnica de neuroimagen más empleada para observar la integridad anatómica de la vascularización del tejido nervioso y la del parénquima cerebral. Tanto es así, que es una técnica incluida tanto en los criterios de Dubois (Dubois *et al.* 2007), como en los de la NIA-AA (Jack *et al.* 2011). Su especificidad y sensibilidad como marcador de EA son superiores al 85% (Ballard *et al.* 2011).

El primer lugar donde se observa claramente neurodegeneración es en la región hipocampal. Concretamente, esto ocurre en estructuras relevantes como el córtex entorrinal y la región CA1, hecho que coincide con los primeros depósitos de tau según las fases definidas por Braak (Braak y Braak 1995). Además, las pérdidas de estas estructuras correlacionan con la clínica inicial de la EA prodrómica (Frisoni *et al.* 2010). A medida que la EA avanza, la neurodegeneración se expande hacia estructuras como el neocórtex frontal, temporal y parietal, por lo que es posible emplear la MRI como biomarcador de seguimiento para observar la evolución de la enfermedad.

Respecto a este último hecho, algunos autores afirman que una ligera disminución del grosor de ciertas regiones neocorticales se asocia a un factor de riesgo para el desarrollo de EA, puesto que pueden preceder a la atrofia del hipocampo (Dickerson *et al.* 2011, Sabuncu *et al.* 2011).

Los principales inconvenientes de la MRI no son derivados de la técnica y ya se han mencionado aquellas enfermedades, también demencias,

cuya diferenciación clínica de la EA es complicada. Sujetos con enfermedades como la demencia por cuerpos de Lewy o las demencias frontotemporales son difíciles de distinguir mediante esta técnica de aquellos sujetos que padecen EA preclínica (Scheltens *et al.* 2002). Es por ello que la MRI no es una técnica que pueda usarse en exclusiva como criterio absoluto para diagnosticar una EA de forma precoz, por lo que siempre va a tener que ser acompañada de otras pruebas.

No obstante, dados los prometedores resultados de esta técnica, existen estudios multicéntricos como el ADNI que investigan si nuevas técnicas de imagen basadas en la MRI como el mapeo tridimensional del hipocampo pueden ser biomarcadores específicos de la EA (Ballard *et al.* 2011).

1.5.2. Biomarcadores en líquido cefalorraquídeo

El uso de biomarcadores en LCR está plenamente aceptado y respaldado por numerosos estudios y se emplea hoy en día en la práctica clínica diaria para identificar la EA (Craig-Schapiro *et al.* 2009, Hampel *et al.* 2010, Jack *et al.* 2010). Además, estos biomarcadores ayudan al diagnóstico prematuro de la enfermedad, así como a diferenciarla de otras demencias. Los compuestos que se miden en LCR son las dos proteínas patológicas más importantes en la EA: A β , tau total y su forma patológica (tau-p).

a) A β

Los niveles de A β en LCR reflejan los procesos patogénicos de agregación de este péptido en placas amiloides. Así, una baja concentración de A β en LCR implica una mayor cantidad de A β

depositado en placas amiloides, por ello A β está disminuido en LCR en los individuos que padecen EA respecto a sujetos sanos (Craig-Schapiro *et al.* 2009, Hampel *et al.* 2010).

En fases tempranas de la EA, los niveles de A β ya aparecen alterados en el LCR. De hecho existen estudios que documentan que el A β empieza a mostrar niveles anormales varios años antes de la aparición de las primeras quejas subjetivas de memoria (Jack y Holtzman 2013), siendo, por tanto, el marcador más precoz que existe hoy en día (Dubois *et al.* 2016).

La combinación de los niveles de A β en LCR con otros criterios diagnósticos como el uso de PiB-PET muestra los niveles de agregación del A β en placas amiloides de una forma mucho más fiable. También se ha visto que los resultados de A β en LCR correlacionan con cambios en el grosor de estructuras anatómicas cerebrales reveladas mediante MRI funcional (Dubois *et al.* 2016). Asimismo, se ha visto que la combinación de A β , tau y p-tau medidas en LCR mejora la fiabilidad diagnóstica y al diagnóstico diferencial de otras demencias (Ballard *et al.* 2011; Lazarczyk *et al.* 2012).

Es relevante un estudio realizado por Kang y colaboradores en el que se demostraba que la producción de A β sigue un ritmo circadiano (Kang *et al.* 2009). En este estudio, se defiende que en el estado de vigilia se produce mayor cantidad de A β que durante el sueño. Esto puede sugerir que periodos largos de falta de sueño tengan un impacto en el desarrollo de EA.

b) Tau y p-tau

Tau y p-tau se consideran también dos biomarcadores en LCR de la EA. De hecho, los niveles de tau total en LCR son un reflejo de la patogenicidad de tau en la corteza cerebral y permiten hacer una aproximación del daño neuronal. Así, muchos estudios prueban que tau aumenta en LCR en aquellos sujetos que padecen una EA frente a sujetos normales al igual que lo hace p-tau (Dubois *et al.* 2007; Craig-Schapiro *et al.* 2009; Hampel *et al.* 2010). Ambos marcadores son indicadores de neurodegeneración y apoptosis neuronal.

A pesar de que p-tau debería de ser un indicador más específico de la EA que la tau total, se ha visto que ambas proteínas se comportan de forma muy similar en enfermos de EA. Tanto los incrementos de los niveles de tau como los de p-tau en LCR se asocian a una mayor carga de ovillos neurofibrilares. Al igual que en el caso del A β , en fases tempranas de la EA los niveles de tau y p-tau están ya alterados, siendo biomarcadores precoces de la aparición de la enfermedad. Es especialmente importante la relación p-tau/tau a la hora de discriminar la EA de otras demencias (Riemenschneider *et al.* 2003).

No obstante, el principal problema que presenta el empleo de este biomarcador es la pérdida de especificidad en el caso de que un sujeto presente una taupatía primaria, diferente a la EA que es considerada una taupatía secundaria (Dickson, 2009). Las taupatías son enfermedades neurodegenerativas en las que la proteína tau se agrega de forma muy similar a lo que ocurre en la EA y, por ello, es también detectada en LCR.

1.5.3. Visión global y dinámica de los biomarcadores.

Los biomarcadores aportan una visión nueva sobre la totalidad de la EA y rompen con la visión estática de la EA del todo o nada. Según esta perspectiva una persona puede estar afectada por la enfermedad y presentar una demencia avanzada o bien estar cognitivamente normal y no estar afectada. Hoy en día, la visión de la EA es gradual y dinámica, de modo que la enfermedad empieza sin hacer ruido muchos años antes de la aparición de los síntomas clínicos y avanza progresivamente hasta comprometer la cognición de la persona. En esta evolución, que puede durar años, los biomarcadores cambian y anticipan la demencia antes de que esta ocurra.

Los cinco principales biomarcadores descritos previamente aportan diferente información sobre el momento de la EA en la que se encuentra un sujeto. Jack y colaboradores realizan un modelo en el que contempla los cinco biomarcadores y su evolución a lo largo del tiempo. Asimismo, distinguen entre dos grandes grupos de biomarcadores: aquellos que indican neurodegeneración y aquellos indicadores del depósito de placas de A β (tabla 3) (Jack *et al.* 2010). Además, indican que los biomarcadores no aumentan todos a la vez, sino que lo hacen de manera ordenada a lo largo del tiempo, concepto que refuerzan en su último trabajo Dubois y colaboradores (Dubois *et al.* 2016).

Tabla 3: división de los biomarcadores en función de aquello que indican. Fuente: (Jack *et al.* 2010).

Biomarcadores de depósito de placas de Aβ	Biomarcadores de neurodegeneración
Disminución de A β en LCR	Aumento de tau y p-tau en LCR
PiB-PET	Hipometabolismo de la glucosa por FDG-PET
	Atrofia cerebral mediante MRI estructural

Este modelo correlaciona los diferentes estadios de la enfermedad con los distintos biomarcadores de la EA y ofrece una visión dinámica de la patología, además de demostrar que, realmente, la EA se inicia mucho tiempo antes de la aparición de síntomas clínicos en el sujeto. El modelo presenta tres fases a lo largo del continuo de la enfermedad, primero la fase asintomática, después la fase DCL (que tiene una mayor aceptación clínica que la recientemente acuñada “EA prodrómica”) y, por último, la fase de demencia tipo EA. Podemos ver la representación gráfica del modelo en la figura 13.

Como se observa en esta figura, los primeros biomarcadores en volverse anormales son aquellos que marcan depósito de placas de A β y que, de hecho, se alteran mucho antes de la fase de demencia e incluso alcanzan su máximo al inicio de la fase DCL, cuando el sujeto empieza a experimentar deterioro cognitivo. Otros aspectos relevantes sobre los biomarcadores de A β son que se afectan antes

que los biomarcadores de neurodegeneración y que no son suficientes para provocar un fenotipo clínico de EA. Además, es relevante recordar en este punto que un PiB positivo se asocia a una baja concentración de A β en LCR (Fagan *et al.* 2006).

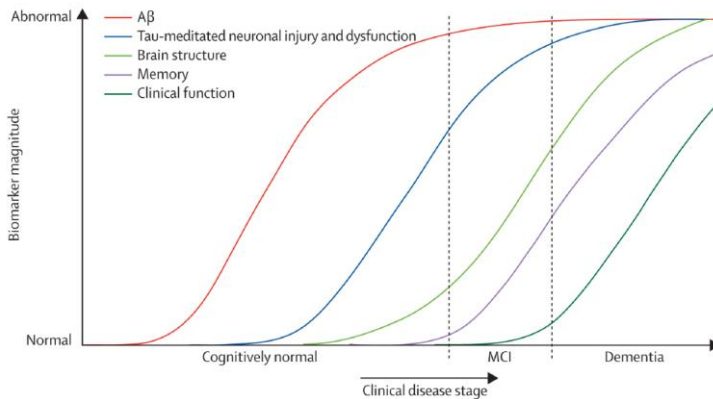


Figura 13: representación gráfica del modelo dinámico de los biomarcadores. En el eje vertical vemos el grado de anormalidad de cada biomarcador mientras que el eje horizontal representa la progresión a lo largo de los diferentes estadios clínicos. Como vemos en la figura, la anormalidad en los biomarcadores precede a los síntomas clínicos. Fuente: (Jack *et al.* 2010).

Los biomarcadores indicativos del daño neuronal y disfunción sináptica (fundamentalmente el FDG-PET y los niveles en LCR de tau y p-tau) serían los siguientes en volverse positivos y también lo harían antes de la fase de DCL. Finalmente, en estadios más avanzados de la enfermedad aparecerían los cambios en la estructura cerebral (fundamentalmente atrofia y disminución del volumen hipocampal, todo ello detectado por MRI) que coincidirían en el tiempo con el inicio de la fase DCL. De hecho, Frisoni y colaboradores defienden que los marcadores estructurales tomados mediante imagen son más

sensibles a la evolución de la enfermedad que aquellos basados en el depósito de A β como la estimación de concentración de éste en LCR (Frisoni *et al.* 2010).

Se ha demostrado que los síntomas cognitivos tienen una relación más directa con los biomarcadores de neurodegeneración que con aquellos que indican deposición de A β . De hecho, estudios post-mortem exponen que es el grado de atrofia cerebral el indicador patológico más estrechamente relacionado con el deterioro cognitivo (Craig-Schapiro *et al.* 2009).

Un último concepto que postula este modelo es la existencia de una fase de latencia de duración variable entre la formación de placas amiloides y el inicio de la cascada neurodegenerativa. Esto se debería a diferencias en el procesado de A β , a la capacidad de resistencia a los daños patológicos derivados de la toxicidad del A β por parte de las células y a los mecanismos de compensación (Karran *et al.* 2011).

Un nuevo modelo sobre el comportamiento de los biomarcadores (Jack y Holtzman 2013) tiene en cuenta el riesgo de desarrollar la EA en diferentes momentos ya que el tiempo de evolución en los síntomas varía entre los diferentes individuos. El modelo aparece doblemente en las figuras 14 y 15 por razones que serán justificadas a continuación.

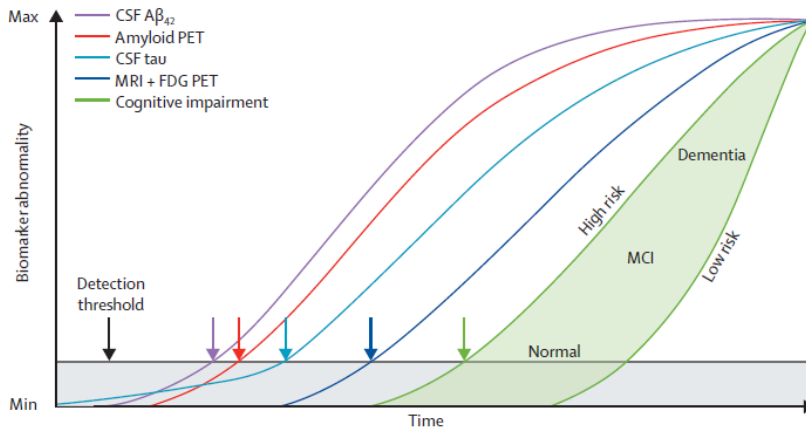


Figura 14: representación gráfica del modelo dinámico de los biomarcadores revisada. En el eje vertical vemos el grado de anormalidad de cada biomarcador mientras que el eje horizontal representa el tiempo de vida del sujeto, a lo largo de la cual evolucionan los distintos biomarcadores. Es relevante la línea indicadora del límite de detección del biomarcador Fuente: Jack y Holtzman (2013).

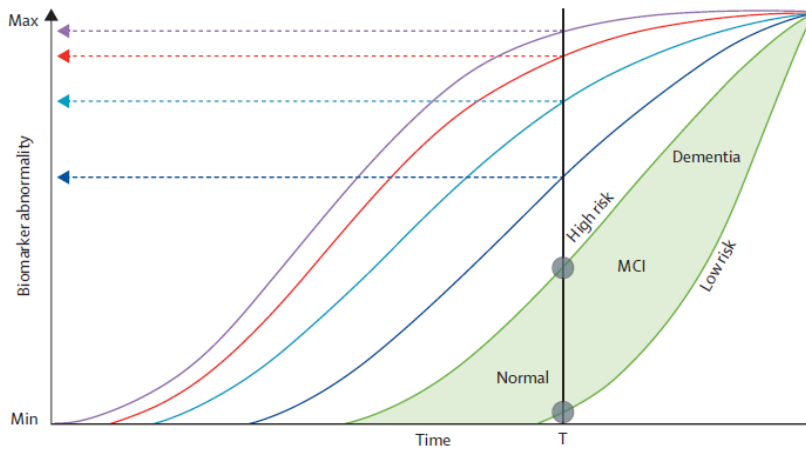


Figura 15: representación gráfica del modelo dinámico de los biomarcadores revisada. En el eje vertical vemos el grado de anormalidad de cada biomarcador mientras que el eje horizontal representa el tiempo de vida del sujeto, a lo largo de la cual evolucionan los distintos biomarcadores. Es relevante la línea vertical indicadora de un mismo tiempo para sujetos de alto y bajo riesgo. Fuente: Jack y Holtzman (2013).

En ambas figuras observamos como el eje horizontal es el tiempo y no la fase clínica de la enfermedad. Al igual que en el modelo de 2010 (mostrado previamente en la figura 13), los biomarcadores indicadores de deposición de $A\beta$ siguen siendo los primeros en volverse positivos y, a continuación, se alteran los marcadores de neurodegeneración. Es llamativo que la forma de las trayectorias de los biomarcadores continúa siendo sigmoidea, pero, en este caso, hay diferencias entre ellas, ya que los biomarcadores que se positivizan más tardíamente tienen pendientes mucho más pronunciadas. Además, se reduce la distancia de separación entre las diferentes curvas, indicando menor separación temporal entre los biomarcadores.

A la derecha aparece el estado clínico de DCL delimitado por las líneas, para su explicación se emplea un tiempo T y su prolongación lineal en la figura 15.

Según esto, existen dos tipos de poblaciones en cuanto a la susceptibilidad de desarrollar EA. Las personas con un alto riesgo de desarrollar esta enfermedad presentan una mayor anormalidad en los biomarcadores a una cierta edad, comparado con aquellos individuos con bajo riesgo a la misma edad, por lo que la curva de la primera población aparece desplazada hacia la izquierda.

Se ha visto que portadores del alelo ApoE 4 cognitivamente normales, que son sujetos de riesgo para la EA de inicio tardío, también presentan niveles disminuidos de $A\beta$. En estudios realizados de EA

familiar, se ha visto que estas alteraciones en A β y p-tau preceden más de 10 años al inicio clínico de la enfermedad (Lazarczyk *et al.* 2012).

Por último, cabe remarcar que en la figura 14 aparece un límite de detección, a partir del cual los biomarcadores empezarían a considerarse positivos. Según este modelo, la anormalidad de tau en LCR precedería a la de A β , pero no es detectable porque estamos por debajo de sus límites de detección. No obstante, mediante esta imagen, Jack y colaboradores proponen un modelo que pretende integrar los puntos de vista opuestos de las corrientes de pensamiento que defienden respectivamente a A β y a tau como orígenes patológicos únicos de la EA (Jack y Holtzman 2013).

Los datos, obtenidos a partir de biomarcadores en ancianos y portadores jóvenes de mutaciones autosómicas dominantes, sugieren que en la secuencia cronológica de los mismos el A β precede a tau. Sin embargo, las autopsias sugieren que A β está precedido por la alteración de tau (Braak y Del Tredici 2011). Estos hechos se integran de forma coherente si se consideran a la taupatía y a la amiloidogénesis como procesos independientes.

Así, la taupatía se desarrollaría muy lentamente y sería el primer proceso fisiopatológico que tendría lugar, pero solo se podría detectar mediante métodos de inmunotinción y, por sí sola, no sería suficiente para desarrollar un fenotipo clínico EA. La posterior aparición independiente de A β acelera la alteración de tau preexistente y potencia la degradación de tejido nervioso al incrementar la apoptosis. Esta aceleración de la taupatía ocurriría tras la detección positiva de

los biomarcadores de A β , razón por la cual tau se detecta posteriormente a A β (Jack y Holtzman 2013).

1.5.4. Biomarcadores periféricos

Como se ha visto, existen varios tipos de técnicas para estimar la evolución de la EA. Este hecho hace que el interés en determinar formas de diagnóstico prematuro de los diferentes tipos de demencia vaya en alza y que la búsqueda de biomarcadores específicos de EA sea uno de los grandes retos de la ciencia y la medicina en estos momentos (Ballard *et al.* 2011).

Es interesante señalar que los biomarcadores están presentes en la práctica clínica diaria, pero con algunas limitaciones. Por ejemplo, los biomarcadores de imagen son costosos y las repeticiones están limitadas. El principal problema del uso de los biomarcadores en LCR es que implican una punción lumbar para la obtención de dicho líquido. Esta técnica es una técnica dolorosa con efectos secundarios tras el examen como migrañas y sangrados raquídeos. Además, excepcionalmente, puede requerir del ingreso de la persona por daños a la zona de la cola de caballo subdural si el sujeto se mueve durante el examen.

Es por ello por lo que la ciencia hoy en día está sumida en la búsqueda de biomarcadores periféricos, aquellos que se encuentren en el plasma o suero de los sujetos, porque es mucho más accesible, menos doloroso y menos costoso. En el presente trabajo nos vamos a centrar en aquellas proteínas que pueden ser de interés para actuar como

nuevos biomarcadores de EA. A continuación se introducen aquellas que van a ser objeto de estudio en la presente tesis doctoral.

a) Clusterina

El gen CLU da lugar a una proteína llamada clusterina, también conocida como apolipoproteína J (ApoJ). Este gen se encuentra en el cromosoma 8p21-p12 y en su estructura destacan nueve exones (Nuutinen *et al.* 2009). Su región promotora tiene lugares de unión para factores de transcripción relacionados con el estrés como CREB, HSF y AP1 (Loison *et al.* 2006). Es destacable el hecho de que existen dos lugares alternativos de inicio de la transcripción del gen, dando, por tanto, diferentes isoformas de la clusterina, cuya diferencia principal radica en que la isoforma más estudiada es secretada y tiene funciones de supervivencia. Existe otra isoforma descrita que permanece en el citoplasma celular y tiene funciones pro-apoptóticas (Yu y Tan 2012).

Tras la modificación post-traducciona a la que se somete la clusterina, su estructura definitiva consta de dos dominos (α y β) de 40kDa unidos por 5 puentes disulfuro que permiten su estabilización (Calero *et al.* 2000).

Las principales funciones de la clusterina están implicadas en la apoptosis, la regulación del sistema complemento, el transporte de lípidos (ya que es una apolipoproteína) y su papel como chaperona dependiente de ATP. En cuanto a su expresión, la clusterina se expresa en todos los tejidos, pero sus niveles son más elevados en el cerebro y en el tejido nervioso (de Silva *et al.* 1990). Dentro del cerebro, es

especialmente relevante su expresión en las capas piramidales y granulares del hipocampo y en las neuronas motoras de las astas ventrales de la médula espinal (Calero *et al.* 2000).

Múltiples estudios relacionan la clusterina con la EA ya que se ha visto que su expresión está aumentada en enfermos que padecen dicha enfermedad (Calero *et al.* 2000; Thambisetty *et al.* 2010; Schrijvers *et al.* 2011). De hecho, se asocia la clusterina con atrofia hipocampal en la EA y con el progreso de la misma hacia sus estadios finales (Calero *et al.* 2000).

Asimismo, estos estudios muestran que existe un aumento de la concentración de clusterina en plasma en los enfermos de EA y que este aumento se correlaciona positivamente con una mayor carga amiloide en diferentes pacientes de EA, observada por PET (Thambisetty *et al.* 2010, Schrijvers *et al.* 2011). En esta línea, existen también estudios que reportan que estos aumentos de la concentración de clusterina en plasma de enfermos de EA y que correlacionan esta concentración con una mayor atrofia en el córtex entorrinal y en el hipocampo (Yu y Tan, 2012) Además, existen evidencias de que la clusterina se colocaliza en las placas amiloides con el A β (Calero *et al.* 2000).

Estudios GWAS han relacionado al gen CLU con la EA esporádica y destacan algunos polimorfismos (SNPs) como factores de riesgo para la EA (Harold *et al.* 2013). Así, parece ser que la expresión de clusterina aumenta ligeramente de forma normal con el envejecimiento, pero tras un daño neuronal su expresión se ve muy aumentada. También

existe una variación genética en la clusterina que podría predisponer a padecer EA en función del metabolismo de ésta sobre las grasas (Yu y Tan 2012).

A nivel molecular, está documentado que la clusterina es capaz de unir péptidos de A β y realizar diferentes acciones una vez unido el A β (Nuutinen *et al.* 2009). Así, la clusterina es capaz de regular la agregación de A β de varias maneras. Por un lado, existen estudios que indican que la clusterina es capaz de disminuir la agregación de A β *in vitro* otorgándole a esta proteína un efecto protector frente a la EA (Oda *et al.* 1995); por otro lado, algunos estudios demostraron en un modelo murino que la clusterina es capaz de promover la agregación del A β y la formación de placas amiloides (DeMattos *et al.* 2001).

Ante esta disyuntiva, refrendada por otros trabajos que apuntaban en ambas direcciones, se propone que la clusterina puede realizar las dos acciones dependiendo del ratio de las concentraciones entre esta proteína y el A β . Así, la clusterina promueve la agregación de A β si hay una elevada concentración del mismo (ratio 1:500), mientras que en concentraciones bajas o similares a la de la propia clusterina se previene esta agregación y se promueve el aclaramiento del A β (ratio 1:10) (Yerbury *et al.* 2007).

Además de la clusterina, existen otras proteínas capaces de aclarar A β del cerebro, como la ya mencionada ApoE. Estas dos apolipoproteínas están estrechamente relacionadas puesto que emplean los mismos receptores LRP. Pese a las similitudes que puedan sugerir estos hechos, hay que destacar que la clusterina es inducible. De hecho su

expresión aumenta cuando hay una mayor agregación de A β (Nuutinen *et al.* 2009). Es también relevante que la clusterina parece cooperar con ApoE, tanto a la hora de evitar la deposición de A β en el parénquima cerebral, como cuando la promueven. Ciertamente, son la clusterina y la ApoE las dos principales proteínas capaces de unir A β en el tejido nervioso y actuar sobre él. Ratones transgénicos *knockout* para ApoE y clusterina muestran una mayor cantidad de A β en el LCR (DeMattos *et al.* 2004).

El aclaramiento de A β mediado por la clusterina se da también mediante la internalización de este péptido en células de la microglía o en astrocitos y siempre es dependiente de la unión a un receptor llamado LRP-2 (también conocido como megalina). La unión del complejo clusterina-megalina da como resultado la principal fuente de aclaramiento de A β y es bastante abundante en zonas como plexos coroideos y a lo largo del endotelio de la BHE (Sagare *et al.* 2007). Su presencia en la BHE hace pensar que, en concentraciones fisiológicas, el complejo megalina/clusterina permite el aclaramiento del A β al exterior. Todos estos roles de la clusterina respecto al A β se pueden ver en la figura 16.

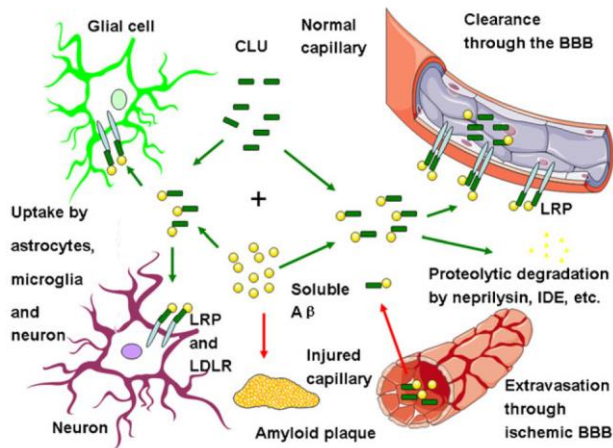


Figura 16: diferentes rutas empleadas por la clusterina para promover el aclaramiento del A β (flechas verdes). La primera es mediante la interacción con los receptores LRP2/megalina que se expresan en las células endoteliales de los capilares que irrigan el tejido cerebral y, así, promueven su salida a través de la BHE. También existen receptores LRP1 en las neuronas, en los astrocitos y en las células de la glía que interaccionan con la clusterina y median la internalización del A β por estas células. Una última forma de aclaramiento es la proteólisis de A β por neprilisina, una metaloproteasa dependiente de zinc. Cuando la concentración de clusterina se ve superada por la concentración de A β , se promueve su agregación (flechas rojas). Fuente: (Yu y Tan 2012)

b) Glicoproteína $\alpha 1\beta$

La glicoproteína $\alpha 1\beta$ es una proteína cuya función es todavía desconocida, si bien en estudios previos mediante proteómica detectamos que esta proteína incrementa su estado de oxidación en sujetos con EA y sujetos con DCL frente a sujetos controles (Di Domenico *et al.* 2016). Esta proteína tiene secuencia similar a la de las inmunoglobulinas y se ha visto en estudios previos que está reducida en sujetos con EA frente a sujetos controles (Puchades *et al.* 2003).

c) Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE)

A lo largo de la presente introducción ya se ha mencionado al receptor RAGE. Este receptor, codificado en el brazo corto del cromosoma 6, consta de 11 exones y 10 intrones y está situado al lado del *locus* del complejo mayor de histocompatibilidad (Bierhaus *et al.* 2005). Esta proteína se categoriza dentro de la familia de las inmunoglobulinas y es un receptor multiligando, ya que es capaz de interactuar y unir a muchas moléculas, además de los AGE (*advanced glycosylation end products*, que son lípidos o proteínas glicosilados por la elevada presencia de azúcares). Estas moléculas pueden estar implicadas en la homeostasis, el desarrollo y la inflamación, pero la que más interesa en la presente tesis es la capacidad de unión entre RAGE y A β (Neeper *et al.* 1992; Hudson *et al.* 2002).

La estructura del receptor de aproximadamente 35 kDa, consta de 5 dominios: el citosólico (que se encarga de la transducción de las diferentes señales), un dominio transmembrana que permite el anclaje a la membrana celular, dos dominios constantes y un dominio variable que une los diferentes ligandos (Hudson *et al.* 2002). Fruto del *splicing alternativo*, existen diferentes isoformas de RAGE, algunas de ellas truncadas, y otras que carecen de dominio transmembrana y son secretadas fuera de la célula (conocidas como sRAGE) (Falcone *et al.* 2005).

La gran importancia que tiene RAGE en la EA es que parece mediar el paso de A β a través de la BHE desde la sangre hacia el LCR,

perjudicando a dicha barrera (Kook *et al.* 2013). De hecho, diferentes estudios defienden esta idea de que RAGE media la transcitosis de A β a través de la BHE y esto se asocia con un mayor estrés oxidativo en las neuronas que lo internalizan (Deane *et al.* 2003; Deane *et al.* 2004). Además, como defienden De Strooper y Karran (2016), la interacción entre el A β y RAGE es una fuente de moléculas pro-oxidantes que acaban por incrementar el estrés oxidativo en la célula pero que contribuye a la respuesta inflamatoria generada por la microglía (Du Yan *et al.* 1996).

d) Proteína quinasa dependiente de RNA de doble cadena (PKR)

PKR (del inglés, *double stranded RNA dependent protein kinase*) también llamado EIF2AK2 (del inglés, *eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2*) es una proteína quinasa que controla la síntesis proteica al fosforilar el factor eucariótico de iniciación de la traducción eIF2 α . Su forma activa está fosforilada y se denomina p-PKR.

Entre otros roles, PKR está implicada en la inflamación y el control de infecciones víricas. Sin embargo, parece tener un papel importante en la patología de la EA, ya que bajo condiciones de estrés oxidativo puede inducir a BACE (Dumurgier *et al.* 2013). Este hecho provoca un aumento en la síntesis de A β que, como se ha visto, correlaciona directamente con el desarrollo de la EA.

Además, se ha observado que PKR está aumentado en cerebros de sujetos con EA. Mouton-Liger y colaboradores muestran en un estudio

que los niveles de p-PKR en LCR de pacientes con EA y con DCL amnésico estaban aumentados respecto a controles normales (Mounton-Liguer *et al* 2012). Además, este estudio también defiende que los niveles de p-PKR correlacionan con los niveles de p-tau en pacientes de EA.

De hecho, en nuestro grupo se realizaron una medida de PKR, entre otras proteínas, en linfocitos de personas sanas portadoras del gen ApoE4, demostrando que la expresión de esta proteína era mayor en portadores del alelo ApoE4 que en los no portadores (Badia *et al.* 2013). Esto sugiere que BACE1 es un componente importante, ya que está aumentada por acción de la PKR y tiene su acción facilitada en los portadores de ApoE4 (Hirsch-Reinshagen *et al.* 2009).

e) Regulador de la Calcineurina (RCAN1) y Calcineurina

RCAN, del inglés *regulator of calcineurin* es el nombre dado a una familia de proteínas que están muy conservadas en las levaduras hasta en los mamíferos (Porta *et al.* 2007). De todos los componentes de esta familia, hay una en particular que tiene especial relevancia en el Alzheimer: RCAN1.

El gen RCAN1 se sitúa en el cromosoma 21q22.12, lugar que le confirió durante mucho tiempo el nombre de DSCR1 (del inglés *Down Syndrome Critical Region 1*), dada su relación con el brazo cromosómico responsable de la trisomía 21 (Ermak *et al.* 2011). Este gen posee seis intrones que separan siete exones. El *splicing* alternativo del RNA mensajero genera cuatro transcritos primarios que serán modificados *a posteriori*. De esos transcritos, RCAN1.1 es el más

expresado en cerebro (además de en músculo esquelético y fibras cardíacas) y, por ello, es el más relevante para la EA (Wu *et al.* 2014).

Por su parte, la calcineurina es una fosfatasa de serinas/treoninas dependiente del sistema calcio-calmodulina. Tiene su origen en el cromosoma 4q21-q24 y su transcripción origina una proteína con dos dominios: uno de ellos catalítico (de 60 kDa) y otro, regulador (de 19 kDa) donde se une RCAN1. La función principal de la calcineurina en la EA es defosforilar a tau, aunque otros estudios defienden que su expresión y niveles de actividad correlacionan con el incremento de A β (Abdul *et al.* 2009, Lloret *et al.* 2011, Furman y Norris 2014).

RCAN1 está sobreexpresada en pacientes con EA (Wu *et al.* 2014). Esta sobreexpresión estaría directamente relacionada con la muerte neuronal y la formación de ovillos neurofibrilares, dado que un aumento de RCAN1 implica una regulación negativa de la calcineurina (Cook *et al.* 2005; Ermak *et al.* 2011) que, como ya hemos dicho, es una defosforilasa de tau.

Datos previos de nuestro laboratorio muestran que, además, RCAN1 es capaz de inducir a GSK3 β . Por tanto la sobreexpresión de esta enzima aumentará la hiperfosforilación de tau al inhibir la calcineurina y, a la par, estimular a GSK3 β . Además, los resultados sugieren que A β induce la expresión de RCAN1, cerrando un círculo que uniría las dos lesiones insignia de la EA (Lloret *et al.* 2011).

Del mismo modo, en un estudio llevado a cabo en nuestro grupo de investigación se mostró que linfocitos de sujetos con genotipo 4/4

para la ApoE tienen mayor expresión de RCAN1, calcineurina y GSK3 β que los controles (sujetos ApoE 3/3) (Badia *et al.* 2013).

En la figura 17 aparece un esquema que muestra las rutas de RCAN1 para aumentar la fosforilación de tau. También se muestra una posible relación entre los efectos de A β y la fosforilación de tau.

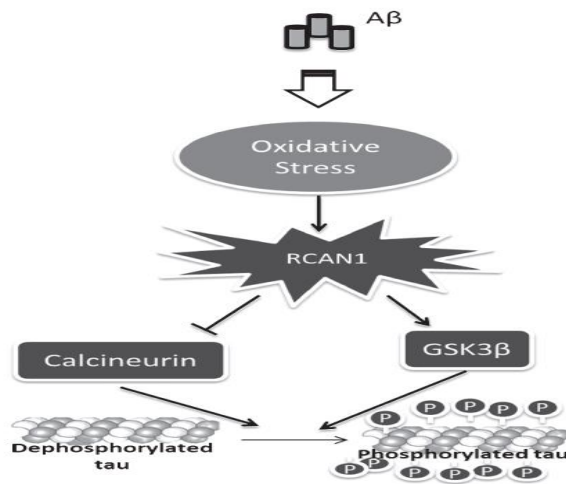


Figura 17: esquematización de las rutas de RCAN1 para aumentar la fosforilación de tau. Fuente: (Lloret *et al.* 2011).

f) Proteínas implicadas en inflamación: TGF- β e IL-6

El factor de crecimiento transformante β (o TGF- β) es el nombre que recibe una familia de citoquinas que tiene un rol especial en proliferación celular, neuroprotección, diferenciación y angiogénesis (Massagué 2012).

Dentro de la familia TGF- β , existen varias isoformas (TGF- β -1, 2, 3) que presentan una estructura conservada (hasta el 80% de homología). La síntesis de todas ellas es en forma de pro-proteína, por lo que necesitan un procesamiento post-traducción para alcanzar su forma

activa. Así, TGF- β 1 es una proteína de 390 aminoácidos, mientras que TGF- β 2 y TGF- β 3 son un poco más largas, con un total de 412 aminoácidos (Massagué 2012). La forma activa de TGF- β se produce cuando se forman dímeros de proteínas de unos 25 kDa y existen dos tipos diferentes de receptores para estas moléculas en diferentes tejidos.

Todas las isoformas de TGF- β se expresan a niveles bajos en las neuronas y en las células gliales y sus niveles aumentan, especialmente en el caso de TGF- β 1, tras una agresión (Flanders *et al.* 1998). De hecho, Unsicker y Kriegstein mantienen que TGF- β actúa junto a neurotrofinas como BDNF (del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*) o NGF (también del inglés *Nerve Growth Factor*) para mantener la homeostasis en el tejido nervioso (Unsicker y Kriegstein, 2003).

Se ha visto que los niveles de TGF- β están elevados en el tejido cerebral de sujetos con EA respecto a controles sanos (Flanders *et al.* 1995), mientras que en la bibliografía hay posiciones contradictorias sobre si TGF- β está disminuida en el plasma de enfermos de EA (De Servi *et al.* 2002) o aumentada (Malaguarnera *et al.* 2006).

Con todo, el rol de TGF- β en la EA no está plenamente descrito. Das y Golde (2006) proponen que estaría relacionado con la protección frente a la inflamación que aparece en las fases tempranas de la EA y que este papel es totalmente dependiente de la señalización de TGF- β por sus receptores (en concreto el receptor tipo II, que se encuentra en las neuronas y en las células gliales) (Das y Golde 2006).

Así, TGF- β es sintetizado por la microglía y los astrocitos activados y sería capaz de reducir la deposición de A β en placas, pero aumentaría la deposición de éste en los vasos sanguíneos cerebrales. De esta forma, TGF- β previene la inflamación temprana, pero, cuando la inflamación se vuelve crónica, su señalización se reduciría a causa de diferentes mecanismos. Por consiguiente, la deposición en placas amiloides continuaría. Además, esta reducción de la señalización parece afectar a la supervivencia de las neuronas (Das y Golde 2006, Tesseur *et al.* 2006). Esto aparece esquematizado en la figura 18.

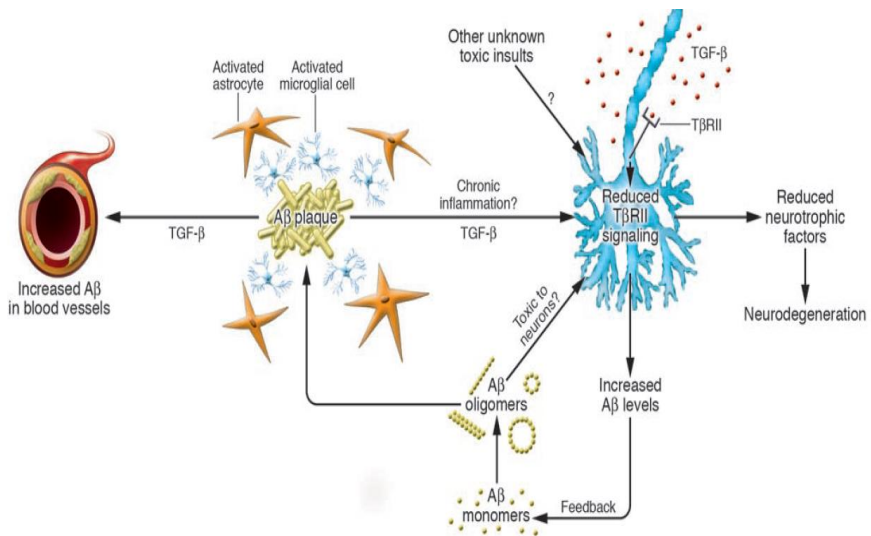


Figura 18: esquema del rol de TGF- β en la EA. Esta citoquina se produce por la microglía y los astrocitos activados al inicio del proceso inflamatorio característico de la enfermedad y actúa sobre la agregación del AB en las placas amiloides. Además, parece ejercer efectos beneficiosos sobre las neuronas, ayudando a su supervivencia frente a la excitotoxicidad del AB. Cuando la inflamación se vuelve crónica las neuronas reducen la expresión de los receptores II para TGF- β y esta reducción de la señalización de TGF- β parece contribuir a la degeneración de la célula. Fuente: (Das y Golde 2006).

Se ha demostrado en ratas que la microinyección intrahipocampal de A β , conjuntamente con la administración de TGF- β por vía intranasal, reduce e incluso detiene la neurodegeneración (Ke *et al.* 2015).

Por su parte, la interleuquina 6 (IL-6) es una citoquina muy implicada en la inflamación y en la respuesta de la fase aguda que ocurre en los primeros momentos de una infección. Diversos estudios la implican con la inflamación que se produce en la EA; por ejemplo, Dursun y colaboradores defienden que los niveles séricos de IL-6 están incrementados en pacientes con EA de inicio temprano (normalmente genético) frente a controles sanos (Dursun *et al.* 2015). Sin embargo, en el mismo estudio se muestra que los niveles de IL-6 no son diferentes entre pacientes con EA esporádica y controles.

Bauer y colaboradores muestran que la IL-6 colocaliza con las placas amiloides, pero no obtienen diferencias en la concentración de IL-6 en LCR de sujetos sanos frente a sujetos con EA (Bauer *et al.* 1991). Sin embargo, Blum-Degen y colaboradores sí reportan estas diferencias (Blum-Degen *et al.* 1995). Los resultados que existen en la bibliografía son un poco confusos, pero tiene sentido que la IL-6 esté implicada en las fases tempranas de la EA, dado su rol en la inflamación.

“Las ideas no duran mucho.
Hay que hacer algo con ellas”

Santiago Ramón y Cajal

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Determinar los niveles de β -amiloide, tau fosforilada y tau total en líquido cefalorraquídeo en sujetos sanos, en pacientes diagnosticados de deterioro cognitivo leve y en aquellos que padezcan enfermedad de Alzheimer.
2. Determinar la concentración en suero de RCAN, clusterina, PKR, calcineurina, RAGE, α 1 β glicoproteína e IL6 para su estudio como posible biomarcador. Todas las proteínas se determinarán en sujetos sanos, en pacientes diagnosticados de deterioro cognitivo leve y en aquellos que padezcan enfermedad de Alzheimer.
3. Estudiar la variación y/o correlación de las proteínas determinadas con el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.
4. Calcular las curvas ROC de las proteínas determinadas para estudiar su sensibilidad y especificidad como posibles biomarcadores para el diagnóstico de EA. Valorar si un conjunto de las proteínas determinadas puede tener un mayor valor diagnóstico.

5. Realizar un análisis discriminante que nos permita categorizar a los sujetos del estudio según las concentraciones de las proteínas determinadas en cada uno de ellos.

6. Analizar si el conjunto de estos biomarcadores nos permite desarrollar una regla de decisión que clasifique correctamente a los pacientes en función de su grupo diagnóstico.

“Dejamos de temer aquello que
se ha aprendido a entender”

Marie Curie.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Aparatos

Los aparatos utilizados en la fase experimental de esta tesis se encuentran ubicados en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, así como en la Unidad Central de Investigación de Medicina (UCIM) situada en la misma facultad. La infraestructura es la correspondiente al grupo de trabajo del Dr. José Viña y la Dra. Ana Lloret.

Centrífugas:

- Eppendorf® Thermomixer Compact.
- Thermo scientific, Sorvall legend XTR.
- Hettich, rotina 35 R para tubos cónicos (Eppendorf®).
- Sigma, 1-14 para tubos cónicos (Eppendorf®).

Balanzas:

- Gram precision, serie AHZ. Sensibilidad $\pm 0,01$ g.

Agitador magnético:

- Hot Plate Stirrer SB 162-3. Marca Stuart.

Sistema de purificación de agua:

- Purelab flex marca Elga.

Congeladores:

- Congelador de -80°C Mmarca Revco. Modelo Ultima II.
- Congelador de 80°C marca Froilabo. Modelo Biomemory 333690 L.
- Congelador de -20°C marca Liebherr, modelo Confort Nofrost.
- Cámara Fría Marca Ibercex.
- Nevera Marca Lynx (2-4°C).

Termobloque:

- Marca Stuart, Block heater, SBH 130 D.

Lavador automático de placas ELISA:

- Marca Tecan, modelo Hydroflex.

Autoclave:

- Marca JP_selecta.

Espectrofotómetro:

- SpectraMax Plus 384.

3.1.2. Reactivos

a) Kits ELISA

Los kits ELISA empleados para la realización de esta tesis, así como la casa comercial de la cual vienen están especificados en la tabla 4.

Tabla 4: en la columna de la izquierda aparecen las proteínas específicas que se determinaron mediante ELISA. A la derecha aparece el nombre de la casa comercial de la que obtuvimos dicho kit.

Proteína de Interés	Lugar de medida	Casa comercial
Péptido β -amiloide (1-42)	LCR	Innogenetics N.V
Tau total	LCR	Innogenetics N.V
Tau fosforilada	LCR	Innogenetics N.V
Tau total	Suero	Thermo Fisher Scientific Inc.
Receptor for Advanced Glycation-End-products (RAGE)	Suero	Ray Biotech Inc.
Double stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)	Suero	CUSABIO BIOTECH.,LTD
Calcineurina	Suero	Cloud-Clone Corp-
Regulator of Calcineurin 1 (RCAN1)	Suero	CUSABIO BIOTECH.,LTD
Clusterina	Suero	CUSABIO BIOTECH.,LTD
α 1 β glicoproteína	Suero	MyBiosource
Factor de crecimiento transformante β (TGF- β 1)	Suero	Diaclone SAS
Interleuquina 6	Suero	Diaclone SAS
ApoE4/Pan-ApoE Elisa Kit	Suero	MBL International Corporation

3.1.3. Material fungible

Tubos Vacutainer®:

- Para LCR: BD Vacutainer®
- Para extracción de suero: BD Vacutainer® SST II Advance.

Pipetas *Pasteur* de vidrio.

Pipetas automáticas multicanal.

Pipetas automáticas monocanal.

3.2. Métodos

3.2.1. Selección de sujetos

Se reclutaron un total de 82 sujetos: 33 son sujetos sanos, 23 pacientes diagnosticados con DCL y 26 son pacientes de EA.

Todos los sujetos accedieron a participar en el estudio de forma voluntaria tras ser informados convenientemente sobre el mismo y tras firmar un consentimiento informado. En todo momento se respetaron los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el consejo de Europa relativo a los Derechos Humanos y la Biomedicina, en la Declaración de la UNESCO sobre el genoma humano y los Derechos Humanos, así como los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

En el caso de que algún sujeto no estuviera capacitado para firmar el consentimiento, éste fue firmado por un familiar a su cargo. Todos los

documentos se incluyen en el presente proyecto que fue previamente aceptado por el Comité Ético del Hospital Clínico de Valencia; el cual se adjunta en el Anexo 6.

a) Sujetos controles

Un total de 33 sujetos sanos, sin antecedentes de demencia, fueron designados como grupo control. Los sujetos control se reclutaron del Servicio de Anestesiología del Hospital Clínico de Valencia, donde se les extrajo una muestra de líquido cefalorraquídeo y otra de sangre que fueron procesadas en nuestro laboratorio.

Los criterios de exclusión para este grupo fueron:

- Estar en un rango de edad diferente al comprendido entre 60 y 85 años.
- Padecer cáncer o alguna otra enfermedad pro-inflamatoria.
- Padecer alguna clase de demencia.
- No firmar el consentimiento informado.

b) Sujetos con DCL y EA

Los pacientes con diagnóstico de DCL y EA provienen del servicio de Neurología del Hospital Clínico de Valencia. Los criterios de exclusión para los sujetos DCL y EA fueron los siguientes:

- Padecer de alguna enfermedad neoplásica o estar recibiendo un tratamiento inmunosupresor por algún otro motivo.
- Ausencia de familiares.

- Padecer alguna enfermedad que influya en el estado oxidativo (como Diabetes Mellitus) o recibir tratamientos que alteren tal estado (hemodiálisis).
- No firmar el consentimiento informado.

El tamaño muestral final fue un total de 23 sujetos DCL y 26 EA. A cada paciente se le hizo una extracción de LCR y una de sangre venosa.

3.2.2. Test cognitivos

A todos los pacientes de los grupos DCL y EA, se les pasó un test al principio del estudio con orientación clínica. Dicho test es el *Mini Mental State Examination* (MMSE), que aparece detallado a continuación.

Fundamento

Este test fue descrito por Folstein y colaboradores (Folstein *et al.* 1975) con el objetivo de valorar el estado cognitivo del paciente y tratar de discernir principios de demencia. Mediante un total de 11 ítems se estudian 5 áreas relevantes de la función cognoscitiva: la orientación espacio temporal, la concentración, la atención, la memoria (tanto inmediata como diferida), la capacidad de cálculo y finalmente el lenguaje expresivo y también receptivo. Es un test muy utilizado debido a su brevedad (puede hacerse en 5-10 minutos) y es habitualmente rutinario en la práctica clínica.

Su validez como medida de la función cognoscitiva está ampliamente aceptada (Tombaugh y McIntyre, 1992), presentando una sensibilidad del 87% a la hora de detectar demencia en pacientes hospitalizados.

Sin embargo, este test presenta algunos sesgos, se ha visto que el MMSE reduce su valor con la edad creciente y en sujetos con un escaso nivel de educación (Crum *et al.* 1993).

Aunque originalmente fue diseñado para discriminar pacientes orgánicos de deprimidos, su utilización es casi diaria en el campo de la psiquiatría y la neurología. De hecho es el test más utilizado en investigación epidemiológica relacionada con estas dos especialidades y también en ensayos clínicos en los que se requieren las funciones intelectivas del paciente (Tombaugh y McIntyre, 1992).

El funcionamiento de este test es muy sencillo: hay un número de ítems y la superación de cada uno da un punto por lo que las puntuaciones obtenidas van de 0 a 35. Existen diferentes valores de corte que permiten interpretar los resultados: una puntuación igual o superior a 29 se asocia a un funcionamiento cognitivo normal, mientras que una puntuación menor o igual a 23/24 suele considerarse patológica en caso de adultos de 65 años de edad o más. Para adultos no geriátricos una puntuación de 27/28 puntos es también considerada como patológica (Patten y Fick, 1993). Estos valores de corte pueden variar dependiendo de varios factores que fomentan el sesgo: la inclusión de personas de escaso nivel cultural y profesional, algo que puede dar falsos positivos, la inclusión de personas que acceden con menos frecuencia al ámbito hospitalario y, finalmente, la inclusión de personas muy ancianas.

La versión española del MMSE descrita por Lobo y colaboradores (Lobo *et al* 1993), llamada MEC (Mini Examen Cognoscitivo) tiene en cuenta el sesgo de baja escolarización en grupos de edad avanzada y añade unas pequeñas modificaciones. El número total de ítems es de 30 o 35, dependiendo del test, y el punto de corte está establecido en 27. La sensibilidad es de un 93% y la especificidad de un 90%(Llamas-Velasco *et al.* 2015). Se adjunta un ejemplar del MMSE en el Anexo 7.

3.2.3. Obtención de las muestras

Se realizó una punción lumbar a primera hora de la mañana siguiendo los procedimientos estándar hasta llegar al espacio subaracnoideo. Se recogieron 2mL de LCR en un tubo de polipropileno y se transportó al laboratorio donde se procesaron todas las muestras. El LCR se centrifugó a 2000 G durante 10 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante fue pipeteado y posteriormente se alicuotó en volúmenes 500 µl y se congeló a -80°C hasta su uso en los análisis bioquímicos necesarios teniendo en cuenta los ciclos de congelación/descongelación.

Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos para suero. En el caso del suero, se depositó la sangre en tubos sin anticoagulante durante 30 min aproximadamente para permitir la coagulación de la sangre. Tras este tiempo la sangre se centrifugo a 1500 G durante 15 min y las muestras se alicuotaron y congelaron a -80º C hasta su posterior análisis.

3.2.4. Ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA)

a) Fundamento de la técnica

El ensayo por inmunoabsorción ligada a enzima (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* o ELISA) es una de las técnicas más utilizadas para detectar antígenos. Está basada en un principio similar al radioinmunoensayo (RIA), pero depende de un enzima en lugar de una sonda radiactiva. Una enzima conjugada a un anticuerpo reacciona con un sustrato incoloro generando un producto coloreado. Según la enzima utilizada puede tener la sensibilidad del RIA con la ventaja de ser menos peligrosa y mucho más barata.

En la actualidad, existen numerosas variaciones de la técnica de ELISA con el objetivo de detectar o de cuantificar tanto antígenos, como anticuerpos. En nuestro caso empleamos el ELISA sándwich, que se diferencia del ELISA por ensayo indirecto en que el primero sirve para cuantificar una proteína sérica, mientras que el segundo se emplea para titular anticuerpos específicos.

b) Procedimiento experimental

La técnica se realiza en placas de poliestireno de 96 pocillos, en cuyo fondo está el anticuerpo contra la proteína que se pretende detectar fijado por adsorción física. Se siguieron las recomendaciones y el protocolo especificado por la casa comercial para cada kit ELISA.

Las proteínas medidas en LCR fueron A β , tau y tau fosforilada. En suero se midieron clusterina, RCAN1, RAGE, PKR, TGF, α 1 β glicoproteína, calcineurina y la interleuquina 6.

Se realizó una curva patrón con distintas concentraciones de la proteína estándar proporcionada por la casa comercial junto al kit. Tanto las muestras como los patrones se cargaron por duplicado en la placa en un volumen especificado en el kit. Dichos volúmenes aparecen a continuación en la tabla 2.

Tras la adición de la muestra a los pocillos, la placa se cubre y se deja en agitación leve (300rpm) y con calor (37°C) durante un tiempo que también aparece especificado en la tabla 5.

Durante el tiempo de incubación se produce la unión específica antígeno-anticuerpo. Tras esta incubación se lava la placa eliminando el líquido restante y añadiendo el tampón de lavado preparado con antelación. Este paso, al igual que todos los futuros lavados se realizan con el lavador de placas *Tecan Hydroflex* y puede consistir en varias aspiraciones de líquido y suministro de tampón de lavado (normalmente se hacen de 3 a 5 ciclos aspiración-suministro).

Tras el lavado se añade un segundo anticuerpo biotinilado que se une al complejo anticuerpo-proteína de interés, presente en las paredes de los pocillos, y se deja incubar en las mismas condiciones que anteriormente durante un tiempo variable (1-2 horas). Tras esta incubación el exceso de anticuerpo biotinilado es eliminado mediante otro lavado, y seguidamente, se añade un conjugado de estreptavidina con peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*), el cual se une en la parte biotinilada del sándwich.

Tabla 5: detalle de volúmenes de muestra empleados en cada kit ELISA, así como de los tiempos de la primera incubación. También aparece si es necesario o no una dilución previa de la muestra.

Proteína de Interés	Volumen cargado (μL)	Tiempo de incubación (min)
Péptido β -amiloide (1-42)	25	60
Tau total	25	60
Tau fosforilada	75	8400
Tau total	50	120
Receptor for Advanced Glycation-End-products (RAGE) (Dilución 1:2)	100	150
Double stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)	100	120
Calcineurina	100	120
Regulator of Calcineurin 1 (RCAN1)	100	120
Clusterina (Dilución 1:500)	100	120
$\alpha\beta$ glicoproteína	100	60
Factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1) (Dilución 1:10)	40	120
Interleuquina 6	100	60
ApoE4/Pan-ApoE Elisa Kit (Dilución 1:500)	100	60 (a 25°C)

Tras la eliminación por lavado del conjugado HRP no unido, la solución con el sustrato de la HRP es añadida a los pocillos. Así, se forma un producto coloreado proporcional a la cantidad existente de proteína tanto en las muestras problemas, como en los estándares. Por último, la reacción se para con una solución *Stop* y la absorbancia es medida en un lector de placas espectrofotométrico a la longitud de onda de $\lambda=450\text{nm}$. La concentración de la correspondiente proteína puede ser determinada gracias a la interpolación en la curva patrón realizada con la concentración de las muestras estándares de concentración conocida.

- Kit de ApoE

Mención especial merece el Kit ELISA para la determinación del genotipo de ApoE: Este kit busca la diferencia entre homocigotos ApoE4/4 y los heterocigotos. Para ello se emplea el ratio de la concentración entre ApoE y Pan-ApoE, de forma que un ratio mayor que 1 indica un genotipo ApoE 4/4 y un valor de 0,44 o más indica que la persona es portadora de una sola copia de ApoE4. Si el ratio es 0, el sujeto no presenta ninguna copia del alelo $\epsilon 4$ y, por tanto, es genotipo 3/3.

3.2.5.Métodos estadísticos

El proceso de análisis siguió diferentes fases para las cuales se usaron distintas pruebas estadísticas con sus respectivos test. Se abordan, sucesivamente, la descripción de la base, así como su depuración de datos, análisis descriptivo, los test de sensibilidad, ANOVA, el concepto

de curva ROC, el análisis factorial y el concepto de análisis discriminante.

Para el presente análisis estadístico se ha usado el programa *IBM SPSS Statistics* 22. En todos los test se considera un resultado estadísticamente significativo cuando el p_valor es menor a 0,05. En caso contrario, se especifica la motivación por la cual se acepta un valor diferente, ya que según Milton (2001) las normas para rechazar o aceptar una hipótesis nula en función del tamaño del p_valor no son absolutamente estrictas. Siempre hay que tener en cuenta que cuando rechazamos H_0 cabe la posibilidad de cometer un error (concretamente de tipo 1).

El p_valor es una medida del grado de riesgo que corremos cuando decidimos aceptar una H_0 y, por si las consecuencias de este error tipo 1 fueran muy graves, el p_valor esta convencionalmente aceptado como muy pequeño. Una regla empirica aproximada es que H_0 no debería rechazarse para valores P que excedan de 0,10.

a) Estructura de las variables.

En primer lugar, se procedió a la depuración de los datos, estableciendo un criterio de selección de forma que sólo fueron considerados aquellos pacientes que tuvieran como máximo una celda vacía del conjunto de variables medidas.

Esta depuración de la base de datos era necesaria, puesto que había demasiados pacientes sin muchas de las variables medidas, por tanto teníamos muchos valores perdidos. Todos los sujetos que cumplieran esta condición se incluyeron en el estudio quedando al final un tamaño

muestral de 66 sujetos, compuesta por 24 sujetos control, 22 sujetos DCL y 20 sujetos EA.

b) Análisis descriptivo y comparación de medias

Las variables A β , tau, p-tau, clusterina, PKR, RAGE, RCAN1 y TGF- β 1 corresponden con las concentraciones de la proteína de interés determinadas en el laboratorio para cada caso.

La variable ApoE es categórica e indica el genotipo de esta proteína presente en cada paciente. La variable Grupo, también categórica, indica el grupo diagnóstico al que pertenece cada sujeto.

En este proyecto el método experimental de determinación de los valores de las diferentes variables se produjo en dos muestreos diferentes. Es decir, se emplearon al menos dos kits ELISA que determinan la misma proteína. Esto implica que la base de datos enlaza dos muestreos distintos, por lo que es necesario contrastar que se puede realizar la agrupación de las dos muestras en una sola variable para realizar este ejercicio. Así, se realiza una prueba de igualdad de medias y varianzas (mediante el test de Levene) para confirmar que los datos pueden ser agrupados dentro de la base de datos para su análisis.

Con el fin de garantizar el uso de la metodología apropiada, cabe confirmar que las variables de la base de datos se distribuyen como una normal. Para ello, se realizó un análisis de normalidad de los datos, comprobando que en todos los grupos muchas de las variables presentaban una distribución normal mediante el test de Kolmogorov-

Smirnov con una significatividad estándar del 95% de confianza ($p\text{-value} > 0,05$).

El siguiente paso fue el análisis comparativo de las variables de la muestra utilizando un test de diferencia de medias mediante la metodología ANOVA. Dicho análisis se centró en comparar la igualdad de medias entre los grupos incluidos en el estudio [Control, DCL, EA], contrastando los resultados con una prueba no paramétrica de asociación (Kruskall-Wallis) para ofrecer robustez a los datos. Se profundizó en el análisis calculando la relación bilateral entre las variables incluidas en cada grupo (dos a dos) empleando la corrección de Bonferroni.

En caso de aquellas variables que siguen una distribución no normal, se emplea la prueba de Kruskal-Wallis para estimar si existen diferencias o no entre los tres grupos de estudio.

Además, se colapsaron los grupos de estudio en dos (*Sano*, *Enfermo*) y se contrastó la igualdad de medias de las diferentes proteínas mediante una T de Student o una U de Mann Witney según la normalidad de los grupos. Hay que mencionar que el grupo *Enfermo* contiene a los sujetos DCL y a los sujetos EA.

c) Correlaciones

Se estimó si existe correlación entre las variables incluidas en el estudio, para tal fin se construye una tabla donde se presentan las correlaciones bivariadas que son estadísticamente significativas, y donde la citada significatividad se contrasta mediante tres test: el

cálculo del coeficiente de correlación de Pearson, la rho de Spearman y la tau-*b* de Kendall, todos ellos con sus niveles de significación.

El coeficiente de correlación de Pearson es una medida de asociación lineal. Puede tomar valores entre 1 y -1, siendo 1 la relación lineal positiva perfecta, 0 la relación lineal nula y -1 la relación lineal negativa perfecta.

El coeficiente tau-*b* de Kendall se emplea para estudiar la relación entre variables ordinales, por lo que en el presente estudio tiene un uso limitado dada la gran cantidad de variables continuas de las que se dispone. Al igual que el coeficiente de correlación de Pearson, sus valores oscilan entre -1 y 1, coincidiendo también en su interpretación.

Finalmente, la rho de Spearman se emplea como el coeficiente de correlación de Pearson, cuando las variables estudiadas incumplen el supuesto de distribución normal (Milton, 2001). Hay que recordar que un *p_valor* significativo en alguna de estas tres pruebas indica correlación y una potencial causalidad.

d) Curvas ROC

Además, dado el interés clínico y la potencial aplicación del estudio, se realizaron curvas ROC con las variables incluidas en la base de datos.

Las curvas ROC (del inglés *Receiver Operating Characteristic*) son una herramienta muy empleada para evaluar la capacidad diagnóstica de una prueba cuantitativa. Consiste en una representación gráfica en la que la sensibilidad de la prueba se encuentra en los ejes de abscisas y

la diferencia entre 1 y la especificidad de la prueba para cada sujeto se muestra en los ejes de ordenadas.

Sensibilidad

Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo. Es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar la enfermedad. De ahí que también la sensibilidad se conozca como FVP o fracción de verdaderos positivos.

$$Sensibilidad = \frac{VP}{(VP + FN)}$$

Especificidad

Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un individuo sano se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar a los sujetos sanos. De ahí que también sea denominada FVN o fracción de verdaderos negativos.

$$Especificidad = \frac{VN}{VN + FP}$$

Esto aparece especificado a continuación en la tabla 6. A su vez, en la figura 19, se muestra una curva ROC. Ésta, calculada como se explica previamente, delimita un área bajo la curva realizada (AUC), que es el valor predictor de la prueba. Este valor siempre oscila entre 0 y 1, donde 0 indica que la prueba no tiene valor predictivo alguno mientras que un valor de 1 indica que es una prueba muy sensible y muy específica (J.Irala Estévez, 2003).

Tabla 6: tabla de contingencia que enfrenta los resultados de una prueba diagnóstica con la presencia o ausencia de una enfermedad. Adaptado de Pita Fernández y Pértegas Díaz (2003).

Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad.		
Resultado de la prueba	Verdadero diagnóstico	
	Enfermo	Sano
Positivo	Verdadero Positivo (VP)	Falso Positivo (FP)
Negativo	Falso Negativo (FN)	Verdadero Negativo (VN)

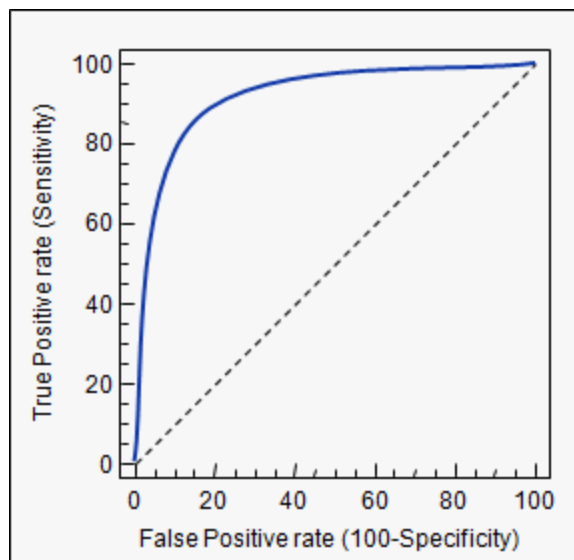


Figura 19: representación de una curva ROC. Tomado de <https://www.medcalc.org/manual/roc-curves.php>.

Por tanto, se considera que una curva ROC tiene un valor predictivo bueno cuando el citado valor oscila entre 0,8 y 1 y un valor predictivo no aceptable por debajo del 0,5.

En el presente estudio, las variables de contraste son cuantitativas y corresponden a los resultados de determinación de proteínas realizado previamente, mientras que la variable de estado indica la categoría a la que pertenece un sujeto (grupo diagnosticado de enfermedad). Es importante resaltar que para obtener una buena curva ROC debe indicarse la categoría que se debe considerar *positiva* en la variable de estado, siendo esto relevante porque para cada variable el valor positivo será diferente.

Una vez realizadas las curvas ROC para las variables de interés, se establecen como modélicas (concepto conocido como *gold-standard* en inglés o patrón de oro en castellano) las curvas obtenidas con las variables A β en LCR, tau en LCR y p-tau en LCR, ya que estas variables corresponden con los biomarcadores más empleados en la práctica clínica.

Las curvas ROC están realizadas frente la variable de grupo diagnóstico (dando como positivo pertenecer al grupo EA), y frente a la variable de diagnóstico colapsada (*Sano* o *Enfermo*, siendo el estado positivo el grupo *Enfermo*).

e) Reducción del número de variables a factores significativos

Se realiza una reducción del número de variables entre las que existe una fuerte dependencia, indicativo de que contienen información similar, y, por tanto, pudieran ser redundantes en la explicación de la

variable dependiente del modelo si se incluyesen conjuntamente en el análisis.

Para ello, se utiliza el procedimiento de construcción de variables combinadas (factores) mediante la técnica de extracción de componentes principales (PCA) de las variables disponibles. A partir de la estimación de los componentes principales, se emplea la técnica del análisis factorial para extraer factores comunes que contengan la mayor parte de la información existente en las variables (Landau y Everitt, 2004). El PCA provee una aproximación para la construcción de estas nuevas variables estadísticas (sintéticas) y para decidir cuántas nuevas variables podrían ser necesarias para representar bien la información original.

El método para la extracción de factores se utiliza para formar combinaciones lineales no correlacionadas de las variables observadas, de forma que el primer componente tiene la varianza máxima. Los componentes sucesivos explican progresivamente proporciones menores de la varianza y no están correlacionados unos con otros. El método continúa con estas directrices hasta que haya tantos componentes que expliquen la mayor parte de la varianza. El análisis principal de los componentes se utiliza para obtener la solución factorial inicial.

Cada una de las p -variables observables es una combinación lineal de k -factores comunes a todas ellas y de un factor único para cada una. Por tanto, todas las variables originales están influenciadas por todos los factores comunes, mientras que para cada una existe un factor

único específico para esa, siendo, tanto una como otra, variables no observables. La determinación de la matriz factorial o matriz de pesos factoriales es uno de los problemas esenciales del análisis factorial.

Una vez determinada la matriz factorial se utiliza la información que ella proporciona con el objetivo de identificar la composición de los factores. Para ello, y con el objeto de facilitar esta interpretación, existen procedimientos como la rotación de factores que pueden ayudar en esta tarea.

Inicialmente cada factor común está correlacionado en distinta medida con cada una de las variables originales. Utilizando la rotación de los factores se obtiene una matriz equivalente a la matriz factorial A . En esta nueva matriz las variables originales presentarán una correlación próxima a 1 con uno de los factores y próximas a 0 con el resto. De esta manera, cada factor tendrá correlación alta con un grupo de variables y baja con el resto, simplificándose la tarea de identificar e interpretar cada uno de los factores.

La prueba de que los factores son representativos se contrasta con dos test: el de KMO y el de Barlett. El test KMO (Kaiser, Meyer y Olkin) representa si existe una relación entre las variables, y tiene un valor que oscila entre 0 y 1. Por lo tanto, un valor KMO cercano a la unidad implica una elevada relación entre las variables. De hecho si el valor de la KMO es menor que 0,5 no se considera aceptable el análisis factorial, puesto que las variables son suficientemente distintas y no pueden ser utilizadas para obtener las combinaciones comunes que representan los factores (Landau y Everitt, 2004).

El test de esfericidad de Barlett valora la aplicabilidad del análisis factorial en las variables del estudio. Un test estadísticamente significativo respalda el análisis factorial y los factores extraídos. Para la demostración de la significatividad se asumen las normas estadísticas convencionales, esto es, el 10%, el 5% o el 1%.

Los factores extraídos del análisis de componentes principales se interpretan como una combinación que se produce entre las variables incluidas en la base y que tienen efectos conjuntos. Cada factor hace referencia a un conjunto de condiciones. Por su parte la extracción de factores significativos contribuye a comprender cómo las distintas variables (proteínas) interactúan biológicamente entre ellas para ejercer sus efectos.

Esta prueba se aplicó en el presente estudio a conjuntos diferentes de variables. En primer lugar al conjunto de las variables clusterina, PKR, RAGE y RCAN1. En segundo lugar, empleamos el mismo conjunto de variables, añadiendo la variable continua TGF- β 1 en un ejercicio y añadimos la variable categórica ApoE en el siguiente ejercicio.

En el primer caso, la elevada correlación entre las cuatro variables mencionadas recomendaba el cálculo de factores para reducir los efectos que tuviese esa correlación en forma de multicolinealidad excesiva y su consecuente efecto sobre la eficiencia de los parámetros. Como es sabido, los factores extraídos son independientes entre ellos, lo que conseguiría resolver este problema estadístico.

En las reducciones de factores se obtuvo el gráfico de componentes en el espacio rotado, que sitúa las variables utilizadas en cada modelo en

función de los valores nuevos que se adquieren mediante la reducción de factores. Para contemplar todas las relaciones que existen entre las proteínas que hemos medido en este estudio, se elaboró un gráfico a partir del análisis de componentes realizado, que muestra cómo se relacionan las diferentes proteínas plasmáticas entre sí. Además, realizamos otro análisis de componentes principales donde añadimos las variables medidas en LCR.

Sobre la base de la idea de Doecke *et al* (2012), el principal interés de la reducción del número de variables independientes en factores en este trabajo es hallar un set de biomarcadores que pueda tener un valor predictivo tanto o más preciso que el de alguna de las variables consideradas modélicas hoy en día y que se emplean en la práctica clínica diaria para diagnosticar EA (Dubois *et al.* 2014), que se aproximan al concepto conocido como patrón de oro.

Además, las primeras cuatro variables introducidas presentan correlación entre ellas y, si se calcula su área bajo la curva, las propias variables de forma independiente superaban el valor umbral de 0,5 pero no llegan a erigirse como pruebas diagnósticas fiables. Por ello, la estimación de factores, entendidos como una combinación lineal de las proteínas medidas en este estudio, permite obtener nuevas variables que incorporan y combinan su información, resultando en un mayor valor predictivo (en este trabajo).

Los factores estimados se exportan a nuevas variables que fueron incluidas en el estudio. Una vez determinados, se realizaron sus curvas ROC en las que se observó una mejora del valor del área bajo la curva.

De nuevo, todas las curvas ROC están realizadas frente la variable de grupo diagnóstico (dando como positivo pertenecer al grupo EA), y también frente a la variable de diagnóstico colapsada (*sano o Enfermo*, siendo el estado positivo el *grupo Enfermo*).

f) Análisis discriminante

El análisis discriminante es un análisis donde existe una variable dependiente categórica Y (variable grupo diagnóstico) y un número concreto de variables independientes continuas X (las proteínas determinadas experimentalmente).

En nuestro caso, el objetivo del análisis discriminante es determinar a qué grupo diagnóstico pertenecen los sujetos en función de las proteínas séricas determinadas. Se pretende encontrar relaciones lineales entre las variables continuas que mejor discriminen en los grupos dados a los sujetos.

Un segundo objetivo es construir una regla de decisión que asigne un sujeto nuevo, que no sabemos clasificar previamente, a uno de los grupos prefijados con un cierto grado de riesgo. Se calculará también la sensibilidad y la especificidad de la regla de decisión resultante.

Es importante destacar que ninguna variable discriminante puede ser la combinación lineal de otras variables, por lo que los factores calculados quedarán fuera del análisis. De esta forma, emplearemos las proteínas RAGE, RCAN, PKR y clusterina como variables independientes continuas. Además, por sus características, emplearemos el modelo aplicable a una variable dependiente

categoría que solo adoptará dos categorías: sujeto control o sujeto con EA.

El análisis discriminante consiste en aprovechar la información contenida en las variables independientes para crear una función, a la que llamaremos D , que será una combinación lineal de las diferentes variables independientes (X_1, X_2, \dots, X_n) y que serán capaces de diferenciar lo más posible a ambos grupos. Hay que tener en cuenta que existirán unos coeficientes (C_1, C_2, \dots, C_n) que conseguirán otorgar a los sujetos de un grupo puntuaciones máximas (superiores) en la función D mientras que los sujetos del otro grupo conseguirán puntuaciones mínimas (Torrado-Fonseca y Berlanga-Silvente. 2013).

De esta manera, obtendremos una función D_C para el grupo de sujetos controles y otra función D_{EA} para los sujetos con EA. Cuando se apliquen ambas funciones a un sujeto que deseamos clasificar, aquella que obtenga un resultado numérico más elevado será la categoría a la que pertenece el sujeto.

Esta misma metodología se aplicó también, con las mismas proteínas como variables independientes, en un modelo en el que las dos variables dependientes fueron sujetos DCL y sujetos EA.

Así, las proteínas empleadas para este análisis fueron clusterina, PKR, RAGE y RCAN1, quedando fuera ApoE (por ser categórica).

“Para las personas creyentes
Dios está al principio. Para los
científicos esta al final de todas
sus reflexiones”

Max Planck

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Descripción de la muestra

Nuestra muestra tiene un total de 66 sujetos divididos en 3 grupos de la siguiente forma: 24 sujetos sanos (controles), 22 sujetos diagnosticados con DCL y 20 son sujetos que padecen la EA. Los controles son sujetos sanos que no padecen ninguna clase de demencia, mientras que los sujetos de los grupos DCL y EA fueron clínicamente diagnosticados y asignados a los grupos correspondientes por neurólogos del Hospital Clínico de Valencia. Las tablas 7,8 y 9 son descriptivas de la población de estudio.

Como puede verse en ellas, el tamaño muestral total en cada grupo es homogéneo y las pruebas estadísticas realizadas con el fin de demostrar dicha homogeneidad así lo respaldan.

En cuanto a la distribución de la población por sexos (tabla 7), existe un claro sesgo hacia el sexo femenino: el 72% de sujetos son mujeres, frente a un 28% de hombres.

Esto tiene sentido puesto que en la introducción se ha mencionado que los estudios EuroDem y EuroCoDe (<http://www.alzheimer-europe.org/EN/Media/Images/Article-Images/Prevalence-Rates/Eurodem>) señalaron que había una mayor prevalencia de la EA en mujeres respecto a hombres. Por tanto, la proporción más alta de mujeres encontrada en nuestra muestra es congruente con estos hallazgos.

Tabla 7: tabla descriptiva de la población de estudio. Se muestra la distribución por sexos en la muestra.

Grupo	SEXO		
	Hombres	Mujeres	Total
control	8	16	24
DCL	6	16	22
EA	4	16	20
Total	18	48	66

Tabla 7: Distribución de la muestra de estudio en función del sexo

En cuanto a las medias de edad de los sujetos observamos que entre los grupos (tanto de mujeres como de hombres) no hay diferencias significativas (tabla 8).

Tabla 8: tabla descriptiva de la población de estudio. Se muestran las medias de edad con su error estándar de los diferentes grupos de estudio que componen la muestra

Grupo	Media de edad (años) \pm error estándar		
	Hombres	Mujeres	Total
control	62 \pm 4	61 \pm 3	62 \pm 2
DCL	72 \pm 3	72 \pm 2	72 \pm 1
EA	69 \pm 4	71 \pm 2	69 \pm 2

Tabla 8: Medias de edades en los diferentes grupos diagnósticos.

A continuación en la tabla 9 aparece la distribución de la muestra la puntuación de cada grupo de estudio en el MMSE (*Mini Mental State Examination*) que se realizó en el momento en los sujetos fueron reclutados para el estudio. Todos los controles obtuvieron 30 puntos y, como ya hemos mencionado en la metodología, no había antecedentes de demencia familiares.

Respecto a la puntuación obtenida en el MMSE los sujetos que presentan EA tienen un valor inferior al punto de corte que indica una demencia (en torno a 24) mientras que los sujetos DCL puntúan superior a los sujetos EA pero no obtienen una puntuación que simbolice ausencia de deterioro cognitivo (el máximo de esta prueba es de 30 puntos y estos sujetos puntúan de media 26 puntos).

Tabla 9: tabla descriptiva de la población de estudio. Se muestra la puntuación en el MMSE de los diferentes grupos junto con sus errores estándar.

Grupo	Puntuación (MMSE) \pm error estándar
control	30 \pm 1
DCL	26 \pm 3
EA	20 \pm 3

Tabla 9: Distribución de la muestra de estudio en función de la puntuación en el MMSE

Se determinaron también los genotipos para la ApoE de todos los sujetos reclutados en el estudio. Como se ha mencionado previamente está descrito (Corder *et al.* 1993) que ser portador de una o dos copias del alelo ϵ 4 de esta apolipoproteína se ha relacionado con un mayor riesgo de padecer EA. En la tabla 10 se muestra la distribución de la muestra en los diferentes grupos según sus genotipos de ApoE.

Observamos un 50.8% de individuos con genotipo 3/3, un 34.4% de individuos con genotipo 3/4 y un 14.8% de individuos que son genotipo 4/4. Es especialmente llamativo, a la par que coherente, los 0 casos de genotipo ApoE 4/4 en el grupo de controles y el 75% de los sujetos con genotipo 3/3 en este mismo grupo.

Tabla 10: tabla descriptiva de las diferentes edades de los grupos de la muestra expresados como medias de edades en los diferentes grupos diagnósticos \pm su desviación típica.

	Genotipo ApoE			Total
	3/3	3/4	4/4	
control	18	6	0	24
DCL	6	8	8	22
EA	10	8	2	20
Total	34	22	10	66

Tabla 10: Distribución del genotipo ApoE en la muestra de estudio

Es llamativo que la distribución del genotipo ApoE 4/4 sea desigual en el grupo EA y en el DCL, ya que era de esperar una distribución similar y posiblemente más sesgada hacia el genotipo ApoE 4/4. Como ya se mencionó, el porcentaje de riesgo de padecer EA siendo portador en homocigosis del alelo 4 de la ApoE es del 20% con 68 años (Corder *et al.* 1993; Roses 1996). Por último también es relevante el hecho de que la población mayoritaria en el grupo EA tenga un genotipo ApoE 3/3.

Con estas evidencias nos planteamos que esta distribución de los genotipos de ApoE en nuestra muestra puede verse afectada por las frecuencias genotípicas totales de los tres alelos de la ApoE. Singh y colaboradores documentan que la frecuencia del alelo 4 en Europa es del 0.127%, mientras que la frecuencia del alelo 3 es del 0.790% y la del alelo 2 es del 0.077%. Por tanto tiene sentido que exista en nuestra muestra una mayor proporción de población que sea portadora de una o dos copias del alelo 3 de la ApoE, frente a los portadores del alelo 4 (Singh *et al.* 2006).

4.2. Determinación de biomarcadores en LCR

4.2.1. Determinación de la concentración de A β en LCR

Los niveles de A β en LCR disminuyen significativamente en el grupo *Enfermo* (que es un grupo que une a los pacientes diagnosticados con DCL y EA) cuando se comparan con el grupo *Sano* (compuesto por los sujetos controles) (figura 20).

Así mismo, los niveles de A β disminuyen significativamente en los pacientes de DCL y EA comparándolos con el grupo de controles (figura 21). Además, también observamos que los niveles de este péptido están disminuidos en los sujetos que padecen EA frente a los que están en estadios más tempranos de la enfermedad (DCL).

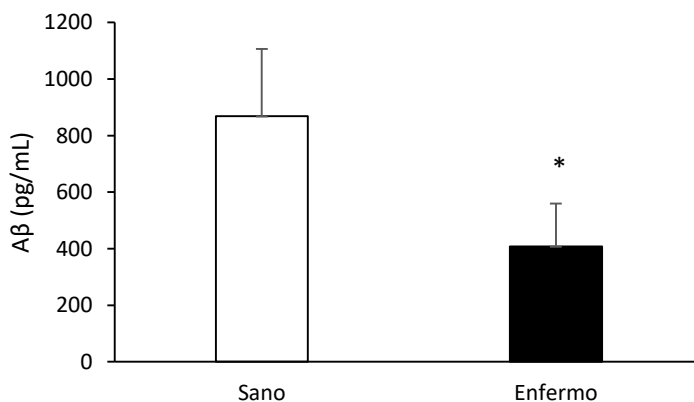


Figura 20: concentración de A β en LCR en los grupos Sano y Enfermo. Los sujetos del grupo *sano* presentan mayor concentración de A β en LCR que los sujetos *enfermos*. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar. Cada determinación se realiza por duplicado. n grupo *sano* =24, n grupo *enfermo*= 40.*p<0.05 respecto al grupo *sano*.

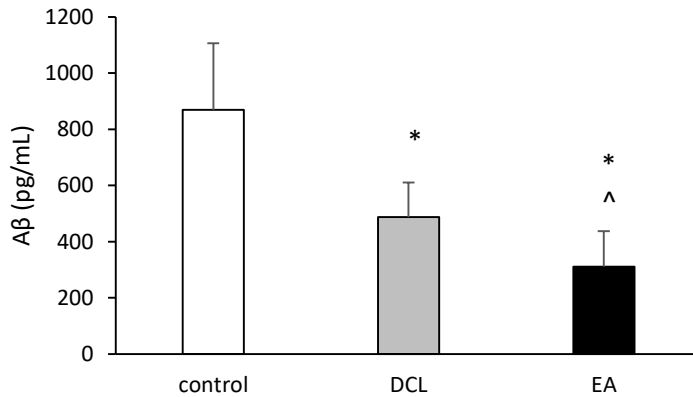


Figura 21: concentración de Aβ en LCR según el grupo de diagnóstico. Los sujetos controles presentan mayor concentración de Aβ en LCR que los sujetos de los grupos DCL y EA. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar. Cada determinación se realiza por duplicado. n grupo control =23, n grupo DCL= 22, n grupo EA=18.* $p < 0.05$ respecto al grupo control. ^ $p < 0.05$ respecto a grupo DCL

En cuanto a la concentración de Aβ en función del genotipo ApoE, se observa que los individuos con genotipo ApoE 4/4 muestran menor concentración de esta proteína respecto a los individuos con ApoE 3/3, independientemente de su grupo diagnóstico (figura 22).

La determinación de Aβ en LCR se ha incluido en la clínica diaria como criterio diagnóstico para la EA y está descrito que su concentración en LCR disminuye en la EA (Dubois *et al.* 2007). Nuestros resultados señalan que los niveles de Aβ en LCR pueden correlacionar con la evolución de la enfermedad ya que los pacientes de EA presentaban significativamente menores niveles que los sujetos DCL.

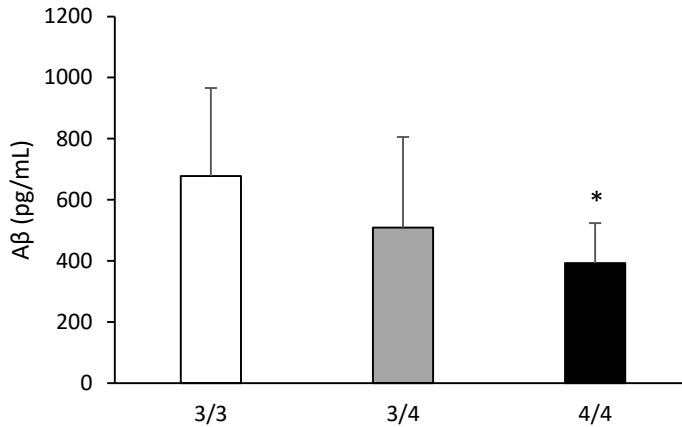


Figura 22: concentración de péptido amiloide en LCR dependiendo del genotipo de ApoE de los sujetos del estudio. Los sujetos con genotipo ApoE 3/3 presentan mayor concentración de péptido amiloide en LCR que los sujetos de genotipo ApoE 4/4. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar. Cada determinación se realiza por duplicado. n grupo ApoE 3/3= 34, n grupo ApoE 3/4 = 22, n grupo ApoE 4/4= 10. *p<0.05 respecto al genotipo ApoE 3/3.

4.2.2. Determinación de la concentración de tau en LCR

Los niveles de tau total en LCR aumentan significativamente en el grupo *Enfermo* respecto a los sujetos del grupo *Sano* (figura 23). Observamos también que los niveles de tau aumentan significativamente en los sujetos DCL y EA respecto al grupo control, pero no encontramos diferencias en la concentración de tau total entre los pacientes DCL y EA (figura 24). Teniendo en cuenta que la proteína tau se distribuye de forma no normal en nuestros datos, aportamos una gráfica donde se muestren la mediana y los percentiles 25 y 75, en forma de diagramas de cajas, tal y como recomiendan Martínez-Gonzalez *et al* (2014). Esto se adjunta en la figura 25.

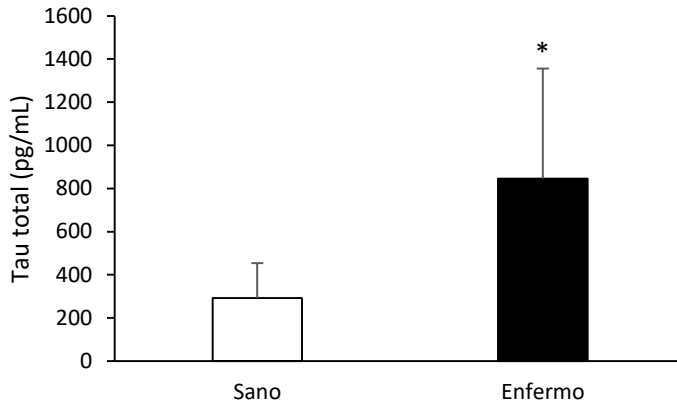


Figura 23: concentración de tau total en LCR en los grupos *Sano* y *Enfermo*. Los sujetos del grupo *Enfermo* presentan mayor concentración de tau en LCR que los sujetos del grupo *Sano*. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar. Cada determinación se realiza por duplicado. n grupo *Sano* =24, n grupo *Enfermo*= 42. * $p < 0.05$ respecto al grupo Sano.

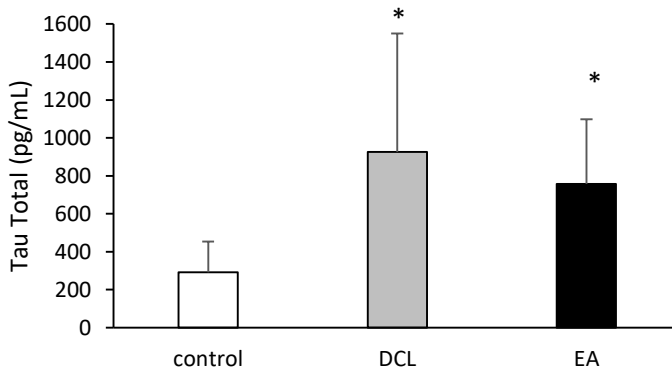


Figura 24: concentración de tau total en LCR según el grupo diagnóstico. Los sujetos controles presentan menor concentración de tau en LCR que los sujetos de los grupos DCL y AD. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar. Cada determinación se realiza por duplicado. n grupo control =23, n grupo DCL= 22, n grupo EA=20 * $p < 0.05$ respecto al grupo control.

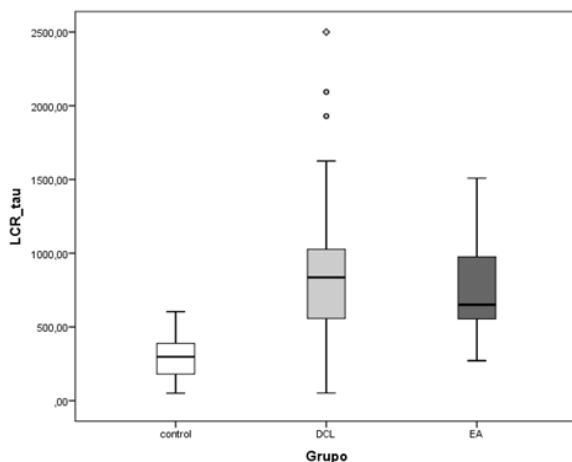


Figura 25: diagrama de cajas para la variable Tau Total. Se muestran las medianas de esta variable en cada grupo, el percentil 25 y el percentil 75. También aparecen los posibles *outliers* indicados con círculos si se desvían más de una desviación típica desde la mediana o con rombos si se desvían más de dos desviaciones típicas.

Para concluir este apartado, observamos que los sujetos con genotipo ApoE 4/4 presentan una mayor concentración de tau total comparado con los individuos 3/3 (figura 26).

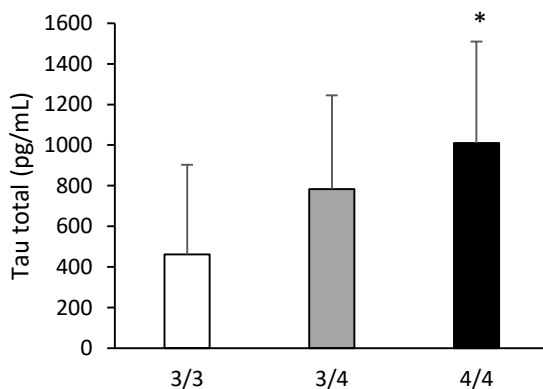


Figura 26: concentración de tau total en LCR según el genotipo de ApoE. Los sujetos con genotipo ApoE 3/3 presentan menor concentración de tau en LCR que los sujetos de genotipo ApoE 4/4. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar. Cada determinación se realiza por duplicado. n grupo ApoE 3/3= 34, n grupo ApoE 3/4 = 22, n grupo ApoE 4/4= 10. * $p < 0.05$ respecto al genotipo ApoE 3/3.

4.2.3. Determinación de la concentración de p-tau en LCR

Los niveles de p-tau en LCR aumentan significativamente en los sujetos del grupo *Enfermo* respecto a los sujetos del grupo *Sano* (figura 27). Cuando comparamos los diferentes grupos según el diagnóstico, los resultados muestran que los niveles de p-tau aumentan significativamente en los sujetos DCL y EA respecto al grupo control (figura 28).

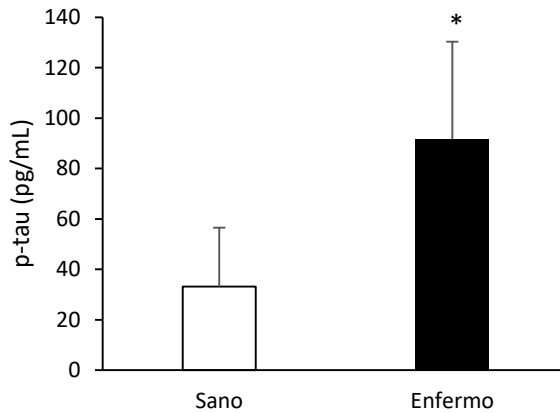


Figura 27: concentración de p-tau en LCR los grupos *Sano* y *Enfermo*. Los sujetos *sanos* presentan menor concentración de tau fosforilada en LCR que los sujetos *enfermos*. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar. Cada determinación se realiza por duplicado. n grupo *Sano* =24, n grupo *Enfermo*= 40 * $p < 0.05$ respecto al grupo Sano.

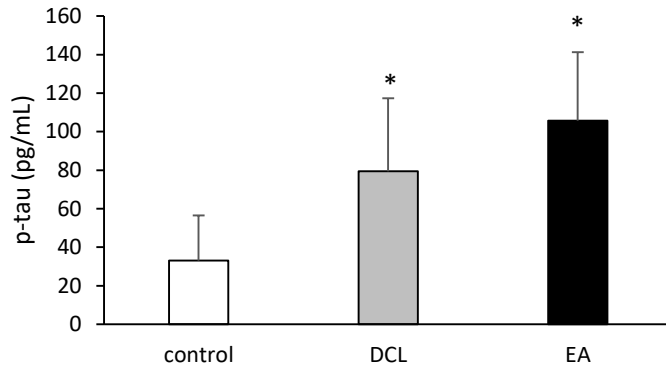


Figura 28: concentración de p-tau en LCR según el grupo de diagnóstico. Los sujetos controles presentan menor concentración de tau fosforilada en LCR que los sujetos de los grupos DCL y EA. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar. Cada determinación se realiza por duplicado. n grupo control =18, n grupo DCL= 22, n grupo EA=19 * $p < 0.05$ respecto al grupo control.

Tau y p-tau también están descritas como biomarcadores de la EA y sus niveles en LCR son indicativos del avance clínico de la enfermedad (Dubois *et al.* 2007). Nuestros resultados reflejan que, efectivamente, los sujetos que padecen la enfermedad tienen los niveles de tau y p-tau significativamente elevados respecto a los sujetos controles.

En cambio, cuando analizamos la concentración de p-tau respecto al genotipo de ApoE observamos que, aunque hay una tendencia a aumentar, no hay diferencias significativas entre los individuos ApoE 3/3, 3/4 y 4/4 (figura 29).

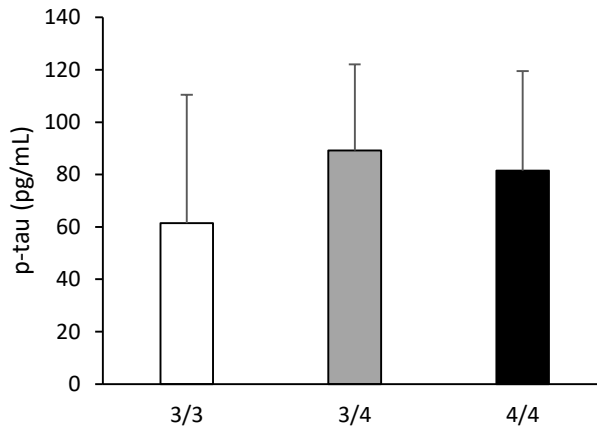


Figura 29: concentración de p-tau en LCR según el genotipo de ApoE. No se observan diferencias significativas en la concentración de p-tau en función del genotipo de ApoE. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar. Cada determinación se realiza por duplicado. n grupo ApoE 3/3= 34, n grupo ApoE 3/4 = 22, n grupo ApoE 4/4= 10.

4.3. Determinación de biomarcadores en suero

Los objetivos de la presente tesis doctoral se basan en comprobar si alguna de las proteínas que aparecen a continuación (o un conjunto de ellas) pueden ser biomarcadores de la EA cuando son medidas en suero. Estas proteínas son clusterina, RAGE, RCAN1, PKR, TGF- β 1, calcineurina, α 1 β -glicoproteína o interleuquina 6.

Por tanto, y al igual que se realizó en las proteínas medidas en LCR, para las proteínas medidas en suero se ha calculado si existen diferencias significativas entre los sujetos de los grupos *Enfermo* y *Sano* y si existen diferencias entre los sujetos de los diferentes grupos de diagnóstico clínico.

4.3.1. Determinación de la concentración de clusterina en suero

La concentración de clusterina es significativamente menor en el grupo *Enfermo* respecto al grupo *Sano* (figura 30). Cuando analizamos los niveles de clusterina entre los tres grupos diagnósticos, observamos que los pacientes con EA presentan menor concentración de clusterina respecto al grupo control y DCL. No encontramos diferencias significativas entre sujetos del grupo control y del grupo DCL (figura 31).

Además, la concentración de clusterina en suero no mostró diferencias significativas entre los grupos de sujetos por sus genotipos de ApoE.

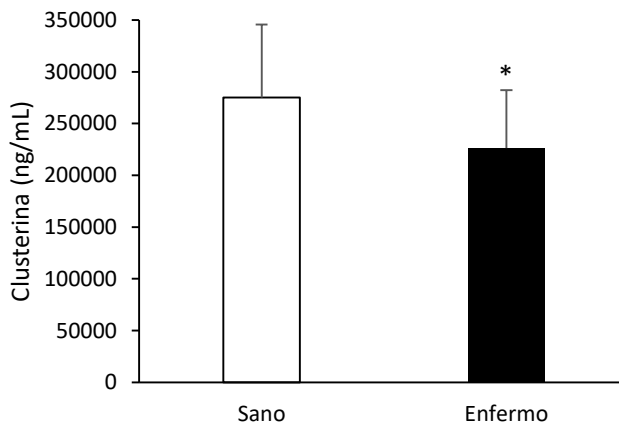


Figura 30: concentración de clusterina en suero los grupos *Sano* y *Enfermo*. Los sujetos *sanos* presentan mayor concentración de clusterina que los sujetos *enfermos*. Cada determinación se realiza por duplicado. n grupo *Sano* =24, n grupo *Enfermo*= 40 *p<0.05 respecto al grupo control. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar.

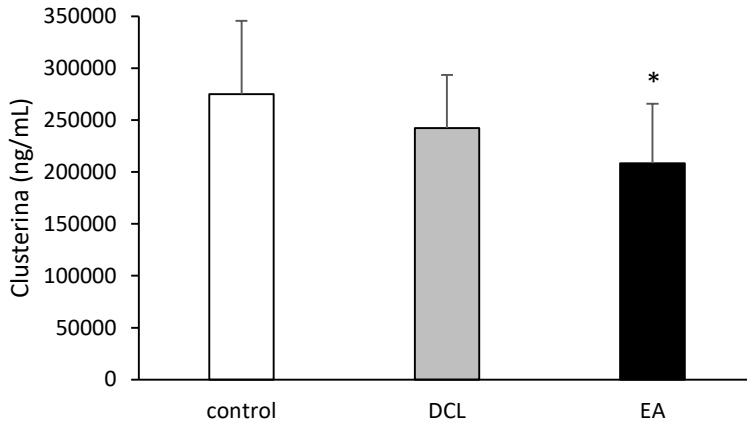


Figura 31: concentración de clusterina en suero en función del grupo de diagnóstico. Los sujetos controles presentan mayor concentración de clusterina que los sujetos AD. Los sujetos DCL no presentan diferencias significativas comparadas con otros grupos. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar. Cada determinación se realiza por duplicado. n grupo control =24, n grupo DCL= 22, n grupo EA=20 *p<0.05 respecto al grupo control.

4.3.2. Determinación de la concentración de RAGE en suero

La concentración de RAGE no muestra diferencias significativas entre los grupos *Sano* y *Enfermo*. No obstante cuando comparamos los niveles de RAGE según los diferentes grupos de diagnóstico observamos que éstos son significativamente mayores en los sujetos del grupo de EA tanto respecto a controles, como respecto a sujetos DCL (figura 32).

Hay que remarcar que RAGE se distribuye de forma no normal, por lo que es necesario aportar una gráfica donde se muestren la mediana y los percentiles 25 y 75, en forma de diagramas de cajas tal y como recomiendan Martínez-Gonzalez *et al* (2014). Esta gráfica se muestra

en la figura 33. Finalmente, la concentración de RAGE en suero no mostró diferencias significativas en los grupos de sujetos por sus genotipos de ApoE.

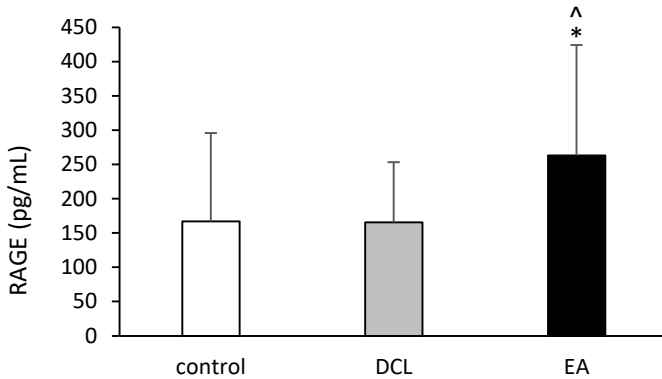


Figura 32: concentración de RAGE en suero en función del grupo de diagnóstico. Los sujetos EA presentan mayor concentración de RAGE que los sujetos control y DCL. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar. Cada determinación se realiza por duplicado. n grupo control =22, n grupo DCL= 21, n grupo EA=20 $p < 0.05$ respecto al grupo control. $\wedge p < 0.05$ respecto a grupo DCL.

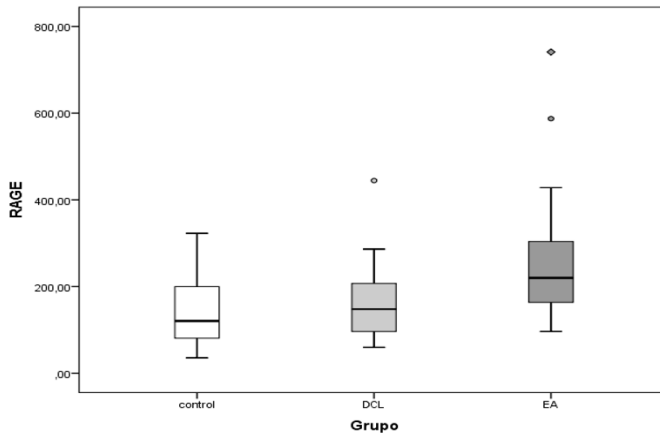


Figura 33: diagrama de cajas para la variable RAGE. Se muestran las medianas de esta variable en cada grupo, el percentil 25 y el percentil 75. También aparecen los posibles *outliers* indicados con círculos si se desvían más de una desviación típica desde la mediana, o con rombos, si se desvían más de dos desviaciones típicas.

4.3.3. Determinación de la concentración de RCAN1 en suero

No hay diferencias significativas en los niveles de RCAN1 entre los sujetos del grupo *Sano* con el grupo *Enfermo*. Comparando las concentraciones de esta proteína entre los tres grupos de estudio, los niveles de RCAN1 fueron significativamente menores en sujetos del grupo EA comparado con los sujetos del grupo DCL (figura 34), pero no hay diferencias significativas entre pacientes de EA y sujetos controles. Tampoco observamos diferencias significativas cuando comparamos los niveles de RCAN1 en los tres grupos de genotipo ApoE.

Debido a que RCAN1 también se distribuye de forma no normal, es necesario aportar una gráfica donde se muestren la mediana y los percentiles 25 y 75 en forma de diagramas de cajas. Esto se encuentra en el la figura 35.

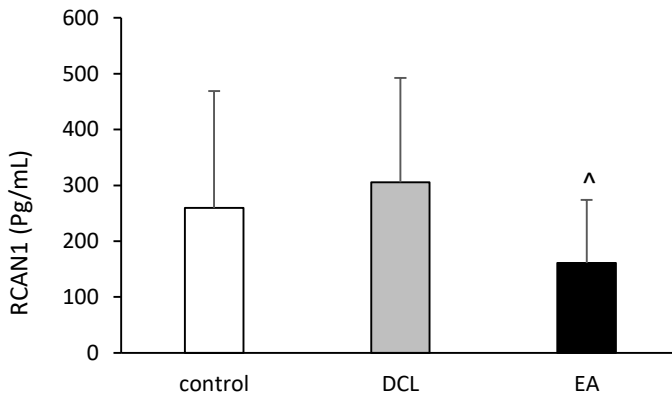


Figura 34: concentración de RCAN1 en suero en función del grupo de diagnóstico. Los sujetos DCL presentan mayor concentración de RCAN1 que los sujetos EA. Los sujetos controles no presentan diferencias significativas comparados con otros grupos. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar. Cada determinación se realiza por duplicado. n grupo control =19, n grupo DCL= 22, n grupo EA=18. $p < 0.05$ respecto al grupo DCL.

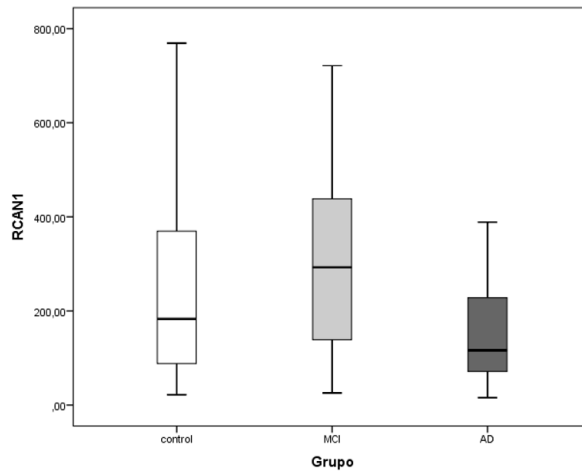


Figura 35: diagrama de cajas para la variable RCAN1. Se muestran las medianas de esta variable en cada grupo, el percentil 25 y el percentil 75.

4.3.4. Determinación de la concentración de PKR en suero

Los niveles plasmáticos de PKR en los sujetos del grupo *Enfermo* están disminuidos con respecto a los sujetos del grupo *Sano* (figura 36). Además, encontramos menor concentración de PKR en el grupo EA con respecto a los sujetos controles cuando comparamos los niveles de esta proteína en función de los grupos de diagnóstico (figura 37).

Teniendo en cuenta que PKR, al igual que otras proteínas, se distribuyen de forma no normal, es necesario aportar una gráfica donde se muestren la mediana y los percentiles 25 y 75 en forma de diagramas de cajas. Esta gráfica aparece en la figura 38.

Finalmente, los niveles de PKR en suero no mostraron diferencias significativas en los grupos de sujetos en función de sus genotipos de ApoE.

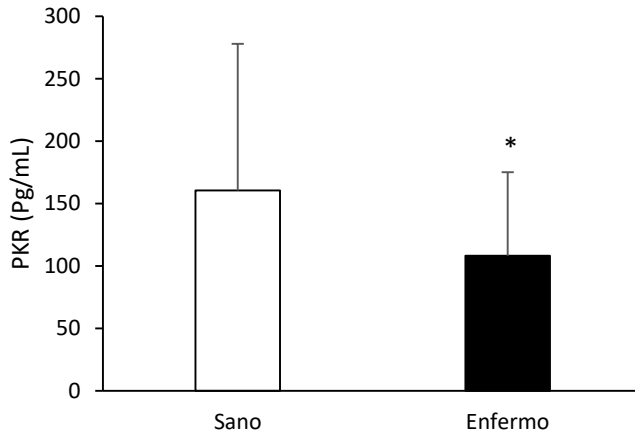


Figura 36: concentración de PKR en suero según los grupos *Sano* y *Enfermo*. Los sujetos del grupo *Sano* presentan mayor concentración de PKR que los sujetos del grupo *Enfermo*. Cada determinación se realiza por duplicado. n grupo *Sano* =24, n grupo *Enfermo*= 40 *p<0.05 respecto al grupo control. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar.

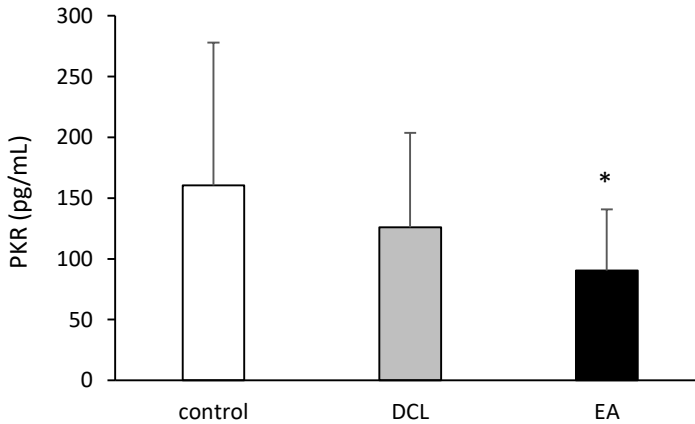


Figura 37: concentración de PKR en suero función del grupo de diagnóstico. Los sujetos controles presentan mayor concentración de PKR que los sujetos EA. Los sujetos DCL no presentan diferencias significativas comparadas con otros grupos. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar. Cada determinación se realiza por duplicado. n grupo control =24, n grupo DCL= 20, n grupo EA=20 *p<0.05 respecto al grupo control.

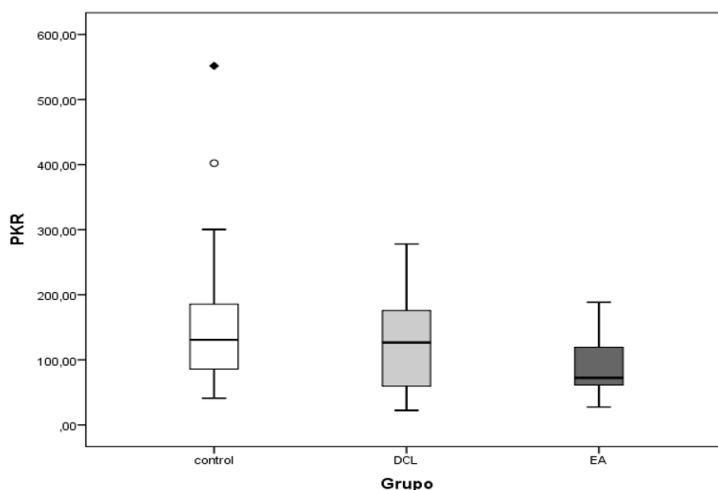


Figura 38: diagrama de cajas para PKR. Se muestran las medianas de esta variable en cada grupo, el percentil 25 y el percentil 75. También aparecen los posibles *outliers* indicados con círculos, si se desvían más de una desviación típica desde la mediana, o con rombos, si se desvían más de dos desviaciones típicas.

4.3.5. Determinación de la concentración de TGF- β 1 e IL-6

Estas dos proteínas están implicadas en los procesos inflamatorios, algo que está descrito en la EA (Wyss-Coray y Rogers, 2012). En el caso de TGF- β 1, no encontramos diferencias significativas entre ningún grupo en ninguna de las comparaciones realizadas a lo largo del estudio. En cuanto a IL-6, sus niveles no pudieron determinarse experimentalmente porque los valores reales obtenidos se encontraban por debajo del umbral de detección del kit (2 pg/ml).

4.3.6. Determinación de la concentración de calcineurina

La calcineurina es la principal proteína reguladora de RCAN1 (Abdul, Sama *et al.* 2009) y en trabajos previos de nuestro laboratorio se vio que estaba afectada en sujetos sanos con genotipo ApoE 4/4 (Badia *et al.* 2013). La determinación de los valores de calcineurina no se pudo

realizar correctamente, ya que los valores reales obtenidos se encontraban por debajo del umbral de detección del kit (0.09ng/ml).

4.3.7. Determinación de la concentración de $\alpha 1\beta$ glicoproteína

La $\alpha 1\beta$ glicoproteína no se pudo determinar por no llegar al límite de detección del kit ELISA (0.1ng/ml). En estudios previos de nuestro grupo de investigación en colaboración con el de la Dra. Perluigi de Roma, vimos mediante proteómica redox que esta glicoproteína se encontraba más oxidada en plasma de enfermos con EA y en sujetos DCL respecto a sujetos controles (Di Domenico *et al.* 2016).

4.4. Correlaciones entre Biomarcadores

Las correlaciones que aparecen a continuación (tablas 11 y 12) se establecen entre aquellas proteínas incluidas en nuestro estudio que tienen una conexión con la EA. Hay que destacar que una correlación no indica causalidad. La asociación entre las citadas proteínas ha de ser sugerida teniendo en cuenta las funciones biológicas y fisiológicas de cada una de ellas.

El hecho de que los coeficientes de las correlaciones entre las variables no superen el 0.5, indica que dichas variables contienen información diferente. Esto motiva la realización de una prueba para la reducción de las mismas al conjunto de factores comunes: un análisis de componentes principales (PCA, explicado en *Metodología*).

El PCA es la metodología estadística que empleamos con el objetivo de encontrar, basándonos en la bibliografía, un set de biomarcadores que

sea sensible y específico y que mejore o complemente a las pruebas diagnósticas empleadas actualmente (Doecke *et al.* 2012).

4.4.1. Correlaciones entre biomarcadores en LCR

Tabla 11: tabla de correlaciones entre los diferentes biomarcadores medidos en LCR e incluidos en el estudio.

		A β	tau	p-tau	ApoE	Grupo
A β	Coeficiente	1	-,302	-,482**	-,380**	-,788**
	Sig. (bilateral)		,017	,000	,002	,000
tau	Coeficiente	-,302*	1	,693**	,425**	,398**
	Sig. (bilateral)	,017		,000	,000	,001
p-tau	Coeficiente	-,482**	,693**	1		,659**
	Sig. (bilateral)	,000	,000			,000

Tabla 11: tabla de correlaciones entre las diferentes proteínas biomarcadoras determinadas en suero e incluidas en el estudio. Se incluyen en la tabla aquellas proteínas que muestran correlaciones significativas bien mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Además, aparece marcado con un asterisco (*) aquella correlación con valor 0.05 o inferior hasta 0.01 y con dos asteriscos (**) aquellas correlaciones con valores de 0.01 o inferiores. Se muestran las proteínas determinadas en LCR a la izquierda y su relación con otras proteínas determinadas en LCR, con la clusterina de forma especial y con los genotipos ApoE y el grupo de diagnóstico.

En la tabla 11 se observa que existe una correlación entre las proteínas medidas en LCR (A β , tau y p-tau) con los grupos de diagnóstico. Esto tiene sentido, puesto que, como ya se ha remarcado previamente, estas proteínas son biomarcadores de uso en la actividad clínica diaria y muchas veces son empleadas por los clínicos en el diagnóstico diferencial. Llama también la atención la correlación de estos biomarcadores en LCR entre ellos, mostrando su solidez a la hora de actuar como criterios diagnósticos de apoyo tal y como proponen Dubois *et al.* (2014).

4.4.2. Correlaciones entre biomarcadores periféricos

Tabla 12. Tabla de correlaciones entre las diferentes proteínas biomarcadoras determinadas en suero e incluidas en el estudio.

		A β	Tau	P-Tau	Clusterina	Grupo
Clusterina	Coefficiente	,338**				-,416**
	Sig. (bilateral)	,007				,001
PKR	Coefficiente	,351**	-,191*	-,305*		-,317*
	Sig. (bilateral)	,005	,027	,021		,011
RCAN1	Coefficiente	,289*			,300*	-,261*
	Sig. (bilateral)	,029			,020	,044
RAGE	Coefficiente	-,179*			-,259*	,289*
	Sig. (bilateral)	,043			,040	,022

Tabla 12: Tabla de correlaciones entre las diferentes proteínas biomarcadoras determinadas en suero e incluidas en el estudio. Solo se incluyen en la tabla aquellas proteínas que muestran correlaciones significativas, bien mediante el coeficiente de correlación de Pearson (en verde), el coeficiente tau de Kendall (en azul) o ambos (en amarillo). Además, aparece marcado con un asterisco (*) aquella correlación con valor 0.05 o inferior hasta 0.01 y con dos asteriscos (**) aquellas correlaciones con valores de 0.01 o inferiores. Se muestran las proteínas séricas determinadas y su relación con las proteínas determinadas en LCR. Estas proteínas no mostraban correlaciones más allá de las reflejadas en esta tabla.

En este caso, observamos que todas las proteínas medidas en suero se correlacionan con los niveles de A β y con el grupo de diagnóstico. Es relevante que PKR tiene una correlación también con tau y p-tau. Además, observamos que RCAN1 y RAGE presentan una correlación significativa con clusterina.

4.5. Estudio de la especificidad y sensibilidad de los biomarcadores determinados

Las curvas ROC se hallan con el objetivo de determinar cómo de sensibles y específicos son estos biomarcadores para ayudar al diagnóstico de un sujeto que padezca EA, razón por la cual se emplea como estado positivo de la enfermedad el grupo de EA de entre los 3 grupos diagnósticos que tenemos en nuestra muestra. Es importante resaltar que para obtener una buena curva ROC debe indicarse la categoría que se debe considerar positiva en la variable de estado, porque para cada variable el valor positivo será diferente (por ejemplo, en la variable $A\beta$ se considera positiva -marcadora de enfermedad- una concentración más pequeña).

4.5.1. Estudio de la especificidad y sensibilidad de los biomarcadores determinados en LCR

Las áreas bajo la curva (AUC) de los biomarcadores empleados en la práctica clínica ($A\beta$, tau y p-tau medidas en LCR) dan muy buen resultado. Hemos calculado cada curva ROC de estas variables para evaluar la capacidad de diagnóstico tanto entre 2 categorías (*Sano* y *Enfermo*), como en 3 categorías (Control-DCL-EA). Los resultados de estas últimas también aparecen en la tabla 13 y en las gráficas de la figura 39

Tabla 13: áreas bajo la curva para las diferentes curvas ROC de los biomarcadores medidos en LCR.

Proteína	AUC Ctrl-DCL-EA	p	AUC Sano-Enfermo	P
A β en LCR	0,99	0.000	0,95	0.000
tau en LCR	0,69	0.150	0,91	0.000
p-tau en LCR	0,82	0.000	0,90	0.000

Tabla 13: Se indica el valor de la AUC tanto para la capacidad diagnóstica frente a los 3 grupos (Ctrl-DCL-EA), como para 2 grupos (*Sano-Enfermo*). En el primer caso el estado positivo se considera pertenecer al grupo EA. En el 2º caso la categoría positiva es pertenecer al grupo *Enfermo*. Es relevante el hecho de que tau en LCR a la hora de diagnosticar entre controles, DCL y EA no es significativa.

Las curvas ROC de A β y p-tau que obtenemos de nuestra muestra dejan un AUC de 0.99 y 0.82, respectivamente a la hora de discriminar entre los grupos control, DCL y EA. Por lo tanto son considerados muy buenos biomarcadores para la EA. Resulta destacable la curva ROC de tau deja un AUC de 0.69, que dista del límite aceptado de 0.8 para considerar una prueba diagnóstica como buena.

Sin embargo, cuando procedemos a colapsar los grupos en enfermos y sanos; las tres curvas ROC dan valores de AUC excelentes, probándose como buenos biomarcadores de la EA.

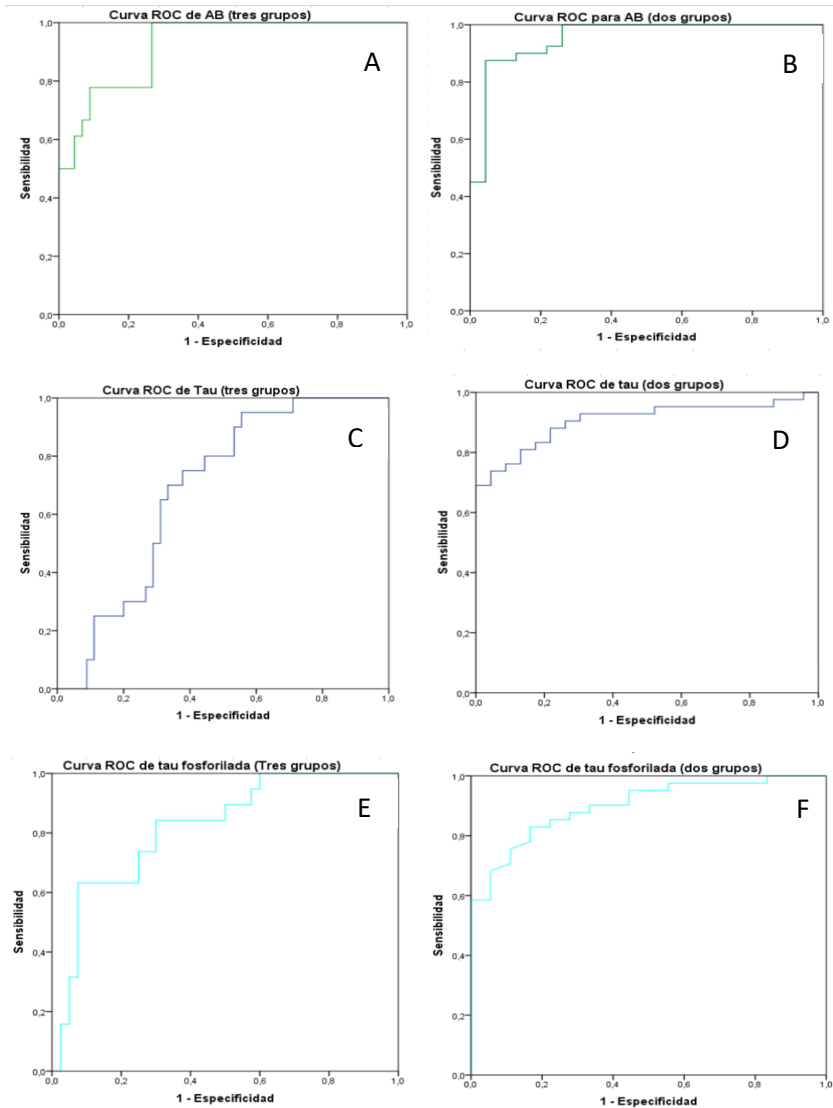


Figura 39: figuras de las curvas ROC para A β (A, B), Tau total (C, D) y tau fosforilada (E, F) (patrones de oro o gold standard) como pruebas diagn3sticas medidas en LCR. **Panel A:** curva ROC de A β que discrimina entre grupos control, DCL y EA. **Panel B:** curva ROC del mismo péptido para discriminar entre *Sanos-Enfermos*. **Panel C:** curva ROC de tau que discrimina entre grupos control, DCL y EA. **Panel D:** curva ROC de tau que discrimina entre *Sanos-Enfermos*. **Panel E:** curva ROC de p-tau que discrimina entre grupos control, DCL y EA. **Panel F:** curva ROC de p-tau que discrimina entre *Sanos-Enfermos*.

4.5.2. Estudio de la especificidad y sensibilidad de los biomarcadores determinados en suero

En las figuras 40, 41, 42 y 43 aparecen las curvas ROC de los biomarcadores determinados en suero cuando se discriminan entre 3 categorías diagnósticas. Además, también realizamos las curvas ROC de estas variables, para evaluar la capacidad de diagnóstico, entre solo 2 categorías (*Sano y Enfermo*). Los datos concretos de las AUC aparecen en la tabla 14.

Tabla 14: areas bajo la curva para las diferentes curvas ROC de los biomarcadores medidos en suero

Proteínas	AUC Ctrl-DCL-EA	p	AUC Sano-Enfermo	p
Clusterina	0,75	0.001	0,72	0.002
PKR	0,68	0.071	0,66	0.080
RCAN1	0,70	0.069	0,53	0.898
RAGE	0,73	0.009	0,63	0.167

Tabla 14: se indica el valor de la AUC tanto para la capacidad diagnóstica frente a 3 estados (siendo la categoría positiva perteneciente al grupo *enfermo* de Alzheimer) como para 2 estados (siendo el estado positivo perteneciente al grupo *enfermo*). Es relevante destacar que clusterina presenta una AUC significativa en ambos casos

En primer lugar, en la figura 40 aparecen las curvas ROC de clusterina. A la derecha podemos observar la capacidad diagnóstica de esta proteína cuando tiene que distinguir sujetos EA de sujetos DCL y controles. A la izquierda observamos este mismo valor diagnóstico pero solo para discriminar sujetos enfermos de sujetos sanos. Como se ha mostrado en la tabla 8, los 2 valores de AUC son estadísticamente significativos, pero ninguno de los ellos es aceptable como marcador diagnóstico por no superar el umbral de 0.8.

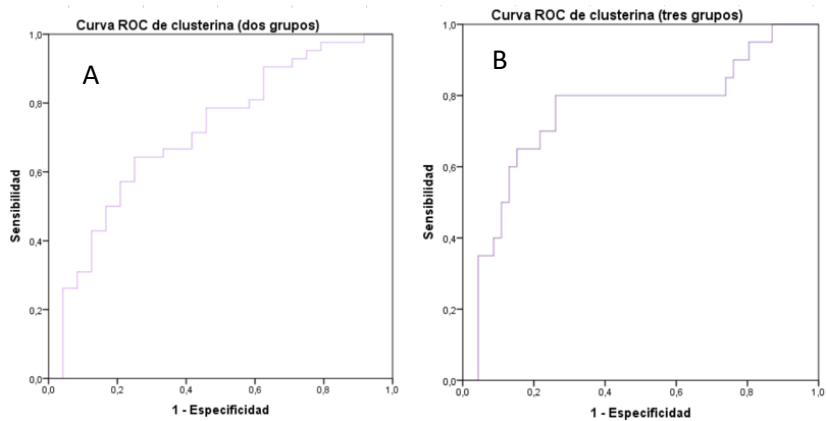


Figura 40: curvas ROC para la clusterina medida en suero. A la izquierda (panel A), aparece la curva ROC de la capacidad diagnóstica de la clusterina para distinguir sujetos *enfermos* de sujetos sanos. A la derecha (panel B) aparece la curva ROC de la misma proteína, esta vez, indicando la capacidad de discriminar sujetos con EA de los sujetos control y DCL. Ninguno de los valores de AUC es válido para hablar de un marcador sensible y/o específico.

A continuación, en la figura 41 aparecen las curvas ROC de PKR en el mismo orden que el antes citado para clusterina. En este caso, las curvas ROC no son significativas, por lo que no se considera su AUC. De forma similar a lo previamente descrito para PKR, RCAN1 tiene también 2 valores no significativos de AUC. Las curvas ROC para esta proteína aparecen a continuación en la figura 42.

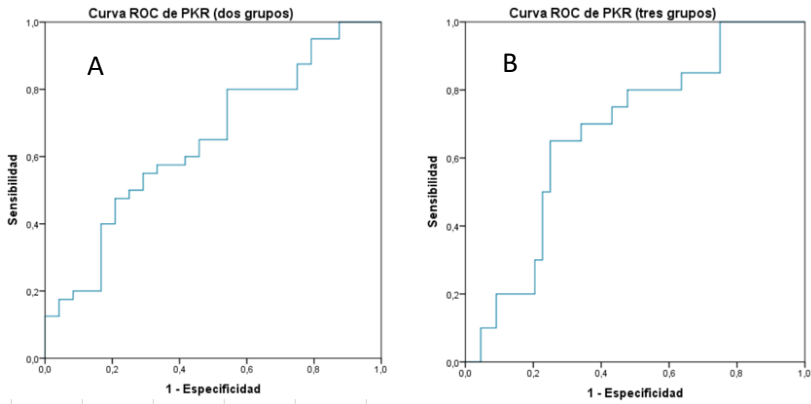


Figura 41: curvas ROC para PKR medida en suero. A la izquierda (panel A), aparece la curva ROC de la capacidad diagnóstica de PKR para distinguir sujetos *enfermos* de sujetos *sanos*. A la derecha (panel B) aparece la curva ROC de la misma proteína, esta vez, indicando la capacidad de discriminar sujetos con EA de los sujetos control y DCL. Ninguno de los valores de AUC es válido para hablar de un marcador sensible y/o específico.

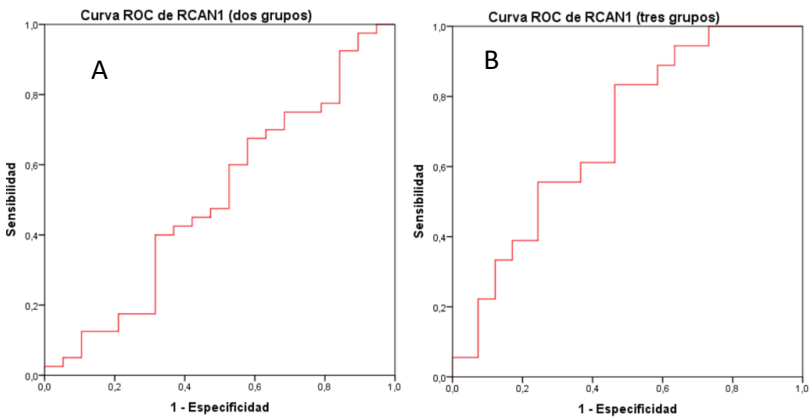


Figura 42: curvas ROC para RCAN1 medida en suero. A la izquierda (panel A), aparece la curva ROC de la capacidad diagnóstica de RCAN1 para distinguir sujetos *enfermos* de sujetos *sanos*. A la derecha (panel B) aparece la curva ROC de la misma proteína, esta vez indicando la capacidad de discriminar sujetos con EA de los sujetos control y DCL. Ninguno de los valores de AUC es válido para hablar de un marcador sensible y/o específico.

En el caso de RAGE las dos curvas ROC aparecen según lo descrito para las anteriores. Llama la atención que su curva ROC, para distinguir sujetos EA de sujetos DCL y control, es significativa pero no llega al valor umbral de 0.8 (figura 43). Sin embargo, al colapsar los grupos DCL y EA en el grupo Enfermo y calcular la curva ROC esta significatividad se pierde. Esto puede ser indicativo de que RAGE es un marcador específico de EA.

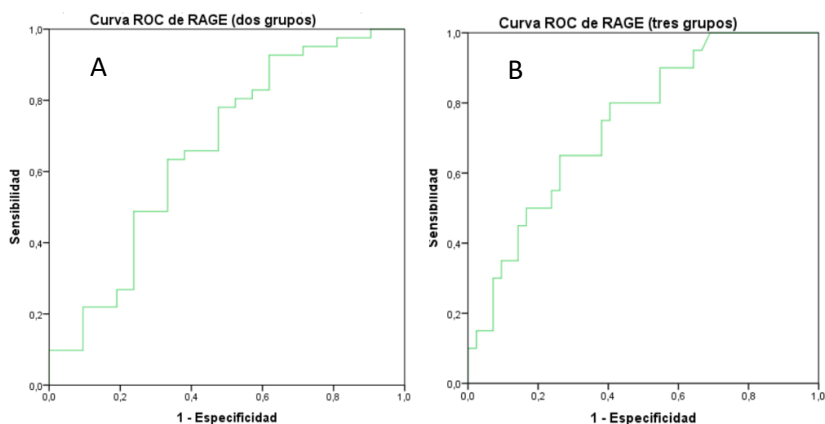


Figura 43: figuras de las curvas ROC RAGE medida en suero. A la izquierda (panel A), aparece la curva ROC de la capacidad diagnóstica de la clusterina para distinguir sujetos *enfermos* de sujetos *sanos*. A la derecha (panel B) aparece la curva ROC de la misma proteína, esta vez indicando la capacidad de discriminar sujetos con EA de los sujetos control y DCL. Ninguno de los valores de AUC es válido para hablar de un marcador sensible y/o específico.

Por tanto, como ya se ha mencionado, ninguna curva ROC de proteínas medidas en suero deja un AUC aceptable en ninguno de los casos, ni siquiera cuando colapsamos los grupos. Este hecho nos hizo pensar que la medida de las proteínas por separado podía dar información demasiado distinta. Asimismo, siguiendo la bibliografía consultada y

viendo que en nuestra muestra era viable, procedimos a realizar una reducción de factores a partir de la que calculamos un set de biomarcadores. Sobre la base de la idea de Doecke y colaboradores (Doecke *et al.* 2012), nos planteamos la obtención un set de biomarcadores que uniera la sensibilidad y la especificidad de los biomarcadores determinados en suero.

4.6. Obtención de un set de biomarcadores

4.6.1. Análisis de componentes principales como método de unión de biomarcadores

Esta prueba fue aplicada a diferentes agrupaciones de variables, ya especificadas en la metodología. En la tabla 15 se reproducen los resultados obtenidos para el determinante de la matriz de correlaciones y la prueba de KMO y Bartlett para el análisis.

Tabla 15: resultados del análisis de componentes principales (PCA). Las variables introducidas en el modelo son clusterina, PKR, RAGE y RCAN1.

Prueba de KMO y Bartlett			Matriz de correlaciones
Medida Kaiser-Meyer-Olkin de adecuación de muestreo		0,49	Determinante = 0.772
Prueba de esfericidad de Bartlett	Aprox. Chi-cuadrado	12,905	
	gl	6	
	Sig.	0,045	

Tabla 15: Se muestran el índice de esfericidad de Barlett, así como su significatividad, el valor del determinante de la matriz y el test KMO.

Por un lado, como se puede observar, el valor del determinante de la matriz de correlaciones no es próximo a 0, lo que indica que las variables usadas están relacionadas y, por lo tanto, el análisis factorial es una técnica pertinente para analizar estas variables. Por otro lado, el valor obtenido para el estadístico KMO es bajo, pero superior a 0,5, lo que implica que la utilización del análisis factorial es aceptable (Bisquerra A., 2004). La significatividad del test nos permite aceptar el análisis, dado el pequeño tamaño muestral empleado.

En la tabla 16, se reproduce la matriz resultante del PCA. En el análisis se han obtenido 2 factores que son capaces de explicar un 66 % de la varianza de los datos originales. El método de extracción utilizado ha sido el análisis de componentes principales y el método de rotación varimax con normalización Kaiser, convergiendo la rotación en 3 iteraciones.

Finalmente, a partir de las 4 variables introducidas obtenemos 2 factores, que matemáticamente serían la combinación lineal entre los elementos que aparecen en la tabla 16 multiplicados por sus respectivas variables (en la primera columna), como se explicaba en la *Metodología*.

Los 2 factores extraídos del citado análisis fueron guardados como nuevas variables. Con éstas se calcularon nuevas curvas ROC, que mostrarán la especificidad y sensibilidad del nuevo set de biomarcadores.

Tabla 16: resultado del análisis de componentes principales.

Componentes extraídos del PCA		
Variable	Componente	
	1	2
Clusterina	0,813	0,082
PKR	-0,045	-0,861
RCAN1	0,589	0,416
RAGE	-0,699	0,470

Tabla 16: Se muestran los dos componentes extraídos de la matriz, así como los valores que explican la variabilidad explicada por cada biomarcador.

Una aplicación de los dos factores del PCA es que su representación nos permite colocar las proteínas de estudio en un espacio explicativo. Esto aparece en la figura 44 y es explicado a continuación.

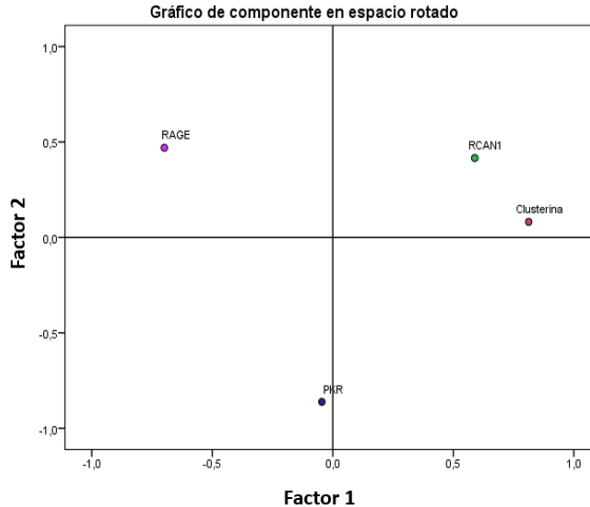


Figura 44: gráfico donde aparecen las proteínas introducidas en el PCA1. En la figura aparecen representadas clusterina, RCAN1, RAGE y PKR y se muestra el peso explicativo de cada una de ellas en los distintos factores.

En la figura 44 observamos los componentes que son parte de los 2 factores del PCA1 explicado previamente. La representación gráfica nos hace ver que en el factor 1 (horizontal) clusterina y RCAN1 tienen un valor próximo a 1, lo que indica que le dan mucho peso a dicho factor. Lo mismo ocurre con RAGE, que le da peso con un valor negativo. PKR sin embargo se mantiene cerca del 0, siendo la que menos nivel explicativo proporciona al factor 1.

Parte de la capacidad explicativa de las proteínas que se representan en este gráfico, tiene que ver con las relaciones biológicas que mantienen entre ellas. Por ejemplo, RCAN1 y clusterina se sitúan cercanas la una de la otra, manteniendo una relación positiva entre ellas. Esto concuerda con la correlación entre ambas proteínas que mostrábamos previamente.

De la misma manera, clusterina muestra una relación negativa con RAGE (siempre respecto al componente 1), lo que también concuerda con lo que ya hemos observado en las correlaciones.

Teniendo en cuenta esta explicación, resultaría interesante observar el comportamiento de estas proteínas cuando introducimos en el modelo de PCA las proteínas determinadas en líquido. Dicho PCA (PCA 2) se realizó únicamente con este fin y el gráfico de componentes aparece a continuación en la figura 45:

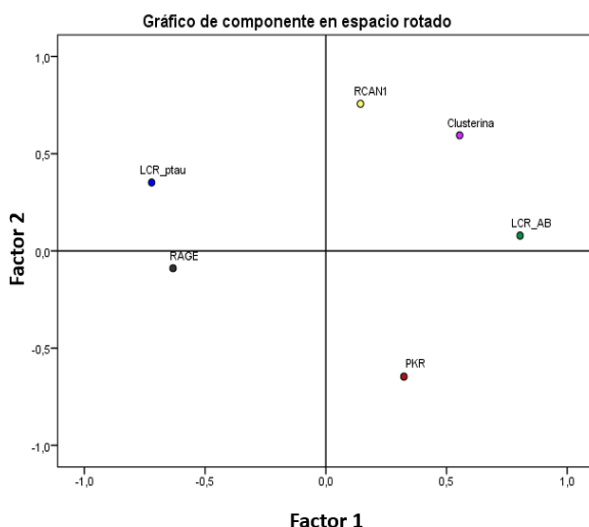


Figura 45: gráfico de espacio explicativo del PCA2 donde aparecen las proteínas introducidas en el PCA1 (clusterina, RCAN1, RAGE y PKR) junto con dos proteínas medidas en LCR. En este caso se introdujeron solo A β y p-tau puesto que al introducir tau en el modelo, éste no era significativo.

En este caso vemos que las proteínas clusterina y RCAN1 siguen situadas cerca la una de la otra, lo que da robustez a la relación entre ambas, que se ha mencionado antes. Cabe destacar la relación entre clusterina, RCAN1 y A β , que será comentada en el apartado de *Discusión*. Asimismo, creemos relevante el hecho de que RCAN, clusterina y PKR tengan una relación positiva entre ellas ya que se sitúan a la derecha del valor 0 para el factor 1. Esto es coherente con las correlaciones que ya hemos observado anteriormente.

De la misma manera, es relevante el hecho de que A β tiene una relación negativa en este caso con RAGE y con p-tau; algo que, de nuevo, también habíamos visto en las correlaciones.

Sin embargo, los factores de este último PCA no serán evaluados como un posible set de biomarcadores, puesto que una buena parte de su explicación teórica recae en las proteínas determinadas en LCR y un objetivo de la presente tesis doctoral es determinar nuevos biomarcadores en suero. Es por ello por lo que tomaremos en consideración el PCA1 que ya fue descrito y explicado previamente y que está compuesto únicamente por proteínas séricas.

4.6.2. Set de Biomarcadores

El principal interés de la prueba descrita en el apartado anterior es hallar un set de biomarcadores que pueda tener un valor predictivo tan preciso como el de una de las variables consideradas modélicas (figura 46). En la tabla 17 aparece el área bajo la curva (AUC) que se obtiene de cada uno de los factores del análisis de componentes principales.

Tabla 17: valores del Área bajo la curva (AUC) que dejan los dos factores del PCA1.

Proteínas	AUC Ctrl-DCL-EA	p	AUC Sano-Enfermo	p
Clusterina, PKR, RAGE y RCAN1. Primer factor extraído.	0.819	0.000	0,747	0.05
Clusterina, PKR, RAGE y RCAN1. Segundo factor extraído	0.371	0.128	0,365	0.121

Tabla 17: Se muestran los valores del AUC para los dos factores extraídos en el PCA1. El primer factor es significativo tanto a la hora de discriminar entre Controles, DCL y EA como a la hora de discriminar entre *enfermos* y *sanos*.

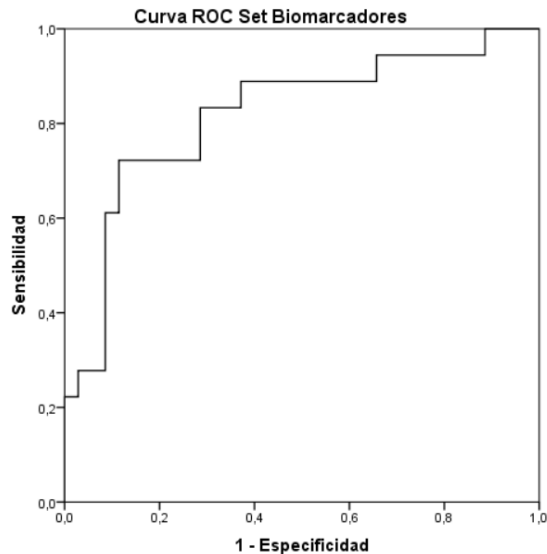


Figura 46: curvas ROC del set de biomarcadores entre grupos control, DCL y EA. Se representa solo el valor de la AUC del factor 1; puesto que es estadísticamente significativo. Este valor de AUC es superior a 0.8 por lo que se puede considerar a este set de biomarcadores como una buena prueba diagnóstica.

Del análisis de componentes principales obtuvimos dos factores con los que realizamos dos nuevas curvas ROC. Resulta notable el potencial valor diagnóstico del Factor 1, que tiene una AUC de 0.82 sobre nuestra muestra y que es estadísticamente significativo. Este resultado nos sugiere que este set de 4 proteínas aporta información al diagnóstico de la EA, que ya de por sí es suficientemente complicado. De hecho, en la clínica diaria los sujetos alcanzan la fase de EA probable sin que se les haya realizado ningún biomarcador de los descritos por Dubois *et al.* (2014), puesto que, bien son demasiado invasivos para un sujeto que manifiesta pocos síntomas cognitivos, bien son demasiado caros para el sistema de salud público.

Cuando se realizaron las curvas ROC (figura 47) para discriminar a los sujetos *enfermos* de los sujetos *sanos* obtuvimos, al igual que en el caso anterior, que solo el factor 1 tenía una AUC significativa. Sin embargo, el valor de esta AUC no superaba el umbral de 0.8, por lo que creemos que este set no puede ser considerado como un set sensible para cualquier estado de deterioro cognitivo, sino que es específico de la EA.

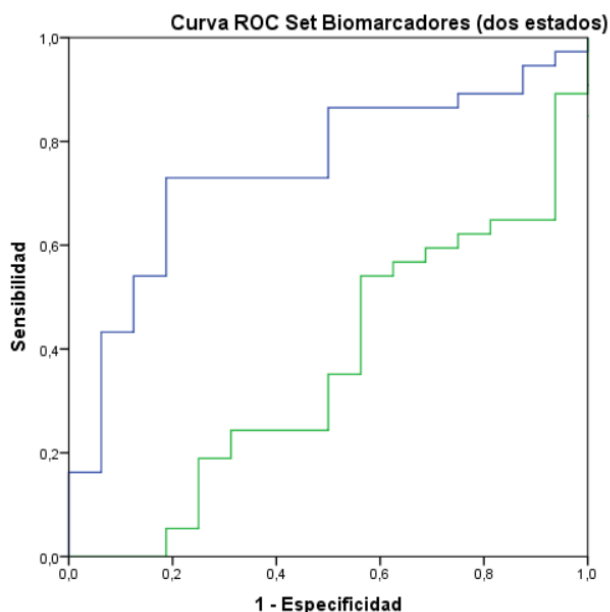


Figura 47: curvas ROC del set de biomarcadores entre grupos *sano* y *enfermo*. Ninguno de los dos valores de AUC es superior a 0.8. Esto refleja la especificidad de nuestro set de biomarcadores de la EA, ya que cuando colapsamos los sujetos con esta patología con los DCL perdemos el valor diagnóstico.

4.6.3. Caracterización de la muestra según los set de biomarcadores y el grupo de diagnóstico

A su vez, quisimos observar si en la representación de los 2 factores, obtenidos a partir del análisis de componentes principales, existía

alguna distribución por subpoblaciones que pudiéramos observar en función del diagnóstico de los sujetos. De esta manera, representamos ambos factores en los ejes de abscisas y ordenadas y clasificamos los puntos en función de la categoría de diagnóstico a la que pertenecen: Control, DCL y EA (figura 48). A la vista del resultado, también quisimos observar solo la distribución de Controles y EA (figura 49) excluyendo al grupo DCL.

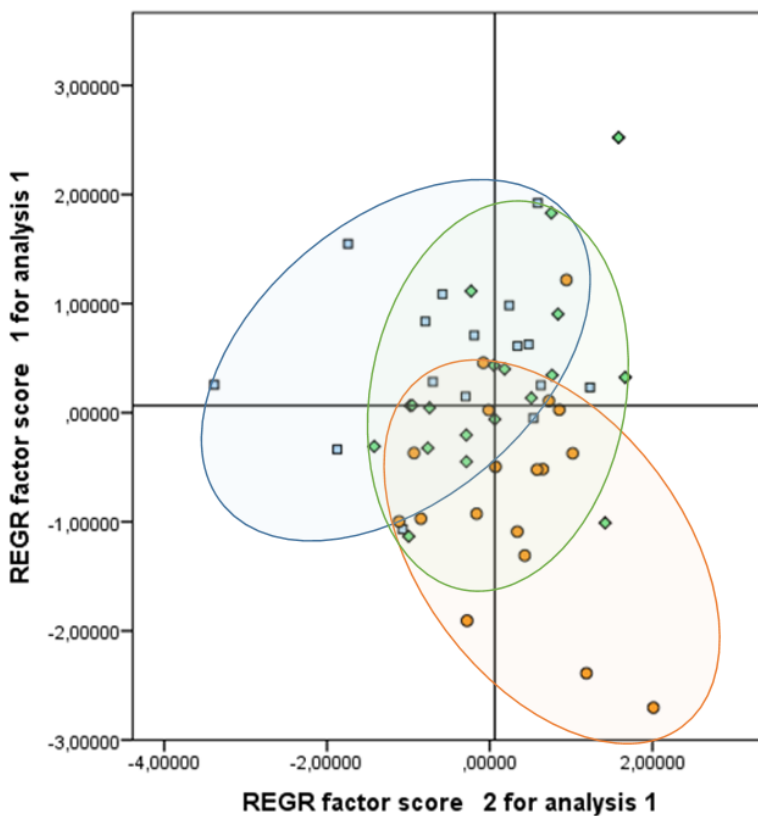


Figura 48: representación de los factores del PCA en función del grupo diagnóstico. El color naranja determina a los enfermos de EA, el color verde a los DCL y los controles son representados por el color azul.

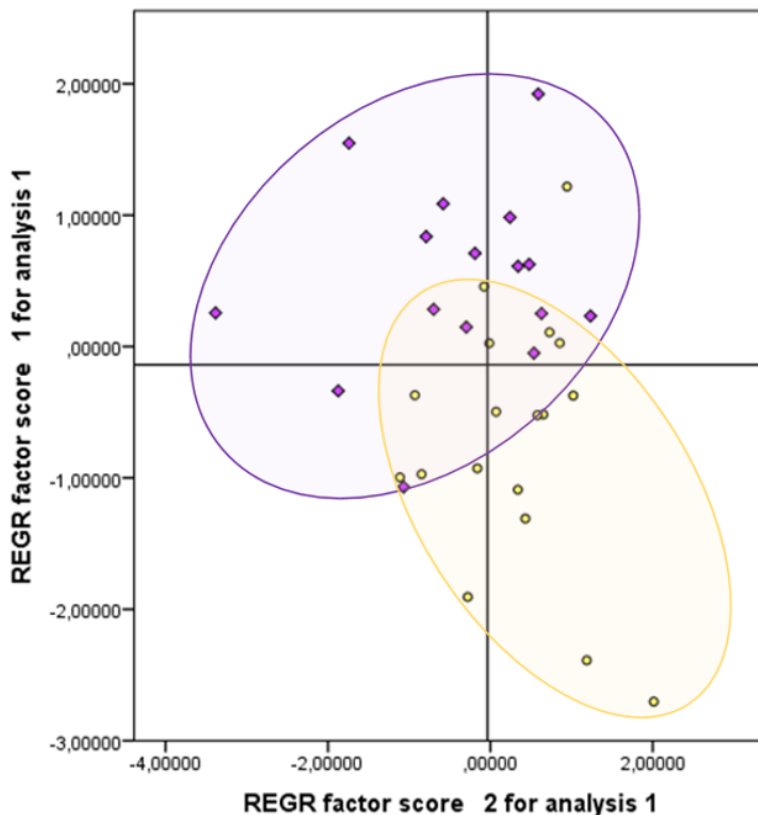


Figura 49: representación de los factores del PCA en función del grupo del grupo de diagnóstico. Solo aparecen controles, en lila y sujetos con EA en amarillo.

En la figura 48 podemos observar como la muestra se divide de forma clara en 3 subpoblaciones en función del diagnóstico. Consideramos importante destacar que existe un área común entre los 3 grupos de diagnóstico según nuestros factores. No obstante, hay un mayor solapamiento de los grupos EA y DCL, puesto que tienen más puntos comunes. Además, se observa una clara tendencia en la que los sujetos

controles tienen una pendiente positiva y los sujetos EA presentan una pendiente negativa. Igualmente, cuando solo seleccionamos los sujetos control y los EA vemos como ambos grupos se diferencian claramente y se posicionan en diferentes cuadrantes (figura 49).

4.7. Estudio de la capacidad predictiva de los biomarcadores determinados en suero

Con el fin de valorar la capacidad de predicción de los biomarcadores plasmáticos, se aplicó un análisis discriminante. El análisis discriminante es una técnica que permite diferenciar los individuos entre grupos y estima una combinación lineal de variables independientes (denominadas discriminantes) que permiten la clasificación de los individuos entre ellos. En este análisis la variable de agrupación (Y) fue el grupo de diagnóstico y las variables independientes (X) fueron las proteínas clusterina, PKR, RCAN1 y RAGE. De estas cuatro proteínas, RCAN1 no se introdujo en el ejercicio por no mostrar diferencias significativas entre sujetos control y pacientes de EA. Estos resultados se mostraron previamente en la figura 34.

Durante la realización del ejercicio se pidió al programa la relación canónica entre la variable dependiente y la función que agrupará las variables independientes. Es recomendable que superen el valor de 0.5 (Torrado-Fonseca y Berlanga-Silvente. 2013) y en nuestro caso la correlación canónica fue de 0.67.

Además, la prueba lambda de Wilks sale significativa en nuestro análisis ($p < 0.001$). Esto indica que la función calculada en el análisis sí

que explica la variable dependiente. Es decir, que la función calculada a partir de clusterina, RAGE y PKR sí que es capaz de discriminar entre los dos estados (control o EA).

Las reglas de decisión para clasificar a nuevos sujetos son las siguientes:

$$D_c = 9,147 \times 10^{-5} * [clu] + 0,40 * [PKR] + 0,16 * [RAGE] - 19,413$$

$$D_{EA} = 6,94 * 10^{-5} * [clu] + 0,28 * [PKR] + 0,20 * [RAGE] - 12,563$$

Donde:

[clu]= concentración de clusterina del sujeto a clasificar.

[PKR]= concentración de PKR del sujeto a clasificar.

[RAGE]= concentración de RAGE del sujeto a clasificar.

D_c = Fórmula discriminante para grupo control.

D_{EA} = Fórmula discriminante para grupo control.

Para clasificar a un sujeto externo al estudio se aplican ambas fórmulas y aquella con mayor puntuación es la categoría a la que pertenece dicho sujeto (Torrado-Fonseca y Berlanga-Silvente. 2013).

Finalmente, el análisis discriminante realizado clasifica a los sujetos de nuestra muestra de forma correcta en el 79.4% de los casos. Para comprobar esta eficacia, el análisis discriminante se calculó sin incluir una parte de la muestra del estudio y, posteriormente, se clasificaron

estos sujetos según las reglas de decisión previamente explicadas. La sensibilidad y especificidad de esta regla de decisión, aplicada sobre nuestra muestra, son del 65% y del 88%.

A continuación se aplican las fórmulas previamente expuestas a uno de los sujetos de nuestra muestra a modo de ejemplo. El sujeto C2 tiene los siguientes valores: Clusterina 317658,45 pg/mL; RAGE 36,83 pg/mL y PKR 300,39 pg/mL. Su valor D_c es de 135,7 y el valor de D_{EA} es de 100,95. Por ello este sujeto sería clasificado como control.

“No hay nada repartido de modo más equitativo que la razón: todo el mundo cree tener la suficiente”

René Descartes.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En los últimos años los criterios diagnósticos de la EA han sufrido una evolución. Hasta ahora se utilizaban los criterios *United Status National Institute for Communicative Disorder and Stroke y The Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA). Estos criterios recaen en la clínica y sólo alcanzan el diagnóstico de Alzheimer probable, requiriéndose para el diagnóstico definitivo la confirmación histopatológica *post mortem*. No obstante recientemente aparecen unos nuevos criterios introducidos por Dubois y colaboradores basados en el uso de biomarcadores y pruebas de imagen (Dubois *et al.* 2007). Estos biomarcadores se realizan en LCR, prueba invasiva y dolorosa, por lo que muchos investigadores nos centramos en la búsqueda de biomarcadores plasmáticos.

Según la FDA un biomarcador es un indicador de un proceso biológico (bien patológico, bien normal) o de un proceso inducido tras una intervención. Así, este marcador es estimado (o medido) de forma cuantitativa. Los biomarcadores sirven como indicadores de salud o de enfermedad en el entorno clínico. Por ello, la sensibilidad, la especificidad de un biomarcador y la facilidad de acceso al mismo, al igual que la correcta validación de éste son factores importantes que pueden influir en un diagnóstico (Humpel, 2011; Robb *et al.* 2016).

Los principales criterios de apoyo al diagnóstico de la EA, entre otras demencias, pasan por biomarcadores. Estos biomarcadores pueden ser en forma de imágenes obtenidas a partir de resonancia magnética

funcional, de PET o mediante la estimación de la concentración de biomarcadores en LCR como el A β , tau o p-tau.

Todos estos criterios fueron introducidos por los diferentes trabajos en el campo de los biomarcadores en la EA, en un intento de mejorar la forma de diagnóstico actual. Fruto de ello, existe un cambio en el concepto de la EA, la cual es ahora observada como una enfermedad de inicio prematuro y asintomático que va avanzando y mostrando poco a poco sus síntomas definitivos (Dubois *et al.* 2007; McKhann *et al.* 2011; Jack y Holtzman. 2013). Sin embargo, los biomarcadores de imagen son costosos y sus repeticiones están limitadas al presupuesto de cada centro hospitalario.

Por su parte, los biomarcadores en LCR son menos costosos de realizar pero son invasivos, dolorosos y el procedimiento empleado condiciona al paciente, por lo que es difícil una repetición.

Nosotros aportamos evidencias sobre proteínas plasmáticas que pueden ser potenciales biomarcadores de EA y cuya estimación no sería, ni implicaría, ningún proceso dañino al paciente más allá de una extracción rutinaria de sangre venosa.

5.1. Relevancia de los biomarcadores determinados en la fisiopatología de la EA

En este estudio, realizamos las determinaciones de A β , tau y p-tau en LCR, para tener al menos, 2 de los biomarcadores postulados por Dubois y colaboradores que apoyan al diagnóstico realizado por los especialistas (Dubois *et al.* 2007). También determinamos las

concentraciones de clusterina, RAGE, PKR, RCAN1 y TGF- β 1 en suero de los sujetos del estudio.

5.1.1. Biomarcadores determinados en LCR

Existen múltiples estudios que se han centrado en medir en LCR los biomarcadores de A β , tau total y tau fosforilada y en describir su comportamiento en la EA. En todos ellos, los niveles de A β están muy disminuidos en enfermos de EA y moderadamente disminuidos en enfermos de DCL. Los resultados presentados en este trabajo aportan evidencia adicional a los resultados de la bibliografía consultada (Craig-Schapiro *et al.* 2009; Hampel *et al.* 2010; Buchhave *et al.* 2012).

El motivo por el cual A β está más disminuido en LCR en los enfermos de EA que en los sujetos del grupo DCL se debe a que hay una menor cantidad de péptido amiloide circulante en el líquido, ya que está en su mayoría agregado en formas de placas amiloides. El sistema empleado, ELISA, solo es capaz de medir el péptido amiloide en su forma soluble y su uso está ampliamente validado, empleándose rutinariamente en la práctica clínica diaria. La medida de A β en LCR como un biomarcador de EA está muy apoyada por evidencias clínicas y experimentales (Dubois *et al.* 2016).

Asimismo, los niveles de tau total y tau fosforilada presentados en los resultados también coinciden con la bibliografía consultada y muestran un aumento de los niveles de dichas proteínas en el LCR de enfermos de EA y DCL (Craig-Schapiro *et al.* 2009; Hampel *et al.* 2010; Buchhave *et al.* 2012). Esto se corresponde con el aumento en la

formación de ovillos neurofibrilares propios de la enfermedad y, también, con un mayor índice de neurodegeneración, que correlaciona con un mayor deterioro cognitivo. Además, al igual que en el caso de A β , las medidas de estos 2 biomarcadores apoyaban al diagnóstico dado por los especialistas en el momento de la entrevista clínica.

Por un lado, todas las proteínas medidas en LCR presentan correlación entre ellas y con el grupo de diagnóstico. A su vez, se muestran diferencias significativas cuando comparamos el grupo de sujetos sanos con el grupo de sujetos enfermos, confirmando el valor diagnóstico de las pruebas y su relación con la enfermedad.

Por otro lado, en el caso de A β y tau total observamos diferencias significativas de concentración en ambos compuestos medidos en LCR entre sujetos con genotipo ApoE 3/3 y ApoE 4/4. En el caso de A β , sujetos con genotipo ApoE 4/4 presentan una menor concentración de A β hecho que tiene sentido con lo encontrado en la bibliografía: la presencia de un alelo ApoE 4 condiciona la producción de A β y es clave en su deposición en forma de placas amiloides (Corder *et al.* 1993, Strimatter *et al.* 1993).

Asimismo, en otros trabajos se refleja una relación dosis dependiente entre A β y el alelo ϵ 4 de esta apolipoproteína, pero, curiosamente, no hay relación descrita entre ApoE y tau (Lautner *et al.* 2014), algo que sí vemos nosotros, puesto que sujetos con genotipo ApoE 4/4 tienen una mayor concentración de tau en LCR que los sujetos con genotipo ApoE 3/3.

En relación a esto, Strittmatter y colaboradores (Strittmatter *et al.* 1994) muestran *in vitro* que la isoforma ApoE3 se une a tau, mientras que la isoforma ApoE4 no es capaz de realizar esta unión. Además, ninguna de las 2 isoformas de ApoE es capaz de unirse a tau hiperfosforilada. Los mismos autores muestran que la unión entre ApoE3 y tau se realiza en dominios de tau susceptibles a la hiperfosforilación, por lo que mencionan la posibilidad de que la isoforma ApoE3 (y también la ApoE2) tenga un rol protector y pueda evitar formación de ovillos neurofibrilares por esta razón (Corder *et al.* 1995).

No obstante, en estudios realizados en humanos hay discordancia en la bibliografía revisada. Por un lado Lindh y colaboradores sugieren que sí existe una correlación entre los niveles de ApoE y los de la proteína tau en enfermos de EA medidos en LCR. Por otro lado, Morris y colaboradores muestran en su estudio que no hay una relación entre ApoE 4 y p-tau o tau total en LCR (Lindh *et al.* 1997, Morris *et al.* 2010).

A continuación, mostramos un esquema resumen de los procesos fisiopatológicos en los que se hallan involucradas las 2 proteínas insignia de la EA. El A β se sintetiza extracelularmente y ejerce efectos tóxicos fuera de las células, al depositarse en placas, y dentro de ellas, al causar la apoptosis de las mismas. Además, A β es aclarado fuera del LCR por diferentes mecanismos. De la misma manera, la hiperfosforilación de tau es tóxica para la célula y la aboca a la apoptosis. Estos procesos aparecen ilustrados en la figura 50.

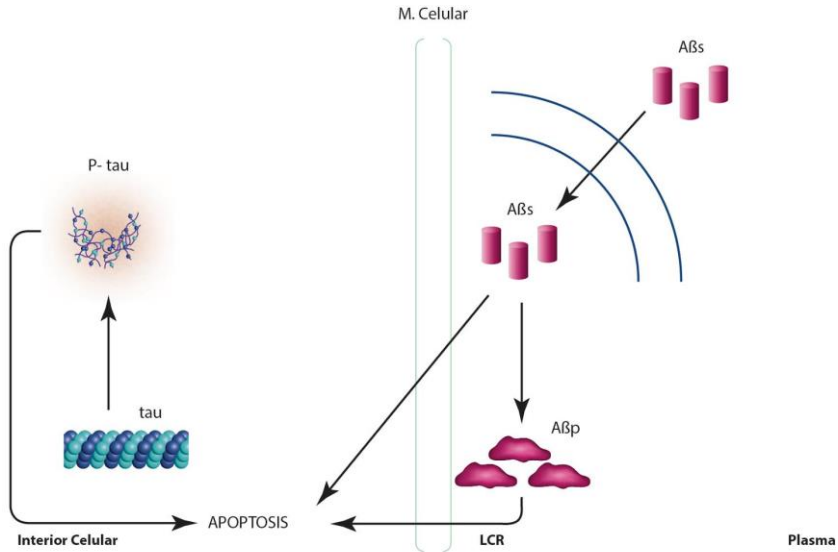


Figura 50: proceso fisiopatológico de la EA según nuestros resultados. Se representan las principales vías por las que Aβ y tau inducen la apoptosis celular. Abreviaturas: Aβs= péptido amiloide en forma soluble, Aβp= péptido amiloide depositado en placas.

5.1.2. Biomarcadores determinados en suero

En este estudio hemos identificado que las proteínas RAGE, RCAN1, PKR y clusterina están relacionadas con la patología de la EA. Es más, la clusterina, además de ser un buen marcador de EA, también lo es de la evolución de la enfermedad, porque sus niveles varían en los diferentes estadios clínicos (control-DCL-EA). A continuación se discuten los resultados obtenidos de cada una de ellas.

a) Clusterina

La clusterina o Apo J es una proteína capaz de interactuar con Aβ y promover o prevenir su agregación mediante la interacción con la astrogliá o con la BHE (Nuutinen *et al.* 2009). Los resultados

presentados muestran una disminución significativa de los niveles de clusterina en el suero de sujetos con EA respecto al suero de los controles. Además, estos resultados se correlacionan con los presentados sobre la concentración de A β en los sujetos EA que, recordemos, presentaban una disminución de este péptido a medida que avanzaba la enfermedad.

Como ya ha sido descrito, la clusterina a concentraciones de A β elevadas tiende a agregar junto al péptido, siendo proamiloidogénica (Yerbury *et al.* 2007). De esta forma, se co-incorpora junto a su sustrato en agregados insolubles, lo cual indicaría una disminución en el suero. Igualmente pensamos que la clusterina muestra tendencia a disminuir en sujetos DCL porque su capacidad para aclarar el A β empieza a verse comprometida y es posible que inicie la agregación de este péptido en forma de placas amiloideas, como ocurre en los sujetos con EA, tal y como describe la bibliografía consultada.

Es relevante señalar que esto concuerda con el hecho de que A β disminuye cada vez más a medida que la enfermedad avanza. Además, es notable para el A β medido en LCR la correlación positiva con clusterina medida en suero. Esto sugiere biológicamente que cuanto más A β hay circulante, más cantidad de clusterina lo une e intenta aclararlo. Sin embargo, cuando la cantidad de A β que se forma es muy elevada, la clusterina tiende a agregar junto a ella y las concentraciones circulantes de ambas disminuirían.

Llama también la atención con respecto a la clusterina, su correlación significativa con RAGE. Esta correlación encontrada tiene un sentido

biológico, ya que, RAGE es un transportador que internaliza moléculas de A β a través de la BHE hacia el cerebro y la clusterina, al contrario, es la encargada de aclarar el A β al exterior de la BHE mediante el receptor megalina (Yu y Tan 2012). Esto es congruente con nuestros resultados, ya que en los enfermos de EA la clusterina esta disminuida respecto a los controles pero RAGE esta aumentado.

Asimismo, hemos encontrado una correlación significativa entre clusterina y RCAN1, aunque la relación funcional entre ambas proteínas aún no ha sido descrita. Tampoco cabe ninguna duda de que los niveles de ambas proteínas se encuentran estrechamente relacionados con los de A β . De esta forma, en la EA, un incremento de A β provocaría una inducción de la expresión de RCAN1 (Lloret *et al.* 2011). Al mismo tiempo, la clusterina también se vería aumentada para tratar de asimilar la carga amiloidea y prevenir la agregación de estos oligómeros (DeMattos *et al.* 2001). Además, cuando observamos el gráfico de componentes del PCA1, RCAN1 y clusterina se mantienen juntos en el mismo cuadrante, sugiriendo que esta relación es firme.

A continuación, en la figura 51 aparece el rol de clusterina en la fisiopatología de la EA que defendemos.

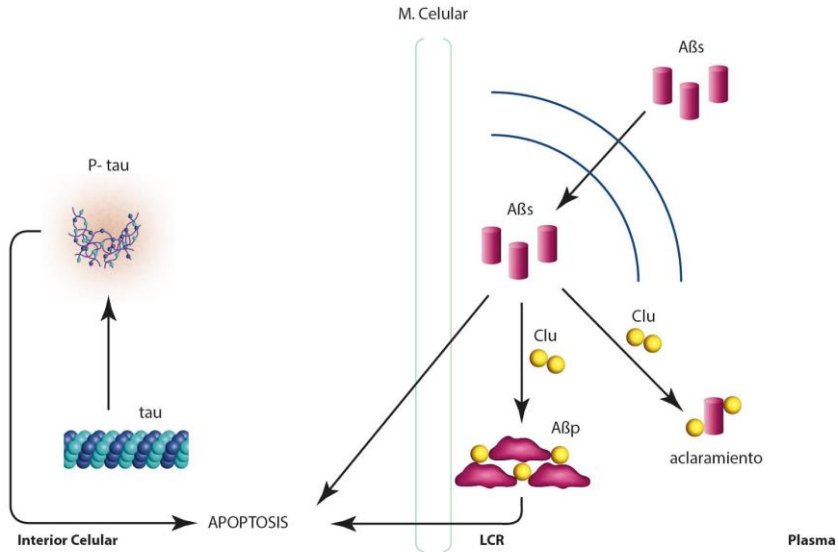


Figura 51: proceso fisiopatológico de la EA según nuestros resultados. Se representan las principales vías por las que Aβ y tau inducen la apoptosis celular. Es relevante el rol de aclaramiento del Aβ por parte de la clusterina, al igual que su rol de agregación del péptido amiloide. Abreviaturas: Aβs= péptido amiloide en forma soluble, Aβp= péptido amiloide depositado en placas, Clu= clusterina.

Ciertos estudios reportan que existe clusterina colocalizada con Aβ, lo cual coincidiría con nuestra hipótesis (Morgan *et al.* 2004, Duyckaerts *et al.* 2009). Pensamos que nuestro resultado refleja el cese del mecanismo protector de la clusterina.

Gran parte de la literatura coincide en señalar a la clusterina como un potencial biomarcador de la EA, aunque todavía existe divergencia sobre si esta proteína se ve aumentada o disminuida en los sujetos con EA. De hecho, un estudio indica que podría llegar a elevarse en plasma hasta 10 años antes de los primeros síntomas clínicos, cuando el paciente es cognitivamente normal (Thambisetty *et al.* 2010), pero no hemos encontrado en la bibliografía revisada estudios prospectivos a tan largo plazo.

En este sentido estudios de cohortes apuntan a que los niveles de clusterina están elevados en el LCR de enfermos de EA y se correlacionan con la sintomatología, la atrofia hipocampal y la carga amiloidea en el cerebro (Schrijvers *et al.* 2011). Estos resultados son contrarios a los que muestran Vishnu y colaboradores: ellos defienden, en un estudio de casos y controles, que la clusterina tanto en plasma como en LCR se ve disminuida en los sujetos con EA frente a los controles, al igual que encontramos en nuestro estudio. (Vishnu *et al.* 2016).

Gupta y colaboradores muestran que la clusterina está significativamente aumentada en pacientes con EA y también en sujetos con DCL respecto a sujetos controles, algo que también defienden Jongbloed y colaboradores. No obstante éstos últimos señalan que no existen diferencias en la concentración de clusterina en LCR entre los diferentes grupos (Jongbloed *et al.* 2015, Gupta *et al.* 2016).

A la vista de la heterogeneidad de resultados sobre la clusterina, nosotros pensamos que, efectivamente, se trata de un buen marcador de EA, aunque probablemente sus niveles en plasma o suero deben depender de la fase de la enfermedad en la que se encuentre cada sujeto.

b) RAGE

Diferentes estudios defienden que RAGE media la transcitosis de A β a través de la BHE. Además, se ha visto que hay neuronas que lo

internalizan y esto se ha asociado con un mayor estrés oxidativo y con su posterior apoptosis (Deane *et al.* 2003, Deane *et al.* 2004).

Los resultados presentados muestran un mayor nivel de RAGE en el suero de enfermos con EA respecto a sujetos controles. Este resultado se correlaciona con la disminución ya observada en los niveles de A β en los sujetos con EA. Por lo tanto, pensamos que existe una facilitación por parte de RAGE que permite al A β entrar de nuevo en el cerebro, como ya está descrito (Kook *et al.* 2013). Esto aparece en la figura 52.

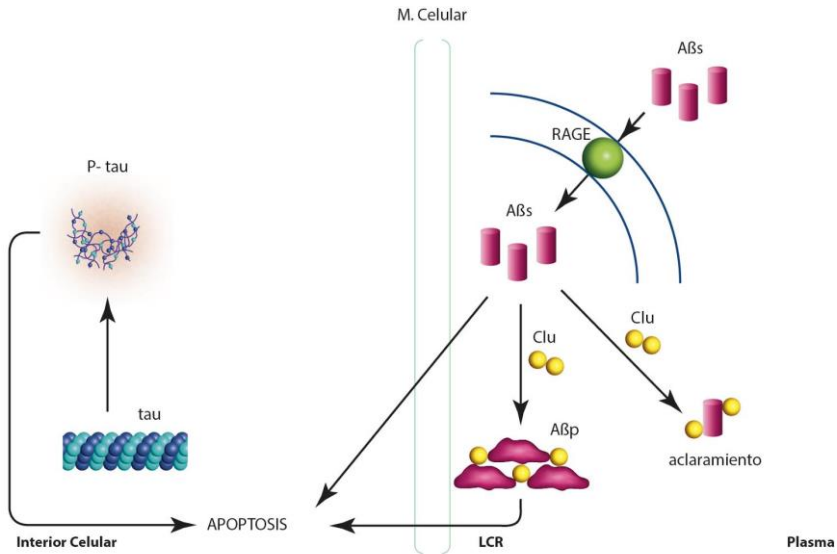


Figura 52. Proceso fisiopatológico de la EA según nuestros resultados. Se representan las principales vías por las que A β y tau inducen la apoptosis celular. Es relevante el rol de aclaramiento del A β por parte de la clusterina, al igual que su rol de agregación del péptido amiloide. Nótese que se ha añadido a RAGE como puerta de entrada del A β al LCR. Abreviaturas: A β s= péptido amiloide en forma soluble, A β p= péptido amiloide depositado en placas, Clu= clusterina.

También es destacable el hecho de que los niveles de RAGE son diferentes entre los sujetos con DCL y los sujetos con EA. Este

resultado nos sugiere que la entrada de A β no es tan abundante en ese momento de la enfermedad.

Existen pocos estudios realizados en humanos donde se determine la cantidad de RAGE. Uno de ellos, llevado a cabo por Donahue y colaboradores, se centra en estudiar el hipocampo de sujetos controles y sujetos con EA. Señala que no hay co-localización de RAGE en los depósitos amiloides encontrados en el hipocampo en los sujetos con EA y que hay una mayor expresión de RAGE en hipocampo y en córtex de enfermos de EA, en comparación con sujetos controles, sugiriendo que RAGE solo sería la puerta de entrada del A β al interior del cerebro (Donahue *et al.* 2006).

Lo que sí existe son estudios realizados en modelos animales; por ejemplo Dean y colaboradores observaron que en ratones transgénicos para APP la expresión de RAGE está incrementada, mientras que la de LRP1, el transportador que aclara A β hacia la sangre, esta reducida (Deane *et al* 2004). Los mismos autores describieron previamente que la interacción de A β con RAGE facilita la internalización del primero a través de la BHE (Deane *et al* 2003).

Así pues, los resultados presentados coinciden con los ya existentes en la bibliografía y aportan nueva evidencia que pueden postular a RAGE como un biomarcador periférico de EA.

c) RCAN1

Nuestros resultados muestran una disminución de RCAN1 en el suero de los sujetos de EA respecto al suero de los sujetos DCL. Sin embargo

no encontramos diferencias significativas entre los niveles de sujetos controles y sujetos EA.

Para interpretar este resultado, pensamos que es importante tener en cuenta que A β soluble induce la expresión de RCAN1 (Lloret *et al.* 2011). Como ya hemos mencionado, en los enfermos de EA la cantidad de A β circulante es menor porque existe una mayor deposición en forma de placas seniles. Los resultados obtenidos de RCAN1 nos sugieren que esta inducción podría no producirse en los sujetos con EA, y por ello, no detectamos diferencias respecto a los controles.

Además, en nuestros resultados mostramos que la expresión de RCAN1 está aumentada en sujetos con DCL respecto a los sujetos con EA. Esto puede deberse a que los primeros sujetos todavía tendrán cantidades de A β circulante suficientes como para ejercer esta inducción. Siguiendo con nuestra hipótesis, resulta congruente el hecho de que RCAN1 se correlacione positivamente con los niveles de A β en LCR, puesto que, como ya se ha mencionado, A β es inductor de RCAN1.

Nuestra propuesta aparece esquematizada a continuación en la figura 53. Es conveniente resaltar que en el trabajo de Lloret y colaboradores se describió que RCAN1 induce la expresión de GSK3 β e inhibe la expresión de la calcineurina: 2 proteínas que, como se mencionó en la *Introducción*, están relacionadas con la fosforilación/defosforilación de tau (Lloret *et al* 2011).

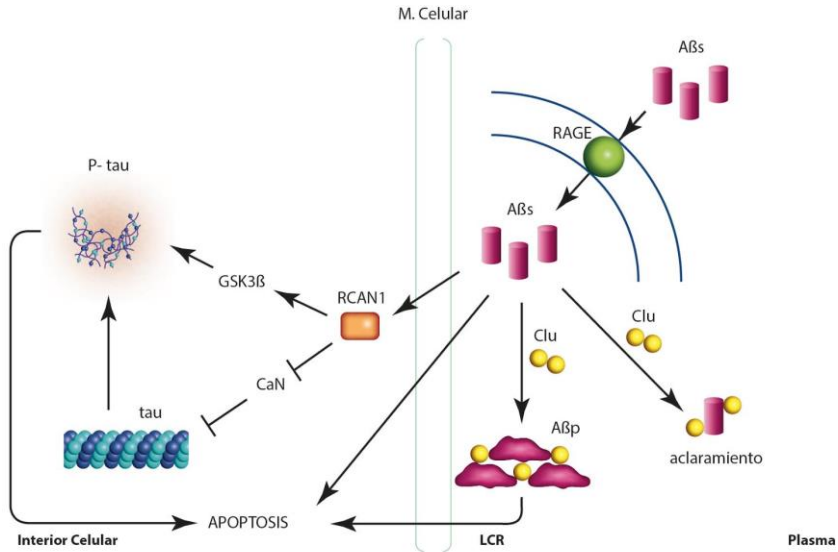


Figura 53: proceso fisiopatológico de la EA según nuestros resultados. Se representan las principales vías por las que A β y tau inducen la apoptosis celular. Es relevante el rol de aclaramiento del A β por parte de la clusterina, al igual que su rol de agregación del péptido amiloide. Nótese que se ha añadido a RAGE como puerta de entrada del A β al LCR. RCAN1 ejerce de nexo de unión entre GSK3 β y CaN. Abreviaturas: A β s= péptido amiloide en forma soluble, A β p= péptido amiloide depositado en placas, Clu= clusterina, CaN= calcineurina,

Existen otros estudios que también apuntan en esta dirección. Por un lado, Wu *et al.* (2014) defienden de forma teórica que RCAN1 estaría sobreexpresada en pacientes con EA. Por otro lado, Harris y colaboradores también siguen en esta línea y muestran en su trabajo que la isoforma RCAN1-1L está sobreexpresada en cerebros de enfermos de EA cuando se compara con controles (Harris *et al.* 2007). De la misma forma, Cook y colaboradores muestran que la expresión de RCAN1 (calcipresina) incrementa su expresión en neuronas del lóbulo temporal durante el envejecimiento normal y también en pacientes que padecen de EA cuando se comparan con sujetos controles (Cook *et al.* 2005).

d) PKR

Los resultados presentados muestran que los sujetos con EA tienen un menor nivel de PKR en suero, significativamente distinto que los sujetos controles.

Se ha descrito que PKR está relacionada con un aumento de la actividad de BACE1 en condiciones de estrés oxidativo, ya que esta proteína se vería inducida por PKR (Dumurgier *et al.* 2013). Este hecho provoca un aumento en la síntesis de A β que está relacionada directamente con el desarrollo de la EA. Además, se ha visto que A β es capaz de activar PKR, promoviendo un bucle que produce una mayor cantidad de A β mediante la activación de BACE (Porta *et al.* 2007). Asimismo Bose y colaboradores mostraron en su trabajo que PKR induce la fosforilación de tau, además de apoptosis, en neuroblastomas expuestos a A β (Bose *et al.* 2011).

Estudios realizados en humanos muestran que PKR está aumentada en LCR de sujetos con EA, frente a sujetos con otras enfermedades neurológicas, en un estudio de cohortes (Mouton-Liger *et al.* 2012). Los mismos autores muestran en otro trabajo que los niveles de pPKR en LCR de sujetos con EA están asociados a un mayor deterioro cognitivo (Dumurgier *et al.* 2013).

Damjanac y colaboradores muestran que 2 dianas de PKR (p53 y Redd1) están incrementadas en linfocitos de sujetos con EA cuando se comparan con linfocitos de sujetos normales (Damjanac *et al.* 2008). En esta línea, en nuestro laboratorio ya observamos que PKR está

aumentada en linfocitos de sujetos jóvenes y cognitivamente sanos, pero portadores del genotipo ApoE 4/4 (Badia *et al.* 2013).

Con todo, los resultados obtenidos de PKR divergen de los mostrados por la bibliografía hasta ahora, si bien es cierto que no hemos encontrado en la literatura otros estudios que midan PKR en suero o plasma. Todo indica que los niveles encontrados en suero no siguen el mismo patrón que los encontrados en cerebro o LCR, lo cual se explica porque las vías de degradación en suero son diferentes a las existentes en LCR o en cerebro.

Observamos también que los niveles de p-tau para los sujetos con EA están aumentados respecto a los controles. También presentamos una correlación negativa entre ambas proteínas. Según lo que está descrito en la bibliografía, PKR es capaz de inducir la fosforilación de tau vía GSK3 β (Bose *et al.* 2011). Una visión de conjunto de todos los procesos previamente tratados puede verse en la figura 54.

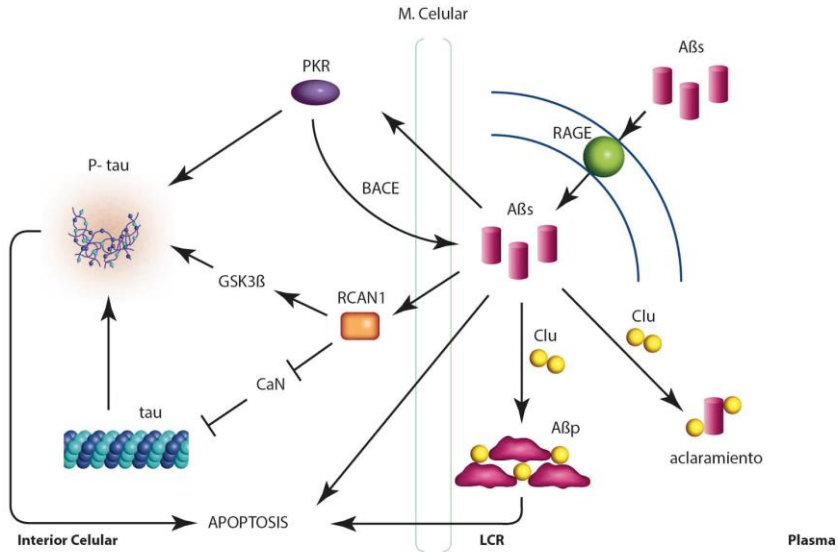


Figura 54: proceso fisiopatológico de la EA según nuestros resultados. Se representan las principales vías por las que Aβ y tau inducen la apoptosis celular. Es relevante el rol de aclaramiento del Aβ por parte de la clusterina, al igual que su rol de agregación del péptido amiloide. Nótese que se ha añadido a RAGE como puerta de entrada del Aβ al LCR. RCAN1 ejerce de nexo de unión entre GSK3β y CaN. PKR es inducida por Aβ a la vez que induce la fosforilación de tau. Abreviaturas: Aβs= péptido amiloide en forma soluble, Aβp= péptido amiloide depositado en placas, Clu= clusterina, CaN= calcineurina, BACE= β-secretasa.

e) TGF-β

Los resultados de la presente tesis no muestran diferencias significativas entre los diversos grupos para TGF-β.

Se ha visto que los niveles de TGF-β están elevados en el tejido cerebral de sujetos con EA (Flanders *et al.* 1995) respecto a controles sanos. Sin embargo, otros estudios muestran tanto que TGF-β está disminuida (De Servi *et al.* 2002) como aumentada en el plasma de pacientes de EA (Malaguarnera *et al.* 2006).

5.2. Capacidad predictiva de los biomarcadores determinados

Una prueba relevante de la capacidad de una molécula para ser considerada un buen biomarcador es la curva ROC. Nosotros comprobamos que las curvas ROC de los biomarcadores en LCR presentan áreas bajo la curva elevadas, lo cual indica una alta especificidad y sensibilidad. En concreto, todas presentan áreas superiores a 0.8 salvo en el caso de tau (donde $AUC = 0.69$). Sin embargo, al comparar las curvas ROC de los grupos *Sano* y *Enfermo* obtenemos que las tres AUC son superiores a 0.9, dejando patente que los biomarcadores medidos en LCR son muy específicos y reaccionan de forma muy sensible a la detección de la enfermedad.

Este no es el caso de los biomarcadores determinados en suero en nuestra muestra, ya que, de todos ellos, la mayor AUC viene dada por la clusterina y es de 0.75, ligeramente inferior al valor umbral de 0.8 para ser considerado como aceptable. Al colapsar los grupos no obtenemos una mejora de este parámetro.

Nuestro set de biomarcadores plasmáticos propuestos (que incluye RCAN, clusterina, PKR y RAGE) presenta una AUC de 0.81, que determina una capacidad diagnóstica elevada, con un AUC de 0.81. Hay que destacar que del PCA se obtienen dos factores que se diferencian entre ellos por el peso que le dan a las distintas proteínas introducidas dentro del modelo. De esta forma, el primer factor es el que mejor AUC tiene e incluye a las proteínas clusterina, PKR, RAGE y RCAN1.

Este resultado nos sugiere que las proteínas periféricas que hemos determinado sí que son, en conjunto, biomarcadoras de la EA. Además, consideramos que este set de biomarcadores aporta una evidencia añadida a los biomarcadores periféricos que están siendo objeto de investigación (Thambisetty *et al.* 2010; Henrisken *et al.* 2014, Hye *et al.* 2014).

Otro aspecto que refuerza el valor predictivo de este set de biomarcadores es el porcentaje de acierto en la clasificación de sujetos según las fórmulas obtenidas en el análisis discriminante. El objetivo de esta prueba es asignar a cada sujeto a su grupo diagnóstico correcto (Control o EA) empleando únicamente las proteínas del set de biomarcadores que podían introducirse en el análisis (que son clusterina, RAGE y PKR). El porcentaje de acierto en esta clasificación es del 79.4%.

Este porcentaje de acierto sobre la muestra es superior al que aportaría un único alelo 4 de la ApoE, que es de aproximadamente un 47% de ser diagnosticado de EA con una edad de 84 años (y de un 10% con 68 años). También es superior a la que aportan dos alelos ApoE 4 (que es de un 90% con una edad de 84 años y un 20% con 68 años), si tenemos en cuenta que nuestra población de estudio tiene una media de edad de 69 años (Corder *et al.* 1993, Roses 1996). Hay que tener en cuenta, no obstante, que nuestro estudio tiene un tamaño muestral limitado y está realizado en un único centro.

Cuando intentamos realizar el análisis discriminante para categorizar a los sujetos incluyendo el diagnóstico de DCL, el análisis se dificulta porque un requisito previo antes de realizar la prueba es la comparación 2 a 2 de las diferentes proteínas del modelo entre los diferentes grupos de diagnóstico. Como hemos mostrado en los resultados, algunas de las proteínas plasmáticas no muestran diferencias entre los grupos DCL y Control.

Por otro lado, al realizar la prueba del análisis discriminante entre los grupos *Sano* y *Enfermo* solo hay diferencias significativas entre estos grupos en la clusterina y en PKR (algo que ya hemos mostrado en nuestros resultados). Por ello, no continuamos con el análisis.

Esta dificultad de clasificación se debe en gran parte a los solapamientos que existen entre los grupos Control - DCL y DCL - EA, algo que apareció en la figura 48 de los resultados.

En dicha figura podemos observar como la muestra se divide de forma clara en tres subpoblaciones en función del diagnóstico, aunque el grupo DCL es increíblemente heterogéneo y se solapa en su mayoría con los otros dos grupos por separado. No obstante, pensamos que esta gráfica refleja que la muestra del estudio tiene una buena distribución y que no está sesgada pese a su pequeño tamaño.

Además, si se eliminan los sujetos DCL y se representan únicamente los controles y los pacientes con EA, obtenemos una gráfica (figura 49 de los resultados) que evidencia con claridad que las subpoblaciones de sujetos con EA y sujetos controles se distribuyen de forma distinta y tienen un comportamiento diferente respecto a las proteínas

plasmáticas de nuestro estudio. Entre estos 2 grupos, el análisis discriminante es capaz de capturar nítidamente las diferencias. Pensamos que esto puede deberse a que nuestro set de biomarcadores es específico para EA y no para un estado previo como DCL.

Por tanto, a modo de resumen, estos resultados respaldan que las curvas ROC de los biomarcadores de LCR son buenas herramientas que evidencian el valor de estas proteínas a la hora de confirmar un diagnóstico de EA o DCL.

De la misma forma, la unión de cuatro biomarcadores sí que se muestra útil para este propósito, con una curva ROC que entra en el rango aceptable de las pruebas diagnósticas. Además, este set es marcador específico de EA, y no de DCL y presenta un elevado porcentaje de acierto a la hora de clasificar sujetos según su diagnóstico. Estos aciertos lo son si clasificamos únicamente entre controles y sujetos con EA.

5.3. Relevancia clínica y limitaciones del estudio

Todos los resultados presentados nos sugieren que el set de biomarcadores que aportamos, compuesto por las concentraciones de clusterina, PKR, RAGE y RCAN1 en sujetos que padecen EA, aporta una evidencia al campo del diagnóstico.

Igualmente, el set de biomarcadores propuesto es específico de EA algo que creemos relevante porque, según la *Alzheimer's Association*, hoy en día el diagnóstico de EA es complicado y es muy frecuente que

los pacientes presenten una EA probable sin que tengan ningún biomarcador de imagen o de LCR realizado y por tanto, no estén diagnosticados correctamente.

La dificultad diagnóstica de la EA es algo que queda patente si observamos que los criterios diagnósticos respaldados por la NINCDS-ADRDA sólo alcanzan el diagnóstico de EA probable. Tienen una sensibilidad que varía entre el 65 y el 96% y una especificidad, también variante, entre el 23 y el 88%.

Estos números cambian con los nuevos criterios de Dubois *et al* (2007) que proponen el uso de un criterio principal (fallo de memoria) y criterios de apoyo al diagnóstico, fundamentados en biomarcadores en LCR o de imagen.

Por un lado, la atrofia del lóbulo temporal medial medida con resonancia magnética tiene unos valores de sensibilidad variables entre el 51 y el 70% y unos valores de especificidad del 69% a la hora de detectar EA prodrómica (Dubois *et al*.2007). Si se añade a esta prueba la edad del sujeto y test cognitivos, estos valores superan la barrera del 80% (81 y 88% respectivamente para sensibilidad y especificidad) para detectar EA prodrómica. Recordemos que, como ya se mencionó en la introducción, la EA prodrómica es aquel período sintomático donde el sujeto sufre los primeros fallos de memoria episódica pero no presenta síntomas suficientemente severos como para comprometer sus actividades de la vida diaria.

Por otro lado, los biomarcadores medidos en LCR, como A β , presentan unos valores de sensibilidad y especificidad muy elevados (86% y 90%)

demostrando que son marcadores tanto específicos como sensibles de la EA. Por su parte, p-tau en LCR presenta también valores superiores al 80% en ambas categorías (Dubois *et al.*2007). De hecho, la combinación de p-tau y A β en LCR presentan valores de sensibilidad y especificidad por encima del 90% y es por ello por lo que son tan empleados en la práctica clínica diaria.

El análisis discriminante calculado nos permite categorizar nuevos sujetos ajenos al estudio en los 2 grupos diagnósticos empleados en dicho análisis con el acierto ya citado del 79.4%. Este aspecto es positivo y lo pusimos a prueba en un análisis de robustez de los resultados, extrayendo aleatoriamente sujetos de los 2 grupos diagnósticos del análisis y clasificándolos posteriormente, en todos los casos de forma correcta. La sensibilidad de esta prueba para discriminar enfermos con EA de sujetos controles es del 65% y la especificidad del 88%.

Si bien es cierto que este set de biomarcadores se ha detectado en una muestra reducida y que sus sujetos provienen de un mismo centro hospitalario, hay que tener en cuenta que los biomarcadores de imagen son costosos y las repeticiones están limitadas. Además, como ya se mencionó en la introducción de la presente tesis doctoral, el uso de los biomarcadores en LCR presenta también algunos aspectos negativos como que implican una punción lumbar para la obtención de dicho líquido; algo que muchos pacientes rehúsan además de ser una técnica invasiva y dolorosa.

En relación a esto último, pensamos que nuestro set de proteínas puede aportar nuevos puntos de partida para determinar una prueba que pueda servir como *screening* de biomarcadores en suero o plasma previamente a la realización de los biomarcadores descritos por Dubois *et al.* (2007). Los valores de sensibilidad y especificidad que obtenemos de nuestro set de biomarcadores indican que dicho set es específico de EA y no de DCL, pero igualmente tienen valores de sensibilidad equiparables con los datos por la NINCDS-ADRDA.

La principal limitación de esta prueba es la variación de las 2 fórmulas discriminantes en el caso de que se ampliara la muestra de estudio y también el hecho de que los kit ELISA empleados pueden dar rangos diferentes de concentración de proteína a los obtenidos en este estudio. Por lo tanto, sería interesante realizar un estudio multicéntrico con muestreos en diferentes lugares eliminar la influencia del ambiente y los hábitos de la zona sobre la muestra, como defiende Humpel (2011), para así validar los resultados presentados.

Con todo, pensamos que nuestro trabajo aporta nuevas evidencias sobre proteínas que pueden postularse como biomarcadores de EA y que en conjunto muestran que son específicas de EA y no de DCL. Asimismo son capaces de clasificar a sujetos del estudio correctamente según su grupo diagnóstico. Con la presente tesis doctoral deseamos contribuir a la búsqueda de biomarcadores plasmáticos que permitirán detectar la EA de forma no invasiva como un análisis rutinario de sangre.

“El secreto de una buena
vejez no es otra cosa que un
pacto honrado con la soledad”

Gabriel García Márquez.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Los niveles de A β , tau y p-tau en LCR son biomarcadores válidos para el diagnóstico de la EA, especialmente en aquellos pacientes donde la clínica no es clara.
2. Los niveles de clusterina en plasma disminuyen significativamente en pacientes de Alzheimer en comparación con sujetos controles sin demencia. Estos niveles correlacionan con los de A β en LCR, lo cual indica una estrecha relación funcional entre ambas.
3. RAGE aumenta en pacientes de Alzheimer con respecto tanto a controles como a enfermos de DCL. Sus niveles correlacionan con los de A β , indicando la relación biológica existente entre ambas.
4. RAGE y clusterina presentan una correlación estadísticamente significativa, lo cual está en concordancia con la función de clusterina de aclarar A β fuera del cerebro y la de RAGE, de internalizarla.
5. PKR disminuye en plasma de pacientes de Alzheimer, comparados con controles sanos.
6. La proteína RCAN1 en plasma está disminuida en enfermos de Alzheimer respecto a sujetos DCL. Sus niveles correlacionan con los de A β , indicando funciones relacionadas.

7. Encontramos un set de biomarcadores plasmáticos específicos de la enfermedad de Alzheimer, compuesto por clusterina, RAGE, RCAN1 y PKR.
8. La curva ROC del set de Biomarcadores encontrado da una AUC de 0.81, lo cual indica alta especificidad en el diagnóstico de la EA.
9. Encontramos una regla de decisión, que clasifica correctamente a los casos sanos/Alzheimer en un 79,4%:

$$D_c = 9,147 * 10^{-5} * [clu] + 0,40 * [PKR] + 0,16 * [RAGE] - 19,413$$

$$D_{EA} = 6,94 * 10^{-5} * [clu] + 0,28 * [PKR] + 0,20 * [RAGE] - 12,563$$

Donde el valor superior clasificará al sujeto en su grupo diagnóstico.

“Ars longa, vita brevis”

Hipócrates

ANEXOS

7. ANEXOS

Anexo 1: Criterios diagnósticos de DCL (a partir de *etersen RC y cols, 2001*).

Criterios Diagnósticos de DCL

1. Queja de pérdida de memoria corroborada por un informador
2. Función cognoscitiva normal
3. Inexistencia de una alteración significativa de las actividades de la vida diaria
4. Puntuación en el test de memoria (como el *Mini Mental State*, ver en Métodos) que no sea inferior más de 1.5 desviaciones estándar de la media de los controles
5. Incumplimiento de los criterios de la NINCDS-ADRDA ni de DSM-IV para la EA (ver más abajo)

Anexo 2: Criterios diagnósticos de la EA según la NINCDS-ADRDA

Criterios Diagnósticos de EA según la NINCDS-ADRDA Traducidos de Tierney, Fisher et al. (1988)

1. Criterios para el diagnóstico Clínico de la EA Probable:
 - 1.1. Demencia, establecida por un diagnóstico clínico y soportada por el test Mini-Mental State de Folstein, la escala de demencia de Blessed u otros test cognitivos similares. Debe estar a su vez confirmada por test neuropsicológicos.
 - 1.2. Déficit en una o más áreas cognitivas

- 1.3. Empeoramiento progresivo de la memoria y otras funciones cognitivas
 - 1.4. No alteración de la consciencia
 - 1.5. Inicio entre la edad de 40 y 90 años de edad, siendo la más frecuente 65 años.
 - 1.6. Ausencia de alteraciones sistémicas o de otras enfermedades cerebrales que pudieran producir por ellas mismas un deterioro progresivo de la memoria y de otras funciones cognitivas.
2. Además, el diagnóstico de la EA Probable está apoyado por:
- 2.1. Deterioro progresivo de funciones cognitivas específicas, como el lenguaje (afasia), las habilidades motoras (apraxia) y percepción (agnosia).
 - 2.2. Actividades de la vida diaria afectadas y patrones de comportamiento alterados.
 - 2.3. Antecedentes familiares con un trastorno similar, especialmente si han sido confirmados anatomopatológicamente
 - 2.4. Diferentes pruebas complementarias
 - 2.4.1.LCR normal, en las determinaciones estándar
 - 2.4.2.EEG normal, con alteraciones inespecíficas
 - 2.4.3.Atrofia cerebral evaluada mediante TAC, cuya progresión está documentada.
3. Otros aspectos clínicos consistentes con el diagnóstico de EA probable, tras la exclusión de otras causas:
- 3.1. Mesetas en la progresión de la enfermedad

- 3.2. Síntomas asociados de depresión, insomnio, incontinencia, ideas delirantes, alucinaciones, accesos emocionales, físicos o verbales, pérdida de peso y alteraciones de la conducta sexual.
- 3.3. Otras alteraciones neurológicas en algunos pacientes, especialmente en aquellos que se hallan en fase avanzada, como hipertensión, mioclonía o alteraciones de la marcha.
- 3.4. Convulsiones en la fase avanzada de la enfermedad
- 3.5. TAC normal para la edad del paciente.
4. Aspectos que convierten el diagnóstico de EA probable en incierto o improbable:
 - 4.1. Aparición brusca o muy rápida
 - 4.2. Manifestaciones neurológicas focales como hemiparesia, alteración de la sensibilidad, pérdida de los campos visuales o falta de coordinación en fases tempranas de la enfermedad.
 - 4.3. Convulsiones o alteraciones de la marcha en fases iniciales de la enfermedad.
5. Diagnóstico clínico de la EA posible.
 - 5.1. Posibilidad de estar basado en una demencia siempre que haya una ausencia de cualquier alteración neurológica, psiquiátrica o sistémica que pueda ser causa subyacente de dicha demencia.
 - 5.2. Posibilidad de estar basado en la presencia de una segunda alteración neurológica o sistémica suficiente para producir demencia y que no es la causa principal de la demencia según las consideraciones del clínico

- 5.3. Denominación puede ser usada en investigación cuando un déficit cognitivo es único y progresivo y además es identificado en ausencia de cualquier otra causa.
6. Criterios para el diagnóstico de EA definitiva
 - a. Criterios clínicos para la EA probable
 - b. Evidencias histopatológicas obtenidas en una biopsia o en la autopsia.

Anexo 3: Criterios diagnósticos de la EA según el DSM-IV

Criterios Diagnósticos de EA según la DSM-IV. Aprobados por la American Psychiatric Association (First 1994)

1. Desarrollo de deficiencia cognitiva múltiple, manifestada por:
 - a. Deterioro de memoria y además, al menos una alteración cognitiva como: afasia, apraxia, agnosia o alteración de funciones ejecutivas.
2. Las alteraciones previas representan un deterioro con respecto a las capacidades previas del paciente y producen dificultades significativas y consecuente deterioro en las funciones ocupacionales y sociales.
3. La evolución se caracteriza por la instauración gradual y el deterioro cognitivo continuo.
4. Las alteraciones mencionadas previamente no se deben a:
 - a. Otros trastornos del sistema nervioso central que puedan ocasionar deterioro progresivo de la memoria y de otras funciones cognitivas.
 - b. Trastornos sistémicos que pueden ocasionar demencia u Intoxicaciones.

5. Las alteraciones no ocurren únicamente durante un síndrome confusional agudo
6. El trastorno no es atribuible a una alteración psiquiátrica que pudiera justificar las manifestaciones, como por ejemplo una depresión mayor o una esquizofrenia.

Anexo 4: Criterios diagnósticos nuevos de DCL

Nuevos criterios para diagnóstico de DCL. Traducidos a partir de Albert, DeKosky *et al.* 2011.

1. Cambios cognitivos relevantes
2. Deterioro en uno o más dominios cognitivos
3. Capacidad de realizar de forma independiente las actividades de la vida diaria.
4. En caso de confirmar el diagnóstico de DCL, se debe intentar profundizar en el mismo y aumentar el grado de certeza respecto a si el sujeto padece o no una demencia tipo EA. Aquí es de gran utilidad el empleo de los biomarcadores a los que hacen referencia Dubois, Feldman *et al.* (2007) puesto que en función de la presencia o no de los mismos la NIA-AA distingue entre:
 - a. DCL debido a enfermedad de Alzheimer con alto grado de certeza: si cumple los criterios centrales y además presenta un biomarcador positivo de depósito de amiloide y un biomarcador positivo de daño neuronal.
 - b. DCL debido a enfermedad de Alzheimer con grado intermedio de certeza: cumple los criterios centrales pero

sólo tiene un biomarcador positivo (bien de amiloidosis o de neurodegeneración).

- c. DCL probablemente no debido a EA: si cumple criterios centrales pero no tiene ningún biomarcador positivo.

Anexo 5: Criterios diagnósticos de la EA según la NIA-AA

Nuevos criterios para diagnóstico de EA. Traducidos a partir de McKhann, Knopman *et al.* 2011

El paciente cumple criterios centrales de demencia y además presenta:

1. Un inicio insidioso de la demencia. Los síntomas no son súbitos, sino que se alargan de meses a años.
2. Existe un claro empeoramiento cognitivo.
3. Los déficits cognitivos iniciales son evidentes y están documentados en la historia clínica y son especialmente notables en, al menos, una categoría:
 - a. Amnésica: Afectación en el recuerdo de información dada recientemente, dificultad lectora.
 - b. No amnésica: El déficit cognitivo afecta a un dominio distinto de la memoria, como el lenguaje (dificultades en expresión y precisión de las palabras), la memoria visuoespacial (agnosia) y la memoria ejecutiva (dificultad de razonamiento). Cualquiera de estas variantes deberían de cursar junto a otros déficits cognitivos.
4. Estos criterios no son aplicables en caso de evidencia de

- a. Enfermedad cerebrovascular concomitante importante (como la existencia de un ictus relacionada con el deterioro cognitivo)
- b. Criterios diagnósticos coincidentes con la demencia por cuerpos de Lewy.
- c. Características propias de otras demencias.

Además, los autores aportan criterios añadidos según el grado de certeza con el que se diagnostique la EA probable:

1. Demencia tipo EA con grado de certeza alto:
 - a. Con deterioro documentado en la historia clínica del paciente y corroborado por un informador.
 - b. El sujeto es portador de una mutación causal de EA: APP, PSEN1 o PSEN2.
2. Demencia tipo EA con evidencia fisiopatológica:
 - a. Empleo de 2 tipos de biomarcadores: de depósito de A β (PET-amiloide) y los de neurodegeneración en (PET glucosa). Deben obtenerse ambos positivos. Si se obtienen uno de los dos positivos se habla de EA posible (que es un rango inferior a la EA, contenido en los diagnósticos de DCL).

Anexo 6: Comité Ético del Hospital Clínico de Valencia

AGÈNCIA REGULARITATIVA



INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL HOSPITAL CLINIC UNIVERSITARI DE VALENCIA

D. Manuel Labiós Gómez Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico
Universitari de Valencia

CERTIFICA

Que en este Comité en su reunión de ordinaria de fecha 30 de junio de 2011 y según consta en el acta de la misma se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación que lleva por título

Identificación de nuevos marcadores periféricos de deterioro cognitivo ligero y de enfermedad de alzheimer

Que será llevado a cabo en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de Valencia y cuyo investigador principal es el Dr. José Viña Ribes, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la **Declaración de Helsinki** (Junio 1964 Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975 Tokio, Japón); (Octubre 1983 Venecia, Italia); (Septiembre 1989 Hong Kong); (Octubre 1996 Somerset West, Sudáfrica); (Octubre 2000 Edimburgo) y (Octubre 2008 Seúl, Corea) en la **Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO** y los acuerdos del **Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a la aplicaciones de la biología y de la medicina** (París 12-1-1998 ratificado el 23-7-1999)

Lo que certifico a efectos oportunos de Convocatoria de Ayudas para proyectos de investigación en Enfermedades Neurodegenerativas

Valencia, 30 de junio de 2011

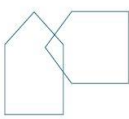
Fdo. Dr. D. Manuel Labiós Gómez
Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica

Anexo 7: Ejemplar del MMSE

Paciente..... Edad.....

Ocupación..... Escolaridad.....

Examinado por..... Fecha.....

Concepto	Puntuación	
	Paciente	Máximo
Orientación		
Digame el día _____ fecha _____ mes _____ estación _____ año _____		(5)
Digame el hospital (o el lugar) _____ planta _____ ciudad _____ provincia _____ nación _____		(5)
Memoria de fijación		
Repita estas 3 palabras: peseta – caballo – manzana (repetirlas hasta que las aprenda)		(3)
Concentración y cálculo		
Si tiene 30 euros y me va dando de 3 en 3: ¿Cuántos le van quedando?: _____ - _____ - _____ - _____		(5)
Repita estos números: 5 – 9 – 2 (hasta que los aprenda). Ahora hacia atrás: _____ - _____ - _____		(3)*
Memoria		
¿Recuerda las 3 palabras que le he dicho antes?: _____ - _____ - _____		(3)
Lenguaje y construcción		
Mostrar un bolígrafo: ¿Qué es esto? Repetirlo con el reloj		(2)
Repita esta frase: «En un trigal había cinco perros»		(1)
Una manzana y una pera son frutas, ¿verdad?		(2)*
¿Qué son el rojo y el verde? _____; ¿Qué son un perro y un gato? _____		(3)
Coja este papel con la mano derecha, dóblelo y póngalo encima de la mesa		(3)
Lea esto y haga lo que dice: CIERRE LOS OJOS		(1)
Escriba una frase _____		(1)
Copie este dibujo		
		(1)
Puntuación total MEC-35		(35)
Puntuación total MEC-30		(30)

*Se suprimen para la versión de 30 ítems.

Nivel de conciencia (marcar): _____

Alerta – Obnubilación – Estupor – Coma

“Al final, lo que importa no son los años de vida, sino la vida de los años”

Abraham Lincoln

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

Abdul, H.M., Sama, M.A., Furman, J.L., Mathis, D.M., Beckett, T.L., Weidner, A.M., Patel, E.S., Baig, I., Murphy, M.P., LeVine, H., 3rd, Kraner, S.D. & Norris, C.M. 2009, "Cognitive decline in Alzheimer's disease is associated with selective changes in calcineurin/NFAT signaling", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 29, no. 41, pp. 12957-12969.

Albert, M.S., DeKosky, S.T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H.H., Fox, N.C., Gamst, A., Holtzman, D.M., Jagust, W.J., Petersen, R.C., Snyder, P.J., Carrillo, M.C., Thies, B. & Phelps, C.H. 2011, "The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease", *Alzheimer's & Dementia*, vol. 7, no. 3, pp. 270-279.

Alberts, B; Johnson, A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K & Walter, P. 2008. *Molecular biology of the cell*. Fifth edition. Garland Science.

Alexopoulos, P., Guo, L., Tsolakidou, A., Kratzer, M., Grimmer, T., Westerteicher, C., Jiang, M., Bujo, H., Diehl-Schmid, J. & Kurz, A. 2012, "Interrelations between CSF soluble A β PP β , amyloid- β 1-42, SORL1, and tau levels in Alzheimer's disease", *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 28, no. 3, pp. 543-552.

Allen D. Roses, M.D. 1996, "apolipoprotein E alleles as risk factors in alzheimer's disease", *Annual Review of Medicine*, vol. 47, no. 1, pp. 387-400.

Alvarez, G., Muñoz-Montaño, J.R., Satrústegui, J., Avila, J., Bogónez, E. & Díaz-Nido, J. 2002, "Regulation of tau phosphorylation and protection against β -amyloid-induced neurodegeneration by lithium. Possible implications for Alzheimer's disease", *Bipolar disorders*, vol. 4, no. 3, pp. 153-165.

Alzheimer, A. 1911, "Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters", *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*, vol. 4, no. 1, pp. 356-385.

Alzheimer's Association 2009, "2009 Alzheimer's disease facts and figures", *Alzheimer's & Dementia*, vol. 5, no. 3, pp. 234-270.

American Psychiatric Association & American Psychiatric Association 1994, "Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM)", *Washington, DC: American psychiatric association*, pp. 143-147.

Anderton, B.H., Betts, J., Blackstock, W.P., Brion, J., Chapman, S., Connell, J., Dayanandan, R., Gallo, J., Gibb, G. & Hanger, D.P. 2001, "Sites of phosphorylation in tau and factors affecting their regulation", *Biochemical Society Symposia* Portland Press Limited, , pp. 73.

Asuni, A.A., Hooper, C., Reynolds, C.H., Lovestone, S., Anderton, B.H. & Killick, R. 2006, "GSK3 α exhibits β -catenin and tau directed kinase activities that are modulated by Wnt", *European Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 12, pp. 3387-3392.

Badia, M., Lloret, A., Giraldo, E., Dasí, F., Olaso, G., Alonso, M. & Viña, J. 2013, "Lymphocytes from young healthy persons carrying the ApoE4 allele overexpress stress-related proteins involved in the pathophysiology of Alzheimer's disease", *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 33, no. 1, pp. 77-83.

Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D. & Jones, E. 2011, "Alzheimer's disease", *The Lancet*, vol. 377, no. 9770, pp. 1019-1031.

Bateman, R.J., Xiong, C., Benzinger, T.L., Fagan, A.M., Goate, A., Fox, N.C., Marcus, D.S., Cairns, N.J., Xie, X. & Blazey, T.M. 2012, "Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease", *New England Journal of Medicine*, vol. 367, no. 9, pp. 795-804.

Batsch, N.L. & Mittelman, M.S. 2015, "World Alzheimer Report 2012", *Overcoming the Stigma of Dementia. Alzheimer's Disease International (ADI), London; 2012. Accessed May*, vol. 5.

Bauer, J., Strauss, S., Schreiter-Gasser, U., Ganter, U., Schlegel, P., Witt, I., Volk, B. & Berger, M. 1991, "Interleukin-6 and α -2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices", *FEBS letters*, vol. 285, no. 1, pp. 111-114.

Bero, A.W., Yan, P., Roh, J.H., Cirrito, J.R., Stewart, F.R., Raichle, M.E., Lee, J. & Holtzman, D.M. 2011, "Neuronal activity regulates the regional vulnerability to amyloid- β deposition", *Nature neuroscience*, vol. 14, no. 6, pp. 750-756.

Bierhaus, A., Humpert, P.M., Morcos, M., Wendt, T., Chavakis, T., Arnold, B., Stern, D.M. & Nawroth, P.P. 2005, "Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products", *Journal of molecular medicine*, vol. 83, no. 11, pp. 876-886.

Birks, J. & Harvey, R. 2003, "Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease", *The Cochrane Library*.

Bisquerra Alzina A. Metodología de la investigación Educativa. 2004 primera edición Editorial La Muralla

Blass, J.P. 2001, "Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia?", *Journal of neuroscience research*, vol. 66, no. 5, pp. 851-856.

Blum-Degen, D., Müller, T., Kuhn, W., Gerlach, M., Przuntek, H. & Riederer, P. 1995, "Interleukin-1 β and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients", *Neuroscience letters*, vol. 202, no. 1, pp. 17-20.

Boche, D. & Nicoll, J.A. 2008, "SYMPOSIUM: Clearance of A β from the Brain in Alzheimer's Disease: The Role of the Immune System in Clearance of A β from the Brain", *Brain Pathology*, vol. 18, no. 2, pp. 267-278.

Bohrmann, B., Tjernberg, L., Kuner, P., Poli, S., Levet-Trafit, B., Näslund, J., Richards, G., Huber, W., Döbeli, H. & Nordstedt, C. 1999, "Endogenous Proteins Controlling Amyloid β -Peptide Polymerization: possible implications for β -amyloid formation in the central nervous system and in peripheral tissues", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 23, pp. 15990-15995.

Bookheimer, S.Y., Strojwas, M.H., Cohen, M.S., Saunders, A.M., Pericak-Vance, M.A., Mazziotta, J.C. & Small, G.W. 2000, "Patterns of brain activation in people at risk for Alzheimer's disease", *New England journal of medicine*, vol. 343, no. 7, pp. 450-456.

Bose, A., Mouton-Liger, F., Paquet, C., Mazot, P., Vigny, M., Gray, F. & Hugon, J. 2011, "Modulation of tau phosphorylation by the kinase PKR: implications in Alzheimer's disease", *Brain Pathology*, vol. 21, no. 2, pp. 189-200.

Braak, H. & Del Tredici, K. 2011, "The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty", *Acta Neuropathologica*, vol. 121, no. 2, pp. 171-181.

Braak, H. & Braak, E. 1995, "Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes", *Neurobiology of aging*, vol. 16, no. 3, pp. 271-278.

Bredesen, D.E. 2014, "Reversal of cognitive decline: a novel therapeutic program", *Aging (Albany NY)*, vol. 6, no. 9, pp. 707-717.

Buchhave P, Minthon L et. al 2012, "Cerebrospinal fluid levels of β -amyloid 1-42, but not of tau, are fully changed already 5 to 10 years before the onset of alzheimer dementia", *Archives of General Psychiatry*, vol. 69, no. 1, pp. 98-106.

Caillé, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Müller, U. & Prochiantz, A. 2004, "Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone", *Development*, vol. 131, no. 9, pp. 2173-2181.

Calero, M., Rostagno, A., Matsubara, E., Zlokovic, B., Frangione, B. & Ghiso, J. 2000, "Apolipoprotein J(clusterin) and Alzheimer's disease", *Microscopy research and technique*, vol. 50, no. 4, pp. 305-315.

Carrillo-Mora, P., Luna, R. & Colín-Barenque, L. 2014, "Amyloid Beta: Multiple Mechanisms of Toxicity and Only Some Protective Effects?", *Oxidative Medicine and cellular longevity*, vol 2014.

Chouraki, V. & Seshadri, S. 2014, "Chapter Five - Genetics of Alzheimer's Disease", *Advances in Genetics*, vol. 87, pp. 245-294.

Cirrito, J.R., May, P.C., O'Dell, M.A., Taylor, J.W., Parsadanian, M., Cramer, J.W., Audia, J.E., Nissen, J.S., Bales, K.R., Paul, S.M., DeMattos, R.B. & Holtzman, D.M. 2003, "In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 23, no. 26, pp. 8844-8853.

Cook, C.N., Hejna, M.J., Magnuson, D.J. & Lee, J.M. 2005, "Expression of calcipressin1, an inhibitor of the phosphatase calcineurin, is altered with aging and Alzheimer's disease", *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 8, no. 1, pp. 63-73.

Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Jr, Rimmler, J.B., Locke, P.A., Conneally, P.M., Schmechel, K.E. & Tanzi, R.E. 1995, "Apolipoprotein E, survival in Alzheimer's disease patients, and the

competing risks of death and Alzheimer's disease", *Neurology*, vol. 45, no. 7, pp. 1323-1328.

Corder, E., Saunders, A., Strittmatter, W., Schmechel, D., Gaskell, P., Small, G., Roses, A., Haines, J. & Pericak-Vance, M. 1993, "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families", *Science*, vol. 261, no. 5123, pp. 921-923.

Cornutiu, G. 2015, "The epidemiological scale of Alzheimer's disease", *Journal of clinical medicine research*, vol. 7, no. 9, pp. 657.

Craig-Schapiro, R., Fagan, A.M. & Holtzman, D.M. 2009, "Biomarkers of Alzheimer's disease", *Neurobiology of disease*, vol. 35, no. 2, pp. 128-140.

Crum RM, Anthony JC, Bassett SS, Folstein MF 1993, "Population-based norms for the mini-mental state examination by age and educational level", *JAMA*, vol. 269, no. 18, pp. 2386-2391.

Damjanac, M., Bilan, A. R., Paccalin, M., Pontcharraud, R., Fauconneau, B., Hugon, J., & Page, G. (2008). Dissociation of Akt/PKB and ribosomal S6 kinase signaling markers in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*, 29(2), 354-367.

Das, P. & Golde, T. 2006, "Dysfunction of TGF-beta signaling in Alzheimer's disease", *The Journal of clinical investigation*, vol. 116, no. 11, pp. 2855-2857.

de Bruijn, R.F., Bos, M.J., Portegies, M.L., Hofman, A., Franco, O.H., Koudstaal, P.J. & Ikram, M.A. 2015, "The potential for prevention of dementia across two decades: the prospective, population-based Rotterdam Study", *BMC medicine*, vol. 13, no. 1, pp. 1.

De Servi, B., La Porta, C., Bontempelli, M. & Comolli, R. 2002, "Decrease of TGF- β 1 plasma levels and increase of nitric oxide synthase activity in leukocytes as potential biomarkers of Alzheimer's disease", *Experimental gerontology*, vol. 37, no. 6, pp. 813-821.

de Silva, H.V., Stuart, W.D., Duvic, C.R., Wetterau, J.R., Ray, M.J., Ferguson, D.G., Albers, H.W., Smith, W.R. & Harmony, J.A. 1990, "A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins", *The Journal of biological chemistry*, vol. 265, no. 22, pp. 13240-13247.

De Strooper, B. & Karran, E. 2016, "The cellular phase of Alzheimer's disease", *Cell*, vol. 164, no. 4, pp. 603-615.

De Strooper, B. 2014, "Lessons from a Failed γ -Secretase Alzheimer Trial", *Cell*, vol. 159, no. 4, pp. 721-726.

Deane, R., Du Yan, S., Subramanian, R.K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C. & Yu, J. 2003, "RAGE mediates amyloid- β peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain", *Nature medicine*, vol. 9, no. 7, pp. 907-913.

Deane, R., Wu, Z. & Zlokovic, B.V. 2004, "RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier", *Stroke; a journal of cerebral circulation*, vol. 35, no. 11 Suppl 1, pp. 2628-2631.

DeMattos, R.B., Brendza, R.P., Heuser, J.E., Kierson, M., Cirrito, J.R., Fryer, J., Sullivan, P.M., Fagan, A.M., Han, X. & Holtzman, D.M. 2001, "Purification and characterization of astrocyte-secreted apolipoprotein E and J-containing lipoproteins from wild-type and human apoE transgenic mice", *Neurochemistry international*, vol. 39, no. 5, pp. 415-425.

DeMattos, R.B., Cirrito, J.R., Parsadanian, M., May, P.C., O'Dell, M.A., Taylor, J.W., Harmony, J.A., Aronow, B.J., Bales, K.R. & Paul, S.M. 2004, "ApoE and clusterin cooperatively suppress A β levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular A β metabolism in vivo", *Neuron*, vol. 41, no. 2, pp. 193-202.

Di Domenico, F., Pupo, G., Giraldo, E., Badia, M., Monllor, P., Lloret, A., Schininà, M.E., Giorgi, A., Cini, C. & Tramutola, A. 2016, "Oxidative signature of cerebrospinal fluid from mild cognitive impairment and Alzheimer disease patients", *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 91, pp. 1-9.

Dickerson, B.C., Stoub, T.R., Shah, R.C., Sperling, R.A., Killiany, R.J., Albert, M.S., Hyman, B.T., Blacker, D. & Detlefsen-Morrell, L. 2011, "Alzheimer-signature MRI biomarker predicts AD dementia in cognitively normal adults", *Neurology*, vol. 76, no. 16, pp. 1395-1402.

Dickson, D.W. 2009, "Neuropathology of non-Alzheimer degenerative disorders", *International journal of clinical and experimental pathology*, vol. 3, no. 1, pp. 1-23.

Doecke, J.D., Laws, S.M., Faux, N.G., Wilson, W., Burnham, S.C., Lam, C., Mondal, A., Bedo, J., Bush, A.I. & Brown, B. 2012, "Blood-based protein biomarkers for diagnosis of Alzheimer disease", *Archives of Neurology*, vol. 69, no. 10, pp. 1318-1325.

Donahue, J.E., Flaherty, S.L., Johanson, C.E., Duncan III, J.A., Silverberg, G.D., Miller, M.C., Tavares, R., Yang, W., Wu, Q. & Sabo, E. 2006, "RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease", *Acta Neuropathologica*, vol. 112, no. 4, pp. 405-415.

Doody, R.S., Raman, R., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., He, F., Sun, X. & Thomas, R.G. 2013, "A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease", *New England Journal of Medicine*, vol. 369, no. 4, pp. 341-350.

Du Yan, S., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M. & Morser, J. 1996, "RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease", *Nature*, vol. 382, no. 6593, pp. 685-691.

Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Cummings, J.L., DeKosky, S.T., Barberger-Gateau, P., Delacourte, A., Frisoni, G., Fox, N.C., Galasko, D., Gauthier, S., Hampel, H., Jicha, G.A., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Sarazin, M., de Souza, L.C., Stern, Y., Visser, P.J. & Scheltens, P. 2010, "Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon", *The Lancet Neurology*, vol. 9, no. 11, pp. 1118-1127.

Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., DeKosky, S.T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Stern, Y., Visser, P.J. & Scheltens, P. 2007, "Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria", *The Lancet Neurology*, vol. 6, no. 8, pp. 734-746.

Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Hampel, H., Molinuevo, J.L., Blennow, K., DeKosky, S.T., Gauthier, S., Selkoe, D., Bateman, R., Cappa, S., Crutch, S., Engelborghs, S., Frisoni, G.B., Fox, N.C., Galasko, D., Habert, M., Jicha, G.A., Nordberg, A., Pasquier, F., Rabinovici, G., Robert, P., Rowe, C., Salloway, S., Sarazin, M., Epelbaum, S., de Souza, L.C., Vellas, B., Visser, P.J., Schneider, L., Stern, Y., Scheltens, P. & Cummings, J.L. 2014, "Advancing research

diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria", *The Lancet Neurology*, vol. 13, no. 6, pp. 614-629.

Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H.H., Scheltens, P., Aisen, P., Andrieu, S., Bakardjian, H., Benali, H., Bertram, L., Blennow, K., Broich, K., Cavado, E., Crutch, S., Dartigues, J., Duyckaerts, C., Epelbaum, S., Frisoni, G.B., Gauthier, S., Genthon, R., Gouw, A.A., Habert, M., Holtzman, D.M., Kivipelto, M., Lista, S., Molinuevo, J., O'Bryant, S.E., Rabinovici, G.D., Rowe, C., Salloway, S., Schneider, L.S., Sperling, R., Teichmann, M., Carrillo, M.C., Cummings, J. & Jack Jr, C.R. 2016, "Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria", *Alzheimer's & Dementia*, vol. 12, no. 3, pp. 292-323.

Dumurgier, J., Mouton-Liger, F., Lapalus, P., Prevot, M., Laplanche, J., Hugon, J., Paquet, C. & Groupe d'Investigation du Liquide Céphalorachidien (GIL) Study Network 2013, "Cerebrospinal fluid PKR level predicts cognitive decline in Alzheimer's disease", *PLoS One*, vol. 8, no. 1, pp. e53587.

Dursun, E., Gezen-Ak, D., Hanağası, H., Bilgiç, B., Lohmann, E., Ertan, S., Atasoy, İ.L., Alaylıoğlu, M., Araz, Ö.S., Önal, B., Gündüz, A., Apaydın, H., Kızıltan, G., Ulutin, T., Gürvit, H. & Yılmaz, S. 2015, "The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease", *Journal of neuroimmunology*, vol. 283, pp. 50-57.

Duthey, B. 2013, "Background paper 6.11: Alzheimer disease and other dementias", *A Public Health Approach to Innovation*, , pp. 1-74.

Duyckaerts, C., Delatour, B. & Potier, M. 2009, "Classification and basic pathology of Alzheimer disease", *Acta Neuropathologica*, vol. 118, no. 1, pp. 5-36.

Ermak, G., Pritchard, M.A., Dronjak, S., Niu, B. & Davies, K.J.A. 2011, "Do RCAN1 proteins link chronic stress with neurodegeneration?", *The FASEB Journal*, vol. 25, no. 10, pp. 3306-3311.

Ewers, M., Brendel, M., Rizk-Jackson, A., Rominger, A., Bartenstein, P., Schuff, N., Weiner, M.W. & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI 2014, "Reduced FDG-PET brain metabolism and executive function predict clinical progression in elderly healthy subjects", *NeuroImage: Clinical*, vol. 4, pp. 45-52.

- Fagan, A.M., Mintun, M.A., Mach, R.H., Lee, S., Dence, C.S., Shah, A.R., LaRossa, G.N., Spinner, M.L., Klunk, W.E. & Mathis, C.A. 2006, "Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid A β 42 in humans", *Annals of Neurology*, vol. 59, no. 3, pp. 512-519.
- Falcone, C., Emanuele, E., D'Angelo, A., Buzzi, M.P., Belvito, C., Cuccia, M. & Geroldi, D. 2005, "Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 25, no. 5, pp. 1032-1037.
- Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P.R., Rimmer, E. & Sczafuca, M. 2005, "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study", *The Lancet*, vol. 366, no. 9503, pp. 2112-2117.
- Fiandaca, M.S., Mapstone, M.E., Cheema, A.K. & Federoff, H.J. 2014, "The critical need for defining preclinical biomarkers in Alzheimer's disease", *Alzheimer's & Dementia*, vol. 10, no. 3, pp. S196-S212.
- First, M.B. 1994, "Diagnostic and statistical manual of mental disorders", *DSM IV-4th edition.APA*, , pp. 1994.
- Flanders, K.C., Ren, R.F. & Lippa, C.F. 1998, "Transforming growth factor- β s in neurodegenerative disease", *Progress in neurobiology*, vol. 54, no. 1, pp. 71-85.
- Flanders, K.C., Lippa, C.F., Smith, T.W., Pollen, D.A. & Sporn, M.B. 1995, "Altered expression of transforming growth factor-beta in Alzheimer's disease", *Neurology*, vol. 45, no. 8, pp. 1561-1569.
- Folstein, M.F., Folstein, S.E. & McHugh, P.R. 1975, "'Mini-mental state': A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician", *Journal of psychiatric research*, vol. 12, no. 3, pp. 189-198.
- Fraser, P.E., Nguyen, J.T., McLachlan, D.R., Abraham, C.R. & Kirschner, D.A. 1993, " α 1-antichymotrypsin binding to Alzheimer A β peptides is sequence specific and induces fibril disaggregation in vitro", *Journal of neurochemistry*, vol. 61, no. 1, pp. 298-305.

Frisoni, G.B., Fox, N.C., Jack, C.R., Scheltens, P. & Thompson, P.M. 2010, "The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease", *Nature Reviews Neurology*, vol. 6, no. 2, pp. 67-77.

Fuchsberger T, Martínez-Bellver S, Giraldo E, Teruel-Martí V, Lloret A, Viña J. 2016. "A β Induces Excitotoxicity Mediated by APC/C-Cdh1 Depletion That Can Be Prevented by Glutaminase Inhibition Promoting Neuronal Survival". *Scientific Reports*. Vol.6, pp. 311-58.

Furman, J.L. & Norris, C.M. 2014, "Calcineurin and glial signaling: neuroinflammation and beyond", *Journal of neuroinflammation*, vol. 11, no. 1, pp. 1.

Galton, C.J., Patterson, K., Xuereb, J.H. & Hodges, J.R. 2000, "Atypical and typical presentations of Alzheimer's disease: a clinical, neuropsychological, neuroimaging and pathological study of 13 cases", *Brain: a journal of neurology*, vol. 123 Pt 3, pp. 484-498.

Gillette-Guyonnet, S., Secher, M. & Vellas, B. 2013, "Nutrition and neurodegeneration: epidemiological evidence and challenges for future research", *British journal of clinical pharmacology*, vol. 75, no. 3, pp. 738-755.

Gupta, V.B., Doecke, J.D., Hone, E., Pedrini, S., Laws, S.M., Thambisetty, M., Bush, A.I., Rowe, C.C., Villemagne, V.L. & Ames, D. 2016, "Plasma apolipoprotein J as a potential biomarker for Alzheimer's disease: Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle study of aging", *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, vol. 3, pp. 18-26.

Guyton, C.G. And Hall, J.E. Tratado De Fisiología Médica. 11ª Edición. Elsevier, 2006.

Haass, C. & Selkoe, D.J. 2007, "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide", *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 8, no. 2, pp. 101-112.

Hampel, H., Shen, Y., Walsh, D.M., Aisen, P., Shaw, L.M., Zetterberg, H., Trojanowski, J.Q. & Blennow, K. 2010, "Biological markers of amyloid β -related mechanisms in Alzheimer's disease", *Experimental neurology*, vol. 223, no. 2, pp. 334-346.

Hardy, J. & Selkoe, D.J. 2002, "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 297, no. 5580, pp. 353-356.

Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskvin, V., Dowzell, K. & Williams, A. 2013, "Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease", *Nature genetics*, vol. 45, no. 6, pp. 712-712.

Harris, C.D., Ermak, G. & Davies, K.J. 2007, "RCAN1-1L is overexpressed in neurons of Alzheimer's disease patients", *FEBS Journal*, vol. 274, no. 7, pp. 1715-1724.

Hartmann, T., Bieger, S.C., Brühl, B., Tienari, P.J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G.W., Masters, C.L., Dotti, C.G. & Unsicker, K. 1997, "Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A β 40/42 amyloid peptides", *Nature medicine*, vol. 3, no. 9, pp. 1016-1020.

Henriksen, K., O'Bryant, S.E., Hampel, H., Trojanowski, J.Q., Montine, T.J., Jeromin, A., Blennow, K., Lönneborg, A., Wyss-Coray, T. & Soares, H. 2014, "The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease", *Alzheimer's & Dementia*, vol. 10, no. 1, pp. 115-131.

Hirsch-Reinshagen, V., Burgess, B.L. & Wellington, C.L. 2009, "Why lipids are important for Alzheimer disease?", *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 326, no. 1-2, pp. 121-129.

Hooper, C., Killick, R. & Lovestone, S. 2008, "The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease", *Journal of neurochemistry*, vol. 104, no. 6, pp. 1433-1439.

Hu, J., Igarashi, A., Kamata, M. & Nakagawa, H. 2001, "Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid β -peptide (A β); retards A β aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 51, pp. 47863-47868.

Huber, J.D., Egleton, R.D. & Davis, T.P. 2001, "Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier", *Trends in neurosciences*, vol. 24, no. 12, pp. 719-725.

Hudson, B.I., Hofmann, M.A., Bucciarelli, L., Wendt, T., Moser, B., Lu, Y., Qu, W., Stern, D.M., D'Agati, V. & Yan, S.S. 2002, "Glycation and diabetes: The RAGE connection", *Current Science*, vol. 83, no.12.

Humpel, C. 2011, "Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease", *Trends in biotechnology*, vol. 29, no. 1, pp. 26-32.

Hye, A., Kerr, F., Archer, N., Foy, C., Poppe, M., Brown, R., Hamilton, G., Powell, J., Anderton, B. & Lovestone, S. 2004, "Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease", *Neuroscience letters*, vol. 373, no. 1, pp. 1-4.

Hye, A., Riddoch-Contreras, J., Baird, A.L., Ashton, N.J., Bazenet, C., Leung, R., Westman, E., Simmons, A., Dobson, R. & Sattlecker, M. 2014, "Plasma proteins predict conversion to dementia from prodromal disease", *Alzheimer's & Dementia*, vol. 10, no. 6, pp. 799-807. e2.

J. Irala-Estévez, M. Martínez-González, M. Seguí-Gómez; Epidemiología aplicada. (1ª ed.)Ariel Ciencias Médicas, Barcelona (2004)

Jack Jr, C.R., Knopman, D.S., Jagust, W.J., Petersen, R.C., Weiner, M.W., Aisen, P.S., Shaw, L.M., Vemuri, P., Wiste, H.J., Weigand, S.D., Lesnick, T.G., Pankratz, V.S., Donohue, M.C. & Trojanowski, J.Q. 2013, "Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers", *The Lancet Neurology*, vol. 12, no. 2, pp. 207-216.

Jack, C.R., Albert, M.S., Knopman, D.S., McKhann, G.M., Sperling, R.A., Carrillo, M.C., Thies, B. & Phelps, C.H. 2011, "Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease", *Alzheimer's & Dementia*, vol. 7, no. 3, pp. 257-262.

Jack, C.R. & Holtzman, D.M. 2013, "Biomarker modeling of Alzheimer's disease", *Neuron*, vol. 80, no. 6, pp. 1347-1358.

Jack, C.R., Knopman, D.S., Jagust, W.J., Shaw, L.M., Aisen, P.S., Weiner, M.W., Petersen, R.C. & Trojanowski, J.Q. 2010, "Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade", *The Lancet Neurology*, vol. 9, no. 1, pp. 119-128.

Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Chishti, M.A., Horne, P., Heslin, D. & French, J. 2000, "A β peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease", *Nature*, vol. 408, no. 6815, pp. 979-982.

Jongbloed, W., van Dijk, K.D., Mulder, S.D., van de Berg, Wilma DJ, Blankenstein, M.A., van der Flier, W. & Veerhuis, R. 2015, "Clusterin levels in plasma predict cognitive decline and progression to Alzheimer's disease", *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 46, no. 4, pp. 1103-1110.

Kanekiyo, T., Xu, H. & Bu, G. 2014, "ApoE and A β in Alzheimer's Disease: Accidental Encounters or Partners?", *Neuron*, vol. 81, no. 4, pp. 740-754.

Kang, J.E., Lim, M.M., Bateman, R.J., Lee, J.J., Smyth, L.P., Cirrito, J.R., Fujiki, N., Nishino, S. & Holtzman, D.M. 2009, "Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 326, no. 5955, pp. 1005-1007.

Karch, C., Cruchaga, C. & Goate, A. 2014, "Alzheimer's Disease Genetics: From the Bench to the Clinic", *Neuron*, vol. 83, no. 1, pp. 11-26.

Karran, E., Mercken, M. & De Strooper, B. 2011, "The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics", *Nature reviews Drug discovery*, vol. 10, no. 9, pp. 698-712.

Ke, K., Lu, J., Qiu, Y. & Peng, Y. 2015, "Protection of TGF- β 1 against Neuroinflammation and Neurodegeneration in A β 1-42-Induced Alzheimer's Disease Model Rats", *PLoS one*, vol. 10, no. 2, pp. e0116549.

Kölsch, H. & Rao, M. 2002, "Neuroprotective effects of estradiol-17 β : implications for psychiatric disorders", *Archives of women's mental health*, vol. 5, no. 3, pp. 105-110.

Kook, S., Seok Hong, H., Moon, M. & Mook-Jung, I. 2013, "Disruption of blood-brain barrier in Alzheimer disease pathogenesis", *Tissue barriers*, vol. 1, no. 2, pp. 8845-8854.

Landau, S. & Everitt, B. 2004, *A handbook of statistical analyses using SPSS*, Chapman & Hall/CRC Boca Raton, FL.

Lautner, R., Palmqvist, S., Mattsson, N., Andreasson, U., Wallin, A., Pålsson, E., Jakobsson, J., Herukka, S., Owenius, R. & Olsson, B. 2014, "Apolipoprotein

E genotype and the diagnostic accuracy of cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer disease", *JAMA psychiatry*, vol. 71, no. 10, pp. 1183-1191.

Lazarczyk, M.J., Hof, P.R., Bouras, C. & Giannakopoulos, P. 2012, "Preclinical Alzheimer disease: identification of cases at risk among cognitively intact older individuals", *BMC Medicine*, vol. 10, no. 1, pp. 1-13.

Lindh, M., Blomberg, M., Jensen, M., Basun, H., Lannfelt, L., Engvall, B., Scharnagel, H., März, W., Wahlund, L. & F. Cowburn, R. 1997, "Cerebrospinal fluid apolipoprotein E (apoE) levels in Alzheimer's disease patients are increased at follow up and show a correlation with levels of tau protein", *Neuroscience letters*, vol. 229, no. 2, pp. 85-88.

Liu, Q., Zerbinatti, C.V., Zhang, J., Hoe, H., Wang, B., Cole, S.L., Herz, J., Muglia, L. & Bu, G. 2007, "Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1", *Neuron*, vol. 56, no. 1, pp. 66-78.

Llamas-Velasco, S., Llorente-Ayuso, L., Contador, I. & Bermejo-Pareja, F. 2015, "Versiones en español del Minimental State Examination (MMSE). Cuestiones para su uso en la práctica clínica", *Rev Neurol*, vol. 61, pp. 363-371.

Lloret, A., Badia, M., Giraldo, E., Ermak, G., Alonso, M., Pallardó, F.V., Davies, K.J. & Viña, J. 2011, "Amyloid- β toxicity and tau hyperphosphorylation are linked via RCAN1 in Alzheimer's disease", *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 27, no. 4, pp. 701-709.

Lloret, A., Badía, M., Mora, N.J., Ortega, A., Pallardó, F.V., Alonso, M., Atamna, H. & Viña, J. 2008, "Gender and age-dependent differences in the mitochondrial apoptogenic pathway in Alzheimer's disease", *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 44, no. 12, pp. 2019-2025.

Lobo, A., Saz, P., Marcos, G., Día, J.L., de la Cámara, C., Ventura, T., Morales Asín, F., Fernando Pascual, L., Montanes, J. & Aznar, S. 1999, "Revalidación y normalización del Mini-Examen Cognoscitivo (primera versión en castellano del Mini-Mental Status Examination) en la población general geriátrica", *Med Clin (Barc)*, vol. 112, no. 20, pp. 767-774.

Lockhart, A., Lamb, J.R., Osredkar, T., Sue, L.I., Joyce, J.N., Ye, L., Libri, V., Leppert, D. & Beach, T.G. 2007, "PIB is a non-specific imaging marker of

amyloid-beta (A β) peptide-related cerebral amyloidosis", *Brain : a journal of neurology*, vol. 130, no. Pt 10, pp. 2607-2615.

Loison, F., Debure, L., Nizard, P., le Goff, P., Michel, D. & le Drian, Y. 2006, "Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress: implication of HSF1-HSF2 heterocomplexes", *The Biochemical journal*, vol. 395, no. 1, pp. 223-231.

Malaguarnera, L., Motta, M., Di Rosa, M., Anzaldi, M. & Malaguarnera, M. 2006, "Interleukin-18 and transforming growth factor-beta 1 plasma levels in Alzheimer's disease and vascular dementia", *Neuropathology*, vol. 26, no. 4, pp. 307-312.

Martínez-González, M., Sánchez-Villegas, A., Toledo Atucha, E. and Toledo Atucha, E. (2014). *Bioestadística amigable* (3ª ed.). 1º ed. Barcelona: Elsevier Health Sciences Spain - T.

Massagué, J. 2012, "TGF β signalling in context", *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 13, no. 10, pp. 616-630.

Mattson, M.P. 2004, "Pathways towards and away from Alzheimer's disease", *Nature*, vol. 430, no. 7000, pp. 631-639.

Maurer, K., Volk, S. & Gerbaldo, H. 1997, "Auguste D and Alzheimer's disease", *Lancet (London, England)*, vol. 349, no. 9064, pp. 1546-1549.

Mawuenyega, K.G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J.C., Yarasheski, K.E. & Bateman, R.J. 2010, "Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 330, no. 6012, pp. 1774.

McGeer, P.L. & McGeer, E.G. 1995, "The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases", *Brain Research Reviews*, vol. 21, no. 2, pp. 195-218.

McKhann, G.M., Knopman, D.S., Chertkow, H., Hyman, B.T., Jack, C.R., Kawas, C.H., Klunk, W.E., Koroshetz, W.J., Manly, J.J. & Mayeux, R. 2011, "The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease", *Alzheimer's & dementia*, vol. 7, no. 3, pp. 263-269.

McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D. & Stadlan, E.M. 1984, "Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease", *Neurology*, vol. 34, no. 7, pp. 939-944.

Milton, J.S. (2001). *Estadística para Biología y Ciencias de la Salud*. Madrid: Ed. Interamericana-McGraw-Hill. 3ª Edición.

Mintun, M.A., Larossa, G.N., Sheline, Y.I., Dence, C.S., Lee, S.Y., Mach, R.H., Klunk, W.E., Mathis, C.A., DeKosky, S.T. & Morris, J.C. 2006, "[11C]PIB in a nondemented population: potential antecedent marker of Alzheimer disease", *Neurology*, vol. 67, no. 3, pp. 446-452.

Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G. & Wilcock, D. 2000, "A β peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease", *Nature*, vol. 408, no. 6815, pp. 982-985.

Morgan, C., Colombres, M., Nuñez, M.T. & Inestrosa, N.C. 2004, "Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease", *Progress in neurobiology*, vol. 74, no. 6, pp. 323-349.

Morris, J.C., Roe, C.M., Xiong, C., Fagan, A.M., Goate, A.M., Holtzman, D.M. & Mintun, M.A. 2010, "APOE predicts amyloid-beta but not tau Alzheimer pathology in cognitively normal aging", *Annals of Neurology*, vol. 67, no. 1, pp. 122-131.

Mouton-Liger, F., Paquet, C., Dumurgier, J., Bouras, C., Pradier, L., Gray, F. & Hugon, J. 2012, "Oxidative stress increases BACE1 protein levels through activation of the PKR-eIF2 α pathway", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, vol. 1822, no. 6, pp. 885-896.

Murray, M.E., Graff-Radford, N.R., Ross, O.A., Petersen, R.C., Duara, R. & Dickson, D.W. 2011, "Neuropathologically defined subtypes of Alzheimer's disease with distinct clinical characteristics: a retrospective study", *The Lancet Neurology*, vol. 10, no. 9, pp. 785-796.

Nagy, Z., Esiri, M. & Smith, A. 1998, "The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease", *Neuroscience*, vol. 87, no. 4, pp. 731-740.

Neeper, M., Schmidt, A.M., Brett, J., Yan, S.D., Wang, F., Pan, Y.C., Elliston, K., Stern, D. & Shaw, A. 1992, "Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins", *The Journal of biological chemistry*, vol. 267, no. 21, pp. 14998-15004.

Nelson, L. & Tabet, N. 2015, "Slowing the progression of Alzheimer's disease; what works?", *Ageing research reviews*, vol. 23, pp. 193-209.

Nitsch, R.M., Slack, B.E., Wurtman, R.J. & Growdon, J.H. 1992, "Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors", *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON*, , pp. 304-304.

Norton, S., Matthews, F.E., Barnes, D.E., Yaffe, K. & Brayne, C. 2014, "Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data", *The Lancet Neurology*, vol. 13, no. 8, pp. 788-794.

Nuutinen, T., Suuronen, T., Kauppinen, A. & Salminen, A. 2009, "Clusterin: A forgotten player in Alzheimer's disease", *Brain Research Reviews*, vol. 61, no. 2, pp. 89-104.

Obermeier, B., Daneman, R. & Ransohoff, R.M. 2013, "Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier", *Nature medicine*, vol. 19, no. 12, pp. 1584-1596.

Oda, T., Wals, P., Osterburg, H.H., Johnson, S.A., Pasinetti, G.M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Stine, W.B., Snyder, S.W. & Holzman, T.F. 1995, "Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid β -peptide (A β 1-42) and forms slowly sedimenting A β complexes that cause oxidative stress", *Experimental neurology*, vol. 136, no. 1, pp. 22-31.

Patten, S.B. & Fick, G.H. 1993, "Clinical interpretation of the mini-mental state", *General hospital psychiatry*, vol. 15, no. 4, pp. 254-259.

Patterson, C., Feightner, J.W., Garcia, A., Hsiung, G.Y., MacKnight, C. & Sadovnick, A.D. 2008, "Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease", *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, vol. 178, no. 5, pp. 548-556.

Patterson, C., Feightner, J.W., Garcia, A., Hsiung, G.Y., MacKnight, C. & Sadovnick, A.D. 2008, "Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk

assessment and primary prevention of Alzheimer disease", *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, vol. 178, no. 5, pp. 548-556.

Petersen RC, Doody R, Kurz A, et al 2001, "Current concepts in mild cognitive impairment", *Archives of Neurology*, vol. 58, no. 12, pp. 1985-1992.

Pflanzner, T., Janko, M.C., André-Dohmen, B., Reuss, S., Weggen, S., Roebroek, A.J.M., Kuhlmann, C.R.W. & Pietrzik, C.U. 2011, "LRP1 mediates bidirectional transcytosis of amyloid- β across the blood-brain barrier", *Neurobiology of aging*, vol. 32, no. 12, pp. 2323.e1-2323.e11.

Phiel, C.J., Wilson, C.A., Lee, V.M. & Klein, P.S. 2003, "GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid- β peptides", *Nature*, vol. 423, no. 6938, pp. 435-439.

Pita Fernández, S. & Pértegas Díaz, S. 2003, "Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad", *Cad Aten Primaria*, vol. 10, pp. 120-124.

Porta, S., Serra, S.A., Huch, M., Valverde, M.A., Llorens, F., Estivill, X., Arbones, M.L. & Martí, E. 2007, "RCAN1 (DSCR1) increases neuronal susceptibility to oxidative stress: a potential pathogenic process in neurodegeneration", *Human molecular genetics*, vol. 16, no. 9, pp. 1039-1050.

Porta, S., Martí, E., De La Luna, S. & Arbonés, M.L. 2007, "Differential expression of members of the RCAN family of calcineurin regulators suggests selective functions for these proteins in the brain", *European Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 5, pp. 1213-1226.

Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W. & Ferri, C.P. 2013, "The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis", *Alzheimer's & Dementia*, vol. 9, no. 1, pp. 63-75.e2.

Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali GC, Wu YT, Prina M. 2015. The global Impact of Dementia an analysis of prevalence, incidence, cost and trends. *World Alzheimer Report 2015*.

Puchades, M., Hansson, S.F., Nilsson, C.L., Andreasen, N., Blennow, K. & Davidsson, P. 2003, "Proteomic studies of potential cerebrospinal fluid protein markers for Alzheimer's disease", *Molecular Brain Research*, vol. 118, no. 1-2, pp. 140-146.

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A., McNamara, J.O. & Williams, S.M. 2001. *Neuroscience*. 2nd Edition. Oxford University Press.

Qizilbash, N., Whitehead, A., Higgins, J., Wilcock, G., Schneider, L., Farlow, M. & Dementia Trialists' Collaboration 1998, "Cholinesterase inhibition for Alzheimer disease: a meta-analysis of the tacrine trials", *Jama*, vol. 280, no. 20, pp. 1777-1782.

R. Alberca 2002, *Tratamiento de las alteraciones conductuales en la enfermedad de Alzheimer y en otros procesos neurológicos*, Ed. Médica Panamericana.

Reddy, P.H. & Beal, M.F. 2005, "Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease?", *Brain Research Reviews*, vol. 49, no. 3, pp. 618-632.

Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S. & Möbius, H.J. 2003, "Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease", *New England Journal of Medicine*, vol. 348, no. 14, pp. 1333-1341.

Reisberg, B., Ferris, S.H., de Leon, M.J. & Crook, T. 1982, "The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia.", *The American Journal of Psychiatry*, .

Reitz, C., Brayne, C. & Mayeux, R. 2011, "Epidemiology of Alzheimer disease", *Nature Reviews Neurology*, vol. 7, no. 3, pp. 137-152.

Riemenschneider, M., Wagenpfeil, S., Vanderstichele, H., Otto, M., Wiltfang, J., Kretzschmar, H., Vanmechelen, E., Förstl, H. & Kurz, A. 2003, "Phospho-tau/total tau ratio in cerebrospinal fluid discriminates Creutzfeldt-Jakob disease from other dementias", *Molecular psychiatry*, vol. 8, no. 3, pp. 343-347.

Robb, M.A., McInnes, P.M. & Califf, R.M. 2016, "Biomarkers and surrogate endpoints: developing common terminology and definitions", *Jama*, vol. 315, no. 11, pp. 1107-1108.

Rogers, J., Webster, S., Lue, L., Brachova, L., Civin, W.H., Emmerling, M., Shivers, B., Walker, D. & McGeer, P. 1996, "Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis", *Neurobiology of aging*, vol. 17, no. 5, pp. 681-686.

- Sabuncu, M.R., Desikan, R.S., Sepulcre, J., Yeo, B.T.T., Liu, H., Schmansky, N.J., Reuter, M., Weiner, M.W., Buckner, R.L. & Sperling, R.A. 2011, "The dynamics of cortical and hippocampal atrophy in Alzheimer disease", *Archives of Neurology*, vol. 68, no. 8, pp. 1040-1048.
- Sagare, A., Deane, R., Bell, R.D., Johnson, B., Hamm, K., Pendu, R., Marky, A., Lenting, P.J., Wu, Z. & Zarcone, T. 2007, "Clearance of amyloid- β by circulating lipoprotein receptors", *Nature medicine*, vol. 13, no. 9, pp. 1029-1031.
- Scheltens, P., Fox, N., Barkhof, F. & De Carli, C. 2002, "Structural magnetic resonance imaging in the practical assessment of dementia: beyond exclusion", *The Lancet Neurology*, vol. 1, no. 1, pp. 13-21.
- Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M.M.B., de Strooper, B., Frisoni, G.B., Salloway, S. & Van der Flier, W.M. 2016, "Alzheimer's disease", *The Lancet*, Volume 388, No. 10043, pp. 505–517.
- Scheltens, P. & Feldman, H. 2003, "Treatment of Alzheimer's disease; current status and new perspectives", *The Lancet Neurology*, vol. 2, no. 9, pp. 539-547.
- Schrijvers, E.M., Koudstaal, P.J., Hofman, A. & Breteler, M.M. 2011, "Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease", *Jama*, vol. 305, no. 13, pp. 1322-1326.
- Schwartz WJ, Smith CB, Davidsen L, Savaki H, Sokoloff L, Mata M, et al. Metabolic mapping of functional activity in the hypothalamo--neurohypophysial system of the rat. *Science*. 1979 Aug 17;205(4407):723–5
- Selkoe, D.J. 2008, "Soluble oligomers of the amyloid β -protein impair synaptic plasticity and behavior", *Behavioural brain research*, vol. 192, no. 1, pp. 106-113.
- Selkoe, D.J. 2001, "Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy", *Physiological Reviews*, vol. 81, no. 2, pp. 741-766.
- Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P.H., Williams, L., Maier, M., Dunstan, R., Salloway, S., Chen, T. & Ling, Y. 2016, "The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease", *Nature*, vol. 537, no. 7618, pp. 50-56.

Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J. & Lemere, C.A. 2008, "Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory", *Nature medicine*, vol. 14, no. 8, pp. 837-842.

Sies, H. 1986, "Biochemistry of oxidative stress", *Angewandte Chemie International Edition in English*, vol. 25, no. 12, pp. 1058-1071.

Singh, P., Singh, M. & Mastana, S. 2006, "APOE distribution in world populations with new data from India and the UK", *Annals of Human Biology*, vol. 33, no. 3, pp. 279-308.

Song, F., Han, G., Bai, Z., Peng, X., Wang, J. & Lei, H. 2015, "Chapter One - Alzheimer's Disease: Genomics and Beyond", *International review of neurobiology*, vol. 121, pp. 1-24.

Sperling, R.A., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Bennett, D.A., Craft, S., Fagan, A.M., Iwatsubo, T., Jack Jr., C.R., Kaye, J., Montine, T.J., Park, D.C., Reiman, E.M., Rowe, C.C., Siemers, E., Stern, Y., Yaffe, K., Carrillo, M.C., Thies, B., Morrison-Bogorad, M., Wagster, M.V. & Phelps, C.H. 2011, "Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease", *Alzheimer's & Dementia*, vol. 7, no. 3, pp. 280-292.

Spires-Jones, T. & Hyman, B. 2014, "The Intersection of Amyloid Beta and Tau at Synapses in Alzheimer's Disease", *Neuron*, vol. 82, no. 4, pp. 756-771.

Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S. & Roses, A.D. 1993, "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 5, pp. 1977-1981.

Tesseur, I., Zou, K., Esposito, L., Bard, F., Berber, E., Can, J.V., Lin, A.H., Crews, L., Tremblay, P., Mathews, P., Mucke, L., Masliah, E. & Wyss-Coray, T. 2006, "Deficiency in neuronal TGF- β signaling promotes neurodegeneration and Alzheimer's pathology", *The Journal of clinical investigation*, vol. 116, no. 11, pp. 3060-3069.

Thambisetty, M., Simmons, A., Velayudhan, L., Hye, A., Campbell, J., Zhang, Y., Wahlund, L., Westman, E., Kinsey, A. & Güntert, A. 2010, "Association of plasma clusterin concentration with severity, pathology, and progression in Alzheimer disease", *Archives of General Psychiatry*, vol. 67, no. 7, pp. 739-748.

Tierney, M.C., Fisher, R.H., Lewis, A.J., Zorzitto, M.L., Snow, W.G., Reid, D.W. & Nieuwstraten, P. 1988, "The NINCDS-ADRDA Work Group criteria for the clinical diagnosis of probable Alzheimer's disease: a clinicopathologic study of 57 cases", *Neurology*, vol. 38, no. 3, pp. 359-364.

Toledo, J.B., Xie, S.X., Trojanowski, J.Q. & Shaw, L.M. 2013, "Longitudinal change in CSF Tau and A β biomarkers for up to 48 months in ADNI", *Acta Neuropathologica*, vol. 126, no. 5, pp. 659-670.

Tombaugh, T.N. & McIntyre, N.J. 1992, "The Mini-Mental State Examination: A Comprehensive Review", *Journal of the American Geriatrics Society*, vol. 40, no. 9, pp. 922-935.

Torrado-Fonseca, M. & Berlanga-Silvente, V. 2013, "Análisis discriminante mediante SPSS", *REIRE*, vol. 6, no. 2.

Tucker, H.M., Kihiko, M., Caldwell, J.N., Wright, S., Kawarabayashi, T., Price, D., Walker, D., Scheff, S., McGillis, J.P., Rydel, R.E. & Estus, S. 2000, "The plasmin system is induced by and degrades amyloid-beta aggregates", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 20, no. 11, pp. 3937-3946.

Turenne, G.A. & Price, B.D. 2001, "Glycogen synthase kinase3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity", *BMC cell biology*, vol. 2, no. 1, pp. 1.

United Nations. Department of Economic 2010, *World population ageing 2009*, United Nations Publications.

Unsicker, K. & Kriegelstein, K. 2003, "TGF- β s and their roles in the regulation of neuron survival" in *Molecular and Cellular Biology of Neuroprotection in the CNS* Springer, , pp. 353-374.

van der Flier, W.M., Pijnenburg, Y.A., Fox, N.C. & Scheltens, P. 2011, "Early-onset versus late-onset Alzheimer's disease: the case of the missing APOE ϵ 4 allele", *The Lancet Neurology*, vol. 10, no. 3, pp. 280-288.

Varma, A.R., Snowden, J.S., Lloyd, J.J., Talbot, P.R., Mann, D.M. & Neary, D. 1999, "Evaluation of the NINCDS-ADRDA criteria in the differentiation of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia", *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, vol. 66, no. 2, pp. 184-188.

Villemagne, V.L., Burnham, S., Bourgeat, P., Brown, B., Ellis, K.A., Salvado, O., Szoeki, C., Macaulay, S.L., Martins, R. & Maruff, P. 2013, "Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study", *The Lancet Neurology*, vol. 12, no. 4, pp. 357-367.

Villemagne, V.L., Pike, K.E., Chételat, G., Ellis, K.A., Mulligan, R.S., Bourgeat, P., Ackermann, U., Jones, G., Szoeki, C. & Salvado, O. 2011, "Longitudinal assessment of A β and cognition in aging and Alzheimer disease", *Annals of Neurology*, vol. 69, no. 1, pp. 181-192.

Vina, J. & Borrás, C. 2010, "Women live longer than men: understanding molecular mechanisms offers opportunities to intervene by using estrogenic compounds", *Antioxidants & redox signaling*, vol. 13, no. 3, pp. 269-278.

Viña, J. & Lloret, A. 2010, "Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid- β peptide", *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 20, no. S2, pp. 527-533.

Vishnu, V.Y., Modi, M., Sharma, S., Mohanty, M., Goyal, M.K., Lal, V., Khandelwal, N., Mittal, B.R. & Prabhakar, S. 2016, "Role of Plasma Clusterin in Alzheimer's Disease—A Pilot Study in a Tertiary Hospital in Northern India", *PloS one*, vol. 11, no. 11, pp. e0166369.

Walsh, D.M., Hartley, D.M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Selkoe, D.J. & Teplow, D.B. 1999, "Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates", *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 36, pp. 25945-25952.

Wang, H., Pasternak, J.F., Kuo, H., Ristic, H., Lambert, M.P., Chromy, B., Viola, K.L., Klein, W.L., Stine, W.B. & Krafft, G.A. 2002, "Soluble oligomers of β amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus", *Brain research*, vol. 924, no. 2, pp. 133-140.

Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F. & Reed, J.C. 1999, "Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 284, no. 5412, pp. 339-343.

Wang, H., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F. & Reed, J.C. 1999, "Ca²⁺-Induced Apoptosis Through Calcineurin Dephosphorylation of BAD", *Science*, vol. 284, no. 5412, pp. 339-343.

Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H. & Zhu, X. 2013, "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1842, no.8, pp.1240-1247.

World Health Organization 2012, *Dementia: a public health priority*, World Health Organization.

Wu, Y., Ly, P.T. & Song, W. 2014, "Aberrant expression of RCAN1 in Alzheimer's pathogenesis: a new molecular mechanism and a novel drug target", *Molecular neurobiology*, vol. 50, no. 3, pp. 1085-1097.

Wyss-Coray, T. & Rogers, J. 2012, "Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature", *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, vol. 2, no. 1, pp. a006346.

Yerbury, J.J., Poon, S., Meehan, S., Thompson, B., Kumita, J.R., Dobson, C.M. & Wilson, M.R. 2007, "The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures", *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 21, no. 10, pp. 2312-2322.

Young-Pearse, T.L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J.B., LoTurco, J.J. & Selkoe, D.J. 2007, "A Critical Function for β -Amyloid Precursor Protein in Neuronal Migration Revealed by In Utero RNA Interference", *The Journal of Neuroscience*, vol. 27, no. 52, pp. 14459-14469.

Yu, J. & Tan, L. 2012, "The role of clusterin in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis, and therapy", *Molecular neurobiology*, vol. 45, no. 2, pp. 314-326.

Zhang, Y., McLaughlin, R., Goodyer, C. & LeBlanc, A. 2002, "Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons", *The Journal of cell biology*, vol. 156, no. 3, pp. 519-529.

Zhao, Y. & Zhao, B. 2013, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*.

Zhong, N. & Weisgraber, K.H. 2009, "Understanding the association of apolipoprotein E4 with Alzheimer disease: clues from its structure", *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 10, pp. 6027-6031.

Zhou, Z., Chan, C.H., Ma, Q., Xu, X., Xiao, Z. & Tan, E. 2011, "The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease", *Cell adhesion & migration*, vol. 5, no. 4, pp. 280-292.