



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**BIOMARCADORES PARA EL
DIAGNÓSTICO DE LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Autor: Manuel Pina Sánchez

Fecha: 15 de junio de 2019

Tutor: María Jesús Oset Gasque

Índice

RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	6
4. RESULTADOS.....	6
4.1. Biomarcadores genéticos	7
4.2. Biomarcadores para EA en el líquido cerebrospinal (CSF)	7
4.2.1. Biomarcadores clásicos.....	7
4.2.2. Biomarcadores candidatos de CSF	9
4.3. Biomarcadores plasmáticos	10
4.4. Visión global.....	12
5. DISCUSIÓN	14
6. CONCLUSIONES	18
7. BIBLIOGRAFÍA	19

Palabras clave:

CBD: Degeneración corticobasal, **CJD:** enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, **EA:** Enfermedad de Alzheimer, **FABP:** Fatty acid binding protein, **FDG:** 18F-fluorodeoxiglucosa, **FTD:** Demencia frontotemporal, **FTLD:** Degeneración frontotemporal lobular, **MCI:** Defecto cognitivo leve, **PCR:** Proteína C reactiva, **PIB:** Pittsburgh Compound-B, **PPY:** Pancreatic polypeptide, **SAA:** Suero amiloide A, **sICAM1:** soluble intercellular cell-adhesion molecule-1, **sVCAM1:** soluble vascular cell-adhesion molecule-1, **TNC:** Tenascina c, **TNF:** Factor de necrosis tumoral, **VaD:** demencia vascular, **VPN:** Valor predictivo negativo, **VPP:** Valor predictivo positivo.

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una neurodegeneración progresiva del cerebro, responsable de la mayoría de casos de demencia registrados y con tendencia a aumentar. Pese a los importantes esfuerzos dedicados, no se conocen todavía las causas que originan la enfermedad. Tampoco existen tratamientos efectivos, que se limitan a tratar los síntomas y retrasar la progresión de la enfermedad.

Una estrategia fundamental contra esta enfermedad se orienta a lograr su diagnóstico temprano y preciso. Y en esta tarea, los biomarcadores juegan un papel esencial. Para el desarrollo de biomarcadores eficaces se precisa conocer su implicación en los mecanismos patológicos de la EA, por ejemplo, en la formación de depósitos de beta amiloide ($A\beta$), o en la formación de ovillos neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada.

El presente trabajo consiste en un estudio bibliográfico cuyo objetivo analizar el estado del desarrollo actual de los biomarcadores para el diagnóstico de la EA y de los potenciales avances próximos. Los biomarcadores más relevantes en función de su naturaleza anatómica actualmente son:

- Biomarcadores genéticos APP, PSEN1, PSEN2, asociados a una mayor probabilidad de sufrir la enfermedad.
- Biomarcadores de CSF que se pueden subdividir en clásicos: $A\beta_{42/40}$, T-Tau, P-Tau y en investigación como la neurogranina.
- Biomarcadores plasmáticos en investigación como el NFLp y para el screening poblacional, los análisis plasmáticos multiprotéicos.
- Las técnicas de imagen MRI o PET.

A partir de los resultados del estudio realizado, se propone un esquema para el diagnóstico de la EA utilizando los biomarcadores actualmente disponibles, aplicable en las etapas previas al desarrollo de sintomatología, y con máxima cobertura.

Se concluye que las líneas de investigación más prometedoras para el diagnóstico precoz de EA son: i) las técnicas de imagen, desde el punto de vista clínico y en el futuro más próximo y ii) los biomarcadores plasmáticos en ensayos clínicos y a más largo plazo, que permiten la toma de muestra y el seguimiento sin riesgo para el paciente.

1. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa progresiva, responsable de dos tercios del total de casos de demencia registrados. La demencia es un síndrome que implica el deterioro de la memoria, el intelecto, el comportamiento y de la capacidad para realizar actividades de la vida diaria. La Organización Mundial de la Salud indica que hoy 50 millones de personas que padecen demencia en el mundo, advierte que cada año se registran cerca de 10 millones de nuevos casos, y prevé que para el año 2050 la cifra actual se triplique, alcanzando los 152 millones de personas enfermas de demencia¹.

Además de la incapacitación y la dependencia de los enfermos, la demencia tiene importantes repercusiones familiares, sociales y económicas que incluyen los costos

médicos y sociales directos y los costos referidos a la atención prestada fuera del ámbito institucional. Se calcula que en 2015, el total del costo social mundial de la demencia ascendió a 818 000 millones de dólares, equivalente al 1,1% del producto interior bruto (PIB) mundial y con previsión de rápido crecimiento. No menos importante es el efecto devastador sobre las familias de las personas afectadas y sobre sus cuidadores que, a menudo, precisan de apoyo por parte de los servicios sanitarios, sociales, financieros y jurídicos pertinentes.

En consecuencia, el conocimiento, diagnóstico y tratamiento de la demencia, y de la EA en particular, representa un reto y una prioridad de salud pública que reclama un importante esfuerzo de la sociedad en recursos e investigación.

Pero la realidad es que, a día de hoy, se desconocen las causas que originan la EA y tampoco existe un tratamiento que consiga la curación¹ sino que los tratamientos van dirigidos a reducir la sintomatología y retardar la progresión de la enfermedad.

En la EA una de las primeras áreas afectadas es el hipocampo, - esencial para el correcto funcionamiento de la memoria²-, que junto con la corteza cerebral se atrofian y contraen. Por otro lado, los ventrículos aumentan su tamaño. En su conjunto, estos cambios reducen el tamaño del cerebro. A nivel microscópico, lo que define a esta enfermedad es la acumulación del péptido β -amiloide ($A\beta$) entre las neuronas y la formación de ovillos neurofibrilares dentro de las mismas. Estas estructuras permanecen después de la muerte neuronal².

Ciertos factores genéticos y ambientales se ha descrito que aumentan la probabilidad de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. Algunos de ellos tienen una notable asociación con la EA, como son: la edad avanzada³; las mutaciones en los genes APP, PSEN1, PSEN2⁴; el género femenino⁵; el nivel educativo⁶; enfermedades cardiovasculares⁷; y la diabetes mellitus tipo 2⁸. Los posibles efectos aditivos de las interacciones entre factores de riesgo en el desarrollo de la enfermedad todavía se encuentran en fase de estudio⁹.

En la evolución de la enfermedad se consideran 3 etapas: La fase inicial preclínica (-20 años) en la que no existen síntomas. En la etapa prodrómica (-5 años) existe una pérdida gradual de axones y aparecen algunos síntomas, siendo el más frecuente un leve deterioro de memoria. Este estado se denomina *defecto cognitivo leve* o Mild Cognitive Impairment (MCI). El 40% al 60% de los pacientes con MCI desarrollarán EA en 5 años, aunque no cumplen los criterios para ser diagnosticados con demencia¹⁰. A diferencia de la EA no afecta a la vida diaria pero se considera una etapa precursora de la enfermedad². Y por último, la propia EA que se puede subdividir en leve, moderada y severa [Figura 1](#).

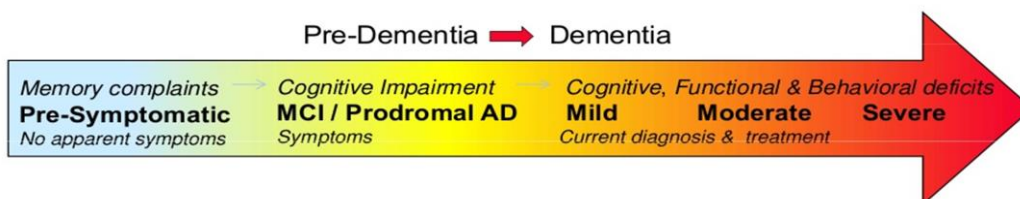


Figura 1. Estadios de desarrollo de la EA. Tomada de Luthman, J. 2015¹¹.

Un diagnóstico temprano de la enfermedad de Alzheimer permitiría optimizar el tratamiento y la prevención de la enfermedad, y con ello mejorar la calidad de vida de las personas con demencia y la de sus familiares y cuidadores. La búsqueda de marcadores biológicos potenciales que ayuden en la identificación y el diagnóstico precoz de la EA constituye una de las estrategias actuales más importantes frente a la enfermedad.

Un biomarcador, o marcador biológico, es un indicador objetivamente medible de los procesos normales biológicos, de los procesos patológicos o de la respuesta frente a una intervención terapéutica¹². Es decir, los biomarcadores son indicadores biológicos que pueden medirse y cuya presencia e intensidad se puede relacionar con el desarrollo de una enfermedad.

El diagnóstico médico de la EA se ha basado fundamentalmente en criterios clínicos, centrado en la presencia de síntomas. Es decir, se consideraba, erróneamente, que la enfermedad se iniciaba cuando aparecían los síntomas. Los biomarcadores nos han permitido conocer que, de hecho, los daños cerebrales comienzan décadas antes de que se manifiesten los primeros síntomas, en la fase preclínica de la EA. Aún hoy, el diagnóstico clínico de la EA es impreciso, con valores de acierto de entorno a un 80% - 90%, o menor conforme estadio sea anterior¹³. La confirmación del diagnóstico se realiza mediante autopsia.

Encontrar biomarcadores con alta especificidad y sensibilidad que faciliten un diagnóstico temprano permitirá intervenir sobre la EA antes de que la neurodegeneración sea significativa, que es precisamente cuando más eficaz es el tratamiento. El objetivo es frenar o retrasar la evolución hacia la demencia en aquellas personas que todavía no presentan síntomas evidentes. Este objetivo impulsa la investigación en biomarcadores que ayuden a un diagnóstico precoz y preciso. Además, los biomarcadores pueden ayudar a monitorizar la progresión de la EA y permitir la evaluación de los tratamientos, entre otras ventajas¹⁴.

Para la definición de biomarcador de diagnóstico en demencias neurodegenerativas se siguieron los criterios aportados por el National Institute on Ageing (NIA) y las conferencias de consenso de la Alzheimer Association, recogidas en el [cuadro 1](#).

Cuadro 1

Criterios que debe cumplir un biomarcador para el diagnóstico de la demencia

- Debe estar asociado a las características fundamentales de la neuropatología
- Validado en casos confirmados de la enfermedad
- Permitir la detección temprana y distinguirla de otras demencias
- No ser invasivo, fácil de usar y barato
- No estar influenciado por el tratamiento de medicamentos sintomáticos

Cuadro1: Criterios a cumplir en biomarcadores para el diagnóstico de la demencia. Lewczuk, P. et al, 2018⁹.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es analizar el estado del desarrollo actual de los biomarcadores para el diagnóstico de la EA y de los potenciales avances próximos.

- Describir la etiología de la enfermedad y su relación con los biomarcadores
- Analizar el diagnóstico actual de la EA y las alternativas a sus deficiencias
- Clasificar los biomarcadores existentes y en investigación. Comparar sus valores predictivos y los estadios en los que son sensibles. Valorar los riesgos en función de la utilidad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales de investigación:

- Revisión de la literatura científica sobre biomarcadores y EA: búsqueda, organización, análisis y valoración de trabajos científicos relevantes sobre el tema
- Cuestionarios a profesionales responsables de unidades de Alzheimer con el propósito de obtener información de los consultados sobre biomarcadores actualmente utilizados y en fase experimental

Métodos

- Búsqueda bibliográfica seguido de documentos relevantes mediante descripciones como: “Alzheimer disease”, “Biomarkers Alzheimer”, “Beta amyloid plaquets”, “Tau neurofibrilar tangles”, “Plasmatic biomarkers”, “CSF biomarkers”, “Alzheimer biomarker consensus”, “Future biomarkers”.
- Bases de datos y fuentes de información relevantes: Google Scholar y Pubmed. Además, cuestionarios a profesionales del campo¹³.
- Criterios de inclusión: texto completo disponible, lengua inglesa, fecha de publicación en los últimos 10 años.

La documentación científica consultada corresponde, en su mayoría, a estudios estadísticos de cohortes prospectivos y transversales para biomarcadores específicos, a artículos de metanálisis, y a compendios del estado de los distintos biomarcadores.

A continuación, se exponen los principales hallazgos obtenidos tras el análisis de la literatura científica consultada.

4. RESULTADOS

Los biomarcadores hallados se estructuran en función de su naturaleza anatómica y se analiza su relación con: i) las características fundamentales de la enfermedad, ii) su fiabilidad estadística, iii) el tiempo de detección, iv) la capacidad de discriminación con respecto a otras enfermedades y v) las etapas de la EA en que es activo (siguiendo el Cuadro 1).

4.1. Biomarcadores genéticos

Los biomarcadores genéticos son secciones del DNA que nos indican características diferenciales entre individuos. En la literatura analizada se describe una correlación con la EA familiar para las siguientes mutaciones de genes asociados con A β ⁴:

- APP. Mutación autosómica dominante o duplicaciones en la proteína precursora de amiloide.
- PSEN1 y PSEN2. Ambas mutaciones autosómicas dominantes. Componentes del sistema proteico γ -secretasa.

Juntas estas tres mutaciones explican de 5 a 10% de los casos de EA temprano. Con menor fuerza de asociación, se conoce que el gen *APOE* ϵ 4 está asociado con la formación de depósitos A β . Igualmente, se describe el efecto protector de *APOE* ϵ 2 contra la formación de depósitos A β ¹⁵.

4.2. Biomarcadores para EA en el líquido cerebroespinal (CSF)

4.2.1. Biomarcadores clásicos

En el líquido cerebro espinal se encuentran tres marcadores biológicos bien establecidos y determinados mediante ELISA. Son los llamados biomarcadores clásicos: β -amiloide 1-42 (A β 42), tau total (T-tau) y fosfo-tau (P-tau).

Los depósitos extracelulares de A β se producen por la división de la proteína precursora de amiloide (APP) por secretasas y procesado por vías amilogénicas. Se produce un péptido de 42 aminoácidos **A β 42** que puede agrupar con otros en el cerebro bajo ciertas condiciones. Los análisis de A β 42 en CSF muestran una significativa reducción de sus niveles en pacientes con EA en comparación con grupos control. Se piensa que la disminución de los niveles de A β 42 se debe a una menor eliminación del mismo desde el cerebro a sangre y CSF, junto a la agregación en el cerebro ¹². Sin embargo, esta hipótesis no puede explicar la disminución los niveles de A β 42 en el CSF de pacientes con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, que no desarrollan placas de péptido β -amiloide ¹⁶.

En un reciente estudio de meta-análisis llevado a cabo por *Olsson B, et al. 2016*, el ratio medio entre A β 42 en EA y controles fue de 0,56. Además entre cohortes con MCI asociada a EA y MCI estable obtuvo una relación fuerte de 0,67 ¹⁷. Por otra parte, los niveles de los distintos tipos de A β en CSF difieren según la enfermedad. Como ejemplo, hay una correlación entre la disminución en los niveles de A β 38 con la FTLD y a su vez los niveles de A β 37 con la LBD ¹⁸. La disminución de A β 42 en CSF precede a la acumulación y, por tanto, al Pittsburgh Compound-B (PIB) ¹⁵.

La sensibilidad y especificidad de A β 42 para distinguir EA de controles fue del 78% y 83% en el estudio de *Galasko D, et al., 1998* ¹⁹. El ratio de **A β 42/A β 40** tiene una sensibilidad y especificidad mayor que A β 42 solo, ya que se piensa que compensa la variación de producción total de A β entre individuos ^{9,20}.

Sumado a lo anteriormente mencionado hay otras dos razones que apoyan el uso de A β 42/A β 40 frente a A β 42 para el diagnóstico de EA. A β 42/A β 40 está menos asociado a errores en la interpretación cuando se usan tubos fabricados con materiales distintos al

polipropileno²¹ (que son los normalmente usados para tomar muestras de CSF) posiblemente debido a que ambas isoformas se adsorben de manera similar en la superficie²². Por otra parte, dos estudios que mediante ELISA buscaban un valor de A β 42/40 para predecir EA en sujetos con MCI *Hansson et al., 2007*²³ y *Lewczuk P, Esselmann H, Otto M, et al 2004*²⁴ llegaron a un valor diagnóstico similar para A β 42/40 0,095 Y 0,098, respectivamente, mientras que para A β 42 eran de 640 y 550 pg/ml variando más de un 15%.

En conclusión, el cociente A β 42/A β 40 posee mejores valores predictivos, hay menos errores asociados a la conservación de la muestra, y los niveles para el diagnóstico están más consensuados que para A β 42 solo.

La segunda característica histológica de la EA son las inclusiones intracelulares de proteína tau asociada a microtúbulos, **total tau (T-tau)**. Los niveles de **T-tau** son mayores en pacientes con EA respecto a los controles de la misma edad. Además, valores altos de T-tau pueden ser un pronóstico de la evolución de MCI hacia EA. Sus niveles no son altos en los casos de MCI estable¹². T-Tau refleja la intensidad de degeneración neuronal. Por esta razón, niveles altos están relacionados con una evolución más violenta de MCI a EA, una pérdida más rápida de las capacidades cognitivas y una mayor mortalidad²⁶. Debido a que T-Tau refleja la intensidad de daño neuronal, niveles altos de esta también se encuentran en otras enfermedades neurodegenerativas como el ictus, VaD, trauma craneal, CBD y altamente con CJD y, en menor medida, con variantes de FTD²⁷. Es importante mencionar que existen menos estudios sobre T-tau respecto a A β por lo que están peor establecidas sus concentraciones para la clasificación de los enfermos.

Mientras que T-Tau refleja inespecíficamente la disrupción de las células nerviosas, la hiperfosforilación anormal de Tau se considera más específica para EA. La **proteína tau fosforilada (P-Tau)** en posición 181 está significativamente aumentada en la EA

con respecto a los controles sanos. Niveles altos de T-tau y P-tau en los estudios de *Blennow et al., 2010*²⁶ y *Vos et al., 2013*²⁸ que son estudios transversales entre sujetos con MCI y ancianos con cualidades cognitivas normales, establecen la relación de riesgo para EA. Otros análisis de distintas formas fosforiladas de P-tau como 199, 231, 235, 396 y 404 podrían ofrecer una mejora significativa respecto al diagnóstico temprano. Otra formas como la 181 y 231 podrían usarse para distinguir EA de otras enfermedades como FTL, LBD, VaD y depresión²⁹.

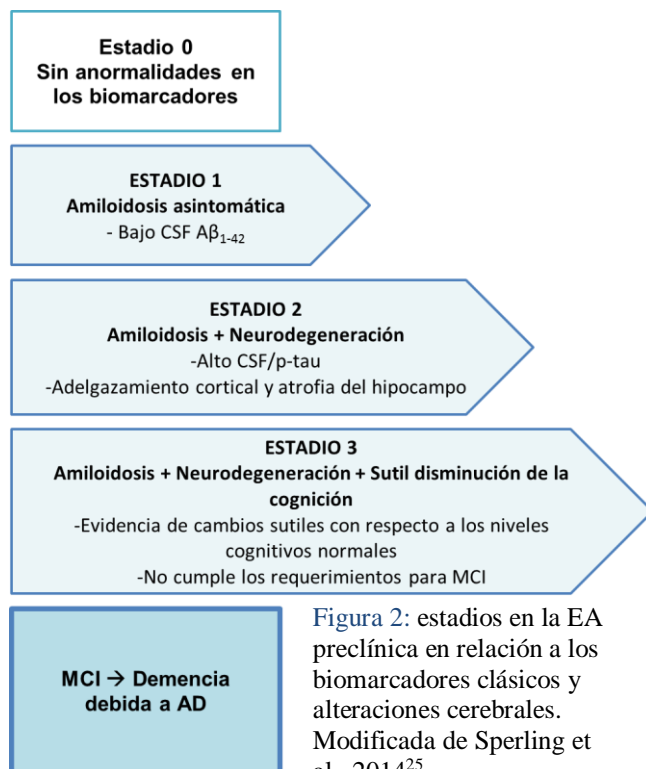


Figura 2: estadios en la EA preclínica en relación a los biomarcadores clásicos y alteraciones cerebrales. Modificada de Sperling et al., 2014²⁵.

Para ilustrar la cronología de los biomarcadores clásicos se toma como referencia la **Figura 2** por *Sperling et al., 2014*²⁵, que los

organiza junto a cambios en la morfología cerebral y en la sintomatología. Se cree que A β 42 empieza a acumularse hasta 20 años antes de desarrollar la enfermedad (estadio 1) y los aumentos en las concentraciones de Tau en torno a 5 años antes (estadio 2). De esta forma las alteraciones en A β 42/A β 40 aparecen en estadios preclínicos y en T- y P-tau en prodrómicos (Figura 2). Todos tienen capacidad para discernir entre MCI estable y asociada a EA. Sin embargo, T-tau no es específica para la enfermedad.

Para pacientes con EA incipiente la combinación de estos tres biomarcadores aporta una sensibilidad del 95% y una especificidad del 83%³⁰. En consecuencia, estos biomarcadores han sido incorporados a los criterios de diagnóstico en investigación y, en algunas ocasiones, en clínica¹³. Si bien sus concentraciones límite para el diagnóstico no están consensuadas, a modo de ejemplo se recogen las descritas las por *Humpel C., 2011*¹² en la Tabla 1.

Tabla1

Niveles de biomarcadores en CSF para el diagnóstico de la AD		
Biomarcador	Control (pg/ml)	EA (pg/ml)
A β 42	794 \pm 20	<500*
T-tau	136 \pm 89 (21–50 years)	
	243 \pm 127 (51–70 years)	>450
	341 \pm 171 (>71 years)	>600*
P-tau	23 \pm 2	>60*

Tabla1. Tomada de Humpel C., 2011. Data obtenida mediante ELISA. Los datos no son relevantes para AD esporádico en < 60. * = p < 0,001.

Otros estudios afirman que los resultados de diagnóstico óptimos son < 459 para A β 42, > 339 para T-tau, y > 67 para P-tau 181 (todos pg/mL)²⁸. La falta de unos valores universales refleja las variaciones en la sensibilidad y especificidad en diferentes ensayos realizados.

4.2.2. Biomarcadores candidatos de CSF

Además de los anteriormente mencionados, nuevos marcadores en CSF se están investigando como la proteína de **neurofilamentos de cadena ligera (NFL)**. Los ovillos neurofibrilares (NFTs) están compuestos principalmente por proteína tau hiperfosforilada y neurofilamentos (NFs). Los NFs son heteropolímeros específicos de neuronas, principalmente expresados en axones mielinados de gran calibre y son componentes estructurales clave del citoesqueleto neuronal.

Una subunidad de NF específica, la proteína NFL, está siendo examinada como biomarcador candidato para el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas. El aumento de la concentración en CSF de NFL ha sido detectado en enfermos con EA y demencia frontotemporal (FTD) respecto a los controles. El CSF NFL puede discernir entre pacientes con EA frente a los sujetos sanos con una alta precisión, mayor a la obtenida con análisis de tau. Pero los resultados no fueron satisfactorios para distinguir entre EA y FTD³¹.

Otro potencial biomarcador es **Neurogranina (Ng)**. Una proteína dendrítica expresada en la corteza e hipocampo por neuronas excitatorias y tiene una función clave en la plasticidad sináptica y la inducción de potenciación a largo plazo en el hipocampo. En el cerebro sano los niveles de Ng son más altos en áreas asociativas corticales, mientras

que en la EA lo son en la corteza y en el hipocampo, reflejando la pérdida sináptica. Por esto la medida de Ng en CSF puede ser un reflejo de la inestabilidad dendrítica y la neurodegeneración. En consecuencia, un enlace directo con los síntomas clínicos de EA²⁰. La Ng es un biomarcador prometedor para EA porque presenta niveles elevados en pacientes con la enfermedad comparados con pacientes cognitivamente normales y predice la progresión desde MCI a EA³². El problema principal de la neurogranina es la falta de datos en estudios clínicos. Para ilustrar lo anterior se acompañan los resultados del estudio transversal de *Kvartsberg, H et al., 2015*³³. En diferentes estudios longitudinales los niveles permanecen estables en EA pero en individuos cognitivamente normales aumentan, lo que sugiere que CSF Ng pueda reflejar disfunción sináptica presintomática³⁴. Permite diferenciar EA y MCI-EA; y niveles altos en pacientes positivos para A β 42 predicen una degeneración más rápida³³.

Tabla 2
Niveles de CSF Ng

Variable	Control	MCI	EA
Ng (SD), pg/mL	99 (24-167)	210(83-433)	336 (126-505)
P-valor vs control		<0,001	<0,001
P-valor vs MCI			<0,05

Tabla 2. Data obtenida mediante ELISA. N = 40 para cada grupo³³.

4.3. Biomarcadores plasmáticos

El diagnóstico a partir de CSF tiene varias desventajas clave: la punción lumbar es un tratamiento invasivo con potenciales efectos adversos, lo que dificulta la toma de muestra y el seguimiento del mismo paciente por los años. En consecuencia, se buscan biomarcadores en otros fluidos corporales para diagnosticar EA. Si bien orina y saliva se pueden recolectar fácilmente, se requieren métodos con una sensibilidad a proteínas extremadamente alta y su relación con la EA no está clara. La sangre se presenta como la mejor opción¹².

No hay una correlación clara entre los niveles plasmáticos y en CSF de T-tau³⁵. Esta diferencia entre las concentraciones de biomarcadores clásicos en CSF y en sangre suele ser bastante común. De igual forma sucede con los niveles plasmáticos de A β 42. Los niveles plasmáticos de este, A β 40 y su ratio pueden estar elevados, reducidos o permanecer sin cambios³⁶. Para ilustrarlo, son significativos los resultados de *Lövheim, H et al., 2017*³⁶.

Tabla 3
Concentraciones plasmáticas de A β libre

Variable	Controles	Casos (EA)	95% IC	P-Valor
pA β ₄₂ , media \pm SD (ng/L)	44,6 \pm 12,5	43,6 \pm 12,5	0,982 - 1,006	0,316
pA β ₄₀ , media \pm SD (ng/L)	143,9 \pm 41,0	142,3 \pm 36,3	0,994 - 1,003	0,525
pA β ₄₂ : pA β ₄₀ ratio, media \pm SD (ng/L)	0,331 \pm 0,129	0,325 \pm 0,131	0,190 - 2,325	0,522

Tabla 3. Data obtenida mediante ELISA. pA β = A β Plasmático

Sin embargo, una excepción es **NFL**. Para este hay una excelente correlación entre CSF y plasma en cuanto a concentraciones. Estos resultados fueron replicados recientemente en muestras de suero y plasma³⁷. Se acompañan los datos tomados del estudio de *Mattsson, N et al., 2017*³⁸.

Tabla 4

Concentraciones plasmáticas de NFL

Variable	Controles (n = 193)	MCI (n = 197)	EA Demencia (n = 180)	P-Valor
Plasma NFL, media (SD), ng/L	34.7 (21.4)	42.8 (29.0)	51.0 (26.9)	<.001

Tabla 4. Resultados obtenidos mediante ELISA³⁸.

Recientemente estudios multiétnicos, como el de *O'Bryant, S. E. et al., 2016*³⁹, han demostrado que a partir de muestras sanguíneas, - analizado el suero por técnicas de proteómica y seleccionando los biomarcadores más selectivos y específicos para EA-, se obtiene un test para la enfermedad con un valor predictivo positivo (VPP) de 0,85 y un valor predictivo negativo (VPN) de 0,94 para población anciana (>65 años). Se estudiaron 21 proteínas. Los marcadores proteómicos ensayados fueron A2M, B2M, PCR, Eotaxin 3, FABP, FVII, I309, IL10, IL18, IL5, IL6, IL7, MIP1- α , PPY, SAA, sICAM1, sVCAM1, TARC, Thrombopoietin, TNC, TNF α .

La aplicación de algoritmos a estas 21 proteínas más la incorporación de características demográficas (edad, sexo y educación) consiguieron especificidad, (E) 0.98, sensibilidad, (S) 0.63, VPP 0.81 y VPN 0.95 para detectar EA. En el caso de la detección de MCI con un E establecida en 0,98, la S fue de 0,42 lo que conlleva un VPP de 0,74 y un VPN de 0,93. Para abaratar el proceso se restringió a 10 proteínas + características demográficas. Para el mismo valor estipulado de E, S fue 0,45 resultando en VPP de 0,75 y VPN de 0,93.

Otros ensayos de análisis proteómicos ofrecen resultados similares⁴⁰. Como contraparte, estos ensayos fallan en mantener los valores predictivos fuera de poblaciones estándar de sujetos sanos y con EA¹³.

Ninguno de los biomarcadores plasmáticos contemplados está incorporado en protocolos de diagnóstico y se tiene que probar su validez, de modo que entrarían en la categoría de biomarcadores candidatos.

4.4. Visión global

Tabla 5.1 Resumen del estado de los biomarcadores de CSF estudiados.
Modificado de *Blennow, K et al., 2017*²⁰.

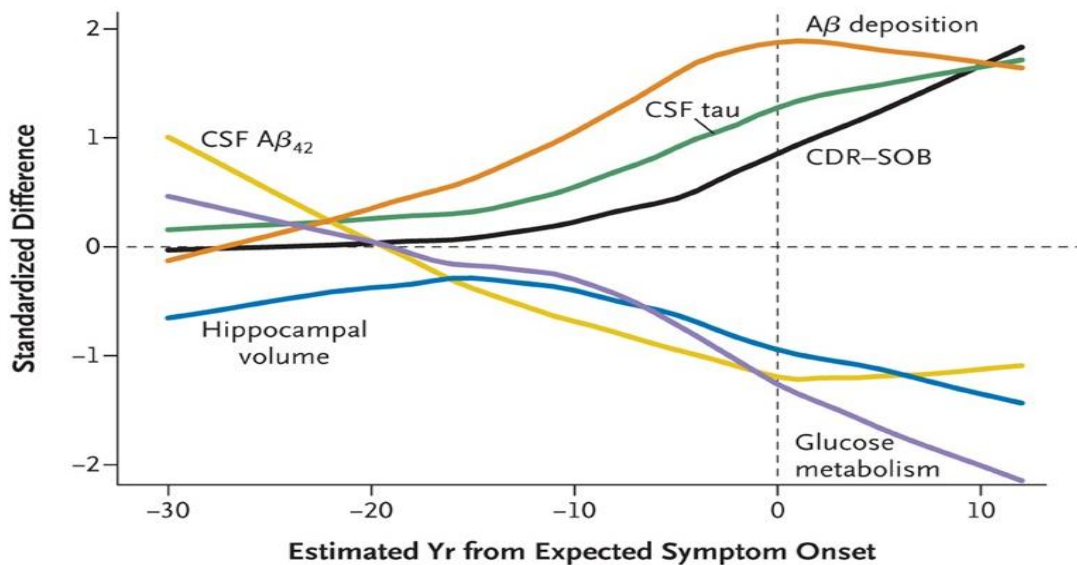
Clase	Fluido	Bio Marcador	EA	Estado de desarrollo	Interpretación
Bio marcadores clásicos	CSF	A β 42	Niveles bajos encontrados en EA y estadios preclínicos	Existen varios inmunoensayos validados comercializados	Es el primer signo en aparecer (niveles bajos) que refleja la existencia de depósitos
			Sensibilidad (S) y especificidad (E) de 78% y 83% ¹⁹ , 85% y 83% ⁴¹		Su disminución precede a PIB ¹⁵
			El cambio medio es de 47,5% menos respecto a controles sanos ¹²		Diferencia MCI estable de MCI asociada a EA (MCI-EA)
					Mayor S y E que A β 42
	CSF	A β 42/A β 40	Niveles bajos encontrados en EA y EA prodrómico	Existen varios inmunoensayos validados comercializados	Menos variación interindividual
			S y E de 94% y 86,7% ²²		Menos errores en al interpretación ²¹
			El cambio medio en torno a 50% menos respecto a controles sanos		Mayor consenso en valores diagnóstico ^{23,24}
					Diferencia MCI estable de MCI-EA
	CSF	T-Tau	Altos niveles de T-Tau se encuentran en EA y EA prodrómico	Existen varios inmunoensayos validados comercializados	Niveles altos de T-Tau reflejan neurodegeneración
			Aumento de aproximadamente el 300% ²⁹		Los niveles son elevados en otras enfermedades ²⁷
			S y E de 80% y 90% ²⁹ , 85% y 78% ⁴¹ .		Diferencian MCI estable y MCI-EA ^{12,26}
	CSF	P-Tau	Altos niveles de P-Tau se encuentran en EA y EA prodrómico	Existen varios inmunoensayos validados comercializados	Refleja la formación de ovillos neurofibrilares
			Aumento de en torno al 200%		Es más específica que T-Tau, no está asociado a otras enfermedades neurodegenerativas
			S y E de 85% y 68% ⁴¹ .		Diferencian MCI estable de MCI-EA ^{39,40} .
Bio marcadores candidatos	CSF	Neurogranina	Niveles altos tanto en EA como EA prodrómico	Varios ensayos en investigación	Niveles altos reflejan la disfunción sináptica, pérdida dendrítica
			Aumento de aproximadamente el 240% ³³		Utilidad en el seguimiento de MCI a EA
					Específico para EA ³⁴

Tabla 5.2 Resumen del estado de los biomarcadores plasmáticos estudiados.
Modificado de *Blennow, K et al., 2017*²⁰.

Clase	Fluido	Biomarcador	EA	Estado de desarrollo	Interpretación
Bio marcadores candidatos	Sangre	NFL	Niveles altos tanto en EA como EA prodrómico Aumento de entono a un 47% ³⁸	Un único ensayo inmunológico comercializado	Niveles altos de NFL en plasma es un marcador de neurodegeneración No es específico para EA
	Sangre	Análisis Multiprotéico	Niveles altos tanto en EA como EA prodrómico S 0,42% y E 0,98% ³⁹	Algoritmos disponibles específicos para ciertas proteínas y datos demográficos ³⁹	Uso destacado como técnica de screening VPN de 0,93 ³⁹

Datos sin referencia tomados de *Blennow, K et al., 2017*²⁰. Datos de Sensibilidad y Especificidad tomado del estudio de Mulder, C et al., 2010⁴⁰. En dicho estudio para alcanzar el 85% de sensibilidad se establecieron como valores diagnóstico para A β 42 550 ng/l = pg/ml (95% CI 531 – 570); 375 pg/ml (325 – 405) para T-Tau; y 52 pg/ml (48 – 56) para P-Tau. Las especificidades correspondientes fueron para A β 42 83% (95% CI 76%–89%); para T-Tau 78% (70%–85%); y para P-Tau 68% (60%–77%)⁴¹.

Esas diferencias respecto a controles sanos siguen un orden. Para ilustrarlo se toma la gráfica del trabajo de Bateman, R. J et al., 2012⁴² [Figura 3](#).



[Figura 3](#): diferencias en pacientes con EA con respecto a sujetos sanos frente al tiempo de instauración de los mismos tomada de Bateman, R. J et al., 2012⁴².

1. Disminución de las concentraciones de A β 42 (- 20 años) seguido de la acumulación. Esto explica porque el A β 42 de CSF precede al PET-PIB. Otros tipos de PET poseen sensibilidad anterior como el PET amiloide con florbetapir, florbetaben o flutemetamol
2. Incremento de las concentraciones en CSF de Tau (- 5 años). En torno a este tiempo también son sensibles los análisis de NFLp, Ng o proteómico plasmático.

3. Acto seguido aparece la atrofia del hipocampo y el hipometabolismo de glucosa, medido con PET-FDG.
4. Por último, deficiencias cognitivas medidas con el test CDR-SOB (clinical dementia rating) que, como se indica en el mismo trabajo, preceden a los síntomas esperados de EA en una media de 3,3 años.

5. DISCUSIÓN

Durante el transcurso de mis prácticas tuteladas en el Hospital Ruber Internacional, tuve la excepcional oportunidad de entrevistar al Dr. Jiménez del Servicio de Neurología¹³. A continuación se acompañan algunas de las ideas recogidas.

El protocolo de diagnóstico de EA en la mayoría de hospitales españoles consiste en:

1. Test cognitivo
2. Análisis sanguíneo (de hormonas tiroideas y vitamina B12) para excluir otras posibles etiologías de la sintomatología
3. Técnicas de imagen (RMN o TAC). Estas técnicas miden tanto el encogimiento del hipotálamo y corteza, como el aumento de los ventrículos. Estas pruebas están asociadas a ↑FP y ↑FN

El resultado del diagnóstico de EA puede ser probable si, los resultados de las pruebas anteriores son positivos. En esta situación entre un 80% – 90% de los diagnosticados realmente padecen la enfermedad. De forma distinta se podría diagnosticar EA posible con un porcentaje todavía menor a los anteriores; o EA definitivo, que se hace por histología y postmortem. El seguimiento del paciente puede reforzar el diagnóstico o debilitarlo.

Esto en el ámbito clínico, que como principal ventaja cuenta con el consenso sobre el protocolo, al contrario que en investigación. Donde ganan más relevancia los biomarcadores es en ensayos clínicos. Existen dos tipos:

- De daño neuronal:
 - T-Tau y P-Tau.
 - FDG-PET donde se verá el hipometabolismo en la zona temporoparietal y el cíngulo-posterior
- Acumulo de A β :
 - Niveles elevados CSF para el cual cabe destacar su elevada labilidad, asociado a su alta lipofilia y como se mencionó anteriormente la necesidad de usar tubos de polipropileno²¹.
 - En su caso no podían usar PiB-PET debido a que el hospital no dispone de ciclotrón y la baja semivida del compuesto. Sin embargo, otro tipo de PET amiloide con florbetapir, florbetaben o flutemetamol. Para los cuales no tienen el mismo valor predictivo que PiB pero si un ↑VPN. Como se aprecia en la [Figura 4](#), la señal en la corteza es sustancialmente mayor en los positivos (derecha).

Por otra parte, parece que el futuro en la clínica va a en dirección de técnicas de imagen multimodal. En tanto que, como de por si es necesario someterse a algún tipo de ellas

para descartar posibles etiologías como tumores o hidrocefalias, aprovechar la prueba para incurrir un diagnóstico.

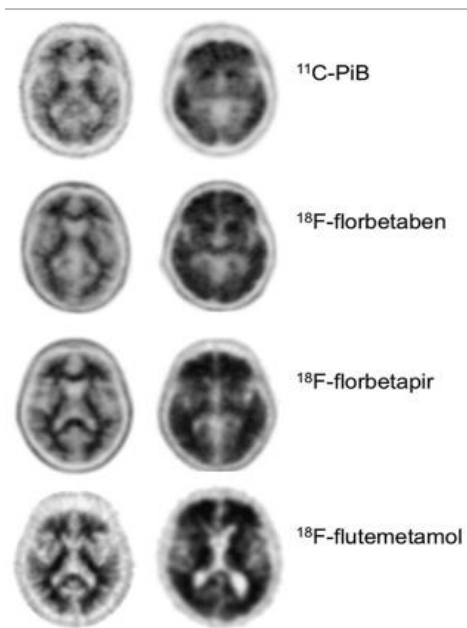


Figura 4. Tomada de Rowe, C et al., 2013⁴³. Imágenes con PiB, florbetaben, florbetapir, y flutemetamol para sujetos sanos (izquierda) y positivos (derecha). Los sanos dan señal en la materia blanca, los positivos que además lo presentan en la materia gris y corteza.

Cosa muy distinta sucederá con la investigación. En este campo parece estar más encaminado a encontrar biomarcadores sanguíneos. Aunque muchos trabajos sobre pulls de proteínas sanguíneas como el de *O'Bryant, S. E. et al., 2016*³⁹ se construyen en base a poblaciones tipo (sanos vs EA). Circunstancias muy distintas a las de una población heterogénea que pueda acudir al servicio de neurología (politoxicómanos, traumatismo, otras enfermedades) y que disminuyen los valores predictivos¹³. La ventaja de los biomarcadores de CSF y sanguíneos (especialmente frente a la imagen) radica en la precocidad y el menor coste.

Con respecto a los biomarcadores clásicos, se contempla primero el A β 42. A pesar de que la teoría que basa el comienzo de EA en la acumulación de A β está continuamente siendo cuestionada, la evidencia aportada por laboratorios y centros clínicos en todo el mundo apoyan la teoría de que el desequilibrio entre la producción y el aclaramiento de A β 42 es normalmente un factor iniciador de la EA. La confirmación de que la presenilina es el centro catalítico de la γ -secretasa aumenta la veracidad de la idea anterior. Todas las mutaciones

dominantes que producen un EA temprano ocurren, o bien en el sustrato (APP), o en la proteasa (presenilina) que genera A β . Duplicaciones del genotipo salvaje de APP en el Síndrome de Down conlleva depósitos de A β en la adolescencia, seguido de microgliosis, astrocitosis y ovillos neurofibrilares, típicos de EA. La Apolipoproteína E4, que predispone al EA en más de 40% de los casos, se ha visto que perjudica el aclaramiento de A β .

Además, los oligómeros solubles de A β 42 aislados del cerebro de pacientes con EA inyectados en roedores ha disminuido el número de sinapsis, aumentado la depresión sináptica a largo plazo y por último generado defectos en la memoria. Estos oligómeros humanos también inducen la hiperfosforilación de Tau y causan distrofia neuronal en neuronas cultivadas. Al cruzar APP humana con ratones transgénicos para la proteína Tau humana aumenta la neurotoxicidad tau positiva. En humanos se ha demostrado que bajos CSF A β y PET-amiloide positivo preceden en varios años otras manifestaciones de EA. Recientemente, ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales (solanezumab, crenezumab, y adcanumab) han sugerido un enlentecimiento de la pérdida cognitiva en análisis de EA moderada. Aunque muchos factores contribuyen a la patogénesis de EA la pérdida de la homeostasis de A β aparece como el objetivo terapéutico más extensamente validado⁴⁴. Se han observado niveles bajos de A β 42/A β 40 tempranamente, incluso antes que PIB en el PET¹⁵ Figura 5 y su capacidad para discernir entre los posibles estados del paciente es sustancialmente alta, sobre todo si es

combinado con otros biomarcadores. Consecuentemente, se ha establecido como un biomarcador crucial para el diagnóstico y seguimiento de EA.

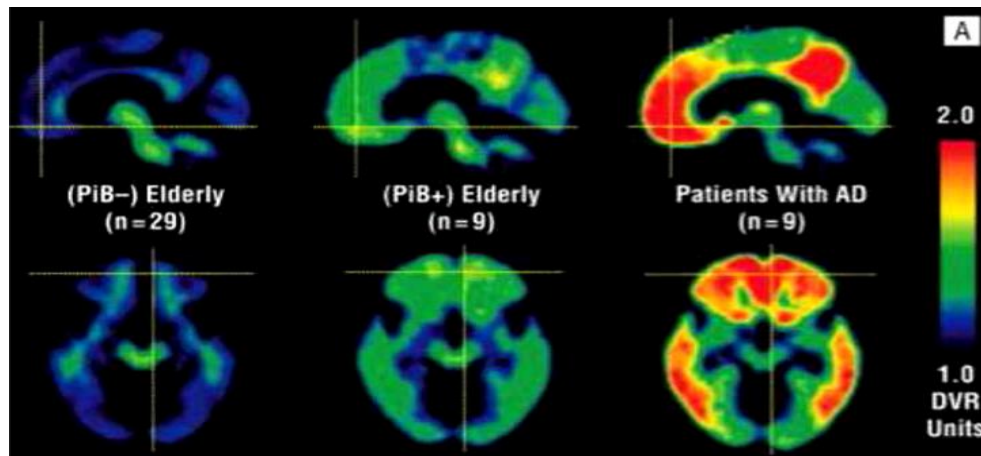


Figura 5: Niveles de A β , medidos por PiB-PET. Se observa una retención inespecífica a nivel de la materia blanca, en lóbulo temporal y frontal. Tomada de Aizenstein, H.J., et al, 2008⁴⁵.

Los biomarcadores de CSF clásicos han demostrado ser específicos y sensibles a la hora de reconocer la EA y los estadios pródromos y la estabilidad de MCI. Otros, como la Ng, están siendo estudiados, y en el caso de corroborarse los datos y la viabilidad de ser incorporado a los anteriores aumentaría la capacidad y anticipación diagnóstica. Es importante tener en cuenta que la punción lumbar está asociada a riesgos dificultando la toma de muestra y el seguimiento. Es por tanto necesario eludir el peligro. Una solución es la toma de muestras plasmáticas, las cuales permiten el seguimiento, a la vez que los posibles efectos no deseados son significativamente menores.

La proteína NFL en plasma es un biomarcador prometedor para enfermedades neurodegenerativas, incluida la EA. En un escenario de ensayo clínico, es posible que se pueda usar la NFL en plasma (junto con datos demográficos y datos de genotipo) para predecir la progresión longitudinal de la enfermedad. Futuros ensayos con muestras repetidas permitirán evaluar la NFL en plasma como una prueba eficaz no invasiva para el diagnóstico de la neurodegeneración³⁸. Los niveles de NFL son superiores en MCI que progresa rápidamente a EA⁴⁶. Si bien los estudios de *Zetterberg et al, 2016*⁴⁶ están realizados en CSF, existe correlación con las concentraciones plasmáticas³⁷. Esto podría ser relevante en el seguimiento de la progresión de la enfermedad y ya existen ensayos comerciales. Sin embargo, la NFL no permite distinguir entre enfermedades neurodegenerativas, es decir, no es específico para EA²⁰.

Otros estudios toman un pull de proteínas hiperexpresadas en EA que sumados a datos demográficos de riesgo permiten discriminar aquellos individuos sin riesgo de padecer EA (alto VPN). Esto posibilita separar al grupo de personas que deben someterse a pruebas más específicas.

Partiendo del esquema del trabajo de Lewczuk, P et al., 2018⁹, se propone ampliarlo para diagnosticar estadios anteriores a EA, procurando el máximo de cobertura y mínimo coste (Figura 6). Dicho estudio explica como en pacientes con >65 años podrían someterse a un análisis sanguíneo de varias proteínas relacionadas con la EA + características demográficas que predisponen a la enfermedad (como diabetes Mellitus II, sexo femenino, edad, nivel socio-cultural, etc.) que si bien no tiene gran capacidad diagnóstica, en dichas poblaciones tiene un valor predictivo negativo muy alto, lo que cribaría a la amplia mayoría de la población.

En el mismo trabajo y acto seguido serían sometidos los que dieran positivo a un examen de CSF. Sería adecuado incluir las técnicas de imagen, pues aunque parece que detectan las alteraciones más tarde que los marcadores de CSF y son más costosas, tienen menos riesgo que la punción lumbar. Por último, si el resultado fuese positivo deberían acudir al neurólogo especialista para recibir el diagnóstico. Y si diesen negativo lo más probable es que se deba a un error en el primer análisis sanguíneo debido a que si bien posee alto VPN no VPP. Aunque dependiendo de los biomarcadores que fuesen positivos también se debería sospechar de SNAP. Pues hay condiciones con sintomatología indistinguible de la EA como: PART (taupatía primaria asociada a la edad), patología de granos argirófilos o la enfermedad hipocampal asociada a la edad¹³.

Se consideró adecuado incluir a aquellas personas con riesgo de padecer EA < 65 (EA familiar) (parte superior). Bajo su voluntad y si presentan antecedentes familiares se deberían someter a análisis genéticos y en caso de ser positivo adherirse a un seguimiento. Una posible opción sería la monitorización con NFLp que posee especificidad suficiente para la neurodegeneración. Si bien ese es su principal problema, la incapacidad para discernir entre enfermedad neurodegenerativas, en pacientes con alto riesgo de EA un incremento en sus niveles estará altamente correlacionado con dicha enfermedad. Es de vital importancia remarcar que debe ser elección propia de la persona someterse al análisis genético, sin obligar a nadie a conocer el riesgo de padecer EA, que a día de hoy no tiene tratamiento eficaz¹³.

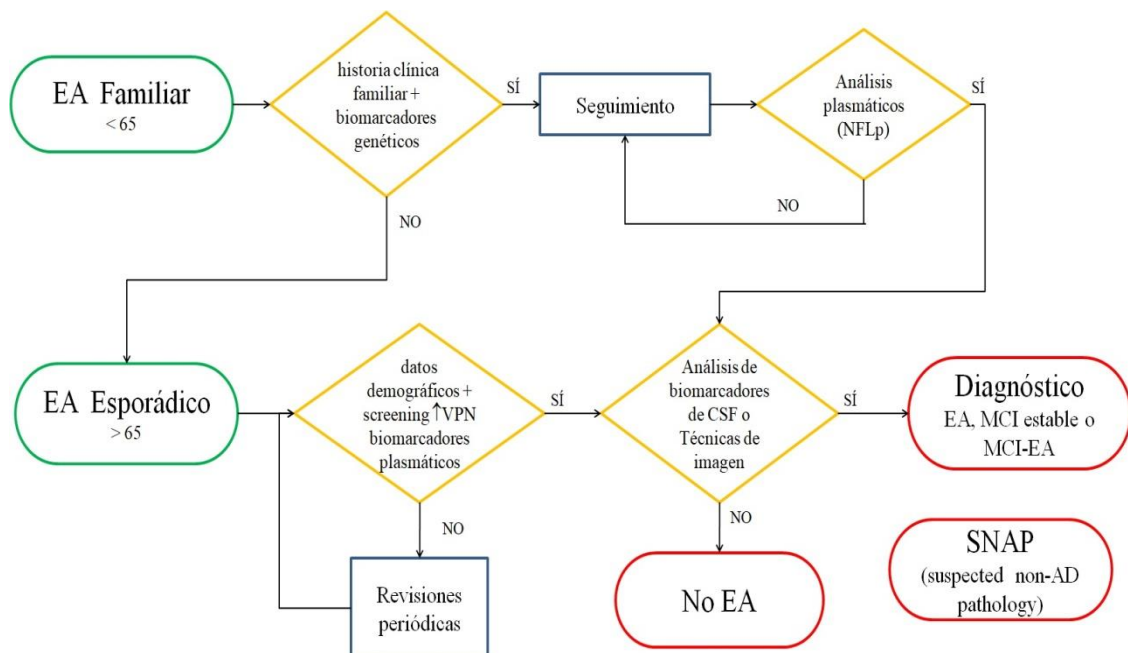


Figura 6. Esquema propuesto de máxima cobertura previo a sintomatología, tomando de partida el trabajo de Lewczuk, P et al., 2018⁹.

Si bien los biomarcadores plasmáticos parecen ser el futuro del diagnóstico de la EA, acarrear una serie de problemas como: la pérdida de fiabilidad al enfrentarse a poblaciones heterogéneas y la necesidad de someterse a otra prueba para la confirmación del resultado en el caso de los análisis multiprotéticos. Otro problema es la incapacidad para discernir entre otras enfermedades neurodegenerativas (en el caso NFLp). No obstante, como ya se mencionó, el seguimiento y toma de muestra es más sencillo.

6. CONCLUSIONES

El diagnóstico clínico en la EA temprano (prodrómico y preclínico) es altamente impreciso. Un diagnóstico temprano permitiría mejorar el tratamiento y reducir el progreso de la enfermedad, y con ello mejorar la calidad de vida de las personas con demencia, la de sus familiares y cuidadores. De manera que necesario continuar los esfuerzos en investigación en aquellos biomarcadores que muestren alteraciones con la mayor rapidez posible.

Por tanto, del análisis del estado de desarrollo actual de los biomarcadores para el diagnóstico de la EA, se concluye:

Los biomarcadores clásicos de CSF, si combinados, poseen una especificidad y sensibilidad suficiente para el diagnóstico en estadios prodrómicos. Estos valores podría aumentar si se miden a su vez uno o más biomarcadores de CSF candidatos. Sin embargo, la toma de muestra es el principal inconveniente, que imposibilita el seguimiento del paciente. En consecuencia, el futuro de desarrollo de estos biomarcadores parece ser limitado.

Por otra parte los biomarcadores plasmáticos solventan los riesgos asociados a la toma de muestra de los análisis de CSF. Aun así, los biomarcadores plasmáticos existentes no tienen sensibilidad ni especificidad suficiente como para lograr un diagnóstico definitivo y su fortaleza reside en formar parte de técnicas de cribado para diferenciar a la población enferma, los cuales necesitarían, a continuación, una prueba para determinar definitivamente la EA. Además dichas técnicas de cribado deberían mejorar sus valores predictivos para poblaciones heterogéneas para poder ser incorporados en los protocolos de diagnóstico de la EA.

Paralelamente a los descubrimientos de biomarcadores para EA temprano, el campo de la neuroimagen se ha desarrollado exponencialmente. Técnicas como MRI, PET utilizando trazadores como el Florbetapir (^{18}F), el compuesto B de Pittsburgh (PiB); y la fluorodeoxyglucosa (FDG). En su estado de desarrollo actual, el alto coste de estos procedimientos y la inconsistencia en la interpretación prohíbe su uso como screeners iniciales de la enfermedad, y puede que no estén listos para individuos en zonas económicamente desfavorecidas o en áreas remotas⁴⁷.

En el desarrollo futuro se distinguen dos líneas de investigación:

- A nivel clínico, se prevé mayor relevancia de las técnicas de imagen multimodal, que no solo diagnostiquen sino que discriminen cualquier otra posible etiología para la EA¹³. Además, nuevas técnicas están siendo desarrolladas con mayor rapidez diagnóstica como el caso de florbetapir, florbetaben y flutemetamol (aunque luego deberán someterse a otra prueba concluyente).
- A nivel de investigación, se estima un mayor desarrollo del campo de los biomarcadores plasmáticos:
 - Debido a tener una capacidad de diagnóstico previo a las técnicas de imagen.
 - Por minimizar los riesgos en la toma de muestra de los pacientes con respecto a CSF.
 - Y consecuencia de que los equipos de análisis necesitan una menor sensibilidad que para otro tipo de muestras como orina o saliva¹².

Un ejemplo es el análisis multiprotéico (seguidos de otra prueba definitiva para el diagnóstico).

El diagnóstico precoz y preciso permitirá conseguir los mejores resultados de los tratamientos existentes. Por otra parte, ayudará a evaluar los tratamientos en investigación en situaciones con máxima eficacia, por ejemplo, en el estudio de los anticuerpos monoclonales solanezumab, crenezumab, y adecanumab para A β o en la transfusión de albumina que aparecen como tratamientos prometedores.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud y Alzheimer's Disease International, Demencia: una prioridad de salud pública (2017).
2. Drew, L. (2018). An age-old story of dementia. *Nature* 559, 2-3.
3. Matthews, F., & Brayne, C. (2005). The incidence of dementia in England and Wales: findings from the five identical sites of the MRC CFA Study. *PLoS medicine*, 2(8), e193.
4. Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database home page (2011).
5. Brookmeyer, R., Gray, S., & Kawas, C. (1998). Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *American journal of public health*, 88(9), 1337-1342.
6. Ott, A., Breteler, M. M., Van Harskamp, F., Claus, J. J., Van Der Cammen, T. J., Grobbee, D. E., & Hofman, A. (1995). Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *Bmj*, 310(6985), 970-973.
7. Bellou, V., Belbasis, L., Tzoulaki, I., Middleton, L. T., Ioannidis, J. P., & Evangelou, E. (2017). Systematic evaluation of the associations between environmental risk factors and dementia: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Alzheimer's & Dementia*, 13(4), 406-418.
8. Carlsson, C. M. (2010). Type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia, and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(3), 711-722.
9. Lewczuk, P., Riederer, P., O'Bryant, S. E., Verbeek, M. M., Dubois, B., Visser, P. J., ... & Jack Jr, C. R. (2018). Cerebrospinal fluid and blood biomarkers for neurodegenerative dementias: an update of the Consensus of the Task Force on Biological Markers in Psychiatry of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry. *The world journal of biological psychiatry*, 19(4), 244-328.
10. Hansson, O., Zetterberg, H., Buchhave, P., Londos, E., Blennow, K., & Minthon, L. (2006). Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *The Lancet Neurology*, 5(3), 228-234.
11. Luthman, J. (2015). Biomarker to diagnosis, Evolution summit.
12. Humpel C., 2011. Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. *Trends in biotechnology*, 29(1), 26-32.
13. Servicio de neurología, Hospital Ruber Internacional. Dr. Jiménez.
14. Shaw, L. M., Vanderstichele, H., Knapik-Czajka, M., Clark, C. M., Aisen, P. S., Petersen, R. C., ... & Dean, R. (2009). Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Annals of neurology*, 65(4), 403-413.
15. 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*, 67(1), 122-131.
16. Wiltfang, J., Esselmann, H., Smirnov, A., Bibl, M., Cepek, L., Steinacker, P., ... & Neumann, M. (2003). β -amyloid peptides in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Annals of neurology*, 54(2), 263-267.
17. Olsson, B., Lautner, R., Andreasson, U., Öhrfelt, A., Portelius, E., Bjerke, M., ... & Wu, E. (2016). CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology*, 15(7), 673-684.
18. Cedazo-Minguez A., 2010. Biomarkers of Alzheimer's disease and other forms of dementia: clinical needs, limitations and future aspects. *Exp. Gerontol*, 45, 5-14
19. Galasko, D., Chang, L., Motter, R., Clark, C. M., Kaye, J., Knopman, D., ... & Miller, B. (1998). High cerebrospinal fluid tau and low amyloid β 42 levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. *Archives of neurology*, 55(7), 937-945.
20. Blennow, K. (2017). A review of fluid biomarkers for Alzheimer's disease: moving from CSF to blood. *Neurology and therapy*, 6(1), 15-24.
21. Lewczuk, P., Beck, G., Esselmann, H., Bruckmoser, R., Zimmermann, R., Fiszer, M., ... & Wiltfang, J. (2006). Effect of sample collection tubes on cerebrospinal fluid concentrations of tau proteins and amyloid β peptides. *Clinical Chemistry*, 52(2), 332-334.
22. Willemse, E., van Uffelen, K., Brix, B., Engelborghs, S., Vanderstichele, H., & Teunissen, C. (2017). How to handle adsorption of cerebrospinal fluid amyloid β (1-42) in laboratory practice? Identifying problematic handlings and resolving the issue by use of the A β 42/A β 40 ratio. *Alzheimer's & Dementia*, 13(8), 885-892.

23. Hansson, O., Zetterberg, H., Buchhave, P., Andreasson, U., Londos, E., Minthon, L., & Blennow, K. (2007). Prediction of Alzheimer's disease using the CSF A β 42/A β 40 ratio in patients with mild cognitive impairment. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 23(5), 316-320.
24. Lewczuk, P., Esselmann, H., Otto, M., Maler, J. M., Henkel, A. W., Henkel, M. K., ... & Kornhuber, J. (2004). Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF A β 42, A β 42/A β 40 ratio and total tau. *Neurobiology of aging*, 25(3), 273-281.
25. Sperling, R., Mormino, E., & Johnson, K., 2014. The evolution of preclinical Alzheimer's disease: implications for prevention trials. *Neuron*, 84(3), 608-622.
26. Samgard K, Zetterberg H, Blennow K, Hansson O, Minthon L, Londos E., 2010 Cerebrospinal fluid total tau as a marker of Alzheimer's disease intensity. *Int J Geriatr Psychiatry*, 25:403–10
27. Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., & Zetterberg, H. (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 6(3), 131.
28. Vos, S. J., Xiong, C., Visser, P. J., Jaseleec, M. S., Hassenstab, J., Grant, E. A., ... & Fagan, A. M. (2013). Preclinical Alzheimer's disease and its outcome: a longitudinal cohort study. *The Lancet Neurology*, 12(10), 957-965.
29. Hampel, H., Blennow, K., Shaw, L. M., Hoessler, Y. C., Zetterberg, H., & Trojanowski, J. Q., 2010. Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Experimental gerontology*, 45(1), 30-40.
30. Hansson, O., Zetterberg, H., Buchhave, P., Londos, E., Blennow, K., & Minthon, L., 2006. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *The Lancet Neurology*, 5(3), 228-234.
31. Lista, S., Toschi, N., Baldacci, F., Zetterberg, H., Blennow, K., Kilimann, I., ... & Lamari, F., 2017. Diagnostic accuracy of CSF neurofilament light chain protein in the biomarker-guided classification system for Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, 108, 355-360.
32. Kester, M. I., Teunissen, C. E., Crimmins, D. L., Herries, E. M., Ladenson, J. H., Scheltens, P., ... & Fagan, A. M. (2015). Neurogranin as a cerebrospinal fluid biomarker for synaptic loss in symptomatic Alzheimer disease. *JAMA neurology*, 72(11), 1275-1280.
33. Kvartsberg, H., Duits, F. H., Ingelsson, M., Andreasen, N., Öhrfelt, A., Andersson, K., ... & Andreasson, U. (2015). Cerebrospinal fluid levels of the synaptic protein neurogranin correlates with cognitive decline in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 11(10), 1180-1190.
34. Kester, M. I., Teunissen, C. E., Crimmins, D. L., Herries, E. M., Ladenson, J. H., Scheltens, P., ... & Fagan, A. M. (2015). Neurogranin as a cerebrospinal fluid biomarker for synaptic loss in symptomatic Alzheimer disease. *JAMA neurology*, 72(11), 1275-1280.
35. Zetterberg, H., Wilson, D., Andreasson, U., Minthon, L., Blennow, K., Randall, J., & Hansson, O. (2013). Plasma tau levels in Alzheimer's disease. *Alzheimer's research & therapy*, 5(2), 9.
36. Lövheim, H., Elgh, F., Johansson, A., Zetterberg, H., Blennow, K., Hallmans, G., & Eriksson, S., 2017. Plasma concentrations of free amyloid β cannot predict the development of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 13(7), 778-782
37. Bacioglu, M., Maia, L. F., Preische, O., Schelle, J., Apel, A., Kaeser, S. A., ... & Shimshek, D. R., 2016. Neurofilament light chain in blood and CSF as marker of disease progression in mouse models and in neurodegenerative diseases. *Neuron*, 91(1), 56-66.
38. Mattsson, N., Andreasson, U., Zetterberg, H., & Blennow, K. (2017). Association of plasma neurofilament light with neurodegeneration in patients with Alzheimer disease. *JAMA neurology*, 74(5), 557-566.
39. O'Bryant, S. E., Edwards, M., Johnson, L., Hall, J., Villarreal, A. E., Britton, G. B., ... & Graff-Radford, N. R. (2016). A blood screening test for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, 3, 83-90.
40. O'Bryant, S. E., Xiao, G., Zhang, F., Edwards, M., German, D. C., Yin, X., ... & Dickson, D. (2014). Validation of a serum screen for Alzheimer's disease across assay platforms, species, and tissues. *Journal of Alzheimer's Disease*, 42(4), 1325-1335.
41. Mulder, C., Verwey, N. A., van der Flier, W. M., Bouwman, F. H., Kok, A., van Elk, E. J., ... & Blankenstein, M. A. (2010). Amyloid- β (1–42), total tau, and phosphorylated tau as cerebrospinal fluid biomarkers for the diagnosis of Alzheimer disease. *Clinical chemistry*, 56(2), 248-253.
42. Bateman, R. J., Xiong, C., Benzinger, T. L., Fagan, A. M., Goate, A., Fox, N. C., ... & Holtzman, D. M. (2012). Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 367(9), 795-804.
43. Rowe, C. C., & Villemagne, V. L. (2013). Brain amyloid imaging. *Journal of nuclear medicine technology*, 41(1), 11-18.
44. Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO molecular medicine*, 8(6), 595-608.
45. Aizenstein, H. J., Nebes, R. D., Saxton, J. A., Price, J. C., Mathis, C. A., Tsopelas, N. D., ... & Bi, W. (2008). Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Archives of neurology*, 65(11), 1509-1517.
46. Zetterberg, H., Skillbäck, T., Mattsson, N., Trojanowski, J. Q., Portelius, E., Shaw, L. M., ... & Blennow, K. (2016). Association of cerebrospinal fluid neurofilament light concentration with Alzheimer disease progression. *JAMA neurology*, 73(1), 60-67.
47. DeMarshall, C. A., Nagele, E. P., Sarkar, A., Acharya, N. K., Godsey, G., Goldwaser, E. L., ... & Nagele, R. G. (2016). Detection of Alzheimer's disease at mild cognitive impairment and disease progression using autoantibodies as blood-based biomarkers. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, 3, 51-62.