

Biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer: definición, significación diagnóstica y utilidad clínica

M. Martín-Carrasco

Introducción. La investigación acerca del desarrollo de biomarcadores fiables en la enfermedad de Alzheimer (EA) se ha convertido en los últimos años en una de las áreas de mayor interés para los investigadores en esta patología, por la enorme repercusión que tendría su diagnóstico y terapéutica. En el presente trabajo se realiza una revisión y actualización de los estudios sobre el tema. **Desarrollo.** El diagnóstico clínico de la EA es inexacto en un 10-15% de los casos, incluso entre investigadores experimentados, y los biomarcadores pueden ayudar a mejorar la precisión del diagnóstico. Asimismo, podrían servir como indicadores indirectos de la acción de los posibles tratamientos modificadores de la evolución de la enfermedad, resolver las dudas que plantea la evaluación cognitiva empleada hasta ahora en los ensayos clínicos y permitir reducir considerablemente el tamaño de la muestra empleada y, por tanto, el coste de los estudios. Actualmente, se trabaja especialmente en marcadores de neuroimagen, de tipo funcional, como los estudios con tomografía por emisión de positrones, que utilizan ligandos específicos para la sustancia beta-amiloide. También se ha estudiado intensamente la presencia de anomalías bioquímicas en el plasma y el líquido cefalorraquídeo, y recientemente se han aplicado técnicas derivadas de la proteómica a partir de los avances en análisis espectroscópicos de masas. **Conclusiones.** Pese a los intensos trabajos, todavía no se ha obtenido un biomarcador de diagnóstico y/o de progresión de enfermedad aplicable fácilmente en el ámbito clínico, y los notables resultados conseguidos se ven limitados todavía al entorno de la investigación.

Palabras clave. Beta-amiloide. Biomarcadores. Enfermedad de Alzheimer. Isoprostanos. Tau. Tomografía por emisión de positrones.

Biomarkers in Alzheimer's disease: their definition, diagnostic significance and clinical usefulness

Introduction. *In recent years, research on the development of reliable biomarkers in Alzheimer's disease (AD) has become one of the main areas of interest for researchers in this pathology, owing to the massive repercussions its diagnosis and treatment would have. In this work we offer a review and updated survey of the studies on this topic. Development.* *The clinical diagnosis of AD is inaccurate in 10-15% of cases, even among experienced researchers, and biomarkers can help to improve the degree of accuracy in diagnosis. Likewise, they could also be used as indirect indicators of the action of possible treatments to modify the progression of the disease, settle the doubts posed by the cognitive assessment utilised up till now in clinical trials, and allow considerable reductions in the size of the sample used, which would in turn result in lower costs of the studies. Special attention is currently being given to functional-type neuroimaging markers, such as studies with positron emission tomography, which make use of specific ligands for beta-amyloid. A great deal of effort has also been spent on studying the presence of biochemical abnormalities in plasma and cerebrospinal fluid, and recent work has involved the application of techniques derived from proteomics based on advances made in mass spectroscopic analysis. Conclusions.* *Despite all this intense activity, researchers have still not obtained a biomarker for the diagnosis and/or progression of the disease that is easy to apply in the clinical setting and the notable results that have been achieved are, to date, restricted to the domain of the research laboratory.*

Key words. *Alzheimer's disease. Beta-amyloid. Biomarkers. Isoprostanos. Positron emission tomography. Tau.*

Clínica Padre Menni.
Pamplona, Navarra,
España.

Correspondencia

Dr. Manuel Martín Carrasco.
Clínica Padre Menni.
Joaquín Beunza, 45.
E-31014 Pamplona
(Navarra).

E-mail

manuelmartin@intersep.org

Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más frecuente de demencia en el anciano y afecta al 20% de las personas de edad superior a 80 años. Se trata de un trastorno degenerativo, de carácter progresivo y, hasta ahora, incurable, que condiciona un deterioro cognitivo y funcional grave de la persona afectada. La repercusión sobre los cuidadores también es muy alta, y da lugar a la sobrecarga de éstos. Los cambios sociodemográficos de las últimas décadas, con un aumento de la tasa de población anciana muy notable, han dado lugar a un crecimiento importantísimo del número total y relativo de personas mayores que convierten a la EA en un problema social y sanitario de primera magnitud [1].

La introducción de los primeros tratamientos efectivos para la EA, los inhibidores de la acetilcolinesterasa, supuso un gran impulso para la investigación de marcadores diagnósticos para la enfermedad. Estos compuestos pueden ser más eficaces en las fases tempranas de la enfermedad, antes de que los cambios neurodegenerativos sean demasiado intensos y se hayan diseminado por el córtex. La popularización de la enfermedad y la conciencia de que existen terapias eficaces han contribuido a que los afectados busquen ayuda médica en fases cada vez más precoces de la enfermedad, cuando el cuadro clínico de demencia apenas se ha configurado con nitidez.

El proceso degenerativo de la EA se inicia probablemente 20 ó 30 años antes del inicio de la sintomatología. Después de la fase preclínica, el primer síntoma consiste por lo general en una afectación de la memoria episódica. Esta primera fase clínica de la enfermedad sin demencia se conoce habitualmente como la fase de deterioro cognitivo leve (DCL) de la EA. En la última década se han realizado grandes esfuerzos para identificar signos clínicos, neuropatológicos, bioquímicos y genéticos que permitieran establecer el diagnóstico de la EA en la fase de deterioro cognitivo leve o incluso en la etapa preclínica. Sin embargo, en la actualidad no existe un método clínico que permita el diagnóstico de la enfermedad en una fase previa a la demencia y que determine qué casos evolucionarán hacia la presentación de un síndrome demencial [2]. De hecho, de acuerdo a los criterios de diagnóstico actualmente en vigor, no puede realizarse un diagnóstico de EA hasta que la demencia esté

presente. Esta paradoja pone de relieve la importancia que tendría el descubrimiento de un marcador biológico que permita diagnosticar la enfermedad de forma precoz, con la selección correcta de los candidatos que deben recibir tratamiento, monitorizar su evolución y comprobar la eficacia de los tratamientos disponibles.

En el presente artículo revisaremos los datos disponibles acerca de las modalidades de biomarcadores diferentes para la EA que se han propuesto en los últimos años, especialmente en los datos relevantes de cara al diagnóstico de la enfermedad.

Concepto de biomarcador

En medicina, se conoce como biomarcador a una característica somática específica o un cambio biológico medible relacionado con un estado de salud o enfermedad, con una enfermedad o con un conjunto de ellas. En realidad, si empleamos la clásica distinción médica entre signos y síntomas, podríamos decir que un biomarcador es un signo susceptible de ser medido y cuantificado. En 1999, el National Institute of Health (NIH) estadounidense organizó una conferencia con el propósito de delimitar las características que debía reunir un biomarcador para ser definido como tal. Los criterios surgidos de dicha reunión están aceptados de forma generalizada por la comunidad científica [3]. Se entiende por biomarcador, de acuerdo con estos criterios, a 'una característica que es medida y evaluada de forma objetiva como un indicador de procesos biológicos normales o patológicos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica'. Por lo tanto, un biomarcador puede emplearse para diagnosticar una enfermedad, para establecer su gravedad (estadiaje), para seguir su progresión o para monitorizar la respuesta a las medidas terapéuticas. Asimismo, se entiende por 'criterio de valoración' (*endpoint*) a la variable predefinida que permite cuantificar el efecto de una intervención. Un criterio de valoración clínico (CVAC) sería una característica o variable que refleja la vivencia del paciente, su funcionamiento o su supervivencia. Un criterio de valoración clínico indirecto (*surrogate endpoint*) es un subtipo de biomarcador que sustituye –con mayor o menor acierto– a un criterio de valoración

clínico, y permite predecir un beneficio clínico –un daño o la falta de daño o de beneficio– sobre la base de datos científicos de carácter epidemiológico, terapéutico, fisiopatológico o de otro tipo. En los últimos años, los biomarcadores han sido adoptados progresivamente como criterios de valoración indirectos en procesos clínicos como el diagnóstico o la evaluación de la eficacia de una intervención terapéutica (p. ej., ensayos clínicos). Un ejemplo de ello es la cuantificación de células CD4 y de carga vírica en los casos de VIH/sida.

Biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer

En las últimas décadas se ha realizado un gran esfuerzo en la búsqueda de un biomarcador de la EA que pudiese ser considerado un criterio indirecto de valoración clínica (CIVAC), de manera que se han propuesto como tales un buen número de determinaciones bioquímicas en líquido cefalorraquídeo (LCR), plasma y orina. También se han propuesto exploraciones realizadas con técnicas de neuroimagen o marcadores genéticos [4]. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora, aunque prometedores, no han conseguido alcanzar un reconocimiento generalizado entre la comunidad científica [5]. En realidad, no resulta fácil encontrar un biomarcador que funcione bien como un CIVAC en la EA, tanto desde el punto de vista práctico como estadístico. Unos problemas mayores derivan del hecho de que la misma definición de los criterios de valoración clínicos resulta complicada en el caso de la EA, tanto en la evaluación como en la cuantificación. Los criterios de referencia de los CVAC en los ensayos clínicos en la EA –es decir, las escalas cognitivas, funcionales y de síntomas neuropsiquiátricos–, son incapaces de distinguir entre intervenciones que producen un alivio sintomático de aquellas que realmente modifican el curso de la enfermedad, y los métodos que se emplean para paliar estas carencias –como el cese y la reintroducción de la intervención aleatorizados– ofrecen en el mejor de los casos sólo pruebas indirectas. Otra gran fuente de problemas deriva del hecho de que el diagnóstico de la EA sea fundamentalmente clínico y sólo pueda realizarse, de acuerdo con los criterios aceptados más comúnmente, cuando el síndrome demen-

cial ya se manifiesta con claridad. Lógicamente, este hecho limita la posibilidad de introducir medidas terapéuticas destinadas a disminuir la progresión de la enfermedad y controla los procesos patológicos de base. En otras palabras, carecemos de CVAC y CIVAC adecuados tanto en la fase clínica inicial de la EA –también llamada fase de DCL– como en la fase preclínica, lo que hace que los estudios clínicos en estas fases resulten muy complicados. Por esta razón, la única alternativa en estos estudios consiste en reclutar muestras muy grandes, lo que da lugar a la inclusión de numerosos casos de falso positivo y continuar el estudio durante el tiempo suficiente para que se produzcan cambios clínicos significativos. Al prolongar la duración del estudio, también es necesario aumentar la muestra inicial, debido a la alta tasa de abandonos que se produce en muestras envejecidas. Por todo ello, los estudios resultan enormemente caros y con altas posibilidades de ofrecer resultados de interpretación dudosa, lo que a su vez retrae a los promotores. La existencia de estas dificultades motivó que el NIH realizara dos conferencias de consenso [6,7] y elaborara los siguientes requisitos que debería cumplir un biomarcador ideal para la enfermedad de Alzheimer:

- Estar relacionado con un rasgo fundamental de la fisiopatología.
- Estar validado en casos confirmados por el estudio neuropatológico.
- Tener una sensibilidad superior al 85% para detectar EA y una especificidad de más del 75% para distinguir la EA de otras causas de demencia, establecidas preferentemente mediante dos estudios independientes con muestras adecuadas.
- Ser preciso, fiable y barato.
- De utilización cómoda y no lesiva para el paciente.
- Ser capaz de apreciar la progresión de la enfermedad y la eficacia de las intervenciones terapéuticas.

Por lo tanto, la utilidad de los biomarcadores en la EA puede establecerse a varios niveles. Los biomarcadores de riesgo (rasgo) permitirían identificar a las poblaciones de riesgo, así ayudarán a la puesta en práctica de medidas preventivas de tipo primario o secundario. Los biomarcadores de diagnóstico (estado), tanto para el diag-

Tabla. Algunos biomarcadores propuestos para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Categoría	Marcadores	Referencias
Plasma	C1q, IL-6RC, homocisteína, niveles de apolipoproteína E, isoprostanos, α_1 -antiquimotripsina, 3-nitrotirosina	[5,63,80]
Neuroimagen	Tomografía computarizada, resonancia magnética, tomografía computarizada por emisión de fotón único, tomografía por emisión de positrones, resonancia magnética funcional, tomografía por emisión de positrones + ligandos	[10,26,81-83]
Líquido cefalorraquídeo	A β 40, A β 42, tau total, fosfo-tau	[49,84-86]
Orina	Isoprostanos, proteína de cadena neural	[5,63,72,74,75,78-80]

nóstico diferencial como el diagnóstico precoz serían de gran utilidad a la hora de confirmar la presencia de la enfermedad y de seleccionar mejor a los sujetos susceptibles de algún tipo de intervención terapéutica. También lo serían los biomarcadores de progresión, que permitieran predecir qué sujetos van a pasar de una fase de DCL a otra o que van a evolucionar de una forma más agresiva. Finalmente, los biomarcadores más necesarios en el momento actual son aquellos que permiten monitorizar los resultados de las intervenciones terapéuticas y distinguir entre intervenciones sintomáticas y modificadoras del curso de la enfermedad; por ejemplo, poseer este tipo de biomarcador permitiría solventar polémicas como las introducidas por el National Institute for Clinical Excellence (NICE) británico a la hora de valorar la efectividad de los inhibidores de la colinesterasa.

Tipos de biomarcadores

En los últimos 5 ó 10 años han aparecido en la literatura científica una lista de sustancias larga y técnicas propuestas como potenciales biomarcadores en la EA, desde pruebas de sensibilidad ocular a marcadores genéticos, pasando por distintas determinaciones en LCR, plasma u orina, hasta una multitud de parámetros de neuroimagen. Entre tanta abundancia, hay que recordar que se han

producido fiascos muy notables que han generado un cierto cansancio o escepticismo en esta área de estudio. A continuación realizaremos una revisión no exhaustiva de las técnicas y sustancias con mayor grado de aval científico para su utilización como biomarcadores en la EA (Tabla).

Biomarcadores genéticos

A medida que ha progresado el conocimiento de la fisiopatología de la EA, se han descubierto una serie de proteínas y genes directamente implicados que han sido valorados como posibles biomarcadores. La mayoría de éstos son marcadores de rasgo, en la medida que incrementan el riesgo de presentar EA, pero no de estado, puesto que hay sujetos que presentan el biomarcador pero que no desarrollan la enfermedad. Los marcadores genéticos más exactos corresponden a las mutaciones en tres genes que causan EA familiar de inicio precoz: *PS1* en el cromosoma 14, *PS2* en el cromosoma 1 y *PPA* en el cromosoma 21. Sin embargo, tan sólo unos cientos de familias en todo el mundo presentan esta forma de la enfermedad, por lo que su determinación sistemática carece de sentido. En cambio, existen varios genes que actúan como factores de riesgo para presentar EA. El más estudiado de ellos es el alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (APOE). Su presencia aumenta claramente el riesgo de desarrollar EA y la probabilidad de conversión de DCL a EA [8]. Los marcadores de rasgo como la APOE pueden ser

de utilidad en ensayos clínicos, en el momento de reclutar muestras con una mayor probabilidad de desarrollar EA. También pueden emplearse para incrementar la especificidad del diagnóstico, pero a expensas de la sensibilidad. Ningún otro marcador genético de riesgo ha mostrado la validez de APOE, pero se estima que existen otras 5-7 variantes genéticas asociadas con la EA de inicio tardío. Es posible que en un futuro próximo estas variantes puedan ser identificadas de manera fiable y constituir, de forma aislada o conjuntamente, un biomarcador de riesgo.

Neuroimagen

Las técnicas de neuroimagen han sido aplicadas al diagnóstico de la EA durante décadas, con un grado de exactitud y precisión cada vez mayores. Las guías de práctica clínica más recientes y autorizadas [9] recomiendan el uso habitual de la neuroimagen estructural en el diagnóstico de la EA. Sin embargo, el cumplimiento de los requisitos exigidos para ser considerados biomarcadores es todavía parcial, pese a los prometedores resultados obtenidos recientemente combinando técnicas de tomografía por emisión de positrones (PET) con ligandos específicos para las proteínas β -amiloide o tau [10]. En general, se considera que la neuroimagen estructural por resonancia magnética (RM) o tomografía computarizada (TC) basada en parámetros de afectación cerebral global –es decir, mediciones del grado de atrofia según el grosor del córtex y el tamaño de los ventrículos– no cumple los criterios de especificidad necesarios, a pesar de la introducción de sistemas automatizados de medición, como el denominado *Brain Boundary Shift Integral* (BBSI) [11]. Aunque estos sistemas pueden mejorar el rendimiento de estos parámetros globales, en general se consideran más útiles las mediciones de estructuras regionales, especialmente del hipocampo [12]. También se han desarrollado protocolos fiables para detectar atrofia del córtex entorrinal, cuerpo calloso y otras áreas implicadas precozmente en la EA. Las mediciones volumétricas hipocámpicas obtenidas con RM se correlacionan fuertemente con el volumen histológico del hipocampo, con la pérdida neuronal, con la fase clínica de la EA y con el deterioro de memoria [13]. Por otra parte, la presencia de atrofia en el hipocampo puede ser de ayuda a la hora de predecir qué sujetos con DCL presentarán

EA [14]. La RM también ha permitido descubrir modelos de atrofia diferentes en sujetos con EA, demencia frontotemporal o demencia con cuerpos de Lewy [15,16]. Valorar si los hallazgos obtenidos son reproducibles por diferentes grupos de trabajo es un aspecto importante para cualquier tipo de biomarcador. En el caso de la medición volumétrica del hipocampo con RM, se han publicado los resultados de un estudio de 52 semanas con milamelina –un agonista muscarínico– realizado en 32 centros de investigación [17]. Los sujetos fueron explorados al inicio y al final del estudio, y se obtuvieron volúmenes del hipocampo y asta temporal. Según estos resultados, el tamaño de la muestra de un ensayo clínico para detectar un 50% de reducción en la progresión de la EA precisaría de 320 sujetos por rama en función del cambio esperado en la escala ADAS-Cog, comparados con los 54 requeridos si se utilizara el volumen del asta temporal y los 21 necesarios si se empleara el volumen del hipocampo. Sin embargo, un problema general de la neuroimagen estructural con las técnicas actuales es que la pérdida neuronal necesaria para ser apreciable es todavía demasiado grande, lo que supone una limitación importante para el diagnóstico precoz. Asimismo, debemos tener en cuenta que los descubrimientos realizados en estudios observacionales no siempre son aplicables directamente a los estudios clínicos. Por ejemplo, en un estudio de inmunización activa con A β 1-42 (AN1792) se apreció una disminución aparente del volumen cerebral global en los sujetos con respuesta activa en el nivel de anticuerpos, que además mejoraron en algunas pruebas cognitivas [18].

La neuroimagen funcional ofrece perspectivas más interesantes. Los estudios con RM funcional (RMf) han encontrado anomalías en la activación cerebral, tales como disminución de la activación en la corteza entorrinal, giro supramarginal, regiones prefrontales, lóbulo temporal anteroinferior y medial, y áreas hipocámpicas, y un aumento de la activación en la corteza parietal medial y cingulada posterior [19]. Sin embargo, los hallazgos en pacientes con deterioro cognitivo leve han sido menos consistentes, con resultados opuestos en cuanto a la activación del lóbulo temporal medial y del hipocampo, disminuida en unos trabajos y aumentada en otros. Esta disparidad puede deberse a diferencias en las muestras clínicas de estudio, dada la fragilidad concep-

tual del DCL, o bien en las tareas experimentales propuestas a los sujetos. También se ha sugerido que la activación aumentada que se encuentra en pacientes en fase de DCL puede deberse a mecanismos compensatorios de hiperactividad en los sistemas neuronales preservados, que ya no es posible en fases más avanzadas de la EA [20]. Los estudios con RM que emplean la técnica denominada *arterial spin-labelling perfusion* (ASL) han mostrado una disminución en la perfusión sanguínea en la corteza frontal, temporoparietal y cingulada posterior, tanto en pacientes con demencia establecida como en fase de DCL, con patrones diferentes en la EA y en la demencia frontotemporal. Dado que esta técnica permite realizar simultáneamente una RM estructural y está exenta del empleo de isótopos o de radiación ionizante, parece muy prometedora para su utilización clínica [21].

La tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) es una técnica utilizada ampliamente. Desde la década de 1980, numerosos estudios han mostrado una disminución de la perfusión cerebral en la corteza temporoparietal en la EA. Asimismo, esta técnica ha permitido diferenciar entre casos de DCL que evolucionaron a demencia de los que no lo hicieron, al detectar en el primer caso incrementos en la perfusión en cerebelo y lóbulo frontal, y disminución en lóbulo parietal, cingulado posterior y *precuneus*. Un estudio importante, realizado en 70 casos de pacientes con EA confirmados anatomopatológicamente y 14 controles, encontró que el SPECT mejoraba la calidad del diagnóstico clínico [22]. Asimismo, se ha podido demostrar que los cambios apreciados con el SPECT se correlacionan bien con el estadiaje de Braak realizado tras la autopsia [23].

No obstante, la resolución del SPECT es notablemente inferior a la de la PET, lo que ha primado la realización de trabajos con esta última técnica. Los estudios con PET-FDG (¹⁸F-fluorodesoxiglucosa) en la EA muestran un déficit en el metabolismo de la glucosa en las áreas de asociación neocorticales (p. ej., cingulado posterior, corteza parietal, temporal y prefrontal), mientras otras estructuras como los ganglios basales, el tálamo, el cerebelo y el córtex primario sensorial y motor se encuentran preservados hasta fases muy avanzadas. Por lo tanto, el déficit metabólico se aprecia de forma característica en la corteza temporal y parietal, y su intensidad se correlaciona con la gravedad del deterioro cognitivo y con su

progresión [24]. En un estudio retrospectivo sobre pacientes con EA leve a moderada [25], el patrón de hipometabolismo medido con PET-FDG obtuvo una sensibilidad del 94% y una especificidad del 73% en el momento de predecir la evolución clínica y el diagnóstico histopatológico de EA, de manera que un PET negativo predecía que en los tres años siguientes era improbable que se produjera una evolución clínica o histopatológica a EA. En distintos estudios, en sujetos con DCL o en familiares de pacientes con EA, la reducción de metabolismo de la glucosa medida con PET es útil cuando hay que distinguir entre sujetos que evolucionan a EA de los que no lo hacen, aunque con cierto solapamiento entre los grupos, capacidad que se ve potenciada cuando se combinan los estudios de PET con la determinación del riesgo genético de los sujetos de estudio (p. ej., APOE ε4) [26,27]. De acuerdo con la tasa de disminución del metabolismo de la glucosa en sujetos con EA, los investigadores han determinado el poder estadístico de la técnica de PET-FDG para distinguir una intervención terapéutica modificadora de la enfermedad, con la obtención de cifras similares a las encontradas con determinaciones volumétricas con RM: se precisaría aproximadamente la décima parte de los casos necesarios que si se emplearan criterios neuropsicológicos o clínicos, lo que parece muy prometedor para su empleo en estudios clínicos [28].

Más recientemente, se han llevado a cabo estudios con PET empleando radioligandos que se acoplan directamente a las placas de β-amiloide, a la proteína tau o a ambos, que permiten la visualización de estas proteínas anómalas *in vivo* o bien detectan la activación de la microglía. Una de estas sustancias, denominada *Pittsburgh Compound-B* (PIB), un derivado de la tioflavina, parece ser altamente selectiva para las placas de β-amiloide a las concentraciones empleadas en los estudios de neuroimagen, de manera que los sujetos con EA presentan una retención de PIB entre el 60-90% superior a los controles. Por otra parte, el depósito de PIB se correlaciona bien con los niveles totales de Aβ y presenta una buena fiabilidad test/retest (variabilidad menor del 10%) [29]. Además, los estudios también han demostrado la presencia de captación de PIB en un cierto número de controles no demenciados [30,31], lo que confirma los hallazgos previos de presencia de patología de tipo Alzheimer en sujetos sin afectación cognitiva. Es probable que se trate de casos de EA en fase

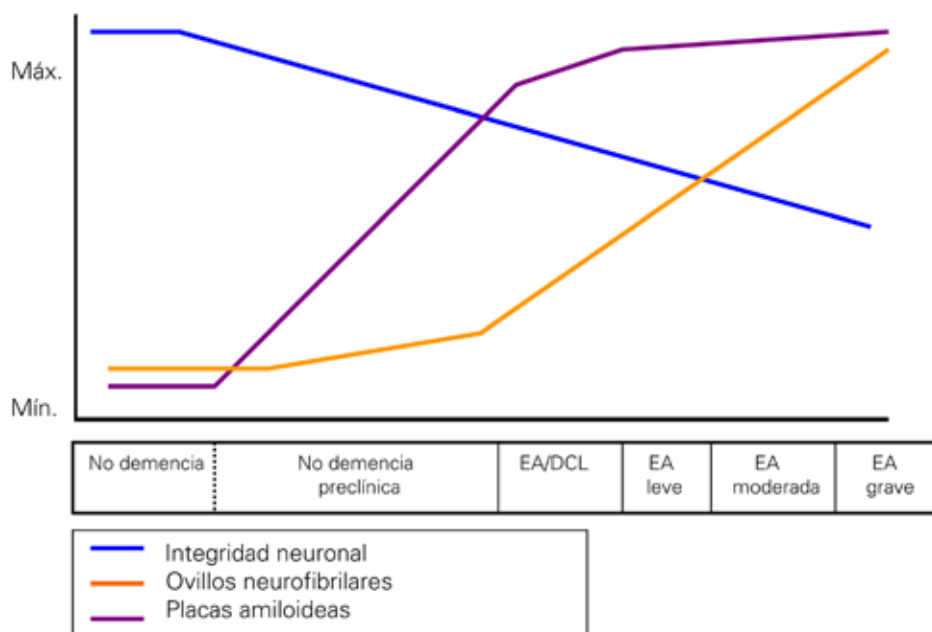


Figura. Fases clínicas y cambios histopatológicos en la enfermedad de Alzheimer.

preclínica, pero son necesarios estudios longitudinales para confirmar esta hipótesis. También resulta de gran interés el resultado de que no se produce captación de PIB en la demencia frontotemporal [32]. En conjunto, los últimos resultados sitúan a esta técnica como un buen biomarcador de diagnóstico, pero su utilidad para reflejar la progresión de la enfermedad y, por tanto, ser empleado como un CIVAC es cuestionable según el resultado de los estudios longitudinales, dado que la deposición de A β parece alcanzar una fase de meseta años antes de la fase clínica final de la enfermedad (Figura) [30,33-35].

Además del PIB, existen otros ligandos prometedores. Uno de ellos es el FDDNP o 2-(1-{6-[(2-[F-18] fluoroetil)(metil)amino]-2-naftil]etilideno) malononitrilo, con propiedades de unión tanto a placas como a ovillos neurofibrilares, por lo que podría tener un papel como biomarcador de diagnóstico tanto en la EA como en otras tauopatías, así como a la hora de predecir la evolución de pacientes con DCL a EA [36,37]. Además, se han desarrollado varios agentes estructuralmente similares al PIB. Uno de ellos es el denominado 18F-BAY94-9172, un derivado estilbeno que

parece poseer propiedades similares al PIB, pero con una vida media seis veces superior, lo que facilitarí su utilización clínica [38]. Otro derivado estilbeno, 11CSB-13, ha mostrado un rendimiento similar al PIB en un estudio preliminar con un número reducido de casos [39]. Por último, 11C-BF-227 es un derivado benzoxazol que se une al amiloide cerebral, pero con un patrón diferente al PIB, por razones aún no explicadas [40]. También se han realizado estudios sobre marcadores de tipo inflamatorio, que indican una activación de la microglía. Aunque este tipo de ligandos no son específicos de la EA, el patrón de activación sí puede serlo, lo que abre la puerta para su utilización en esta patología [41].

Sin embargo, los problemas más importantes para el uso de las técnicas de neuroimagen funcional como biomarcadores en la EA derivan de su coste elevado y de la tecnología sofisticada que las soporta, lo que reduce su aplicación práctica al terreno de la investigación. De ahí que una importante línea de investigación sobre biomarcadores en la EA se haya centrado en determinaciones bioquímicas, mucho más accesibles para la utilización clínica.

Marcadores bioquímicos

Los marcadores basados en determinaciones bioquímicas pueden llevarse a cabo en diferentes compartimentos, especialmente en LCR, plasma y orina. La facilidad de obtención y de procesamiento hace que este tipo de biomarcadores tenga más posibilidades de convertirse en el marcador estándar en la EA, aunque precisamente por el mismo motivo requieren un trabajo adicional importante en cuanto a la protocolización de los procedimientos de extracción y análisis.

Líquido cefalorraquídeo

El LCR está en contacto directo con el espacio extracelular cerebral, por lo que puede suponerse que los procesos fisiopatológicos básicos que ocurren en la EA deben dejar su huella en éste. La obtención de LCR mediante punción lumbar ha sido un procedimiento clásico en el ámbito de la neurología, aunque la introducción de otras técnicas menos invasivas lo ha relegado a ámbitos más específicos, típicamente los orientados hacia la investigación. En general se tolera bien, salvo por la producción de cefaleas en más del 5% de los casos [42]. La búsqueda de biomarcadores de la EA en el LCR tiene una larga tradición, y el número de sustancias propuestas ha sido muy alto y sigue creciendo. A continuación resumiremos los hallazgos mejor establecidos, basándonos especialmente en los últimos trabajos de revisión realizados [19,43-46].

Niveles de proteína β -amiloide. Diversos estudios han mostrado de forma consistente que los niveles de A β 42 están disminuidos en la EA un 50% con relación a los niveles de la población control, mientras que los niveles de A β 40 y A β total no difieren de los de los controles [47]. La sensibilidad de la medida varía entre el 55-100% (media: 86%), mientras que la especificidad para distinguir los pacientes con EA de los controles oscila entre el 67-100% (media: 89%). Sin embargo, la prueba no es muy útil en el diagnóstico diferencial del tipo de demencia, ya que encontramos también niveles disminuidos en otras formas de demencia (p. ej., demencia vascular, demencia frontotemporal, etc.) [48]. Algunos trabajos han valorado el rendimiento de la determinación de A β 42 en el momento de distinguir los sujetos con DCL que van a evolucionar a demencia, y los resultados han sido positivos, de manera que

la presencia de niveles bajos caracteriza a los casos que desarrollan demencia [49]; así, la prueba reúne características para ser un biomarcador de diagnóstico útil. Sin embargo, y a pesar de que los niveles muestran cierta correlación con la gravedad de la enfermedad, tienden a permanecer estables al menos durante períodos de varios meses, por lo que su utilidad como biomarcador de progresión o de respuesta a las intervenciones terapéuticas es más dudosa [50].

Tau total y fosfo-tau. Si se tiene en cuenta el papel que tiene la proteína tau en los ovillos neurofibrilares, es lógico que se haya estudiado el potencial de la determinación de los niveles de tau en el LCR como biomarcador en la EA. En estudios transversales se han demostrado incrementos de tau en pacientes con EA que duplican o triplican el valor encontrado en controles sanos [47]. La prueba alcanzaba unos niveles de especificidad entre el 65-86% y una sensibilidad entre el 40-86%. En pacientes en fases incipientes de demencia el rendimiento de la prueba es incluso mejor, con una especificidad del 85% y una sensibilidad del 75% al distinguir los sujetos con EA de controles sanos. En cambio, la capacidad de la determinación de tau para distinguir la EA de otras formas de demencia es baja, dado que los niveles de tau también están elevados en otras demencias [51]. La determinación de tau puede ser de utilidad cuando se discriminan los sujetos con DCL que desarrollarán una EA, aunque una vez establecida la enfermedad los niveles permanecerán relativamente estables, y en estudios longitudinales se han encontrado correlaciones poco marcadas con los cambios en el rendimiento cognitivo [52]. Dado que la proteína tau puede estar fosforilada a distintos niveles, se ha estudiado si existen diferencias entre el comportamiento como biomarcador de los niveles de tau total y de las formas de tau fosforilada [53]. Los estudios revelan que los niveles de estas formas fosforiladas son más específicos para la EA, y en concreto la determinación de fosfo-tau treonina 231 distinguía entre pacientes con EA y otras enfermedades neurológicas con una sensibilidad del 85% y una especificidad del 97% [54]. En conjunto existen evidencias de que la determinación de tau total y de epítomos de tau fosforilado pueden constituir biomarcadores de diagnóstico de la EA y para predecir el cambio de DCL a EA, aunque su papel para el diagnósti-

co diferencial entre diversas formas de demencia y para monitorizar el curso de la enfermedad sea todavía objeto de estudio.

Combinaciones de A β 42 y fosfo-tau. Algunos autores han trabajado con la hipótesis de que combinando las determinaciones de A β 42 y tau en el LCR mejoraría el poder predictivo de ambas pruebas. En la mayoría de los estudios la sensibilidad y la especificidad de la combinación de los dos biomarcadores han sido ligeramente superiores (89 y 90%) que las encontradas para tau total (81 y 91%) y A β 42 (86 y 89%) por separado a la hora de diferenciar sujetos con EA de controles sanos. En cambio, la diferenciación entre EA y otras demencias no ha funcionado tan bien [48].

Por el contrario, un estudio reciente que compara pacientes con EA de inicio temprano, controles normales y pacientes con demencia frontotemporal con respecto a los niveles de A β 42, tau total y fosfo-tau 181, encontró que la combinación de A β 42 y fosfo-tau 181 distinguía entre las dos formas de demencia con una sensibilidad del 72% y una especificidad del 93% [55]. En otro estudio, la combinación de tau total y fosfo-tau 396/404 mostró una sensibilidad del 96% y una especificidad del 100% a la hora de discriminar entre EA y demencia vascular. Por lo tanto, una prometedora línea de investigación se encuentra abierta en este campo, aunque hasta ahora los resultados hablan más a favor de marcadores de diagnóstico que de progresión.

Otras sustancias. Se ha estudiado un gran número de otras sustancias en el LCR como posibles marcadores de la EA, que incluyen marcadores de glucosidación, estrés oxidativo, inflamación y metabolismo fosfolipídico [5]. Algunas de estas sustancias prometedoras son las citocinas (p. ej., IL1, SB100), la ubiquitina y la neuromodulina [47]. En general se trata de propuestas interesantes, pero a las que resta un gran esfuerzo para cumplir los criterios de biomarcador en la EA. Quizá las sustancias sobre las que existe más interés sean los isoprostanos F2, un grupo de sustancias que resulta de la peroxidación en el ámbito cerebral y que se encuentra elevado en el cerebro y el LCR de pacientes con EA [56]. En concreto, se ha encontrado en estudios transversales que las concentraciones de una de estas sustancias, denominada IPF2A, están elevadas en el LCR de pacientes con EA y se correlacionan directamen-

te con las concentraciones de tau total e inversamente con los de A β 42. En pacientes con DCL aparecen concentraciones intermedias de IPF2A de las registradas en sujetos con EA y controles sanos, y los casos que posteriormente evolucionaban a EA tenían concentraciones más altas que los que no lo hacían [24,57]. Varios estudios longitudinales han mostrado que a lo largo de uno y dos años las concentraciones de isoprostanos F2 aumentan en el LCR [58,59], de manera que las medidas basales podían distinguir con una precisión del 100% los sujetos con DCL que progresaban a EA. Por otra parte, al añadir la medición de isoprostanos a la valoración cognitiva o a la RM, mejoraba el poder diagnóstico y predictivo, aunque estos resultados aún deben ser validados en muestras más numerosas. Otro hallazgo de interés es que los portadores de mutaciones de EA en fase preclínica también presentan un aumento de isoprostanos en el LCR, lo que sugiere que este marcador puede ser útil tanto para formas familiares como esporádicas de la enfermedad [60]. La combinación de mediciones en el LCR de A β 42, tau e isoprostanos F2 ha permitido diagnosticar la EA con una sensibilidad del 84% y una especificidad del 89% [61], mientras que en otro estudio el mismo grupo de marcadores permitió clasificar correctamente el 88,5% de los pacientes de acuerdo con su diagnóstico clínico o histopatológico [62].

Otra forma de enfocar el problema consiste en realizar determinaciones más amplias de proteínas o metabolitos con técnicas de proteómica o metabolómica basadas en los avances en espectrometría de masas, e intentar buscar no ya candidatos aislados según los conocimientos de la fisiopatología de la EA, sino perfiles que sean característicos de la enfermedad. Se trata de aproximaciones muy interesantes, y es posible que en un plazo breve aporten resultados más concluyentes de los obtenidos hasta ahora [63]. Por ejemplo, en uno de estos trabajos [64] se formuló una plataforma de 23 elementos proteicos en el LCR que diferenciaban casos de EA de controles sanos y con otras enfermedades neurológicas con una sensibilidad y especificidad del 94%, y un error predictivo del 5,9%. Asimismo, existen trabajos prometedores en cuanto a la capacidad de diferenciar entre EA, demencia en la enfermedad de Parkinson y demencia frontotemporal [65], y para distinguir entre sujetos con DCL que progresan a EA o no [66] empleando plataformas distintas

medidas en el LCR. La combinación de distintos fragmentos de A β (A β 1-16, A β 1-33, A β 1-39 y A β 1-42) analizados en el LCR con la técnica denominada MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectroscopy*) ha conseguido discriminar la presencia de EA con una sensibilidad del 89%, especificidad del 83% y precisión del 86% [67]. La mayoría de los estudios basados en técnicas de proteómica se han llevado a cabo en el LCR, y aunque los escasos trabajos realizados en suero y plasma resultan igualmente prometedores, todavía son necesarios estudios de validación [68,69].

Plasma

Aunque la punción lumbar sea una técnica relativamente fácil de realizar y tenga una incidencia muy baja de efectos adversos, y éstos no sean de gravedad, sigue siendo una técnica ciertamente invasiva. Dada la magnitud epidemiológica de la EA, parece poco realista pensar en realizar punciones lumbares a miles de personas ancianas. Un biomarcador ideal, especialmente uno que pueda ser utilizado en la práctica clínica habitual, debería obtenerse de una forma similar a los procedimientos habituales para la realización de análisis (p. ej., determinaciones en sangre, orina, saliva, lágrimas o incluso cabellos). Todavía hay que obtener datos más exactos acerca de si lo que ocurre en compartimentos cerrados como el cerebro o el LCR tiene su reflejo en fluidos periféricos, pero cada vez hay más pruebas de que la barrera hematoencefálica (BHE) no es tan impermeable como se ha creído tradicionalmente. De hecho, cerca de 500 mL de LCR son reabsorbidos por la sangre al día de forma fisiológica, y existen datos de que en la EA pueden existir lesiones en la BHE que faciliten este flujo.

En la búsqueda de marcadores plasmáticos de la EA, el primer abordaje lógico era la determinación de A β , pero los estudios realizados no son concluyentes a la hora de diferenciar entre pacientes y controles [70]. Recientemente se ha publicado que la determinación del ratio A β 42/A β 40 puede ayudar a predecir los sujetos con DCL que evolucionarán a EA, pero estos datos requieren confirmación [71]. Asimismo, se han publicado diversos trabajos sobre el papel que pueden desempeñar una serie de sustancias o sus metabolitos vinculados con la EA según el estado actual de conocimientos de la fisiopatología de la enfermedad, como los isoprostanos, el colesterol,

las citocinas y otras sustancias, pero los resultados carecen todavía de la fiabilidad necesaria.

Orina

Obviamente, una prueba diagnóstica de EA que pudiera realizarse en orina tendría grandes ventajas de accesibilidad sobre otro tipo de fluidos. Se han postulado al menos dos determinaciones en orina con posibilidades de convertirse en un marcador diagnóstico de la EA. Una de éstas es la determinación de isoprostanos F2, aunque los resultados son todavía incipientes [72-74]. La otra es la determinación de NTP (proteína de cadena neural, *neural thread protein*), una fosfoproteína de membrana cuya expresión se encuentra aumentada en la fase fetal, en ciertas patologías tumorales y en la EA [75]. El papel que desempeña esta proteína en la EA todavía es desconocido, pero puede tener relación con el propio proceso degenerativo y con el intento de aumentar la conectividad de las neuronas supervivientes. Se han encontrado niveles aumentados de NTP en LCR, plasma y orina de pacientes con EA [76,77], en relación con controles sanos, aunque el interés se ha centrado recientemente en la determinación en orina mediante una técnica de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) denominada UNTP (*urine neural thread protein test*). Las comprobaciones test-retest muestran que los niveles aparecen relativamente estables con intervalos de 2 días a 4,5 años, lo que sugiere que las determinaciones positivas (elevadas) o negativas (normales) no fluctúan significativamente a lo largo del tiempo [78]. Un estudio reciente prospectivo ciego examinó los resultados del UNTP en 168 sujetos referidos a centros especializados para valoración por sospecha de demencia y que fueron diagnosticados tras un protocolo de diagnóstico estándar de EA probable (20,8%), EA posible (31,5%), DCL (22,0%) y EA excluida (25,6%) [79]. Las determinaciones de NTP se compararon con las de un grupo de 122 controles sanos, y se obtuvo una sensibilidad del 90% y una especificidad del 91% para el diagnóstico de EA probable al comparar con el grupo de controles sanos, con un valor predictivo positivo del 94,6% para el conjunto de diagnósticos EA probable, EA posible y DCL, y un valor predictivo negativo del 41,5% para la exclusión del diagnóstico de EA. Estos resultados son muy alentadores de cara a la utilidad de la prueba en un

entorno clínico real, aunque es necesario que estos trabajos sean validados de forma adecuada.

Conclusiones

La EA constituye uno de los retos sanitarios y sociales que caracterizan las sociedades occidentales en el comienzo del siglo XXI. Pese a los importantes avances registrados en la última década, todavía hay que afrontar desafíos muy importantes tanto en el terreno del diagnóstico como en el de la terapéutica. Uno de ellos es el descubrimiento de biomarcadores de diagnóstico, progresión y respuesta terapéutica. Los campos más explorados en este sentido son la neuroimagen funcional y las determinaciones bioquímicas en el LCR de proteína β -amiloide y tau, pero ambos tipos de pruebas tienen en común la dificultad de su aplicación en un entorno clínico habitual, y su uso parece limitado hoy por hoy a centros especializados o de investigación. La búsqueda de marcadores en fluidos periféricos puede beneficiarse de los avances en áreas como la proteómica o la metabolómica, pero estas técnicas, aunque prometedoras, han proporcionado hasta ahora únicamente resultados preliminares.

Bibliografía

1. Wimo A, Jonsson L, Winblad B. An estimate of the worldwide prevalence and direct costs of dementia in 2003. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006; 21: 175-81.
2. Nestor PJ, Scheltens P, Hodges JR. Advances in the early detection of Alzheimer's disease. *Nat Med* 2004; 10 (Suppl): S34-41.
3. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89-95.
4. Hyman BT. Biomarkers in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1998; 19: 159-60.
5. Lovestone S. Biomarkers in Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging* 2006; 10: 118-22.
6. Consensus report of the Working Group on Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease. The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. *Neurobiol Aging* 1998; 19: 109-16.
7. Frank RA, Galasko D, Hampel H, Hardy J, de Leon MJ, Mehta PD, et al. Biological markers for therapeutic trials in Alzheimer's disease. Proceedings of the biological markers working group; NIA initiative on neuroimaging in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 521-36.
8. Growdon JH. Biomarkers of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1999; 56: 281-3.
9. Pitner JK, Bachman DL. A synopsis of the practice parameters on dementia from the American Academy of Neurology on the diagnosis of dementia. *Consult Pharm* 2004; 19: 52-63.
10. Dickerson BC, Sperling RA. Neuroimaging biomarkers for clinical trials of disease-modifying therapies in Alzheimer's disease. *NeuroRx* 2005; 2: 348-60.
11. Fox NC, Cousens S, Scahill R, Harvey RJ, Rossor MN. Using serial registered brain magnetic resonance imaging to measure disease progression in Alzheimer disease: power calculations and estimates of sample size to detect treatment effects. *Arch Neurol* 2000; 57: 339-44.
12. Killiany RJ, Gomez-Isla T, Moss M, Kikinis R, Sandor T, Jolesz F, et al. Use of structural magnetic resonance imaging to predict who will get Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2000; 47: 430-9.
13. Gosche KM, Mortimer JA, Smith CD, Markesbery WR, Snowdon DA. Hippocampal volume as an index of Alzheimer neuropathology: findings from the Nun Study. *Neurology* 2002; 58: 1476-82.
14. Jack CR, Jr., Petersen RC, Xu Y, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, et al. Rates of hippocampal atrophy correlate with change in clinical status in aging and AD. *Neurology* 2000; 55: 484-9.
15. Barnes J, Godbolt AK, Frost C, Boyes RG, Jones BF, Scahill RI, et al. Atrophy rates of the cingulate gyrus and hippocampus in AD and FTL. *Neurobiol Aging* 2007; 28: 20-8.
16. Whitwell JL, Weigand SD, Shiung MM, Boeve BF, Ferman TJ, Smith GE, et al. Focal atrophy in dementia with Lewy bodies on MRI: a distinct pattern from Alzheimer's disease. *Brain* 2007; 130: 708-19.
17. Jack CR, Jr., Slomkowski M, Gracon S, Hoover TM, Felmlee JP, Stewart K, et al. MRI as a biomarker of disease progression in a therapeutic trial of milameline for AD. *Neurology* 2003; 60: 253-60.
18. Fox NC, Black RS, Gilman S, Rossor MN, Griffith SG, Jenkins L, et al. Effects of Abeta immunization (AN1792) on MRI measures of cerebral volume in Alzheimer disease. *Neurology* 2005; 64: 1563-72.
19. Craig-Schapiro R, Fagan AM, Holtzman DM. Biomarkers of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2008, Oct 28. [Epub ahead of print].

20. Dickerson BC, Sperling RA. Functional abnormalities of the medial temporal lobe memory system in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: insights from functional MRI studies. *Neuropsychologia* 2008; 46: 1624-35.
21. Johnson NA, Jahng GH, Weiner MW, Miller BL, Chui HC, Jagust WJ, et al. Pattern of cerebral hypoperfusion in Alzheimer disease and mild cognitive impairment measured with arterial spin-labeling MR imaging: initial experience. *Radiology* 2005; 234: 851-9.
22. Jagust W, Thisted R, Devous MD, Sr., Van HR, Mayberg H, Jobst K, et al. SPECT perfusion imaging in the diagnosis of Alzheimer's disease: a clinical-pathologic study. *Neurology* 2001; 56: 950-6.
23. Bradley KM, O'Sullivan VT, Soper ND, Nagy Z, King EM, Smith AD, et al. Cerebral perfusion SPET correlated with Braak pathological stage in Alzheimer's disease. *Brain* 2002; 125: 1772-81.
24. Thal LJ, Kantarci K, Reiman EM, Klunk WE, Weiner MW, Zetterberg H, et al. The role of biomarkers in clinical trials for Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2006; 20: 6-15.
25. Silverman DH, Small GW, Chang CY, Lu CS, Kung De Aburto MA, Chen W, et al. Positron emission tomography in evaluation of dementia: regional brain metabolism and long-term outcome. *JAMA* 2001; 286: 2120-7.
26. Drzezga A, Lautenschlager N, Siebner H, Riemenschneider M, Willoch F, Minoshima S, et al. Cerebral metabolic changes accompanying conversion of mild cognitive impairment into Alzheimer's disease: a PET follow-up study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30: 1104-13.
27. Small GW, Ercoli LM, Silverman DH, Huang SC, Komo S, Bookheimer SY, et al. Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 6037-42.
28. Alexander GE, Chen K, Pietrini P, Rapoport SI, Reiman EM. Longitudinal PET evaluation of cerebral metabolic decline in dementia: a potential outcome measure in Alzheimer's disease treatment studies. *Am J Psychiatry* 2002; 159: 738-45.
29. Klunk WE, Lopresti BJ, Ikonomic MD, Lefterov IM, Koldamova RP, Abrahamson EE, et al. Binding of the positron emission tomography tracer Pittsburgh compound-B reflects the amount of amyloid-beta in Alzheimer's disease brain but not in transgenic mouse brain. *J Neurosci* 2005; 25: 10598-606.
30. Jack CR, Jr., Lowe VJ, Senjem ML, Weigand SD, Kemp BJ, Shiung MM, et al. 11C PiB and structural MRI provide complementary information in imaging of Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Brain* 2008; 131: 665-80.
31. Rowe CC, Ng S, Ackermann U, Gong SJ, Pike K, Savage G, et al. Imaging beta-amyloid burden in aging and dementia. *Neurology* 2007; 68: 1718-25.
32. Rabinovici GD, Furst AJ, O'Neil JP, Racine CA, Mormino EC, Baker SL, et al. 11C-PIB PET imaging in Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2007; 68: 1205-12.
33. Klunk WE, Mathis CA, Price JC, Lopresti BJ, DeKosky ST. Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease. *Brain* 2006; 129: 2805-7.
34. Engler H, Forsberg A, Almkvist O, Blomquist G, Larsson E, Savitcheva I, et al. Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease. *Brain* 2006; 129: 2856-66.
35. Kemppainen NM, Aalto S, Wilson IA, Nagren K, Helin S, Bruck A, et al. PET amyloid ligand [11C]PIB uptake is increased in mild cognitive impairment. *Neurology* 2007; 68: 1603-6.
36. Small GW, Kepe V, Ercoli LM, Siddarth P, Bookheimer SY, Miller KJ, et al. PET of brain amyloid and tau in mild cognitive impairment. *N Engl J Med* 2006; 355: 2652-63.
37. Shoghi-Jadid K, Small GW, Agdeppa ED, Kepe V, Ercoli LM, Siddarth P, et al. Localization of neurofibrillary tangles and beta-amyloid plaques in the brains of living patients with Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 2002; 10: 24-35.
38. Rowe CC, Ackerman U, Browne W, Mulligan R, Pike KL, O'Keefe G, et al. Imaging of amyloid beta in Alzheimer's disease with 18F-BAY94-9172, a novel PET tracer: proof of mechanism. *Lancet Neurol* 2008; 7: 129-35.
39. Verhoeff NP, Wilson AA, Takeshita S, Trop L, Hussey D, Singh K, et al. In vivo imaging of Alzheimer disease beta-amyloid with [11C]SB-13 PET. *Am J Geriatr Psychiatry* 2004; 12: 584-95.
40. Kudo Y, Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, Maruyama M, et al. 2-(2-[2-Dimethylaminothiazol-5-yl]ethenyl)-6-(2-[fluoro]ethoxy)benzoxazole: a novel PET agent for in vivo detection of dense amyloid plaques in Alzheimer's disease patients. *J Nucl Med* 2007; 48: 553-61.
41. Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, Gunn RN, Myers R, Turkheimer FE, et al. In vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet* 2001; 358: 461-7.
42. Blennow K, Wallin A, Hager O. Low frequency of post-lumbar puncture headache in demented patients. *Acta Neurol Scand* 1993; 88: 221-3.
43. Hampel H, Burger K, Teipel SJ, Bokde AL, Zetterberg H, Blennow K. Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2008; 4: 38-48.
44. Lonneborg A. Biomarkers for Alzheimer disease in cerebrospinal fluid, urine, and blood. *Mol Diagn Ther* 2008; 12: 307-20.
45. Aluise CD, Sowell RA, Butterfield DA. Peptides and pro-

- teins in plasma and cerebrospinal fluid as biomarkers for the prediction, diagnosis, and monitoring of therapeutic efficacy of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782: 549-58.
46. Frankfort SV, Tulner LR, Van Campen JP, Verbeek MM, Jansen RW, Beijnen JH. Amyloid beta protein and tau in cerebrospinal fluid and plasma as biomarkers for dementia: a review of recent literature. *Curr Clin Pharmacol* 2008; 3: 123-31.
 47. Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx* 2004; 1: 213-25.
 48. Borroni B, Di Luca M, Padovani A. Predicting Alzheimer dementia in mild cognitive impairment patients. Are biomarkers useful? *Eur J Pharmacol* 2006; 545: 73-80.
 49. Hampel H, Teipel SJ, Fuchsberger T, Andreasen N, Wiltfang J, Otto M, et al. Value of CSF beta-amyloid1-42 and tau as predictors of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 705-10.
 50. Andreasen N, Hesse C, Davidsson P, Minthon L, Wallin A, Winblad B, et al. Cerebrospinal fluid beta-amyloid(1-42) in Alzheimer disease: differences between early- and late-onset Alzheimer disease and stability during the course of disease. *Arch Neurol* 1999; 56: 673-80.
 51. Sunderland T, Linker G, Mirza N, Putnam KT, Friedman DL, Kimmel LH, et al. Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA* 2003; 289: 2094-103.
 52. Hampel H, Goernitz A, Buerger K. Advances in the development of biomarkers for Alzheimer's disease: from CSF total tau and Abeta(1-42) proteins to phosphorylated tau protein. *Brain Res Bull* 2003; 61: 243-53.
 53. Hampel H, Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, Goernitz A, Andreasen N, et al. Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study. *Arch Gen Psychiatry* 2004; 61: 95-102.
 54. Buerger K, Teipel SJ, Zinkowski R, Blennow K, Arai H, Engel R, et al. CSF tau protein phosphorylated at threonine 231 correlates with cognitive decline in MCI subjects. *Neurology* 2002; 59: 627-9.
 55. Schoonenboom NS, Pijnenburg YA, Mulder C, Rosso SM, Van Elk EJ, Van Kamp GJ, et al. Amyloid beta(1-42) and phosphorylated tau in CSF as markers for early-onset Alzheimer disease. *Neurology* 2004; 62: 1580-4.
 56. Pratico D, Sung S. Lipid peroxidation and oxidative imbalance: early functional events in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2004; 6: 171-5.
 57. Pratico D, Clark CM, Lee VM, Trojanowski JQ, Rokach J, Fitzgerald GA. Increased 8,12-iso-iPF2alpha-VI in Alzheimer's disease: correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Ann Neurol* 2000; 48: 809-12.
 58. Quinn JF, Montine KS, Moore M, Morrow JD, Kaye JA, Montine TJ. Suppression of longitudinal increase in CSF F2-isoprostanes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2004; 6: 93-7.
 59. De Leon MJ, DeSanti S, Zinkowski R, Mehta PD, Pratico D, Segal S, et al. Longitudinal CSF and MRI biomarkers improve the diagnosis of mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2006; 27: 394-401.
 60. Ringman JM, Younkin SG, Pratico D, Seltzer W, Cole GM, Geschwind DH, et al. Biochemical markers in persons with preclinical familial Alzheimer disease. *Neurology* 2008; 71: 85-92.
 61. Montine TJ, Kaye JA, Montine KS, McFarland L, Morrow JD, Quinn JF. Cerebrospinal fluid abeta42, tau, and f2-isoprostane concentrations in patients with Alzheimer disease, other dementias, and in age-matched controls. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125: 510-2.
 62. Grossman M, Farmer J, Leight S, Work M, Moore P, Van Deerlin V, et al. Cerebrospinal fluid profile in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2005; 57: 721-9.
 63. Hye A, Lynham S, Thambisetty M, Causevic M, Campbell J, Byers HL, et al. Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Brain* 2006; 129: 3042-50.
 64. Finehout EJ, Franck Z, Choe LH, Relkin N, Lee KH. Cerebrospinal fluid proteomic biomarkers for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2007; 61: 120-9.
 65. Abdi F, Quinn JF, Jankovic J, McIntosh M, Leverenz JB, Peskind E, et al. Detection of biomarkers with a multiplex quantitative proteomic platform in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis* 2006; 9: 293-348.
 66. Simonsen AH, McGuire J, Hansson O, Zetterberg H, Podust VN, Davies HA, et al. Novel panel of cerebrospinal fluid biomarkers for the prediction of progression to Alzheimer dementia in patients with mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 2007; 64: 366-70.
 67. Portelius E, Zetterberg H, Andreasson U, Brinkmalm G, Andreasen N, Wallin A, et al. An Alzheimer's disease-specific beta-amyloid fragment signature in cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett* 2006; 409: 215-9.
 68. German DC, Gurnani P, Nandi A, Garner HR, Fisher W, Diaz-Arrastia R, et al. Serum biomarkers for Alzheimer's disease: proteomic discovery. *Biomed Pharmacother* 2007; 61: 383-9.
 69. Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, et al. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med* 2007; 13: 1359-62.
 70. Irizarry MC. Biomarkers of Alzheimer disease in plasma. *NeuroRx* 2004; 1: 226-34.
 71. Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J, Boeve BF, Knop-

- man DS, Ivnik RJ, et al. Association of low plasma Aβ₄₂/Aβ₄₀ ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2007; 64: 354-62.
72. Kim KM, Jung BH, Paeng KJ, Kim I, Chung BC. Increased urinary F(2)-isoprostanes levels in the patients with Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 2004; 64: 47-51.
73. Montine TJ, Quinn JF, Montine KS, Kaye JA, Breitner JC. Quantitative in vivo biomarkers of oxidative damage and their application to the diagnosis and management of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2005; 8: 359-67.
74. Pratico D, Clark CM, Liun F, Rokach J, Lee VY, Trojanowski JQ. Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2002; 59: 972-6.
75. De la Monte SM, Xu YY, Wands JR. Modulation of neuronal thread protein expression with neuritic sprouting: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1996; 138: 26-35.
76. Munzar M, Levy S, Rush R, Averback P. Clinical study of a urinary competitive ELISA for neural thread protein in Alzheimer disease. *Neurol Clin Neurophysiol* 2002; 2002: 2-8.
77. Kahle PJ, Jakowec M, Teipel SJ, Hampel H, Petzinger GM, Di Monte DA, et al. Combined assessment of tau and neuronal thread protein in Alzheimer's disease CSF. *Neurology* 2000; 54: 1498-504.
78. Levy S, McConville M, Lazaro GA, Averback P. Competitive ELISA studies of neural thread protein in urine in Alzheimer's disease. *J Clin Lab Anal* 2007; 21: 24-33.
79. Goodman I, Golden G, Flitman S, Xie K, McConville M, Levy S, et al. A multi-center blinded prospective study of urine neural thread protein measurements in patients with suspected Alzheimer's disease. *J Am Med Dir Assoc* 2007; 8: 21-30.
80. Ho L, Sharma N, Blackman L, Festa E, Reddy G, Pasinetti GM. From proteomics to biomarker discovery in Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 2005; 48: 360-9.
81. Chong MS, Lim WS, Sahadevan S. Biomarkers in preclinical Alzheimer's disease. *Curr Opin Invest Drugs* 2006; 7: 600-7.
82. Growdon JH. Incorporating biomarkers into clinical drug trials in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2001; 3: 287-92.
83. Pupi A, Mosconi L, Nobili FM, Sorbi S. Toward the validation of functional neuroimaging as a potential biomarker for Alzheimer's disease: implications for drug development. *Mol Imaging Biol* 2005; 7: 59-68.
84. Andreasen N, Blennow K. CSF biomarkers for mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Clin Neurol Neurosurg* 2005; 107: 165-73.
85. Blennow K. CSF biomarkers for Alzheimer's disease: use in early diagnosis and evaluation of drug treatment. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5: 661-72.
86. Wallin AK, Blennow K, Andreasen N, Minthon L. CSF biomarkers for Alzheimer's disease: levels of beta-amyloid, tau, phosphorylated tau relate to clinical symptoms and survival. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006; 21: 131-8.