



**ESTUDIO DE FRAGMENTOS SOLUBLES
DE LA PROTEÍNA PRECURSORA
AMILOIDE COMO BIOMARCADORES EN
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Tesis Doctoral presentada por

Claudia Paula Boix Rodríguez

-2020-

Director de tesis:

Javier Sáez Valero

Codirectora de tesis:

Inmaculada Belén López Font

Programa de Doctorado en Neurociencias

Instituto de Neurociencias –UMH-CSIC

Sant Joan d'Alacant, 14 de marzo de 2020

TESIS DOCTORAL CONVENCIONAL

A quien corresponda:

La tesis doctoral desarrollada por mí, Claudia Paula Boix Rodríguez, con título: **“Estudio de fragmentos solubles de la proteína precursora amiloide como biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer”**, presenta un formato convencional. Como indicio de calidad se presentan los trabajos previamente publicados:

Alterations in the Balance of Amyloid- β Protein Precursor Species in the Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's Disease Patients

Inmaculada Lopez-Font, Claudia P. Boix, Henrik Zetterberg, Kaj Blennow and Javier Sáez-Valero.

Journal of Alzheimer's disease. 2017. DOI: 10.3233/JAD-161275

C-terminal fragments of the amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid as potential biomarkers for Alzheimer disease

María-Salud García-Ayllón, Inmaculada Lopez-Font, Claudia P. Boix, Juan Fortea, Raquel Sánchez-Valle, Alberto Lleó, José-Luis Molinuevo, Henrik Zetterberg, Kaj Blennow and Javier Sáez-Valero.

Scientific Reports. 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-02841-7

Las publicaciones utilizadas no han sido ni serán empleadas en ninguna otra tesis.

Fdo.: Claudia Paula Boix Rodríguez



Sant Joan d'Alacant, 14 de mayo de 2020

D. **Javier Sáez Valero**, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández (UMH) e Investigador adscrito al Instituto de Neurociencias de Alicante, centro mixto UMH-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

AUTORIZO la presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Estudio de fragmentos solubles de la proteína precursora amiloide como biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer**” y realizada por D^a. Claudia Paula Boix Rodríguez, bajo mi inmediata dirección y supervisión como director de su Tesis Doctoral en el Instituto de Neurociencias (UMH-CSIC) y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

Dr. Javier Sáez Valero



Sant Joan d'Alacant, 14 de mayo de 2020

D^a. **Inmaculada Belén López Font**, Investigadora adscrita al Instituto de Neurociencias de Alicante, centro mixto UMH- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

AUTORIZO la presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Estudio de fragmentos solubles de la proteína precursora amiloide como biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer**” y realizada por D^a. Claudia Paula Boix Rodríguez, bajo mi inmediata dirección y supervisión como codirectora de su Tesis Doctoral en el Instituto de Neurociencias (UMH-CSIC) y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

Dra. Inmaculada Belén López Font

Dr. Miguel Valdeolmillos
Coordinador del Programa de Doctorado en Neurociencias

A Comisión de Doctorado de la UMH,

Reunida la CAPD de Neurociencias, considera que la motivación razonada presentada por Dña Claudia Paula Boix Rodriguez, **reúne las condiciones establecidas** en el PROCEDIMIENTO CON CARÁCTER EXCEPCIONAL PARA EL DEPÓSITO Y LA DEFENSA DE TESIS DOCTORALES AFECTADAS POR EL ESTADO DE ALARMA DERIVADO DE LA CRISIS SANITARIA POR COVID-19, y como coordinador de dicha Comisión, certifico:

Que la Tesis Doctoral titulada “Estudio de fragmentos solubles de la proteína precursora amiloide como biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer” ha sido realizada por D^a. Claudia Paula Boix Rodríguez, bajo la dirección de D. Javier Sáez Valero como director y D^a. Inmaculada Belén López Font como codirectora, y doy mi conformidad para que sea presentada de forma no presencial a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández.

San Juan de Alicante, 8 Mayo 2020



Dr. Miguel Valdeolmillos López

Coordinador del programa de Doctorado en Neurociencias

A mi querida familia

AGRADECIMIENTOS

“Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro” (Ramón y Cajal) y por extensión de su propia vida. Por permitirme llevar a cabo esta tarea y por la posibilidad formativa que me han brindado, quiero agradecer en primer lugar al Instituto de Neurociencias de Alicante, al CSIC y a la Universidad Miguel Hernández, haber puesto a mi alcance los medios para favorecer el desarrollo de esta tesis doctoral.

También quiero agradecer a mis directores de tesis el esfuerzo realizado y su dedicación a mi propósito. Al equipo investigador que he podido conocer durante este proceso, le agradezco sus enseñanzas, el afecto que me han profesado y su confianza en mí, los cuales han sido fundamentales para llegar al final de este camino.

A los profesores, maestros y tutores que me han formado como profesional y como persona, les agradezco cada idea y cada precepto suyo que me han dejado. Espero poder honrarles como merecen, para que puedan seguir sintiéndose orgullosos. Seguir encontrándome con los que todavía están, es un regalo.

A mis amigos, porque los considero una extensión de mi misma, los quiero como a la familia que son, y representan un pilar fundamental en mi existencia.

A mi abuelo José María se lo debo todo y le agradezco cada vértice y arista de mi carácter, trazados con esmero sobre el boceto en blanco de mi infancia. Su amor incondicional sigue siendo hoy el motor de mi vida y su fuerza, mi coraje.

A mi madre Azucena, le agradezco su bondad infinita, heredada de su tía Concha, de su abuela María Azucena y de su bisabuela, la cual espero, continúe transmitiéndose a lo largo de las generaciones. Ella guía el timón de mi vida, es la creadora de una saga y es el espejo en el que quiero que se miren mis hijos. Su capacidad creativa se refleja en cada una de sus obras (mi vida, la de mi hermana, la de mi hija...) y su magia brilla con cada gesto.

A mi hermana Núria, por ser el mayor regalo que me han hecho jamás. Soñé con ella durante años, y he intentado darle lo mejor para que evolucione y vuele tan alto como quiera. La realidad ha superado con creces mis sueños; me enorgullece en cada paso que da, en cada palabra, con cada gesto... y la quiero más que a nada. A ella le debo haber finalizado con éxito esta tesis, es una líder natural y nunca sucumbe.

A mi amor, Carlos, le agradezco que haya enriquecido cada recoveco de mi persona. Saberse amado tal y como uno es, proporciona la confianza y la sonrisa necesarias para afrontar el presente y el futuro. Me inspira respeto por muchos motivos, sobretodo por su capacidad de superación, su versatilidad y el hecho de que esté siempre dispuesto a cambiar de opinión, a favor de la evidencia. Gracias por Carolina y por los que estén por venir.

Y para finalizar, a mi hija Carolina, que nació durante el desarrollo de esta tesis. Le agradezco sus besos, sus abrazos y sus sonrisas. Espero ser capaz de transmitirle la libertad con la que he crecido, el amor que le tengo y la certeza de que ella es la dueña de su futuro, para que sea muy feliz.

“En cuestiones de ciencia, la autoridad de miles no vale más que el humilde razonamiento de un único individuo”. (Galileo)

Índice

ABREVIATURAS	III
ABSTRACT	V
RESUMEN	IX
<i>I. Introducción</i>	1
1. La enfermedad de Alzheimer	5
1.1. Características patológicas	6
1.1.1. Formación de placas amiloides.....	7
1.1.2. Formación de ovillos neurofibrilares.....	8
1.2. La proteína APP	10
1.2.1. Maduración y tráfico intracelular de APP	10
1.2.2. Procesamiento de APP	12
1.2.3. Vías alternativas de procesamiento de APP	14
1.2.4. Glicosilación de proteínas y su relación con el Alzheimer	17
1.3. Clasificación del Alzheimer	19
1.3.1. Según el estadio clínico	19
1.3.2. Según la edad de inicio.....	21
1.3.3. Según la implicación que tenga el factor genético	21
1.4. Tratamiento.....	24
1.4.1. Tratamientos farmacológicos	24
1.4.2. Tratamientos no farmacológicos	25
1.4.3. Tratamientos en fase de investigación.....	26
2. Diagnóstico.....	34
2.1. Historia clínica (anamnesis, entrevista clínica y exploración física).....	36
2.2. Test cognitivo	36
2.3. Pruebas complementarias	38
2.3.1. Análisis de sangre.....	38
2.3.2. Exploración neuropsicológica	38
2.3.3. Pruebas de neuroimagen.....	39
2.3.4. Pruebas genéticas: análisis de formas familiares.....	44
3. Biomarcadores en CSF	45
3.1. Importancia de la búsqueda de biomarcadores en CSF para la enfermedad de Alzheimer: A β 42, T-tau y P-tau	45
3.2. Otros fragmentos de APP como marcadores alternativos al A β : sAPP α y sAPP β	47
<i>II. Objetivos</i>	49
<i>III. Material y Métodos</i>	53
1. Recolección de muestras: CSF y cortezas cerebrales humanas.....	55
1.1. Muestras de CSF.....	55

1.2.	Muestras de corteza cerebral frontal.....	56
2.	Procesamiento analítico de las muestras biológicas.....	57
2.1.	Extracción, tratamiento y preparación de las muestras	57
2.1.1.	Muestras de CSF.....	57
2.1.2.	Muestras de corteza cerebral	57
3.	Electroforesis y western blot de APP	58
3.1.	Anticuerpos utilizados	59
3.1.1.	Anticuerpos primarios	59
3.1.2.	Anticuerpos secundarios.....	62
4.	Análisis de APP mediante interacción con lectinas	63
5.	Inmunoprecipitación de APP.....	64
6.	Análisis estadístico	64
IV.	<i>Resultados</i>	65
1.	Alteraciones en los niveles de las distintas especies de APP presentes en el CSF de pacientes con la enfermedad de Alzheimer	67
1.1.	Niveles inalterados de sAPP α y sAPP β en el CSF de pacientes con la AD....	67
1.2.	Desequilibrio entre las especies de APP en el CSF de pacientes con la AD...	73
1.3.	Desequilibrio entre las especies APP-KPI en el CSF de pacientes con la AD	74
2.	La glicosilación de la proteína APP determina su procesamiento proteolítico y se muestra alterada en el cerebro de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer	76
2.1.	Caracterización y niveles de sAPP α y sAPP β en el cerebro de sujetos con la AD	77
2.2.	Patrón de interacción de las especies sAPP α y sAPP β de cerebro humano con lectinas	79
3.	Fragmentos C-terminales de APP en el CSF como biomarcadores potenciales para la enfermedad de Alzheimer.....	83
3.1	Presencia de fragmentos solubles C-terminales de APP (APP-CTFs) en el CSF humano	83
3.2.	El APP-CTF de ~25 kDa aumenta en el CSF de pacientes con la AD.....	87
V.	<i>Discusión</i>	91
VI.	<i>Conclusiones</i>	105
VII.	<i>Publicaciones</i>	109
VIII.	<i>Anexos</i>	155
Anexo A.	Escala de deterioro global (GDS-FAST)	157
Anexo B.	Genes/loci asociados a la AD.....	159
IX.	<i>Bibliografía</i>	160

ABREVIATURAS

- A β : Péptido beta-amiloide, del inglés *Amyloid-beta peptide*
- A β 42: Péptido beta-amiloide 1-42, del inglés *Amyloid-beta peptide 1-42*
- AD: enfermedad de Alzheimer, del inglés *Alzheimer's disease*
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ApoE: apolipoproteína E
- APP: Proteína Precursora Amiloide, del inglés *Amyloid β -Protein Precursor*
- ARN: ácido ribonucleico
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- BACE1: enzima β -secretasa, del inglés *β -site APP cleaving enzyme 1*
- CNS: sistema nervioso central, del inglés *Central Nervous System*
- CSF: líquido cefalorraquídeo, del inglés *Cerebrospinal Fluid*
- CTF: fragmento C-terminal, del inglés *C-terminal fragment*
- dDS: sujetos con Síndrome de Down y demencia tipo Alzheimer, del inglés *Down Syndrome subjects with Alzheimer's type dementia*
- ECA: Ensayos Clínicos Aleatorizados
- ER: retículo endoplasmático, del inglés *Endoplasmatic Reticulum*
- FAD: enfermedad de Alzheimer hereditaria, del inglés *Familiar Alzheimer Disease*
- FTD: demencia frontotemporal, del inglés *Fronto Temporal Dementia*
- GWAS: estudios de asociación a gran escala del genoma, del inglés *Genome-Wide Association Studies*
- HDL: lipoproteínas de alta densidad, del inglés *high-density lipoprotein receptor*
- ICD: dominio intracelular, del inglés *intracellular domain*
- KPI: inhibidor proteasa Kunitz
- LOAD: AD de inicio tardío, del inglés *Late-Onset AD*
- LRP: proteína relacionada con los receptores de lipoproteína de baja densidad
- MCI: deterioro cognitivo leve, del inglés *Mild Cognitive Impairment*
- NC: controles sanos, del inglés *non-disease controls*
- NTF: fragmento N-terminal, del inglés *N-terminal fragment*
- PET: tomografía por emisión de positrones, del inglés *Positron Emission Tomography*
- PS1 y PS2: presenilina 1 y presenilina 2
- P-tau: proteína tau hiperfosforilada, del inglés *hyperphosphorylated tau protein*

RAGE: receptor de los productos finales de la glicación avanzada

RM: Resonancia Magnética

sAPP: fragmento soluble N-terminal de APP, del inglés *soluble N-terminal APP fragment*

sAPP α y sAPP β : del inglés *soluble APP α y APP β*

SDS-PAGE: del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*

T-tau: proteína tau total, del inglés *total tau protein*

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD), the most common form of senile dementia, is a progressive neurodegenerative disorder of multifactorial etiology that usually has an average duration of 10 years after diagnosis. It is characterized by the formation of extracellular protein deposits (amyloid plaques) and intracellular (neurofibrillary tangles). Amyloid plaques are extracellular deposits composed mainly of the β -amyloid peptide ($A\beta$); while neurofibrillary tangles are intracellular aggregates formed by a hyperphosphorylated form of the cytoskeletal protein tau (P-tau). Thus, AD is a tauopathy among others, but it is the only one with amyloid plaques, a more specific phenomenon of this pathology. $A\beta$ is one of the proteolytic fragments generated by the processing of a transmembrane glycoprotein called amyloid precursor protein (APP), through the successive action of two proteolytic enzymes, β - and γ -secretase. APP can also be processed by α -secretase, initiating a non-amyloidogenic pathway that does not generate $A\beta$; other secretases, such as η -secretase, act in an alternative manner on APP in physiological conditions generating different types of fragments. In the AD pathology there is an imbalance among alternative APP processes that coexist under physiological conditions. The APP is also subject of post-translational modifications that may partly determine its further processing by one route or another, such as the glycosylation. Glycosylation is a co- and post-translational modification consisting in the addition of carbohydrates to a protein, and plays a critical role in many cellular activities. There is a growing evidence of an altered glycosylation in the brain of subjects with AD, which alters the functionality of these glycoproteins and contribute to the pathology. Therefore, a detailed investigation of the glycosylation processes could be key for the understanding of the pathogenesis of AD, as well as for the development of diagnostic methods and novel therapeutic approaches.

Currently, the diagnosis of AD is based on clinical data with the support of complementary tests. The use of biomarkers is essential to obtain an early diagnosis and to provide certainty to the clinical diagnosis. The most widely studied CSF biomarkers have been T-tau (total tau) and P-tau, which are elevated in the CSF of patients with AD compared to healthy controls, although their specificity is low, as there are high levels of T-tau and P-tau in other tauopathies and other neurodegenerative disorders; other

biomarker is the A β peptide, A β 42, which paradoxically appears decreased in the CSF. It is believed that this decrease in the CSF is due to its sequestration in plaques, making it difficult to use as an early biomarker. For all these reasons, other fragments derived from APP proteolysis have been proposed as alternative biomarkers, and we focus this thesis on this possibility.

First, we aimed to characterize and determine the levels in the human CSF of the soluble fragments of the APP ectodomain generated by the amyloidogenic processing, sAPP β , and the non-amyloidogenic, sAPP α ; as well as the full-length form (sAPPf), recently described in the CSF by our group. Our analysis was carried out in a CSF collection of patients with AD and controls without the disease, characterized by the determination of the core biomarkers of AD, A β 42, T-tau and P-tau. By electrophoretic separation, western blot analysis and specific antibodies against specific residues exposed after the processing by α - or β -secretase, we characterized both sAPP α and sAPP β , species of around 100 and 120 kDa. These soluble fragments could be generated from neuronal APP variants, APP695, as well as from longer APP variants that carry a KPI domain (Kunitz-type Protease Inhibitor), mostly expressed in glial cells. None of these species, sAPP α or for sAPP β , showed changes in their levels in subjects with AD when compared to controls. Differences between subjects with AD and controls were detected when the levels of the 100 and 120 kDa species were determined with an antibody against the C-terminal region of APP, which allows sAPPf to be determined, or with an antibody against the KPI domain, to determine the sAPP-KPI forms. Although the absolute levels of these 100 and 120 kDa forms did not show significant differences in the direct comparison between the AD and controls, the proportion of them revealed differences that could indicate alterations in expression and/or proteolytic processing.

The levels of the proteolytic fragments sAPP α and sAPP β were also determined in brain extracts of the frontal cortex of subjects with histopathological confirmation of the disease. Similarly to what was observed in the CSF, we did not find significant differences between the levels of sAPP α and sAPP β fragments, determined by western blot, in brain extracts of subjects with AD when compared with controls. In addition, this study was extended to the glycosylation analysis of APP, by the interaction of these species with different lectins, protein that bind glucans with high specificity. First, the 100 kDa species (probably derived from APP695) showed differential glycosylation versus those of 120 kDa (derived from APP-KPI species), possibly due to their different cell origin. It was more interesting to note differences in glycosylation between the sAPP α

and sAPP β species, which may indicate that glycosylation determines the processing by the secretases. Finally, we also observed significant differences in the glycosylation pattern of sAPP α when comparing AD extracts with controls, which would demonstrate glycosylation alterations in APP associated with the pathological condition.

We also include in this thesis studies on the possibility of determining the short C-terminal APP fragments (CTFs; a membrane-tethered fragment) in the CSF to explore their potential use as alternative biomarkers. Among the different immunoreactive bands detected with several antibodies against the C-terminal region of APP, in all cases we distinguish as the major form species of about 25 kDa compatible by molecular mass to a CTF resulting from the proteolytic processing of APP by η -secretase (CTF η). The levels of this 25 kDa APP-CTF were higher in CSF samples of subjects with familiar AD determined by the presence of mutations in the presenilin-1 gene (*PSEN1*), and demented Down syndrome subjects (chromosome trisomy 21, which includes the APP gene), compared to their respective age-matched controls. The 25 kDa APP-CTF was also found to be increased in the CSF of subjects with sporadic AD when compared to age-matched controls.

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (AD), la forma más común de demencia senil, es un trastorno neurodegenerativo progresivo de etiología multifactorial que suele tener una duración media de 10 años tras el diagnóstico. Se caracteriza por la formación de depósitos proteínicos extracelulares (placas amiloides) e intracelulares (ovillos neurofibrilares). Las placas amiloides son depósitos extracelulares compuestos principalmente por el péptido β -amiloide ($A\beta$); mientras que los ovillos neurofibrilares son agregados intracelulares formados por una forma hiperfosforilada de la proteína citoesquelética tau (P-tau). Así, la AD es una tauopatía entre otras, pero es la única que cursa con placas amiloides, fenómeno más específico de esta patología. $A\beta$ es uno de los fragmentos proteolíticos generados por el procesamiento de una glicoproteína transmembrana denominada proteína precursora amiloide (APP), a través de la acción sucesiva de dos enzimas proteolíticas, β - y γ -secretasa. La APP también puede ser procesada por α -secretasa, iniciando una vía no amiloidogénica que no produce $A\beta$; así como por otras secretasas, como la η -secretasa, que actúan de manera alternativa sobre APP en condiciones fisiológicas generando distintos tipos de fragmentos. Se entiende que en la patología de la AD subyace un desequilibrio entre los procesamientos alternativos de la APP que coexisten en condiciones fisiológicas. La APP también es objeto de distintas modificaciones postraduccionales que en parte pueden determinar su ulterior procesamiento por una vía u otra, entre ellas destaca la glicosilación. La glicosilación es un proceso de modificación co- y postraduccionales consistente en la adición de un glúcido a una proteína, y que desempeña un papel crítico en muchas actividades celulares. Existe una evidencia creciente sobre la existencia de glicoproteínas con glicosilación alterada en el cerebro de sujetos con la AD, lo que puede evidenciar alteraciones en la funcionalidad de dichas glicoproteínas y contribuir a la patología. Por lo tanto, una investigación detallada de los procesos de glicosilación podría ser clave para la comprensión de la patogénesis de la AD, así como para el desarrollo de métodos diagnósticos y aproximaciones terapéuticas novedosas.

Actualmente, el diagnóstico de la AD se basa en datos clínicos con el soporte de pruebas complementarias. El uso de biomarcadores resulta fundamental para avanzar en el diagnóstico precoz y dar certeza al diagnóstico clínico. Los biomarcadores del CSF más ampliamente estudiados han sido T-tau (tau total) y P-tau, que se encuentran elevados

en el CSF de pacientes con la AD respecto a controles sanos, aunque su especificidad es insuficiente, ya que también aumentan en otras tauopatías y otros desordenes neurodegenerativos; y la forma del péptido A β , A β 42, que paradójicamente aparece disminuido en el CSF. Se entiende que esta disminución en el CSF puede deberse a su secuestro en placas, dificultando su uso como biomarcador temprano. Por todo ello, se han propuesto como biomarcadores alternativos otros fragmentos derivados de la proteólisis de APP, y en esa posibilidad centramos esta tesis.

En primer lugar, tratamos de caracterizar y determinar los niveles en el CSF humano de los fragmentos solubles del ectodominio de APP producto tanto del procesamiento amiloidogénico, sAPP β , como del no amiloidogénico, sAPP α ; así como de la forma sin procesar proteolíticamente (sAPPf), recientemente descrita en el CSF por nuestro grupo. El análisis se realizó en una colección de CSF de pacientes con la AD y controles sin la enfermedad, caracterizados por la determinación de los biomarcadores clásicos de la AD como son A β 42, T-tau y P-tau. Mediante separación electroforética, análisis por western blot, y utilización de anticuerpos específicos para el extremo resultante del procesamiento por α - o β -secretasa de la APP, caracterizamos, tanto para sAPP α como para sAPP β , especies de alrededor de 100 y 120 kDa. Estas especies se podrían corresponder con las formas resultantes de las variantes de APP neuronales, APP695, y variantes más largas portadoras del dominio proteico denominado KPI (Kunitz-type protease inhibitor), expresadas normalmente en células gliales. Ninguna de estas especies mostró cambios en sus niveles, ni para sAPP α ni para sAPP β , en sujetos con la AD al ser comparados con controles. Sí se detectaron diferencias entre sujetos con la AD y controles cuando los niveles de las especies de 100 y 120 kDa se determinaron con un anticuerpo contra la región C-terminal de APP, que permite determinar sAPPf, o con un anticuerpo contra el dominio KPI, para determinar las formas sAPP-KPI. Aunque los niveles absolutos de estas formas de 100 y 120 kDa no mostraron diferencias significativas en la comparación directa entre los sujetos con la AD y los controles, la proporción de las mismas sí reveló diferencias que podrían indicar alteraciones en la expresión y/o procesamiento proteolítico.

Los niveles de los fragmentos proteolíticos sAPP α y sAPP β , también fueron determinados en extractos cerebrales de corteza frontal de sujetos con confirmación histopatológica de la enfermedad. De manera semejante a lo observado en el CSF, no encontramos diferencias significativas entre los niveles de fragmentos sAPP α y sAPP β , determinados por western blot, en extractos cerebrales de sujetos con la AD al

compararlos con los controles. Además, este estudio lo extendimos al análisis de la glicosilación mediante la interacción de estas especies con diferentes lectinas. En primer lugar, las especies de 100 kDa (derivadas probablemente de la APP-695, mayormente neuronal) mostraron glicosilación diferencial frente a las de 120 kDa (derivadas de especies APP-KPI, mayormente de origen glial), posiblemente reflejando el distinto origen celular. Resultó más interesante constatar diferencias en la glicosilación entre las especies sAPP α y sAPP β , lo cual puede indicar que ciertas glicoformas se procesan proteolíticamente por una vía preferencial. Finalmente, también observamos diferencias significativas en el patrón de glicosilación de la sAPP α al comparar extractos de sujetos con la AD con controles, lo que demostraría alteraciones en la glicosilación asociadas a la condición patológica.

Por último, en esta memoria también están incluidos los estudios sobre la determinación de pequeños fragmentos C-terminales de APP (CTFs; asociados en principio a membrana) en el CSF, para explorar su potencial empleo como biomarcadores alternativos. Entre las distintas bandas inmunoreactivas a anticuerpos generados contra la región C-terminal de APP, en todos los casos, distinguimos como la forma mayoritaria una especie de unos 25 kDa, compatible por tamaño con el CTF resultante del procesamiento proteolítico de la APP por la η -secretasa (CTF η). Los niveles de este APP-CTF de 25 kDa fueron superiores en muestras de CSF de sujetos con AD genético determinado por la presencia de mutaciones en el gen de la presenilina-1 (*PSEN1*), y pacientes dementes con síndrome de Down (trisomía en cromosoma 21 que incluye el gen *APP*), respecto a sus controles de edad pareada. El APP-CTF de 25 kDa también se encontró aumentado en el CSF de sujetos con AD esporádico al ser comparados con controles de edad pareada.

I. Introducción

En el año 1906, Santiago Ramón y Cajal obtuvo el premio Nobel de Medicina, junto a Camillo Golgi, en reconocimiento a su trabajo sobre la estructura del sistema nervioso. Mediante sus investigaciones sobre los mecanismos que gobiernan la morfología y los procesos conectivos de las células nerviosas, desarrolló una nueva y revolucionaria teoría que empezó a ser llamada la “doctrina de la neurona”, basada en que el tejido cerebral está compuesto por células individuales. Sus investigaciones originales sobre la estructura microscópica del cerebro lo convirtieron en un pionero de la neurociencia moderna y sus trabajos han servido de inspiración a generaciones de pensadores e investigadores posteriores. Frases como “mientras el cerebro sea un misterio, el universo continuará siendo un misterio” o “las neuronas son como misteriosas mariposas del alma, cuyo batir de alas quién sabe si esclarecerá algún día el secreto de la vida mental”, reflejan un objetivo pendiente desde sus días, como es comprender los mecanismos que subyacen a los procesos mentales [1].

En ese mismo año, 1906, se produjo el fallecimiento de la primera paciente identificada con enfermedad de Alzheimer (AD, del inglés *Alzheimer Disease*), cuya patogenia sigue sin estar esclarecida por completo a día de hoy. El psiquiatra alemán Alois Alzheimer conoció en el año 1901 a Auguste Deter, una mujer de 51 años con un cuadro clínico que no encajaba con ninguna patología descrita hasta la época.

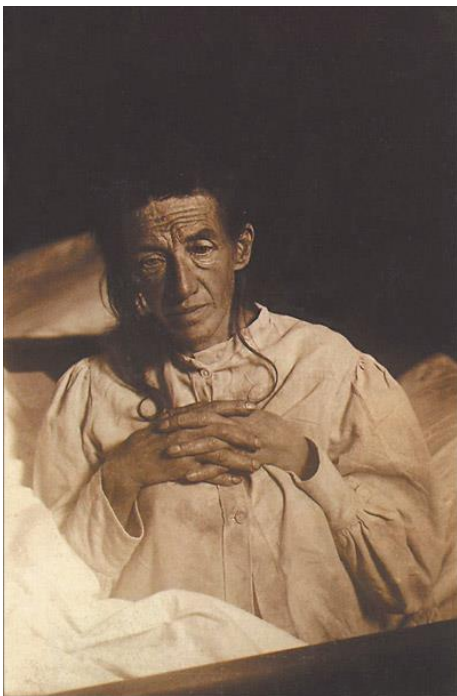


Figura 1.1. La paciente Auguste Deter. [2]

“Uno de los primeros síntomas fue un fuerte sentimiento de celos hacia su marido. Pronto mostró progresivos fallos de memoria, no podía encontrar el camino a casa, arrastraba objetos sin sentido, se escondía, o a veces pensaba que otras personas querían matarla, de forma que empezaba a gritar”.

“Durante su internamiento, sus gestos mostraban una completa impotencia. Estaba desorientada en espacio y tiempo. De cuando en cuando decía que no entendía nada, que se sentía confusa y totalmente perdida. A veces consideraba la llegada del médico como la visita de un funcionario y pedía perdón por no haber acabado su trabajo, mientras que otras veces comenzaba a gritar por temor a que el médico quisiera operarla.

En ocasiones lo despedía completamente indignada, chillando frases que indicaban su

temor a que el médico quisiera herir su honor. De vez en cuando estaba completamente delirante, arrastrando las mantas de un lado a otro, llamando a su marido y a su hija, y con aspecto de tener alucinaciones auditivas. Con frecuencia gritaba durante horas y con una voz horrible”.

“La regresión mental avanzó gradualmente. Tras cuatro años y medio de enfermedad, la paciente falleció. Al final estaba completamente apática y confinada a la cama, donde adoptaba una posición fetal” [3].

Alois Alzheimer la siguió desde 1901 hasta su fallecimiento en 1906, cuando pudo examinar su cerebro al microscopio, el cual fue teñido con una tinción de plata denominada “de Bielschowsky”, mostrando unas estructuras particulares o neurofibrillas, que posteriormente se demostró como una estructura característica de los cerebros de sujetos con la patología que pasó a recibir la denominación de Alzheimer. Así, en el interior de las neuronas se observaron una o varias fibras únicas prominentes por su grosor e impregnabilidad. Estudios posteriores demostraron que en estadios más avanzados de la enfermedad, se aprecian muchas fibrillas en paralelo con los mismos cambios, acumulándose hasta formar densos haces que avanzaban de forma progresiva hasta la superficie de la célula [4]. Finalmente, Alzheimer también describió un conjunto de haces de fibrillas, sin núcleo ni citoplasma en algunas ocasiones, en el lugar donde había existido una neurona.

Entre un cuarto y un tercio de todas las neuronas de la corteza cerebral, mostraban alteraciones en la tinción de sus neurofibrillas, coloreándose de un modo diferente respecto de las neuronas normales. Esto parecía indicar que se había producido una transformación química de la sustancia fibrilar, sobreviviendo así las fibrillas a la destrucción de la célula. Su transformación química, podía ser la razón por la que sobrevivían a la destrucción celular, coincidiendo con el almacenamiento de un producto patológico todavía desconocido en aquella época, fruto de un metabolismo neuronal alterado [3].

Como adelantamos, durante los siguientes años fueron reportados casos similares, siendo categorizada por primera vez la patología como “enfermedad de Alzheimer” por Emil Kraepelin. A lo largo del siglo XX se ha ido perfilando el diagnóstico respecto al curso clínico de la enfermedad y confirmación neuropatológica *post mortem* [4]. La AD es el principal tipo de demencia y se engloba dentro de las denominadas enfermedades neurodegenerativas, que constituyen un grupo heterogéneo de patologías que afectan al sistema nervioso central (CNS, del inglés *Central Nervous System*) [5].

La AD se está convirtiendo en la epidemia del siglo XXI ya que se encuentra ligada al envejecimiento de la población. La mejora en las condiciones de vida y en los sistemas sanitarios han condicionado un aumento en la supervivencia, y con ello un incremento en la prevalencia de patologías asociadas a la edad. Por ello, cabe esperar un aumento muy significativo del número de personas con deterioro cognitivo y demencia. Este hecho supondrá un reto de preocupantes dimensiones sociosanitarias en las próximas décadas [6], tanto en el ámbito nacional como internacional, proyectándose como el grupo de enfermedades con mayor impacto en términos de prevalencia y gasto del presupuesto. Actualmente, más de 50 millones de personas en el mundo padecen demencia senil [7], lo que extrapolado al año 2050 será superior a 130 millones. La mayoría de estas personas recibe un diagnóstico tardío, lo que genera un retraso en el inicio de tratamiento [8], con consecuencias negativas sobre la evolución y el pronóstico.

1. La enfermedad de Alzheimer

La demencia tipo Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa progresiva de etiología multifactorial, que se manifiesta como deterioro cognitivo y trastornos conductuales. Provoca la alteración de múltiples funciones corticales superiores, incluyendo la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio. Suele tener una duración media aproximada de 10 años tras el diagnóstico, aunque esto puede variar en proporción directa con la severidad de la enfermedad en el momento de su detección [9].

Por otro lado, es la forma más común de demencia, con una prevalencia del 50-60% sobre el resto de las enfermedades que cursan con demencia. Además, muestra un aumento exponencial con la edad, afectando al 24-33% de la población mayor de 85 años [10], y representa la quinta causa de muerte más frecuente en la población mundial [7]. La prevalencia en Europa es del 5,1%, mientras que la prevalencia por sexo es del 3,3% en los hombres y del 7,1% en las mujeres, con igual tendencia creciente con el aumento de la edad [11].

Si miramos hacia el futuro, esperamos un aumento en la esperanza de vida, y por consiguiente un aumento de personas que alcancen la edad crítica para desarrollar esta patología. De este modo, si no se encuentra un tratamiento que frene o cure su evolución, en el año 2050 puede que 1 de cada 85 personas en el mundo padezcan la enfermedad [12].

Teniendo en cuenta la larga duración de la AD, el estado de discapacidad y dependencia que genera, además de la carga social y económica que implica, es evidente que existe una necesidad de progreso científico en el campo de los trastornos neurodegenerativos, especialmente de aquellos asociados al envejecimiento.

1.1. Características patológicas

Las características clínicas definitorias de la AD son la manifestación de un funcionamiento deficiente de algunos de los elementos que constituyen el SNC, como consecuencia de variaciones progresivas que se desarrollan durante años. La causa de estas modificaciones no es del todo conocida, pero se han demostrado cambios a nivel molecular que tienen repercusión a nivel celular, estructural y funcional [13].

A nivel estructural, la AD afecta en primer lugar al sistema límbico, más concretamente al hipocampo, lo cual provoca el deterioro de la memoria y cambios en el estado de ánimo. Después, afecta a la corteza cerebral, condicionando la dificultad para controlar las emociones e impidiendo la realización de actividades básicas de la vida diaria como comer o el aseo personal. Finalmente, en etapas avanzadas de la enfermedad afecta el tronco del encéfalo, alterando el funcionamiento de múltiples órganos y de determinados reflejos necesarios para la supervivencia (como la deglución), llevando al individuo a situaciones que pueden ser incompatibles con la vida [14].

A nivel molecular, la enfermedad se caracteriza por la formación de depósitos proteínicos extracelulares (placas amiloides) e intracelulares (ovillos neurofibrilares) [15], los cuales se relacionan con la pérdida neuronal y sináptica, así como con la proliferación de astrocitos en el área cercana a las neuronas degeneradas (astrocitosis).

También puede observarse angiopatía amiloide [16] cuando los depósitos son vasculares, así como inclusiones de tipo cuerpos de Lewy [17], favoreciendo todo ello la activación de mecanismos de inflamación con implicación de otro elemento glial, la microglía [18].

Las placas amiloides son depósitos extracelulares compuestos principalmente por el péptido β -amiloide ($A\beta$), rodeados de neuritas distróficas, astrocitos y microglía;

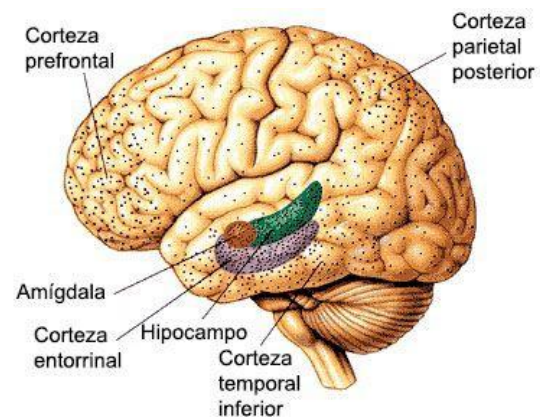


Figura 1.2. Distribución de las placas seniles y los ovillos neurofibrilares en fases avanzadas de la AD. [14]

mientras que los ovillos neurofibrilares son agregados intracelulares formados por la forma hiperfosforilada de la proteína tau (P-tau), una proteína que se encuentra asociada a los microtúbulos (Figura 1.3).

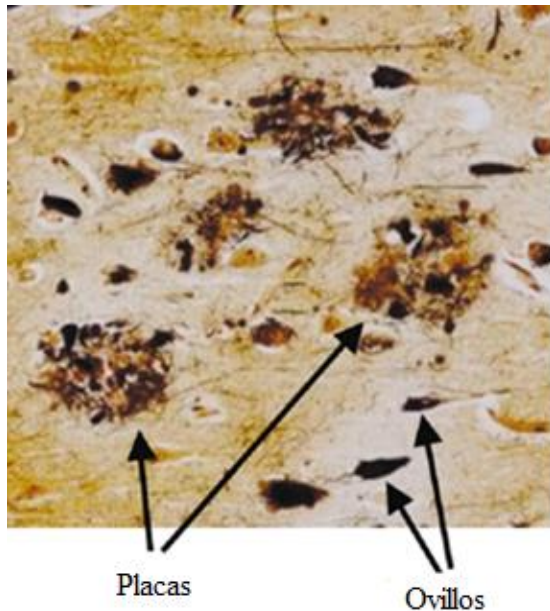


Figura 1.3. Placas y ovillos en corteza cerebral de cerebro con la AD. [10]

Ambos tipos de depósitos proteináceos son una característica distintiva de la AD, y el estudio de los mecanismos patogénicos que conllevan a estos cambios son el objetivo principal en la investigación de la enfermedad [10]. Según la hipótesis amiloidogénica, aquella que despierta mayor consenso en el campo, la sobreproducción/agregación de los péptidos A β sería la causa primigenia y desencadenante de la patología, activando la cascada de cambios patológicos que siguen a continuación, como la disfunción sináptica y la pérdida neuronal en las áreas afectas [19]. Los mecanismos de interrelación entre

el metabolismo amiloide y la fosforilación de tau siguen sin ser descifrados, y son materia de controversia.

1.1.1. Formación de placas amiloides

Tal y como se ha comentado con anterioridad, el componente principal de las placas amiloides es la proteína A β , un fragmento proteolítico pequeño de unos 4 kDa generado a partir de la proteína precursora amiloide (APP, del inglés *amyloid precursor protein*) [15], que tiene un tamaño aproximado de unos 100-120 kDa. Se trata de una proteína transmembrana de tipo I con un tiempo corto de residencia en la membrana plasmática, siendo rápidamente procesada, por vías alternativas, a través de proteasas conocidas como secretasas. Estas secretasas actúan de manera secuencial. En la conocida como vía amiloidogénica, que es la responsable de la generación del péptido A β , actúan la β - y la γ -secretasa, mientras que en la vía no amiloidogénica, vía que no genera A β , la APP es procesada por la α - y la γ -secretasa. Ambas vías coexisten en condiciones fisiológicas normales, así como con otras vías alternativas. Todos estos aspectos serán tratados con detalle más adelante.

De este modo, el péptido A β se produce de forma constitutiva durante el metabolismo celular normal, y puede encontrarse como péptido circulante en el líquido cefalorraquídeo (CSF, del inglés *cerebrospinal fluid*) de humanos y otros mamíferos, así como en plasma y otros fluidos [20]. La mayor parte del A β total producido por las células se encuentra en su forma mayoritaria, que es la de A β 40 (40 aminoácidos), y en menor proporción en su forma más larga que es la de A β 42 (42 aminoácidos). También se han descrito formas menores con distinta longitud de aminoácidos [21].

La forma A β 42 es la que mayor capacidad tiene de formar agregados y se cree que puede ser la responsable del inicio de la formación de oligómeros [22]. Los agregados de las distintas especies de A β finalmente formarán fibras y placas amiloides, cosa que sucede cuando éste se genera en altas concentraciones y es potencialmente coadyuvado por otros factores por determinar. Los estudios inmunohistoquímicos han revelado que las especies “largas” de A β (A β 40 y A β 42) tienen diferente distribución en los depósitos cerebrales respecto a otras isoformas más cortas. De hecho, mientras que la angiopatía amiloide y las placas seniles están constituidas por péptidos A β cortos y largos, el principal componente de las placas difusas parece ser el A β 17 [23]. En definitiva, las especies “largas” de A β y particularmente los oligómeros de A β 42 son las que se asocian al desarrollo y progresión de la AD.

1.1.2. Formación de ovillos neurofibrilares

Estos depósitos intracelulares se componen principalmente por la proteína citoesquelética tau en su forma hiperfosforilada, P-tau. Tau es una proteína axonal soluble que se une a los microtúbulos, y sus funciones son promover el ensamblaje y estabilizarlos a través de su unión a la tubulina. También mantiene el citoesqueleto neuronal, con la finalidad de garantizar el transporte de proteínas axonales [24][25].

La proteína tau es codificada por el gen *MAPT* y en humanos se localiza en el cromosoma 17, pudiendo ser objeto de procesamiento alternativo para generar distintas isoformas. En su región carboxilo terminal, presenta 3-4 dominios repetidos en tándem de unión a microtúbulos, cuya secuencia de aminoácidos está altamente conservada y es codificada por los exones 9-12. Así, su estructura puede combinarse con microtúbulos a través de dicho dominio, y anclarse al citoesqueleto o a la membrana celular a través del dominio amino terminal, variable en sus insertos entre las isoformas de tau [26]. La fosforilación de los residuos de serina y treonina, que flanquean el dominio de unión a

microtúbulos de tau, regula sus interacciones con tubulina e influye en su estado conformacional [27][28]. De este modo, la actividad biológica de tau está regulada por su grado de fosforilación, y dicha fosforilación está a su vez regulada por el equilibrio entre múltiples quinasas como la GSK-3 β (del inglés *glycogen synthase kinase 3*) y la Cdk5 (del inglés *cyclin dependent kinase 5*), y por fosfatasas como PP-1 y PP-2A (del inglés *protein phosphatase 1 y 2A*).

En las neuronas, la fosforilación y desfosforilación de la proteína tau se encuentra en un equilibrio dinámico. Sin embargo, en las neuronas de los sujetos con la AD la proteína tau aparece hiperfosforilada de manera anormal; hasta en 30 residuos de serina/treonina, y mostrando una solubilidad alterada [29]. Esta hiperfosforilación de tau se produciría como consecuencia de un desequilibrio entre las quinasas y fosfatasas ya

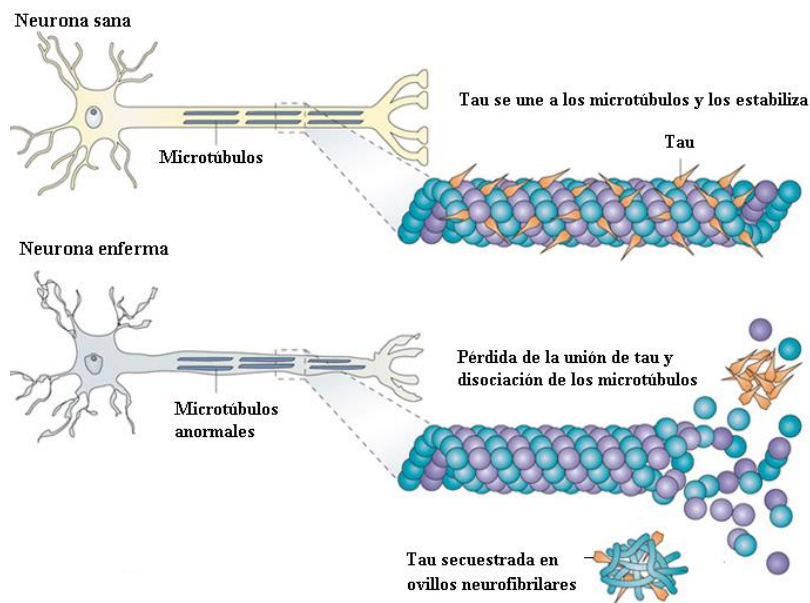


Figura 1.4. Esquema de la proteína tau y su función en los microtúbulos en neurona sana y en neurona enferma de AD.
[32]

comentado, provocando isoformas de P-tau que no realizan adecuadamente su función de ensamblaje de microtúbulos, dando lugar a alteraciones en el citoesqueleto y en el transporte axonal [30]. A su vez, P-tau secuestra a la proteína tau normal y otras proteínas asociadas a microtúbulos, comenzando a agregarse en fibras insolubles y formando los ovillos neurofibrilares (Figura 1.4.). Esta hiperfosforilación patológica está asociada a otras modificaciones tales como glicosilación y ubiquitinación. Tanto la pérdida de estabilidad de microtúbulos, como la formación de ovillos causan alteraciones en la función neuronal y sináptica [10].

La opinión mayoritaria en el campo, pero también controvertida, es que un metabolismo anormal amiloide con la generación de exceso de oligómeros de A β , actúa como desencadenante para promover la activación de la vía que induce la

hiperfosforilación de tau. Al mismo tiempo, tau también influye en la formación de A β , creando un bucle pernicioso que desencadena la patología [31].

1.2. La proteína APP

Tal y como se ha descrito con anterioridad, el péptido A β [33] se genera a través del procesamiento de APP, una glicoproteína transmembrana de tipo I. El gen de esta proteína está localizado en el cromosoma 21 y contiene 18 exones [34]. Se trata de una proteína ubicua cuyo gen es objeto de un procesamiento alternativo, pudiéndose distinguir tres isoformas principales en el CNS: APP695, APP751 y APP770 que están formadas por 695, 751 y 770 aminoácidos respectivamente.

La APP695, que excluye los exones 7 (dominio inhibidor de la proteasa Kunitz o KPI) y 8 (dominio del antígeno Ox-2), es la forma transcrita mayoritariamente en neuronas [35]. La APP751 (sin el exón 8) y la APP770 (con los exones 7 y 8) son identificables en el CNS asociadas a tejido endotelial y vascular, pero también en la glía [36]. Las formas largas APP751 y APP770 son comúnmente conocidas como formas KPI. En otros tejidos también se han descrito otras variantes de APP como la formas APP639 [37], y las APP677, APP696, APP733, APP752, estas últimas todas carentes del exón 15 [38].

1.2.1. Maduración y tráfico intracelular de APP

APP, como proteína transmembrana de tipo I, posee un extremo corto carboxilo terminal hacia el citosol, mientras que su dominio extracelular amino terminal es mucho más largo. El dominio A β abarca parte del dominio transmembrana y del extracelular, por lo que al generarse por procesamiento proteolítico quedaría soluble. La APP se sintetiza en el retículo endoplásmico (ER, del inglés *endoplasmic reticulum*), y como otras glicoproteínas de membrana se transporta a la misma a través de la red de Golgi [39]. Durante su transporte, la proteína APP sufre varias modificaciones co- y postraduccionales que incluyen glicosilación, fosforilación, ubiquitinación y sulfataciones de tirosina [40]. Las alteraciones en las modificaciones postraduccionales pueden determinar una vía preferente de ulterior procesamiento proteolítico. La vía amiloidogénica se ve favorecida como resultado de la retención elevada de APP en compartimentos de pH ácido como los endosomas, mientras que un rápido tránsito a membrana y/o disminución de su internalización desde la superficie celular promueve el procesamiento de APP por la vía no amiloidogénica (Figura 1.5.) [41]. Así, existen

evidencias de que la O-glicosilación de APP, por adición de un residuo N-Acetilglucosamina (GlcNAc), favorece su procesamiento proteolítico no amiloidogénico, propiciando la acción de la α -secretasa [42]. Aumentos en la glicosilación por O-GlcNAc, como los propiciados por la prostaglandina J2 (un mediador endógeno de la inflamación) parecen disminuir la cantidad de APP que sería degradada por el proteosoma [43]. Del mismo modo, la glicosilación de APP mediada por la glucosiltransferasa de tipo mucina GalNAc-T6 (*polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6*), que parece glicosilar APP muy cerca del sitio de escisión por la β -secretasa o BACE1, previene el procesamiento amiloidogénico y por tanto la generación de A β [44]. Los procesos de glicosilación recibirán un tratamiento más detallado en el apartado 1.2.4.

El tráfico intracelular de APP también se regula por interacciones a través del dominio citosólico de diferentes adaptadores intracelulares, pudiendo dar como resultado una mayor o menor generación de A β [41][45].

Por último, se sabe que la APP se localiza en la membrana en forma de dímeros, y que el propio proceso de dimerización en fracciones subcelulares determina también la vía de procesamiento proteolítico [46]. El conocimiento de los mecanismos relacionados

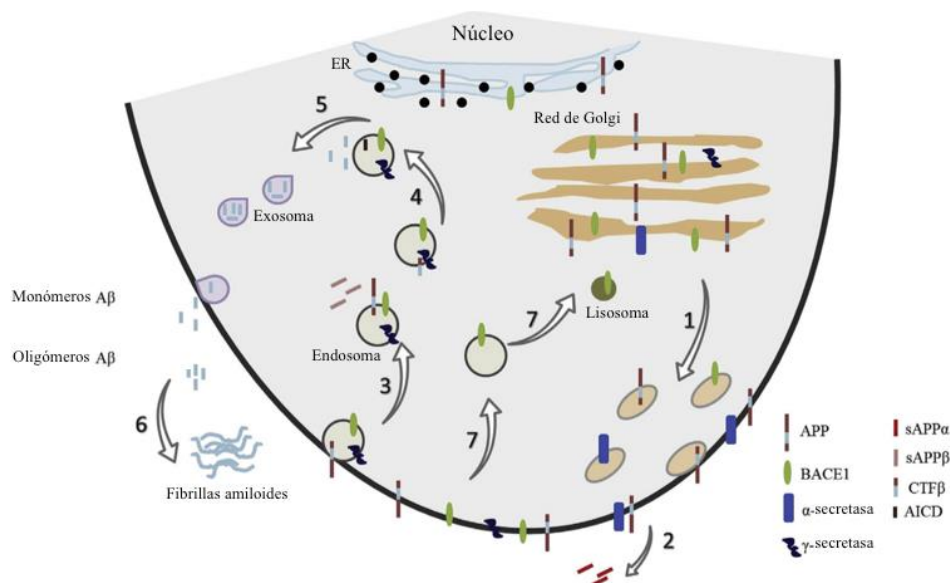


Figura 1.5. Transporte de APP. (1) Las proteínas APP, BACE1, α -y γ -secretasas recién sintetizadas son transportadas a la membrana plasmática. (2) La APP es proteolizada en la membrana plasmática por la α -secretasa liberando sAPP α . (3) La APP, BACE1 y la γ -secretasa se internalizan en endosomas tempranos desde la superficie celular, donde APP es proteolizada en primer lugar por BACE1. (4) El sAPP β se libera en el lumen mientras que el CTF β es proteolizado por la γ -secretasa. (5) Los péptidos A β se liberan fuera de la célula en exosomas. (6) Los péptidos A β acumulados forman fibrillas amiloides. (7) BACE1 también se puede procesar en la red de Golgi y los lisosomas, favoreciendo el procesamiento no amiloidogénico. Imagen original tomada de Yuksel [34]

con la maduración/transporte de APP y su dimerización, podrían proporcionar nuevas dianas terapéuticas potenciales para el tratamiento de la AD.

1.2.2. Procesamiento de APP

Como se ha comentado en repetidas ocasiones, la APP se procesa por dos vías principales, la amiloidogénica y la no amiloidogénica. En la membrana plasmática esta proteína es cortada por la α -secretasa iniciando la vía no amiloidogénica. Mediante un mecanismo por esclarecer, puede internalizarse dentro de vesículas recubiertas de clatrina a través de la vía endosómica o lisosómica y ser procesada por BACE1 [47][48]. A día de hoy, todavía se discute si la región subcelular donde se localiza la APP es el determinante último de la vía de procesamiento, puesto que puede procesarse incluso en su tránsito a membrana. Una vez en la membrana plasmática, su localización en balsas lipídicas y otros múltiples factores también pueden determinar la vía de procesamiento [34].

De cualquier modo, siguiendo la hipótesis más consensuada, el procesamiento amiloidogénico comienza con la internalización de APP en endosomas, que también concierne a la proteína transmembrana BACE1 [49]. El procesamiento por BACE1 determina la generación de un fragmento soluble largo de APP N-terminal denominado sAPP β , y un fragmento que contiene el dominio C-terminal y que permanece anclado a la membrana (denominado CTF β de C-terminal β , o C99 refiriéndose a la longitud en aminoácidos). Tras este primer corte, actuaría la γ -secretasa sobre el CTF β generando dos fragmentos solubles, el A β , y un fragmento denominado APP-ICD (por el dominio intracelular), este último es soluble en el citosol. La γ -secretasa no corta APP en una secuencia consenso, pudiendo procesar el CTF β de APP en múltiples sitios, generando así diferentes isoformas del péptido A β de distinta longitud (A β 36/A β 43) [50][51], siendo la isoforma A β 42 la más amiloidogénica y asociada con la progresión de la AD. Resulta llamativo que durante la progresión de la AD, la concentración de A β 42 incrementa en el cerebro de los pacientes con Alzheimer debido a un aumento en su producción y/o deficiencia en mecanismos de degradación. Sin embargo, los niveles de A β 42 y A β 40 en el CSF de pacientes con la AD disminuyen, presumiblemente debido a que A β queda secuestrado en las placas y no trasvasa al CSF. En este contexto, con dos dinámicas jugando en direcciones opuestas, aumento de producción y aumento de deposición, la interpretación de los cambios en los niveles de A β en el CSF, particularmente en las etapas presintomáticas de la enfermedad, resulta complicada [52].

Como se ha comentado, parece que los péptidos A β se generarían tras su internalización, pero independientemente de esto, no se puede descartar la acción de secretasas en otras regiones subcelulares [47][53][54]. De cualquier modo, los péptidos A β podrían ser secretados fuera de la célula directamente o en exosomas [55], y finalmente las formas tóxicas serían las causantes de la formación de oligómeros. Estos oligómeros son los que tras formar protofibrillas y fibrillas finalmente se acumularían como placas seniles [56].

No obstante, se asume que en condiciones fisiológicas, aunque se produzca la vía amiloidogénica, la mayoría de moléculas de APP son proteolizadas por la vía no amiloidogénica sin generarse A β . La vía no amiloidogénica comienza en la membrana plasmática en la que reside la α -secretasa, aunque algunos estudios apuntan al procesamiento incluso durante su tráfico a la membrana. En el cerebro, la principal α -secretasa parece ser ADAM10, aunque otras metaloproteasas han demostrado también esta actividad [57].

La α -secretasa corta la APP en una región cercana a la acción de BACE1, pero en este caso, al tratarse de un dominio transmembrana situado en una región más interna, incluye parte de la secuencia que correspondería al A β , por lo que su acción imposibilita la generación del péptido. De este modo, la α -secretasa libera un fragmento soluble largo de APP N-terminal denominado en este caso sAPP α , y un fragmento que permanece anclado a la membrana denominado CTF α o C83 (por su longitud de 83 aminoácidos). El ulterior procesamiento del CTF α por la γ -secretasa genera un péptido de 3 kDa denominado p3 sin propiedades amiloidogénicas, y un ICD soluble intracelular [58] (ver Figura 1.6.).

Por tanto, la decisión sobre la vía de procesamiento de la APP depende en gran medida de su ubicación subcelular, y en consecuencia, de la vecindad de APP con según que secretasas [41].

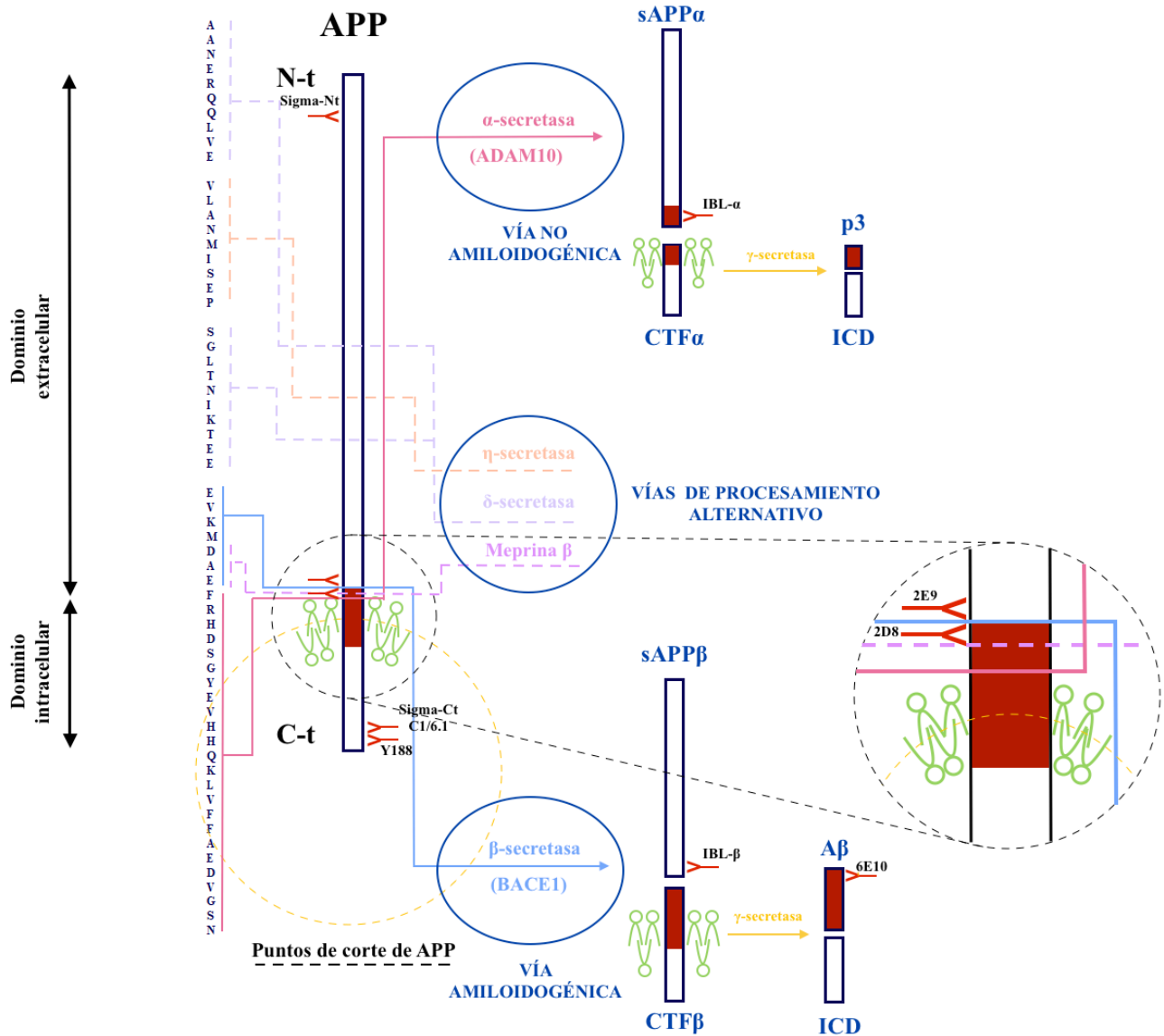


Figura 1.6. Procesamiento de la proteína precursora amiloide. Representación esquemática del procesamiento de APP por la α/γ -secretasa (vía no amiloidogénica) y la β/γ -secretasa (vía amiloidogénica). En la imagen se pueden observar la formación de los fragmentos grandes extracelulares solubles, sAPP α y sAPP β , del péptido A β y p3, más cortos, así como la formación de los fragmentos que contienen la región C-terminal de APP (CTF e ICD) (no representado a escala). Además, se muestran los puntos de corte de APP por las diferentes secretasas. También están representados los anticuerpos utilizados en esta tesis, así como sus sitios de unión.

1.2.3. Vías alternativas de procesamiento de APP

Recientemente se han descubierto nuevas proteasas/secretasas que procesan alternativamente APP y pueden determinar la generación de A β . La posibilidad de la participación de estas secretasas en la neurodegeneración puede comenzar una nueva etapa en la investigación de tratamientos contra la AD [34].

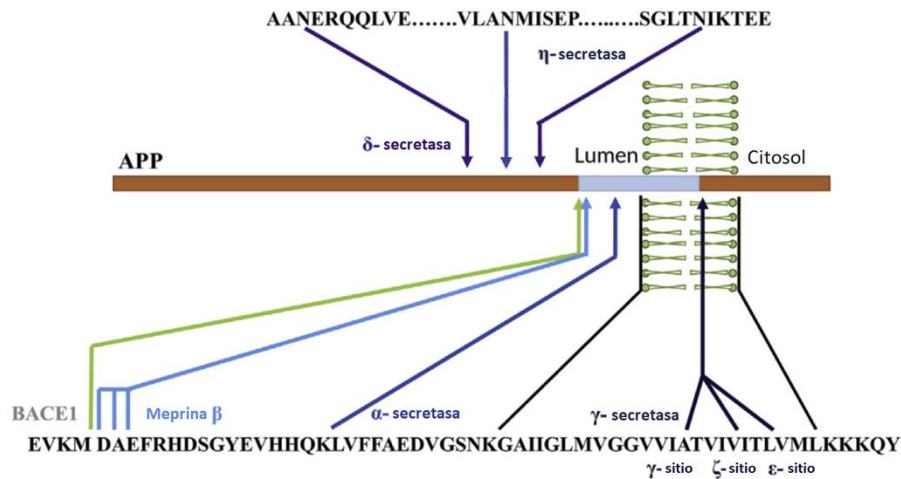


Figura 1.7. Puntos de corte de la proteína APP. Representación de APP y sus distintos puntos de corte a través de los cuales es proteolizada mediante diversas secretasas. Estas secretasas actúan en cada una de las vías de procesamiento conocidas hasta el momento (según se indica en Figura 1.6.). Se documenta el procesamiento proteolítico para la γ -secretasa en el sitio habitual γ , y en los alternativos ϵ (46 aminoácidos) y ζ (48-49 aminoácidos), que originalmente generan formas más largas de A β que sufren un recorte sucesivo cada 3-4 aminoácidos por el mismo complejo. Imagen original tomada de Yuksel [34].

A. Meprina β

La meprina β es una metaloproteasa dependiente de zinc que se encuentra localizada en variedad de tejidos. Es capaz de procesar APP, bien en el mismo sitio que BACE1 (dando lugar también a la generación de A β), o bien dentro de la la región N-terminal del A β , generando péptidos de 11 y 20 kDa, los cuales han sido hallados en tejido cerebral humano en condiciones no patológicas (Figura 1.7.). De este modo, la meprina β es también conocida como β -secretasa alternativa [59][60]. La posible participación de meprina β en la patología amiloide se apoya en el hallazgo de niveles aumentados de ARN mensajero (ARNm) en cerebros *post mortem* de pacientes con AD [61]. También se ha demostrado que la meprina β compite con ADAM10 por el procesamiento de APP en la superficie celular [60].

B. η -secretasa

La enzima conocida como η -secretasa procesa APP en regiones más alejadas del dominio A β (en los aminoácidos 504–505 de APP695), generando un extremo N-terminal largo, pero más corto que los ya mencionados sAPP α y sAPP β , y un CTF η (C191) de aproximadamente unos 25 kDa (Figura 1.7.). El procesamiento posterior de este CTF η ocurre por ADAM10 o BACE1 liberando péptidos denominados α -A η y β -A η , respectivamente [62]. Se ha determinado que la generación del CTF η por η -secretasas podría estar mediado por la metaloproteasa MT5-MMP (enzima de matriz ligada a la

membrana), que previamente se demostró que posee la capacidad de escindir APP *in vitro* [63][62]. También se ha demostrado que el CTF η aumenta en un modelo de ratón transgénico APP/PS1 (el denominado APPS1-21), y en los cerebros humanos con la AD. Además, la potenciación a largo plazo se ve significativamente atenuada *ex vivo* en rodajas de hipocampo tratadas con péptidos α -A η [62]. La investigación adicional realizada mediante el uso de ratones transgénicos 5 \times FAD (del inglés *Familiar Alzheimer Disease*) respalda el efecto de la η -secretasa en la patología amiloide, la neuroinflamación y el deterioro cognitivo [64][65]. Además de MT5-MMP, la metaloproteasa MT1-MMP también se ha descrito recientemente como proamiloidogénica. *In vitro* MT1-MMP, aumenta la producción de A β y CTF β (lo cual conlleva una acción posterior de BACE1) en un proceso que implica la modulación del tráfico de APP [66]. Estos estudios resaltan la importancia de considerar ciertas metaloproteasas como potenciales dianas para la AD.

C. δ -secretasa

La conocida como δ -secretasa es una endopeptidasa de asparagina que también escinde APP en su dominio N-terminal (residuos Asn373 y Asn585 de APP), y que curiosamente también puede procesar tau [67] (Figura 1.7.). La δ -secretasa parece que interactúa con APP en los endosomas. Además, la escisión de APP por esta secretasa facilitaría el procesamiento posterior de APP por BACE1, lo que llevaría a un aumento en la generación de A β . Un estudio original sobre los niveles de δ -secretasa en cerebros con la AD respaldó su papel amiloidogénico [67]. En otro estudio del mismo grupo, se reveló una mejora de las funciones cognitivas de los ratones 5 \times FAD tras el tratamiento con un inhibidor de la δ -secretasa bioactivo y permeable al cerebro [68]. Este grupo también ha demostrado recientemente la capacidad del procesamiento por δ -secretasa de tau, correlacionándolo con la producción de A β [69].

D. Catepsina B

La catepsina B es una cisteína proteasa lisosómica que se identificó por primera vez en las placas seniles de cerebros *post mortem* de sujetos con la AD [70]. Investigaciones posteriores han demostrado niveles reducidos de A β y una mejora en la función de la memoria tras la inhibición de la catepsina B o su delección genética [71][72][73][74]. Asimismo, se ha determinado que los niveles de catepsina B se encuentran elevados en el plasma de pacientes con la AD en comparación con controles sanos [75]. Estos experimentos llevaron a proponer la catepsina B como una nueva β -secretasa. Al contrario, otros estudios mostraron una disminución de la expresión de catepsina B en monocitos de personas con la AD [76], así como un aumento de los niveles de A β en

ratones transgénicos modelo de la AD tras la inhibición de la catepsina B [77][78]. Estos resultados contradictorios fueron respaldados por un estudio reciente en el que las inyecciones en el hipocampo de ratones transgénicos APP/PS1 con adenovirus que expresaban catepsina B, redujeron la patología amiloide en estos ratones, que también mostraron mejoras de aprendizaje y comportamiento [79]. En este complejo escenario, también se ha demostrado que la catepsina B, puede desempeñar un papel en la inducción de neuroinflamación mediada por microglía tras la exposición sistémica de ratones al lipopolisacárido de la bacteria periodontal *Porphyromonas gingivalis* encontrada en el cerebro de pacientes con la AD; lo que sugiere que la catepsina B es un posible objetivo terapéutico en el tratamiento de la AD asociada a periodontitis [80]. Estos resultados contradictorios apuntan a la necesidad de una mayor investigación sobre el papel de la catepsina B en la patología amiloide.

En resumen, resulta imprescindible ampliar nuestro conocimiento sobre mecanismos fisiopatológicos adicionales a las vías clásicas de procesamiento de APP, con el fin de definir estrategias adecuadas de tratamiento complementario o alternativo.

1.2.4. Glicosilación de proteínas y su relación con el Alzheimer

La glicosilación es una de las formas más comunes y complejas en cuanto a modificación co/postraduccional de las proteínas. Se trata de la unión covalente de ciertos residuos glucídicos a algunos aminoácidos específicos de las proteínas. Es un proceso conservado en términos evolutivos que tiene lugar en mamíferos, equinodermos, gusanos, insectos, protozoos, y ciertos tipos de hongos. Según el enlace químico formado entre los residuos de aminoácidos y el azúcar, se puede clasificar como:

- **N- glicosilación:** se forma entre el grupo amino de la cadena lateral de un residuo de asparagina (Asn), que pertenece a la secuencia consenso o específica Asn-X-Ser/Thr, siendo X cualquier aminoácido que no sea prolina, y la N-acetilglucosamina (GlcNAc) de la cadena del oligosacárido del ciclo del dolicol-fosfato, por lo que siempre hablamos de cadenas ramificadas de azúcares. Ocurre a nivel cotraduccional en el ER y termina en el aparato de Golgi.
- **O- glicosilación:** se produce en una etapa más tardía de la maduración de las proteínas, cuando estas ya están casi totalmente plegadas, y ocurre en el aparato de Golgi. La unión del azúcar se lleva a cabo en el grupo hidroxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos serina o treonina, así como de

tirosina. El primer azúcar de la cadena de oligosacáridos que se enlaza, suele ser N-acetilgalactosamina (GalNAc), pero también se da con GlcNAc, xilosa, manosa, etc. Se pueden añadir más residuos de azúcar con posterioridad, de uno a uno, y con diferentes tipos de enlaces, dando como resultado diferentes O-glicanos con estructura ramificada compuestos generalmente por pocos residuos de monosacáridos. De manera particular, los mucina-O-glicanos son usualmente O-glicoproteínas (GalNAc) enlazadas a una serina de una alta complejidad estructural, las cuales parecen estar implicadas en la secreción de materiales para formar la matriz extracelular y resultan importantes determinantes antigénicos [81]. Existen proteínas O-glicosiladas en todos los compartimentos principales de la célula, como en las membranas, citoplasma, mitocondrias y núcleo [82][83].

La correcta glicosilación desempeña un papel crítico en muchos procesos celulares en los que participan las glicoproteínas en cuestión, incluida la señalización, transducción, degradación de proteínas y regulación de la expresión génica [84][85]. Se ha sugerido esta modificación proteica como potencial objetivo terapéutico para tratar la AD y otras enfermedades relacionadas con la apoptosis celular y autofagia [86][87][88][89].

A pesar de que se han observado alteraciones en la glicosilación de APP, P-tau y otras proteínas relevantes para el desarrollo de la patología en pacientes con la AD [90], en la actualidad no existe un consenso sobre la relevancia de estos hallazgos, y tampoco de si las alteraciones en la glicosilación son promotoras o consecuencias de la patología. No obstante, existe una creciente evidencia de la participación de glicoproteínas con glicosilación alterada en la patogenia de la AD, de hecho, se sabe que la formación de placas seniles y ovillos neurofibrilares está regulada parcialmente por la glicosilación de proteínas. En este contexto, diversos estudios demuestran que tanto la N- como la O-glicosilación de APP pueden regular el tráfico de esta proteína y disminuir la producción de A β [91]. También se ha observado que las dos proteasas requeridas para la generación del péptido A β , β - y γ -secretasa, también pueden modular la glicosilación de APP [92][93][94].

La glicosilación puede ser importante en la patogénesis de la AD, ya que el transporte a la membrana de APP y su correcto procesamiento podrían verse afectados por la forma en que la proteína APP esté glicosilada. Por lo tanto, una investigación con más detalle

de los procesos de glicosilación podría ser clave para la comprensión de la patogénesis de la AD, y para el desarrollo de métodos diagnósticos y terapéuticos [95].

1.3. Clasificación del Alzheimer

1.3.1. Según el estadio clínico

La evolución típica de la AD se divide en sucesivas fases en función de los síntomas habituales (cognitivos y funcionales) que se manifiestan. En este sentido, se suelen emplear dos sistemas para graduar la evolución de la enfermedad:

El primero de ellos, ha contemplado clásicamente tres fases en la demencia: **leve, moderada y grave**. Actualmente, se está realizando un intento generalizado por caracterizar la enfermedad en una **fase preclínica/prodrómica**, debido a la necesidad de estudiar tratamientos eficaces para la misma, que no han aportado buenos resultados cuando se aplican en el resto de los estadios [96].

El otro sistema, se basa en la **escala GDS** (Escala de Deterioro Global, del inglés *Global Deterioration Scale*). Ésta, considera la evolución de la cognición y la función cotidiana desde la normalidad de cualquier adulto hasta las últimas consecuencias de la AD, dividiéndose en **siete etapas**. Dado que la evolución de la enfermedad tiene un curso continuo, y lentamente progresivo, los límites de cada una de estas etapas no están bien definidos, pero permiten una graduación orientativa para su seguimiento. Está basada en la *Teoría de la retrogénesis*, según la cual, una persona con la AD va perdiendo las capacidades cognitivas y funcionales en orden inverso a como se adquieren, de forma natural, con el crecimiento y la maduración cerebral. Así, una de las capacidades afectadas en fases leves es la capacidad de gestionar el dinero, mientras que el control de esfínteres se pierde más tardíamente, al revés de cómo sucede en el desarrollo de un niño. Éstas son las características principales de cada fase (de la normalidad a los primeros indicios de deterioro cognitivo) [97]:

- **GDS 1 (Ausencia de déficit cognitivo):** normalidad cognitiva.
- **GDS 2 (Déficit cognitivo muy leve):** todas aquellas personas que, debido a la edad, presentan sutiles fallos de memoria, que o bien no son percibidas ni por el entorno familiar ni por el médico o, en cualquier caso, no se consideran relevantes y no son patológicas.
- **GDS 3 (Déficit cognitivo leve, MCI del inglés *Mild Cognitive Impairment*):** todas aquellas personas que presentan signos de deterioro cognitivo leve, como

pueden ser la desorientación en entornos no familiares, pérdida de objetos, dificultades para organizarse o para evocar palabras comunes o nombres de personas, así como la mala gestión de asuntos financieros, problemas para retener lo que ha leído o recordar a personas que ha conocido recientemente. Esta fase representa el punto intermedio entre la normalidad cognitiva y los primeros síntomas de demencia, siendo equivalente a la **fase preclínica**.

- **GDS 4 (Déficit cognitivo moderado):** se asocia a un nivel de deterioro cognitivo moderado y determina el diagnóstico de **demencia**. Se caracteriza por dificultades para llevar a cabo las tareas más complejas debido a problemas organizativos y de concentración, como por ejemplo dificultades para planificar un viaje u organizar una celebración familiar. Sin embargo, no tendrá problemas de orientación importantes, tanto en el tiempo como en lugares conocidos. Y reconocerá perfectamente a las personas que forman parte de su entorno.
- **GDS 5 (Déficit cognitivo moderadamente grave):** la persona afectada ya empieza a necesitar asistencia para realizar tareas cotidianas como elegir la ropa o preparar la comida. Tampoco es capaz de recordar datos simples y habituales, como su número de teléfono o dirección. Las dificultades de orientación ya son francas, tanto en el tiempo (el día, la hora), como saber el lugar en el que se encuentra. En general, conoce los nombres de sus allegados más próximos e identifica correctamente a las personas familiares.
- **GDS 6 (Déficit cognitivo grave):** el deterioro cognitivo se agrava y, con él, la alteración funcional en las actividades básicas, de manera que es incapaz de vestirse correctamente o cuidar su higiene personal sin ayuda, presentando problemas del control de esfínteres (urinarios al inicio e intestinales posteriormente). Además, presenta signos graves de desorientación, tanto en el tiempo como en el lugar y aparecen problemas de orientación respecto a su propia persona y biografía, pudiendo olvidar el nombre de sus allegados. Presenta cambios de personalidad y conducta, pudiendo desarrollar episodios de agitación, ansiedad, agresividad, delirios o alucinaciones.
- **GDS 7 (Déficit cognitivo muy grave):** es el estadio final de la enfermedad y se caracteriza por un deterioro cognitivo y funcional muy grave. La persona va perdiendo de manera progresiva la capacidad para hablar y comunicarse. A medida que esta fase avanza, el enfermo va necesitando ayuda para hacer todas las actividades cotidianas: comer, caminar o incluso mantenerse erguido [97].

Dentro de esta fase se pueden apreciar seis estadios en función de la severidad de los síntomas.

En la misma línea que la escala GDS, existen otros métodos que permiten realizar distintas clasificaciones clínicas de la enfermedad (como la escala FAST, MEC u otras similares, ver Anexo A). Uno de los más utilizados es el MMSE (del inglés, *Mini Mental State Examination*), que se basa en la elaboración de un test breve (de 5-10 minutos de duración). Con ello se consigue evaluar de forma rápida la existencia de un déficit cognitivo, pero no orienta sobre el dominio alterado ni sobre la causa del mismo. Puede realizarse en cada consulta para evaluar la variación de los síntomas y con ello la evolución del déficit en caso de que exista, siendo los resultados comparables entre sí. También permite medir la respuesta al tratamiento (ver apartado 2.2.).

1.3.2. Según la edad de inicio

A. Alzheimer presenil, temprano o de inicio precoz (EOAD, del inglés *Early-Onset AD*)

Se considera cuando comienza antes de los 60 años, aunque el rango varía en función de la fuente consultada [98][99]. Representa el 5% de los casos de la AD, y entre estos el 10-15% se debe a FAD (ver en el siguiente apartado). La mayoría de los casos restantes son AD esporádicos con una etiología genética compleja.

B. Alzheimer senil, tardío o de inicio tardío (LOAD, del inglés *Late-Onset AD*)

Debuta después de los 60-65 años. Representa el 95% de los casos [100], y aunque es esporádico en su inmensa mayoría, también pueden contribuir a su desarrollo diferentes factores de riesgo genéticos.

1.3.3. Según la implicación que tenga el factor genético

Desde un punto de vista genético la AD es un desorden heterogéneo, pudiendo clasificarse en dos subgrupos, familiar o esporádica, siendo la esporádica la más común:

A. Alzheimer genético o familiar (FAD)

La variante FAD es un desorden autosómico dominante que como se ha comentado con anterioridad, se manifiesta en la mayoría de los casos de manera más temprana al esporádico. Es causada por la mutación en alguno de estos tres genes: el gen de la propia APP situado en el cromosoma 21; el gen de la presenilina 1 (PS1) situado en el cromosoma 14; o el gen de la presenilina

2 (PS2) situado en el cromosoma 1. La PS1 o su homóloga la PS2, son las subunidades catalíticas del complejo γ -secretasa [99][101].

Los pacientes suelen desarrollar los síntomas de demencia entre los 30 y los 60 años dependiendo del tipo de mutación, y presentan un patrón semejante dentro de la familia. Algunos casos pueden tener una edad de inicio tardía. La FAD de inicio precoz representa menos del 2% de los casos y suele diagnosticarse antes de los 45 años [102]. Alrededor del 30-40% de los pacientes con inicio temprano de los síntomas tienen un aumento de la frecuencia de presentaciones atípicas, como alteraciones en dominios sin afectación de la memoria, incluyendo el plano ejecutivo, el lenguaje, el comportamiento y el plano visuoespacial [103][104][105].

La asociación de la proteína APP al desarrollo de la FAD parece clara. Tal y como se ha comentado con anterioridad, PS1 y PS2 son proteínas homólogas que participan en el complejo γ -secretasa, tanto en la vía amiloidogénica como en la no amiloidogénica. Sus mutaciones han sido consideradas cinéticamente como de ganancia, aunque también de pérdida de función, existiendo un consenso en asociarlas a un aumento en la relación $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ lo que parece ser determinante para el desarrollo de la patología. Aproximadamente un 10-15% de los casos de FAD de inicio precoz se deben a mutaciones en la APP, y un 70-80% o más en la PS1. Las mutaciones de la PS2 son raras, y hay que tener en cuenta que la PS1 es la que mayoritariamente forma parte del complejo γ -secretasa en el cerebro humano [106][107][108]. Hasta el momento, se han identificado aproximadamente 215 mutaciones patógenas para la PS1, 15 para la PS2 y 52 para la APP [102], aunque no se descarta que existan más genes causantes todavía sin identificar [107].

B. Alzheimer esporádico (LOAD)

La mayoría de la población que desarrolla la AD padece AD esporádico (sAD) comúnmente conocido como AD de inicio tardío (LOAD del inglés, *Late-Onset AD*), y cuyos síntomas generalmente aparecen a los 65 años o incluso en edad más avanzada.

LOAD no está determinado genéticamente (patrón de herencia no mendeliano), pero tiene un componente genético y además está influenciado por muchos factores de riesgo, tanto genéticos como no genéticos, entre los que se encuentran por supuesto la edad, la actividad física e intelectual, la

dieta, el peso corporal, la diabetes (especialmente diabetes tipo 2) y la hipercolesterolemia [109].

El componente genético se asocia con una heredabilidad estimada de hasta el 79% [110]. Entre los numerosos genes implicados en la patogénesis, aquél que se asocia a un mayor riesgo genético es el gen *APOE*, que codifica para la apolipoproteína E, y concretamente, como veremos más adelante, su variante alélica $\epsilon 4$ (ApoE4 [111]). En los últimos años se ha logrado un progreso sustancial a través de estudios de asociación a gran escala del genoma (GWAS, del inglés *Genome-Wide Association Studies*) en la búsqueda de factores de riesgo genético para la AD. En la tabla del Anexo B se muestra la actualización sobre el número conocido de genes y loci asociados a la AD. Hasta la fecha de redacción de la Tesis, se han identificado 43 genes/loci de susceptibilidad para LOAD, números que sin duda habrá que actualizar por la constante investigación en el campo.

El gen que codifica para ApoE se expresa y se secreta en el cerebro mayoritariamente en las células gliales (astrocito), y se puede determinar tanto en plasma como en CSF. ApoE participa en el transporte de colesterol y lípidos [111][112], estando presente dentro del CNS en forma de lipoproteínas, fundamentalmente de alta densidad (HDL).

Hasta el momento, se han descrito 3 variantes alélicas denominadas ApoE2, ApoE3, y ApoE4, que se diferencian entre ellas tan solo en un aminoácido. ApoE2 es la variante que ofrece una mayor protección contra la AD, pero también la menos común; mientras que ApoE4, cuya frecuencia es del 15% aproximadamente en el sur de Europa, se asocia a un mayor riesgo de sufrir la enfermedad [113]. Un solo alelo de ApoE4 condiciona que un individuo sea entre 2 y 3 veces más propenso a padecer Alzheimer, mientras que la presencia de 2 alelos resulta en un riesgo entre 8 y 12 veces superior al de la población general [114][112][106]. El genotipo ApoE3/3 es el más común en la población, con una frecuencia poblacional de 75-80%. La forma en la que una variante u otra afecta al riesgo de desarrollar la enfermedad se desconoce, pero se ha sugerido que la proteólisis de APP y el aclaramiento de $A\beta$ se ven afectados por los niveles de ApoE y colesterol en suero [115][116][117]. De hecho, niveles altos de colesterol sérico se correlacionan con la AD [118][119]. Así, ApoE4 se ha asociado directamente con una

reducción en la eliminación de A β en comparación con las otras variantes [120]. De este modo, ApoE se une con A β y con la proteína tau con menor o mayor afinidad en función de la isoforma (ApoE2 > ApoE3 > ApoE4), posiblemente modulando la hiperfosforilación de tau, así como el transporte de A β a través de la barrera hematoencefálica y consecuentemente la formación de las placas amiloides [112][121][122]. Además, se ha reportado que la sobreexpresión de ApoE4 bloquea la formación de las sinapsis y altera la plasticidad del hipocampo [123].

De cualquier modo, el objetivo final de comprender la genética de la enfermedad de Alzheimer es descubrir nuevas vías que puedan converger en la causa de esta enfermedad, e identificar objetivos farmacológicos para el tratamiento terapéutico [98]. Por otro lado, evidentemente existen factores protectores frente a la enfermedad como son la edad, mayor protección cuanto más joven, la actividad física regular y la dieta (cardiosaludable) que conllevan un peso corporal adecuado, así como niveles séricos de colesterol y de presión arterial entre otros, dentro de la normalidad [124][109].

1.4. Tratamiento

Actualmente la AD es incurable. Los tratamientos de los que se dispone son sintomáticos y actúan en distintos puntos del proceso neuropatológico [125][126]. Aunque se han desarrollado múltiples tratamientos desde hace 30 años, éstos no frenan la progresión de la enfermedad, pero mejoran la calidad de vida de los pacientes. Resulta fundamental profundizar en la fisiopatología de la demencia para la obtención de un tratamiento curativo [126].

1.4.1. Tratamientos farmacológicos

Hay cuatro fármacos comercializados para el tratamiento de la AD moderada [127][128], aunque ninguno es curativo. Tienen un efecto sintomático y la eficacia disminuye progresivamente en el tiempo. Estos fármacos pertenecen a dos grupos:

A. Inhibidores de la acetilcolinesterasa: donepezilo, rivastigmina y galantamina

Inhiben la enzima acetilcolinesterasa en la hendidura sináptica, prolongando la vida media del neurotransmisor acetilcolina, lo cual implica un aumento de transmisión colinérgica. Aunque más del 50% de los pacientes no

responde al tratamiento, los respondedores pueden mantener la capacidad de cognición previa durante un período de entre 6 y 24 meses [125][126][127][128].

B. Antagonistas de los receptores de ácido N-metil-D-aspártico (NMDAR): memantina

Su acción se basa en el bloqueo del receptor de NMDA, disminuyendo la excitotoxicidad del glutamato, que en sujetos con la AD está elevado en exceso. Suelen administrarse junto a inhibidores de la acetilcolinesterasa por ser poco específicos para la AD [126].

1.4.2. Tratamientos no farmacológicos

A. Orientados a retrasar el avance de la enfermedad

El entorno del paciente puede tener un papel acelerador o retardante en la evolución de la enfermedad. Enlentece la progresión de síntomas la realización de actividad física, un ambiente familiar que favorezca el bienestar y socializar con otros individuos. Sin embargo, son acelerantes los cambios de las rutinas, el estrés, cambios de domicilio (institucionalización en residencias para la tercera edad), etc. [129].

B. Intervención psicosocial

Su objetivo es identificar los antecedentes y reducir las consecuencias de las alteraciones conductuales. Pueden clasificarse según su orientación: al comportamiento, a las emociones, a la estimulación y a la cognición [130]. En el caso de una intervención orientada a las emociones, distinguimos la terapia de reminiscencia (fomenta el recuerdo de situaciones vividas a través de objetos, fotos, sonidos...), la de validación (se basa en aceptar la realidad), la psicoterapia de apoyo, la integración sensorial (mediante actividades dirigidas que activen los sentidos) y la terapia de presencia estimuladora (consiste en la escucha de audios de los familiares). Con todo esto, se consigue disminuir comportamientos desafiantes y ansiedad [131][132], actuando positivamente sobre el humor y la cognición [133]. La finalidad de estas terapias es mitigar las distorsiones cognitivas, dentro de las cuales se encuentra la orientación (aportando datos sobre la persona y el entorno, para definir su papel en la sociedad) y el entrenamiento cognitivo.

Los tratamientos dirigidos a la estimulación incorporan ámbitos como la actividad física, el arte, actividades recreativas, musicoterapia y terapias con

mascotas. Se aplican con la intención de mejorar la conducta, el humor y la rutina de la vida diaria [130].

1.4.3. Tratamientos en fase de investigación

Con el objetivo de frenar el curso de la enfermedad, actualmente se están investigando nuevas estrategias terapéuticas y tratamientos dirigidos a múltiples dianas, pensados para ser administrados en las fases iniciales de la AD [126]. Para que los futuros tratamientos resulten eficaces, será necesario desarrollar en paralelo nuevas técnicas diagnósticas que permitan hacer un diagnóstico precoz de la AD en fase preclínica, o incluso que permitan predecir el desarrollo de ésta. La prevención de la AD es un reto para los investigadores, y para llevarla a cabo es necesario comprender mejor su etiología, y en qué medida influyen tanto los factores ambientales como el estilo de vida en el riesgo de desarrollar la enfermedad [126]. Los progresos de la ciencia de los últimos 30 años han servido para establecer diferentes estrategias terapéuticas, de las cuales, destacan dos: aquellas dirigidas a reducir la formación del péptido A β 42 y la fosforilación de la proteína tau [127][126].

A. Estrategias antiamiloides

La hipótesis amiloidogénica propone que el péptido A β tiene un papel clave en el desarrollo de la AD. Así, las diversas estrategias antiamiloides están enfocadas en actuar en distintos puntos del metabolismo de APP. Una de las posibles causas del fracaso terapéutico de estos fármacos en desarrollo, podría atribuirse a la ausencia de biomarcadores diagnósticos apropiados para el reclutamiento de los sujetos participantes en los ensayos clínicos aleatorizados (ECA), en fases en las que la intervención terapéutica sea útil [134][126].

- **Disminución de la producción de péptidos A β : inhibidores de secretasas**
 - **Inhibidores de BACE1**

La vía amiloidogénica se inicia cuando la enzima BACE1 proteoliza APP. Su falta de especificidad supone un reto para la elaboración de inhibidores como tratamiento de la AD, ya que tiene múltiples sustratos como la neuregulina-1, implicada en la mielinización de los nervios [135][136][137]. Otro desafío añadido, es la necesidad de que estos fármacos tengan la facilidad de atravesar la barrera hematoencefálica y modular la enzima en el CNS [138]. Los pocos ECA

de fase 3 existentes son un reflejo de lo difícil que resulta diseñar un fármaco con esas premisas. Así, por ejemplo, el E2609 es un compuesto inhibidor de BACE1 [139] que disminuye los niveles de A β y sAPP β en el CSF de controles sanos, sujetos con MCI o con AD leve, proporcionando una supresión significativa de BACE1 en el cerebro [140][141][142][143]. Sin embargo, a pesar de los resultados obtenidos se ha discontinuado el ensayo por falta de resultados a nivel cognitivo [191].

Por otro lado, las tiazolidinedionas (rosiglitazona y pioglitazona) son medicamentos orales para el tratamiento de la diabetes tipo 2 que actúan como inhibidores de la β -secretasa estimulando el receptor γ (PPAR γ). La activación de estos receptores puede disminuir la expresión de la β -secretasa y promover la degradación de la APP al aumentar su ubiquitinación [144]. La pioglitazona puede atravesar la barrera hematoencefálica, aunque no está claro si la rosiglitazona puede alcanzar el CNS en los seres humanos [144]. Los potenciales efectos terapéuticos de los agonistas de PPAR γ en la AD podrían también tener que ver con su efecto sobre la acción de la insulina, el metabolismo de lípidos y carbohidratos y la cascada inflamatoria. La resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia periférica parecen promover la neuropatología de la AD [145], y tanto la rosiglitazona como la pioglitazona aumentan la sensibilidad periférica a la insulina y reducen las concentraciones de insulina, que compite con A β por la degradación de la enzima que degrada la insulina [144][146]. Los efectos de la rosiglitazona en la cognición de pacientes con la AD o MCI se han estudiado en ECA de fase 3, y la pioglitazona se ha probado en ECA de fase 2 (NCT00982202, NCT00736996, NCT00550420, NCT00428090, NCT00348309). Sólo hubo dos ECA de fase 3 (NCT00428090; AVA105640), en los que se estudió la rosiglitazona como monoterapia en individuos con AD leve o moderada y estratificados para *APOE4*, de los que hasta ahora no se han reportado resultados positivos (no hubo eficacia en la cognición o función global) [147]. La rosiglitazona ha sido retirada del mercado en Europa por asociarse a un aumento del riesgo cardiovascular. También la pioglitazona, por aumentar la probabilidad de cáncer de vejiga. Por todo ello, junto con los resultados negativos de los ensayos, se han discontinuado los ECA con dichos fármacos [146].

por ello, que pueden surgir efectos adversos si se inhibe inespecíficamente esta enzima, limitando así el desarrollo de ECA con estos fármacos [138][150][151].

Los inhibidores de la actividad γ -secretasa fueron los primeros en ser estudiados en ECA, pero no tuvieron éxito debido a importantes efectos secundarios y han sido discontinuados. No obstante, descartar la γ -secretasa como diana farmacológica para la AD sería prematuro. En este sentido, se siguen desarrollando algunos inhibidores y sobre todo moduladores de la γ -secretasa para la terapia de la AD, con el objetivo de reducir la generación de $A\beta$ sin interferir en otros sustratos que no sean APP [151].

Respecto a los inhibidores de la γ -secretasa discontinuados, el semagacestat (LY450139) ha sido el más estudiado en humanos. A pesar que se demostró que su administración en humanos disminuía los niveles de $A\beta$ en sangre y en CSF [152], su desarrollo se detuvo en agosto de 2010 debido a los efectos adversos en el ensayo de fase III. El tratamiento prolongado con semagacestat se relacionó con una mayor dificultad para llevar a cabo las actividades diarias, así como con un descenso del umbral cognitivo [152]. En este contexto, se ha demostrado que el semagacestat promueve un efecto “rebote” con aumentos en los niveles de $A\beta$ [153]. Estos efectos son claramente diferentes a los causados por una pérdida de la función de las presenilinas.

El Avagacestat (BMS-708163) es otro potente inhibidor oral de la γ -secretasa que alcanzó las pruebas clínicas de fase II, reduciendo los niveles en el CSF de $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ en voluntarios sanos y en pacientes con la AD [154]. En un estudio separado de fase II de avagacestat, se usaron biomarcadores de CSF para seleccionar pacientes con la AD prodrómica. Sin embargo, hubo un compromiso insuficiente con el objetivo y, debido al empeoramiento de la cognición en los tratados, se dio por finalizado el desarrollo [155].

Los moduladores selectivos de la γ -secretasa se han elaborado para bloquear el procesamiento de APP sin efectos secundarios sobre otras vías metabólicas [151]. Son ejemplos de estos medicamentos los AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos) como por ejemplo el ibuprofeno, el sulindaco, la indometacina y el flurbiprofeno (tarenflurbil). El tarenflurbil y el ibuprofeno no dieron buenos resultados en ECA [156][157][126]. Se realizó un estudio generalizado de los AINE cuyos resultados indican que la protección frente a la AD no es un beneficio general proporcionado por estos fármacos [126].

Otro ejemplo de moduladores de la γ -secretasa es el NIC5-15, un alcohol de azúcar cíclico natural presente en frutas y vegetales como la soja [158]. Modula la γ -secretasa y reduce la producción de $A\beta$, aumentando la sensibilidad a la insulina [158][159]. Este compuesto ha demostrado mejorar la memoria en modelos neuropatológicos de la AD preclínicos [159][126]. El NIC5-15 inhibe selectivamente la γ -secretasa, preservando la proteína Notch, con efectos sobre la inflamación, inhibiendo la activación de la microglía, por lo que podría ser un buen tratamiento para la AD [126].

- **Activación de la α -secretasa**

A nivel farmacológico resulta más difícil activar una vía que su inhibición. Es por ello que, aunque cabría esperar que al activar la α -secretasa se estimulase el procesamiento de APP por la vía no amiloidogénica, disminuyendo así la cantidad de APP disponible para metabolizarse a través de la amiloidogénica, apenas se han encontrado fármacos que modulen la α -secretasa en modelos animales; y prueba de ello es la escasez de fármacos en fase de ECA [126].

El galato de epigallocatequina (EGCG) se extrae de las hojas del té verde. Es un flavonoide polifenólico con muchas funciones beneficiosas: actúa positivamente sobre la cognición, tiene acción antitumoral, antiinflamatoria y neuroprotectora [160]. Activa la α -secretasa, inhibiendo la generación de oligómeros tóxicos de $A\beta$.

El etazolato (EHT 0202) controla los síntomas de la AD y modifica la progresión de la enfermedad, mediante la estimulación de la α -secretasa, inhibiendo la muerte de neuronas secundaria a la generación de $A\beta$ [161].

La acitretina es un fármaco que se emplea para el tratamiento de la psoriasis severa, con acción agonista sobre el receptor del ácido retinóico [162]. En algunos modelos preclínicos estimula la vía no amiloidogénica de la APP mediante el aumento de la expresión de ADAM10, reduciendo los niveles de $A\beta$ [162][163][164].

• **Antiagregantes amiloides: inhibición de la agregación de los péptidos $A\beta$**

Actualmente no existen fármacos disponibles que inhiban la agregación de los péptidos $A\beta$ para su uso en humanos, aunque se ha trabajado en su desarrollo durante años. Así, el glucosaminoglucano 3-aminoácido 1-propaneosulfonic

sintético (3APS) se diseñó para antagonizar la interacción del A β con glucosaminoglucanos endógenos [165][166]. De este modo, se interferiría en la formación de fibrillas de amiloide, estabilizando su depósito en placas [166]. Los pobres resultados obtenidos en un ECA de fase 3 en el año 2007 dieron lugar a la suspensión del mismo [126].

El escilo-inositol estabiliza los agregados de A β e inhibe su toxicidad en el hipocampo de ratón. Se llevó a cabo un ECA en pacientes con AD de leve a moderada con pobres resultados, por lo que finalmente se ha interrumpido [167].

La colostrina es un compuesto de polipéptidos rico en prolina, derivado del calostro ovino, que mejora la cognición en modelos animales, impidiendo la agregación de A β y su neurotoxicidad en ensayos celulares [168]. Un ECA demostró ligeras mejorías en la evaluación MMSE de pacientes con AD leve, pero éstas no se mantuvieron a partir de 15 meses del inicio del tratamiento [169].

El clioquinol (PBT1) es un complejo que inhibe la interacción entre los metales y el péptido A β en el cerebro [170][146]. Se han evaluado tanto el PBT1 como el PBT2 con fracasos terapéuticos durante ECA en fases 2 y 3 debido a la falta de eficacia [126].

- **Compuestos que favorecen la eliminación de los agregados y depósitos amiloides**

Se basa en 3 estrategias:

- **Activación de las enzimas encargadas de degradar las placas amiloides**

Actualmente no se ha evaluado ningún activador de proteasas que pudieran abarcar esta función debido a la inespecificidad de estos compuestos. Esta estrategia se basa en que los agregados y las placas amiloides se degradan por diferentes enzimas como la neprilisina, la enzima encargada de degradar la insulina, la enzima convertidora de angiotensina, la metaloproteinasa 9, la enzima convertidora de endotelina o la plasmina [171][172]. Los niveles de estas enzimas descienden en la AD, por lo que se ha postulado que favorecen la formación y acumulación de las placas amiloides [171].

- **Modulación del transporte de A β desde el cerebro hacia la circulación periférica**

Existen diferentes estrategias para aumentar el transporte de A β desde el cerebro a la circulación periférica. En este sentido, ApoE regula el transporte de

A β entre el CNS y la circulación, en concreto ApoE4 favorece el paso de A β desde la sangre hacia el cerebro. El receptor de los productos de la glicación avanzada (RAGE), también favorece el paso de A β al CNS. La proteína relacionada con los receptores de la lipoproteína de baja densidad (LRP), aumenta la salida de A β del cerebro a la sangre [173][174][175][176].

De todas estas estrategias, sólo se ha desarrollado en ECA la basada en la inhibición/modulación de RAGE (PF-04494700 [177] y TTP4000 [126]), con pobres resultados.

- **Inmunoterapia específica antiamiloide**

Las inmunoterapias activas y pasivas se desarrollaron para eliminar el A β soluble y agregado. Al menos tres mecanismos inmunomediados diferentes pueden promover la eliminación de A β : solubilización mediante la unión del anticuerpo a A β ; fagocitosis de A β opsonizada por microglia; y extracción de A β del cerebro por anticuerpos plasmáticos [146].

▪ **Inmunoterapia activa (vacunación)**

Se basa en favorecer la eliminación de A β reduciendo la carga amiloidea en el cerebro de pacientes con la AD. Se ha estudiado la vacunación con A β 42 y otros fragmentos sintéticos y los resultados han sido positivos en modelos de ratones transgénicos [126]. Sin embargo, algunos ECA inicialmente prometedores, como el de la vacuna AN1792 constituida por péptido A β 42, se suspendieron al detectar meningoencefalitis en algunos sujetos.

Posteriormente, se diseñaron vacunas de segunda generación que utilizaban segmentos más cortos de A β (A β 1-6). CAD 106 (Novartis) fue la primera vacuna de segunda generación y actualmente se encuentra en fase 3 de un ECA [178]. Ha provocado una respuesta de anticuerpos contra A β en el 75% de los sujetos, sin generar efectos adversos [126][149]. Otras vacunas desarrolladas son la ACC-001 (cuya investigación se desestimó durante un ECA fase 2), la ACI-24, la MER5101 y la AF205, que no han sido probadas en ensayos [179][180][181].

▪ **Inmunoterapia pasiva (anticuerpos monoclonales/policlonales)**

Se basa en la administración de anticuerpos “humanizados” dirigidos contra A β y producidos en el laboratorio. Se administran por vía intravenosa,

consiguiendo una respuesta inmunitaria no mediada por células T [181]. Mejora el déficit cognitivo y disminuye la carga amiloidogénica neuronal debido a la neutralización de los oligómeros amiloides solubles [181][182].

Actualmente, se están realizando ECA de fase 1-3 (ver Figura 1.8.) con diversos anticuerpos monoclonales. El solanezumab es un anticuerpo humanizado que se une a la porción central de A β (A β 12-28) [175][183]. El ganterenumab es un anticuerpo IgG1 humano que se une con elevada afinidad a las fibras de A β [184][185], degradando las placas amiloides mediante un proceso de activación de macrófagos y de reclutamiento de la microglía. El crenezumab (MABT5102A) es otro anticuerpo humanizado en fase de desarrollo para el tratamiento de la AD leve-moderada y en pacientes FAD asintomáticos.

Por otro lado, se dispone de mezclas de inmunoglobulinas para administración intravenosa, constituida por fracciones de anticuerpos policlonales contra A β , con el objetivo de reducir la toxicidad neuronal causada por A β [186][187][188]. Esta inmunoglobulina se denomina GammagardTM (preparación de anticuerpos de plasma humano), y parece tener efectos inmunomoduladores, favoreciendo la fagocitosis de A β por parte de la microglía [188].

B. Estrategias contra la fosforilación de la proteína tau

Existen dos enfoques terapéuticos principales para atacar a la proteína tau, la modulación de la fosforilación de tau con inhibidores de las quinasas, y el uso de compuestos que inhiban la agregación de tau y/o promuevan la eliminación de los agregados.

El primer enfoque se basa en la observación de que la hiperfosforilación de tau y la formación de ovillos neurofibrilares pueden promoverse mediante la actividad alterada de algunas quinasas, particularmente la glucógeno-sintasa-quinasa-3 (GSK3 β), pero también de la p70-S6-quinasa; así como por la desregulación de la fosfatasa PP2A [189]. De hecho, la GSK3 β es una diana terapéutica interesante porque está involucrada en la hiperfosforilación de tau, pero también parece estar relacionada con la formación de A β , con la señalización celular y con la transcripción de genes [189][146].

Se ha observado en un modelo de ratón transgénico que tras la administración oral de la nicotinamida, forma biológicamente activa de la niacina (vitamina B3), y el precursor de la coenzima NAD⁺, se reduce la concentración cerebral de P-tau

(Thr231), y se previene el deterioro cognitivo de los animales tratados [190]. La nicotinamida se ha utilizado en varios ECA en los que se incluyen pacientes con trastornos neurodegenerativos, y ha demostrado ser bastante segura además de bien tolerada. Hasta la fecha de redacción de la tesis, estaba en curso un ECA de fase 2 de este compuesto [149]. Por otro lado, se han desarrollado otros inhibidores de GSK3 β ya discontinuados y actualmente existen otros fármacos en distintas fases de ECA.

2. Diagnóstico

Para realizar el diagnóstico clínico de demencia se deben cumplir una serie de criterios. El error en el diagnóstico puede oscilar entre un 10-30%, especialmente en fases tempranas y en presentaciones leves. Por otra parte, al disponer de numerosos criterios aplicables, los juicios clínicos pueden variar con oscilaciones en las cifras de prevalencia [192]. Algunos de estos criterios serían el Manual Diagnóstico y Estadístico de las Enfermedades Mentales V edición (DSM-V, del inglés *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) (ver Tabla 1.1.); la Clasificación Internacional de las Enfermedades (CIE-10); los criterios del Instituto Nacional de Envejecimiento (NIA, del inglés “*National Institute on Aging*”) y la Asociación de Alzheimer (AA, del inglés “*Alzheimer’s Association*”), o una combinación de ambos (NIA-AA) [193]; el Examen de Cambridge para los Trastornos Mentales de los Ancianos (CAMDEX, del inglés *Cambridge Examination for Mental Disorders of the Elderly*) o los criterios del Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Comunicativos y Accidentes Cerebrovasculares – Asociación de Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados (NINCDS-ADRDA, del inglés *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association*) [194].

A pesar de que el abordaje diagnóstico se encuentra uniformizado, debido a la magnitud y a la prevalencia del problema, existen ciertas discrepancias sobre la conveniencia de realizar algunas pruebas complementarias de forma rutinaria en todo paciente con deterioro cognitivo [192].

Criterios diagnósticos de AD probable	
Criterio principal	<p>Presencia de un trastorno de memoria episódica inicial y significativo que incluya las siguientes características:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pérdida de memoria progresiva y gradual durante al menos seis meses, comunicada por el paciente o un informador fiable. - Objetivar mediante tests neuropsicológicos la pérdida de memoria episódica. Normalmente consiste en recoger fallos de reconocimiento que no mejoran o no se normalizan con claves. - El defecto de memoria episódica puede ser aislado o asociarse a otras alteraciones cognitivas.
Características adicionales	<p>Presencia de atrofia en el lóbulo temporal medial: pérdida de volumen del hipocampo, la amígdala y la corteza entorrinal, evidenciada por resonancia magnética (RM) utilizando medidas visuales directas o por técnicas de volumetría.</p>
	<p>Alteraciones de biomarcadores en el CSF: disminución de Aβ42 o aumento de la concentración de T-tau o P-tau, o combinaciones de ellos, o de otros posibles marcadores futuros.</p>
	<p>Alteraciones características de neuroimagen funcional con tomografía por emisión de positrones: hipometabolismo de glucosa bilateral en regiones temporales y parietales. Otras alteraciones con radioligandos que sean validadas tal y como se prevé con el compuesto B de Pittsburgh (PIB) o el FDDNP.</p>
	<p>Evidencia de una mutación autosómica dominante en un familiar de primer grado.</p>

Tabla 1.1. Criterios diagnósticos propuestos en el DSM-V para AD según Dubois. [193]

Los criterios diagnósticos clínicos actuales de la AD conllevan diversos inconvenientes. El principal a efectos del tratamiento, es que cuando los pacientes cumplen los criterios ya han desarrollado la demencia, apreciándose un deterioro significativo en varias áreas cognitivas, por lo que el grado de patología presente en el cerebro ya es generalizado. Debido a esto, probablemente sea tarde para que puedan beneficiarse de una intervención farmacológica que modifique la evolución de la enfermedad. Además, estos criterios no permiten un diagnóstico etiológico de la AD, realizándose este por exclusión de otro tipo de demencias [194].

La importancia del diagnóstico precoz para la AD, al igual que para la mayoría de los trastornos, se debe a que las intervenciones terapéuticas más eficaces se dan en etapas tempranas o preclínicas de la enfermedad. En este caso, lo ideal sería intervenir cuando la pérdida sináptica y el deterioro cognitivo apenas se han iniciado [195]. Por este motivo, en 2011 el NIA y la AA introdujeron el concepto de AD preclínica, etapa que se presenta antes de hacerse evidente el MCI. En 2015, la NIA-AA y el Grupo de Trabajo Internacional dieron la definición de la fase preclínica, refiriéndose a ésta como el “día de aparición de las lesiones patológicas de AD sin evidencia de síntomas clínicos” [196]. En este sentido, como se discutirá más adelante, el uso de biomarcadores aparece como fundamental.

Establecer un diagnóstico preciso es complejo, y se basa en un serie de elementos: historia clínica, exploración física con énfasis en el estado mental mediante pruebas diagnósticas como los test cognitivos, estudios bioquímicos para descartar problemas sistémicos o metabólicos (niveles de vitamina B12, perfil tiroideo, niveles de vitamina D, entre otros), y estudios de imagen estructural o funcional [196].

2.1. Historia clínica (anamnesis, entrevista clínica y exploración física)

Durante la evaluación inicial, los especialistas llevan a cabo la **anamnesis**, que consiste en la construcción de un relato con los síntomas iniciales, cuando empezaron a aparecer y cuál ha sido su evolución; y una **entrevista clínica** con el paciente y un informador fiable. También se debe realizar una exploración neuropsicológica abreviada, una valoración de la repercusión funcional, y una exploración física y neurológica detallada, tratando de advertir cambios en la atención, en la memoria y en el comportamiento, así como en otras funciones [197].

2.2. Test cognitivo

Durante la primera visita, ya puede realizarse algún **test cognitivo breve** que, aunque no sea específico de la AD, puede indicar el grado de afectación. Uno de los más empleados es el **MMSE**, que permite una primera valoración de cribado de algunas funciones cognitivas, como la orientación espacio-temporal, la memoria inmediata, la concentración o el lenguaje, entre otras [97]. Dicho test, podrá repetirse a lo largo de la evolución de la enfermedad para valorar de forma objetiva los cambios clínicos.

MINI MENTAL STATE EXAMINATION (MMSE)				
¿En qué año estamos?	0-1	ORIENTACIÓN TEMPORAL (Máx. 5)		
¿En qué estación?	0-1			
¿En qué día (fecha)?	0-1			
¿En qué mes?	0-1			
¿En qué día de la semana?	0-1			
¿En qué hospital (o lugar) estamos?	0-1	ORIENTACIÓN ESPACIAL (Máx. 5)		
¿En qué piso (o planta, sala, servicio)?	0-1			
¿En qué provincia estamos?	0-1			
¿En qué país (o nación, autonomía)?	0-1			
Nombre tres palabras Euro-Caballo- Manzana (o Balón-Bandera-Árbol) a razón de 1 por segundo. Luego se pide al paciente que las repita. Esta primera repetición otorga la puntuación. Otorgue 1 punto por cada palabra correcta, pero continúe diciéndolas hasta que el sujeto repita las 3, hasta un máximo de 6 veces.		Nº de repeticiones necesarias FIJACIÓN-Recuerdo Inmediato (Máx. 3)		
Si tiene 30 euros y me va dando de tres en tres, ¿cuántos le van quedando? Detenga la prueba tras 5 sustracciones. Si el sujeto no puede realizar esta prueba, pídale que deletree la palabra MUNDO al revés. 30 0-1 27 0-1 24 0-1 21 0-1 18 0-1 (O 0-1 D 0-1 N 0-1 U 0-1 M 0-1)		ATENCIÓN-CÁLCULO (Máx. 9)		
Preguntar por las tres palabras mencionadas anteriormente. Otorgar 1 punto por cada palabra.		RECUERDO diferido (Máx. 3)		
<ul style="list-style-type: none"> - Denominación: Mostrarle un lápiz o un bolígrafo y preguntar ¿qué es esto? Hacer lo mismo con un reloj de pulsera. Lápiz 0-1 Reloj 0-1 - Repetición: Pedirle que repita la frase: “ni sí, ni no, ni pero” (o “En un trigal había 5 perros”) 0-1 - Órdenes: Pedirle que siga la orden: “coja un papel con la mano derecha, dóblelo por la mitad, y póngalo en el suelo”. Coge con mano derecha 0-1, dobla por la mitad 0-1, pone en suelo 0-1 - Lectura: Escriba legiblemente en un papel “Cierre los ojos”. Pídale que lo lea y haga lo que dice la frase. 0-1 - Escritura: Que escriba una frase (con sujeto y predicado). 0-1 - Copia: Dibuje 2 pentágonos intersectados y pida al sujeto que los copie tal cual. Para otorgar un punto deben estar presentes los 10 ángulos y la intersección. 0-1 		LENGUAJE (Máx. 9)		
Puntuaciones de referencia: 26 o más (normal), 25-20 (MCI), 19-10 (deterioro moderado), 9-0 (deterioro severo)		Puntuación Total (Máx. 30 puntos)		

<p>Tabla 1.2. MMSE. Se obtiene una puntuación global sobre 30, estando estandarizada su interpretación. De 30 a 26 se considera compatible con la normalidad; de 25 a 20 existe MCI; de 19 a 10 se asocia a deterioro cognitivo moderado; mientras que puntuaciones de 9 a 0, implican un deterioro cognitivo severo. [198][199][200]</p>
--

2.3. Pruebas complementarias

Con el objetivo de descartar otras posibles causas de deterioro cognitivo y afinar en el diagnóstico, el especialista puede indicar que se realicen **pruebas complementarias**. No hay ninguna prueba que por sí misma permita diagnosticar la AD, por lo que se precisa de un conjunto de pruebas e indicios de cambios cerebrales que permitan orientar el diagnóstico [97].

2.3.1. Análisis de sangre

Habitualmente se solicita una analítica de sangre convencional para descartar, entre otros, procesos infecciosos o déficits vitamínicos que puedan explicar afectación cognitiva. La Academia Americana de Neurología (AAN) estableció como recomendables para el diagnóstico y evaluación de la demencia la determinación en todo paciente con deterioro cognitivo de las siguientes pruebas de laboratorio: recuento de células sanguíneas, electrolitos (incluido calcio), glucosa, BUN/creatinina (BUN, del inglés *Blood Urea Nitrogen*), pruebas de función hepática, tirotrópina, vitamina B12 y serología de lúes; estableciendo el resto de las pruebas complementarias como opcionales. En la práctica diaria, y a pesar de las recomendaciones expuestas, la realización de pruebas de laboratorio rutinarias ronda en torno sólo al 70% de los pacientes, siendo menor en mayores de 85 años (40-50%) [192].

2.3.2. Exploración neuropsicológica

Una evaluación neuropsicológica detallada es útil para precisar las características y el alcance de la alteración cognitiva, conductual y de su posible impacto en la vida cotidiana. Cuando se realiza, por disponer del recurso en el centro donde se está llevando a cabo el estudio, suele ser una visita de cierta extensión y se acostumbra a solicitar que la persona afectada acuda a la visita con el neurólogo/neuropsicólogo acompañado de algún familiar o persona próxima que la conozca bien [201][202].

2.3.3. Pruebas de neuroimagen

Las pruebas de imagen pueden servir para caracterizar otras causas de deterioro cognitivo y para encontrar indicios de neurodegeneración, atrofia o lesiones neuronales. Se recomienda la realización de un estudio de imagen en todo paciente con demencia (al menos en una ocasión).

Estas pruebas se pueden dividir en dos grupos:

- Pruebas de neuroimagen estructural: tomografía axial computerizada (TAC o TC) y resonancia magnética nuclear (RMN).
- Pruebas de neuroimagen funcional: resonancia magnética funcional (RMF o del inglés, fMRI), tomografía por emisión de positrones (más conocida por las sigas del inglés, PET), tomografía por emisión de positrones asociada a tomografía computerizada, tomografía computerizada de emisión monofotónica.

Estas técnicas se están postulando como una alternativa no invasiva para el diagnóstico del MCI o de la AD preclínica [203], pudiendo ofrecer imágenes funcionales con elevada sensibilidad y especificidad (variable en función del tipo de estudio realizado).

A continuación, se explican de forma pormenorizada:

A. Tomografía axial computerizada (TAC)

Se emplea para la detección de trastornos estructurales potencialmente reversibles (neoplasias, hematomas subdurales, hidrocefalia a presión normal), así como la de cualquier otro hallazgo patológico (incluida patología cerebrovascular) [192].

Puede resultar una prueba útil si previamente se ha realizado un diagnóstico clínico adecuado. El escaso porcentaje de TACs patológicos en pacientes diagnosticados previamente de AD, apoya la escasa utilidad del TAC en el diagnóstico inicial de dichos pacientes sin la aplicación de un protocolo diagnóstico adecuado [192].

La neuroimagen estructural se solicita de manera sistemática en pacientes con problemas cognitivos en fases iniciales, buscando la confirmación etiológica; o cuando existen dudas respecto a la misma [197]. El TAC tiene un coste menor que la RMN y la duración de la prueba es escasa, por lo que es bien tolerado por el paciente, realizándose en la mayoría de los casos.

B. Resonancia magnética nuclear (RMN)

En los últimos años, debido a la necesidad de realizar un diagnóstico precoz de la AD, se ha centrado el esfuerzo en el desarrollo de técnicas de neuroimagen que permitan lograr la detección de la enfermedad en etapas preclínicas, antes de que se produzca el daño cerebral irreversible. Estas técnicas se centran en la medición de marcadores de injuria y disfunción neuronal, e incluyen técnicas avanzadas de RMN, como imágenes de tensor de difusión (DTI), espectroscopía, y conectividad neuronal mediante resonancia funcional de estado de reposo. Se distinguen 2 tipos de resonancia magnética:

- **Resonancia magnética estructural**

La RM estructural busca la demostración de marcadores positivos de la AD como la atrofia hipocampal [204], siendo la que se realiza con mayor frecuencia por ser la más accesible y sencilla de ejecutar. La AD y las enfermedades cerebrovasculares son las afecciones más frecuentes causantes de demencia, por este motivo, durante la realización de una RM estructural se debe evaluar la extensión y el patrón de atrofia cortical, además del daño vascular en toda su extensión [204].

Las secuencias utilizadas en la RM estructural para el estudio de demencias son:

3D T1-ponderado Gradient Echo: permite obtener imágenes volumétricas con alta resolución espacial que muestran un alto contraste entre la sustancia gris y la sustancia blanca.

Fluid Attenuation Inversion Recovery (FLAIR): permite visualizar lesiones hiperintensas cercanas a los espacios que contienen CSF como los ventrículos cerebrales, detectando también lesiones ubicadas en la corteza y regiones subcorticales. Posee baja sensibilidad para lesiones de fosa posterior, lesiones lacunares del tálamo, y de la médula espinal.

T2-ponderado Turbo o Fast Spin Echo (TSE/FSE), T2-Gradient Echo (GE)*. Estas secuencias permiten generar reconstrucciones multiplanares para generar secciones en diferentes proyecciones que permitan una valoración optimizada [204].

Barkhof ha sugerido un algoritmo de seis pasos con el objetivo de interpretar imágenes estructurales para la evaluación de demencias (ver Tabla 1.3.) [204][205].

1. Excluir una lesión estructural susceptible de tratamiento quirúrgico. Considerar tanto lesiones con efecto de masa significativo (p. ej. hematoma subdural, meningioma), como lesiones con menor efecto de masa (p. ej. malformaciones arteriovenosas).
2. Excluir edema cerebral, tanto edema generalizado (p. ej. hidrocefalia) como edema focal (p. ej. edema del lóbulo temporal medial en encefalitis por virus del herpes simple). En cualquier caso que exista edema, considerar el uso de difusión por resonancia magnética e imágenes con contraste.
3. Evaluar el incremento de señal en T2/FLAIR, tanto en sustancia blanca (p. ej. cambios de sustancia blanca en enfermedad vascular) como en sustancia gris (p. ej. infarto talámico en enfermedad vascular o alteraciones del pulvinal en Creutzfeldt-Jakob). Considerar aplicar una escala de evaluación de alteraciones de sustancia blanca, tales como el Fazekas o el ARWMC (cambios en la sustancia blanca relacionados con la edad). Cuando se describan los cambios vasculares, evaluar y reportar específicamente lagunas, <i>état criblé</i> , y lesiones talámicas (bilaterales), y si los cambios involucran el tronco cerebral o los ganglios basales.
4. Evaluar microsangramientos en T2*GE, especialmente en sujetos con cambios de sustancia blanca.
5. Determinar el grado y patrón de atrofia cortical general (GCA), y reportar específicamente si la atrofia: <ul style="list-style-type: none"> - Es anormal para la edad o no - Es simétrica o asimétrica - Tiene un patrón regional - Tiene un gradiente posterior o anterior
6. Evaluar la atrofia focal, especialmente en las siguientes regiones: <ul style="list-style-type: none"> - Lóbulo temporal medial (p. ej. en AD) - Polo temporal y/o lóbulos frontales (p. ej. consistente con demencia frontotemporal) - Atrofia biparietal (atrofia cortical posterior, principalmente AD) - Atrofia occipital (atrofia cortical posterior o síndrome de Balint, usualmente AD pero existe considerable sobreposición con otras patologías neurodegenerativas, p. ej. MCI) - Cingulado posterior y precúneo (p. ej. presenil o AD posterior) - Atrofia mesencefálica (p. ej. parálisis supranuclear progresiva) - Atrofia pontina (y cerebelosa) (p. ej. atrofia multisistémica) - Atrofia cerebelosa (p. ej. abuso de alcohol, priones, etc.)

Tabla 1.3. Evaluación estructurada de RM en el enfrentamiento clínico de las demencias. MCI: Deterioro Cognitivo Leve. [204][205]

Si el algoritmo resulta negativo y existe una alta sospecha de demencia, es recomendable repetir la prueba de imagen en un intervalo de tiempo que depende de la velocidad de avance del deterioro clínico [204].

- **Resonancia magnética funcional (fMRI)**

La resonancia magnética funcional (conocida por sus siglas en inglés; fMRI), mediante el efecto BOLD (del inglés, *Blood-Oxygen-Level Dependent*), mide la respuesta hemodinámica en los cambios de flujo sanguíneo relacionados con la energía utilizada por las neuronas [206][207].

Para su realización, se le solicita al individuo que lleve a cabo alguna tarea o se le muestra un estímulo. El modo en que se desarrollan estas actividades se

denomina paradigma. Los paradigmas se elaboran de tres maneras diferentes: de “bloques”, usado para eventos o tareas sistemáticas [204], “relacionado a eventos”, usado para eventos no repetitivos con una duración variable cercana a las tareas cotidianas [208][209], y “combinado”. El paradigma de bloques tiene un mayor poder estadístico que el relacionado a eventos [204].

La fMRI se ha empleado para determinar la ubicación de áreas específicas previo a intervenciones quirúrgicas [210]. Se han usado paradigmas cognitivos en diversas patologías, como es el caso de la AD, y también se han llevado a cabo estudios de cambios de la memoria (ajustados por edad y por patología) [211].

C. Pruebas de medicina nuclear: tomografía por emisión de positrones (PET), PET/TC y tomografía computerizada de emisión monofotónica (SPECT)

Se reservan para el diagnóstico diferencial de las demencias, ya que tienen un coste muy elevado. Poseen una sensibilidad y especificidad muy altas. Son pruebas funcionales.

- **SPECT**

Su realización se lleva a cabo en pacientes en los que interesa realizar un diagnóstico diferencial en demencias atípicas o en el MCI, así como para estudiar la progresión de la enfermedad.

- **El PET y PET/TC**

Se utilizan para la medición de depósitos de β -amiloide o tau en el caso de la AD. Ambas técnicas detectan alteraciones morfológicas y moleculares específicas de la enfermedad.

Son técnicas de evaluación funcional y molecular del cerebro que permiten estudiar la distribución encefálica de un radiotrazador, que puede ser un marcador de metabolismo (glucosa, oxígeno), de perfusión, de neuroreceptores (benzodiazepinas, dopamina, GABA), o de otras moléculas (amiloide, proteína tau). Cada uno de ellos, se liga a un isótopo emisor de positrones (Ej: Flúor-18), permitiendo la visualización de su distribución en el encéfalo [204].

A pesar de que el F18-fluorodeoxiglucosa (F18-FDG) es el radiotrazador más empleado, existen en la actualidad numerosos compuestos que resultan más específicos en las demencias, permitiendo incluso evaluar el depósito de proteína tau y β -amiloide cerebrales.

El estudio de las imágenes del PET se lleva a cabo de forma visual y semicuantitativa mediante la utilización de diversos programas [204].

- **PET con F18-FDG**

La prueba se basa en que los individuos sanos presentan habitualmente un consumo elevado de glucosa en la corteza cerebral y en los núcleos de la base, con una distribución homogénea y simétrica señalizada por el F18-FDG, una molécula análoga a la glucosa.

Puede distinguir precozmente grupos de riesgo de acuerdo a la alteración metabólica existente, estratificando a los sujetos con mayor riesgo de demencia. Anualmente, un 10-15% de individuos con MCI evolucionan a la AD [212], apreciándose hipocaptación bilateral en la corteza parietotemporal y cíngulo posterior. Esto es indicativo de la fase prodrómica de la AD. Por el contrario, el resultado normal de la prueba indica un riesgo muy bajo de progresión a demencia (a corto/medio plazo) [213][214].

Se han realizado estudios que demuestran que el patrón de hipometabolismo temporoparietal bilateral es indicativo de la AD, con una sensibilidad del 93%, una especificidad del 63%, y una precisión diagnóstica del 82% [215].

Los estudios metabólicos cerebrales se pueden llevar a cabo mediante una evaluación cuantitativa mecanizada, con el objetivo de disminuir los errores diagnósticos, a través de la comparación de imágenes entre pacientes con la AD y modelos de sujetos sanos [216].

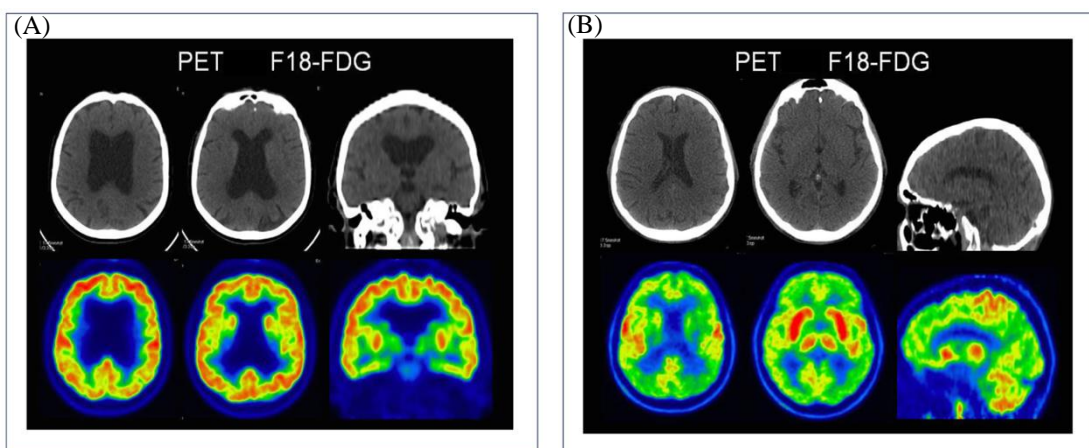


Figura 1.9. A) PET/TC normal. B) PET/TC en un paciente con AD. A) Distribución homogénea de F18-FDG en la corteza y los núcleos basales. B) Hipometabolismo parietotemporal de cíngulo posterior y frontal bilateral, respetando las áreas pre y postcentral [204].

- **PET con otros radiotrazadores**

Se considera establecido que 15 años antes de la aparición de los síntomas clínicos del MCI, comienzan a depositarse en el cerebro el péptido β -amiloide y posteriormente la proteína tau. Se están estudiando múltiples formas de medir proteínas relacionadas con la evolución temporal de la enfermedad (biomarcadores), con el objetivo de realizar un diagnóstico lo más precoz posible, lo cual servirá para estimar el pronóstico y para evaluar la respuesta al tratamiento [217][218].

Existen múltiples radiotrazadores para el estudio de $A\beta$, entre ellos el 18F-AV-45 (18F-florbetapir; Amyvid™), el 18F-BAY94-9172 (18F-florbetaben; Neuraceq™) y el 18F-3'-F-PIB (18F-flutemetamol; VizamyI™) [204][219].

En la actualidad, se están evaluando radiotrazadores que permitan detectar el depósito de tau en el cerebro mediante PET/TC. Un ejemplo de ellos lo constituye el 18F-THK5105, diferenciando a controles de pacientes con la AD, en los que se aprecia alta concentración del radiotrazador en el hipocampo y en la base del lóbulo temporal [220].

El PET cerebral se puede utilizar en la actualidad para identificar pacientes con riesgo de desarrollar demencia con el objetivo de iniciar un tratamiento precoz. Todavía no se ha incorporado esta prueba molecular en el protocolo diagnóstico estándar de los pacientes con AD, a pesar de la existencia de una correlación entre el grado de deterioro cognitivo de los sujetos con la AD, y los depósitos de $A\beta$ y tau [221].

2.3.4. Pruebas genéticas: análisis de formas familiares

Suelen recomendarse en casos de inicio muy precoz o con historia familiar de la AD. Hay que tener en cuenta, eso sí, que el origen puramente genético y hereditario de la AD sólo se da en menos de un 1-2% de los casos. Por eso, no se emplean de forma generalizada los tests genéticos con fines diagnósticos, ya que tienen un coste muy elevado con rentabilidad escasa [222].

3. Biomarcadores en CSF

En el año 2007 comenzó el proceso de consenso para la utilización de biomarcadores en el diagnóstico precoz de la AD [223]. El objetivo, como ya se ha mencionado anteriormente, era diagnosticar la AD en el estadio más temprano posible mediante la medición de A β 42, T-tau y P-tau en CSF, la realización de pruebas genéticas, el estudio funcional con PET y/o la medición de cambios estructurales por RM; todo ello posterior a la presencia de los cambios cognitivos sugestivos del inicio de la enfermedad [96][224].

3.1. Importancia de la búsqueda de biomarcadores en CSF para la enfermedad de Alzheimer: A β 42, T-tau y P-tau

En 2018 se clasificaron los biomarcadores en 3 grupos mediante un sistema denominado AT(N): A (A β 42), T (tau patológico) y N (neurodegeneración/daño neuronal); en el que se clasifican dicotómicamente los biomarcadores como positivos o negativos y que permite una definición “biológica” de la AD [96]. La asignación de positividad se puede dar, no sólo en base a la determinación de estos biomarcadores en el CSF, sino también en base a pruebas de PET, RMN u otras pruebas de imagen.

Muchos estudios han examinado los niveles de A β 42 o tau en el CSF de pacientes con la AD [194][195]. La mayoría de estos estudios concluyen que los niveles de T-tau y P-tau están elevados en los CSF de pacientes con la AD respecto a individuos sanos, aunque también concluyen que la especificidad respecto a esta enfermedad es insuficiente, ya que individuos con otras taupatías y desórdenes neurológicos también muestran niveles altos de ambos biomarcadores.

El grado de deterioro clínico en la AD se asocia con los niveles de P-tau y T-tau en el CSF. La existencia de la proteína tau en CSF actúa como marcador de cambios patológicos, vinculándose a la pérdida de neuronas. La forma hiperfosforilada de la proteína tau, proteína P-tau, en el CSF, se correlaciona con el estado de fosforilación de tau en el cerebro [225], y se asocia de forma paralela al cambio de volumen del hipocampo en pacientes con pérdida de memoria [226]. Sin embargo, no existe buena correlación entre los niveles de T-tau en el CSF y la progresión clínica de la AD [225] [226], lo cual puede estar en relación a la existencia de un techo en el nivel de biomarcador cuando la demencia se ha establecido [194].

En la mayoría de los sujetos con la AD en los que se ha realizado un diagnóstico clínico [195], se observan niveles bajos de A β 42 en el CSF. Estos niveles pueden detectarse años o décadas antes de la aparición de los síntomas [227]. Aunque sus niveles aumentan en el cerebro de pacientes con la AD, paradójicamente disminuyen en el CSF. La razón no está clara, aunque es posible que se deba a la mayor facilidad de fibrilación de A β 42 y su secuestro en placas. Por otra parte, niveles bajos de A β 42 se han determinado también en otras patologías como la hidrocefalia normotensiva o en la encefalopatía del tipo Creutzfeldt-Jakob, así como en alguna otra patología [228].

Se ha demostrado que niveles elevados del cociente T-tau/A β 42 o P-tau/A β 42 en el CSF infieren en el deterioro clínico, funcional y cognitivo [229], el cual posee un elevado nivel predictivo para la identificación de sujetos con AD prodrómico o con MCI [230].

A pesar del avance realizado en los últimos años, la combinación de los marcadores clásicos de la AD, A β 42, T-tau y P-tau, continúa sin ofrecer suficiente mejora en el diagnóstico clínico, y la búsqueda de nuevos biomarcadores en el CSF sigue siendo prioritaria.

La obtención de CSF para el estudio de biomarcadores supone un procedimiento que todavía se considera invasivo, y su análisis resulta complicado para muchos de los sistemas de salud [224]. Por ello, la generalización del uso de biomarcadores para el diagnóstico de la AD requiere que los test sean simples y seguros para el paciente, que detecten de forma temprana la enfermedad, que tengan un alto valor predictivo positivo con un bajo índice de falsos negativos, y un coste/beneficio aceptable.

Este apoyo “biológico” al diagnóstico de la AD permitirá, una vez desarrollado y validado, llevar a cabo una medicina más precisa, con el soporte de los biomarcadores para realizar el diagnóstico temprano y valorar la respuesta al tratamiento.

Existen una serie de aspectos pendientes de desarrollarse/mejorar en el futuro, entre los que se encuentra establecer unos parámetros razonables de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad en todos los biomarcadores, corrigiendo su variabilidad en el CSF. Además, resultaría interesante la introducción de nuevos biomarcadores al sistema AT(N) [96][224].

3.2. Otros fragmentos de APP como marcadores alternativos al A β : sAPP α y sAPP β

Como se ha comentado, el péptido A β 42 puede ser considerado como el marcador más específico para la AD, pero se da la paradoja de que disminuye en el CSF aún cuando aumenta su generación en el cerebro. De este modo, la dinámica del cerebro no se corresponde en paralelo con la del CSF. Por este motivo, se han considerado como biomarcadores alternativos fragmentos de APP alternativos al A β 42, que no quedan secuestrados en placas, y que también son generados durante el procesamiento de la proteína. Los fragmentos del ectodominio de la APP, sAPP, han sido postulados como nuevos y prometedores biomarcadores en el CSF para el diagnóstico de la AD. Tanto sAPP α como sAPP β están presentes en el CSF, y numerosos estudios han buscado confirmar su potencial interés [231][232][233].

Sin embargo, hasta el momento, la determinación de los niveles de sAPP α , producto de la vía no amiloidogénica, en el CSF de sujetos con la AD frente a sujetos sin demencia ha resultado contradictoria. De este modo, hay trabajos en los que se reporta un aumento en sus niveles, otros que no muestran cambios significativos, e incluso hay algunos que muestran una ligera disminución [234]. Los resultados de los niveles de sAPP β , de los que se espera reflejen la vía amiloidogénica, también han resultado controvertidos [234]. Además, la mayoría de los estudios muestran una correlación positiva entre los niveles de sAPP α y sAPP β , tanto en sujetos control como en sujetos con la AD [235][236][237][238]. Dado que la generación de sAPP β debería ser inversamente proporcional a la de sAPP α , estos resultados son un tanto desconcertantes, y se ha sugerido que puede haber un factor común que regule el metabolismo de APP influyendo en la actividad de ambas secretasas (α y β -secretasa) [231]. También se ha sugerido una posible reactividad cruzada en los anticuerpos usados en los ensayos de sAPP α y sAPP β como un factor contribuyente para su inexplicable correlación [231].

Hasta hace poco no se había estudiado la posibilidad de que el sAPP α y el sAPP β estuvieran presentes en CSF formando oligómeros, aunque a nivel cerebral la APP forma dímeros en membrana. En un trabajo anterior de nuestro grupo demostramos que la APP completa, no procesada proteolíticamente (sAPPf, del inglés *soluble full-length*), coexiste en el CSF con sAPP α y sAPP β , y que todas estas especies son capaces de formar heterómeros [239][240][241]. En este sentido, el estado de oligomerización de APP es

especialmente relevante, ya que la mayoría de las cuantificaciones de los niveles de sAPP α y sAPP β en el CSF de los sujetos con la AD se basan en determinaciones ELISA, en las que no se discrimina el estado de oligomerización de estas proteínas. Los datos previos de nuestro equipo indican que la formación de heterómeros de sAPP interfiere en la medición de los niveles de sAPP α y sAPP β cuando se utilizan los ELISA comerciales disponibles en la actualidad.

Por lo tanto, la correcta estimación de los niveles de sAPP α y sAPP β es necesaria para una evaluación de su potencialidad como biomarcadores. La posibilidad de estudiar otros fragmentos proteolíticos producto del procesamiento de la APP permanece casi totalmente inexplorada [231].

II. Objetivos

La finalidad del trabajo estriba en caracterizar las especies de sAPP en CSF como biomarcadores potenciales para la AD. Para ello, se han desarrollado los siguientes objetivos:

1. Caracterizar las variantes/isoformas de sAPP (sAPP_f, sAPP_α y sAPP_β) en el CSF de pacientes sanos y con la AD.
2. Determinar la posible correlación existente entre los niveles de sAPP_f, sAPP_α y sAPP_β entre sí, y respecto a los biomarcadores clásicos de la AD, como son el Aβ₄₂, T-tau y P-tau, en el CSF de pacientes sanos y con la AD.
3. Determinar los niveles de los fragmentos proteolíticos cerebrales de la APP (sAPP_α/sAPP_β).
4. Determinar la influencia de la glicosilación en el procesamiento de la APP en extractos cerebrales de pacientes sanos y con la AD.
5. Investigar la presencia de pequeños fragmentos APP-CTFs en el CSF de pacientes sanos y con la AD para explorar su potencial empleo como biomarcadores alternativos.

III. Material y Métodos

1. Recolección de muestras: CSF y cortezas cerebrales humanas

Con el fin de conseguir los objetivos antes mencionados, hemos realizado diversos análisis empleando para ello dos tipos de muestras humanas: CSF y fragmentos de corteza cerebral frontal.

1.1. Muestras de CSF

Disponemos de muestras de 3 tipos de pacientes procedentes de diferentes centros médicos. Cada estudio se realizó con sus respectivos controles (NC, del inglés *non-disease controls*), obtenidos por el mismo equipo, y con el mismo protocolo de manipulación de las muestras. En los grupos control la edad fue siempre pareada respecto a la de los sujetos con demencia. Dado el escaso número de muestras ensayadas, no siempre se consiguió disponer de colecciones dónde el género también estuviera pareado.

- **FAD**

7 pacientes con confirmación de AD autosómico dominante. Todos ellos tienen el gen *PSEN1* mutado (diversas mutaciones) y forman parte del Programa de Asesoramiento Genético para la demencia familiar (PICOGEN). Las muestras proceden del Hospital Clínic de Barcelona.

NC, como controles de los pacientes con FAD: 7 sujetos sanos de las mismas familias y edad similar, pero portadores del gen silvestre (sin mutar).

- **dDS** (del inglés *Down syndrome subjects with Alzheimer's type dementia*)

7 pacientes con síndrome de Down y demencia tipo Alzheimer. Las muestras proceden del Hospital Sant Pau de Barcelona.

NC, como controles de los pacientes con dDS: 7 sujetos sanos de edad similar.

- **LOAD**

20 sujetos con AD esporádico. Estos sujetos presentan síntomas cognitivos tempranos y diagnóstico biológico de la AD por su perfil de biomarcadores clásicos de CSF. Estos biomarcadores tienen capacidad para discriminar sujetos con la AD con más de un 90% de especificidad [242]: niveles de T-tau superiores a 400 pg/mL y de P-tau a 70 pg/mL, junto con concentraciones de A β 42 menores de 550 pg/mL. Las muestras proceden del Laboratorio Clínico de Neuroquímica en Mölndal, Suecia.

NC, como controles de los pacientes con LOAD: 20 sujetos de edades similares con síntomas cognitivos inespecíficos y sin evidencia neuroquímica

de la AD determinada mediante los biomarcadores clásicos (T-tau <350 pg/mL; P-tau <60 pg/mL y A β 42 > 550 pg/mL).

Medición de T-tau, P-tau y A β 42 por ELISA

Las concentraciones totales de T-tau, P-tau y A β 1-42 (A β 42) en el CSF se midieron utilizando los ensayos ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas, del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) de INNOTEST (Fujirebio Europe). Todas las muestras fueron analizadas como parte de la rutina clínica por técnicos de laboratorio certificados, siguiendo procedimientos estrictos y con controles de calidad de placas ELISA individuales, tal y como se ha descrito previamente [243].

1.2. Muestras de corteza cerebral frontal

Las muestras de corteza cerebral se corresponden con piezas congeladas inferiores a 1 gramo de tejido. Estas muestras fueron obtenidas del banco de tejidos neurológicos de la Fundación CIEN-Unidad de Investigación Proyecto Alzheimer (UIPA; Madrid), y del banco de tejidos de la Región de Murcia, en ambos casos coordinados por el mismo neuropatólogo, el Dr. Alberto Rábano (Fundación CIEN-UIPA).

Los casos de la AD se corresponden a casos esporádicos con historial clínico de demencia y confirmación histológica. Los casos fueron categorizados como estadios V-VI durante el análisis neuropatológico siguiendo la escala de Braak y Braak [244]. El intervalo postmortem medio del tejido fue inferior a 8 horas. Se dispuso de muestras obtenidas de 7 pacientes con la AD (3 hombres y 4 mujeres, con un rango de edad 81 ± 12 años) y 7 pacientes sanos como controles (3 hombres y 4 mujeres, en este caso su rango de edad fue sensiblemente inferior por limitaciones de disponibilidad del banco de tejidos, 65 ± 15 años). Todos los pacientes con la AD cumplían criterios clínicos para probable AD (NINCDS-ADRDA) [245]. Tal y como se comentó anteriormente, fueron seleccionados en base a su historial clínico y diagnóstico neuropatológico basado en los criterios de diagnóstico CERAD, del inglés *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*[246]. Los sujetos control resultaron negativos en su análisis histopatológico, y no tenían antecedentes de síntomas neurológicos o psiquiátricos ni de alteración en la memoria.

Todos los estudios realizados con las muestras fueron previamente aprobados por el comité de ética de la Universidad Miguel Hernández, y se llevaron a cabo en

conformidad con la declaración de Helsinki [247]. Las muestras se recibieron anonimizadas e identificadas sólo en base al código del banco de tejidos.

2. Procesamiento analítico de las muestras biológicas

Cada tipo de muestra tuvo un tratamiento diferente en función de su naturaleza.

2.1. Extracción, tratamiento y preparación de las muestras

2.1.1. Muestras de CSF

Nuestro estudio no requirió de reclutamiento específico de los sujetos participantes, y se realizó con consentimiento informado para la cesión de las muestras en proyectos de investigación genéricos. El procedimiento de extracción y análisis del CSF en los hospitales y centros donde fue recolectado se realizó siguiendo protocolos estandarizados [248]. Las muestras fueron almacenadas a -80°C en el propio banco hasta su cesión. El transporte se realizó en nieve carbónica. A su recepción, los CSFs fueron alicuotados por nuestro equipo de investigación para evitar procesos de descongelación-congelación en cada uno de los análisis realizados.

2.1.2. Muestras de corteza cerebral

Las muestras de tejido cerebral recolectadas en los bancos de tejidos se mantuvieron en todo momento a -80°C . Su transporte se realizó en nieve carbónica y se almacenaron en destino de nuevo a -80°C .

Para solubilizarlas, se descongelaron parcialmente en nieve carbónica de manera que la temperatura no subiese más de lo necesario (entre -40°C y -20°C). De esta forma, se separaron pequeños trozos de muestra de alrededor de 0,2 g. Posteriormente, el tejido separado se descongeló lentamente en hielo, se pesó con precisión y se homogeneizó en un tampón de solubilización (10% p/v) adecuado para extraer proteínas intrínsecas de membrana (Tris-HCl 50 mM; pH 7,4; NaCl 500 mM; EDTA 5 mM; 1% (p/v) Nonidet P-40; 0,5% (p/v) Triton X-100). El tampón se complementó con un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma P834) para evitar la degradación producida por las enzimas proteolíticas liberadas durante la homogeneización. El homogenado se sonicó utilizando un *Microson ultrasonic cell disruptor Misonix* en 3 series de 10 pulsos, manteniéndolo siempre en hielo y evitando en la medida de lo posible la formación de espuma. Tras sonicar, las muestras se centrifugaron a $70.000\times g$ a 4°C durante 1 hora (*AllegraTM 64R de Beckman Coulter*).

Por último, se recolectó el sobrenadante, que contenía las proteínas intracelulares y de membranas solubilizadas, se alicuotó y se almacenó a -80°C hasta el momento de su utilización.

La concentración total de proteína de los distintos extractos se determinó utilizando como estándar albúmina de suero bovino (BSA, abreviatura estándar del inglés) de acuerdo con el método del ácido bicinconínico (BCA; Pierce). Este método se basa en la reducción, por reacción con las proteínas, de los iones cúprico a iones cuproso bajo condiciones alcalinas. Los iones cuprosos reaccionan con el BCA (verdoso) para dar un color morado. La intensidad del color morado resulta proporcional al contenido proteico de la muestra. La medida de la proteína se realizó en placa de 96 pocillos, en la que también se incluyeron pocillos con BSA a diferentes concentraciones para construir una recta patrón de concentración frente a absorbancia. Una vez obtenida la recta, se extrapolaron los valores de absorbancia para conocer la concentración de proteína de la muestra a analizar. Las determinaciones de proteína se realizaron siempre por triplicado, utilizando $2\ \mu\text{L}$ de muestra, y $10\ \mu\text{L}$ para los estándares y los blancos (H_2O destilada por la dilución de los estándares de BSA y tampón de solubilización por las muestras). Se midió la absorbancia de la muestra a $560\ \text{nm}$ en el lector de placas *Microplate Reader Benchmark* de Bio-Rad, que está acoplado a un ordenador para registro de los resultados y tratamiento de los mismos mediante el programa Excel.

3. Electroforesis y western blot de APP

Con el fin de analizar y caracterizar las proteínas de extractos de corteza cerebral y de CSF, se recurrió a la separación electroforética en condiciones desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Las electroforesis se llevaron a cabo siguiendo el método de *Laemmli* [249] y con el sistema electroforético *Mini-Protean Tetra Cell* (Bio-Rad). Se trata de un tipo de electroforesis desnaturizante en que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturizantes como el beta-mercaptoetanol, que rompe los puentes disulfuro, y el SDS, un detergente aniónico que actúa como agente desnaturizante y disociante, igualando las cargas entre proteínas y permitiendo su separación en función únicamente de su masa molecular. Por lo tanto, es un tipo de electroforesis basado en la distinta migración de moléculas cargadas en solución en respuesta a un campo eléctrico.

Los volúmenes de muestra a cargar fueron de 30 μ L para los CSF (mismo volumen en cada calle) y 30 μ g para las cortezas cerebrales (misma cantidad de proteína en cada calle). Antes de cargar el gel, se añadió tampón de carga electroforética a las muestras, y éstas se desnaturalizaron en un termobloque a 98°C durante 5 minutos.

Para el análisis de la proteína completa APP y de los fragmentos N-terminales de mayor tamaño, sAPP α y sAPP β , las muestras se separaron por electroforesis en geles de Tris-Tricina al 7,5%, y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ m (Schleicher & Schuell Bioscience, GmbH, Dassel, Germany).

Para el análisis de los fragmentos C-terminales de APP (APP-CTFs), las muestras de CSF se separaron por electroforesis en geles Tris-Tricina al 16%, y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,20 μ m (Whatman, GE-Healthcare).

Las membranas fueron bloqueadas con tampón de bloqueo Odyssey (LI-COR Biosciences) y posteriormente se incubaron con los anticuerpos indicados en la Tabla 3.1. Por último, se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado conjugado fluorescentemente. La inmunoreactividad se registró en un sistema de imágenes infrarrojas Odyssey Clx (LI-COR Biosciences). La intensidad de las bandas obtenidas fue analizada empleando el software LI-COR (Image Studio Lite).

3.1. Anticuerpos utilizados

3.1.1. Anticuerpos primarios

- **Anti-APP N-terminal (IgG):** Anticuerpo policlonal desarrollado en conejo. Epítipo: aminoácidos 46-60 de APP695. Reconoce la región N-terminal del APP695, APP751 y APP770. Dilución 1:1000. Sigma **A8967**. Llamado en este estudio **Sigma-Nt**.
- **Anti-APP C-terminal (IgG):** Anticuerpo policlonal desarrollada en conejo. Epítipo: aminoácidos 676-695 del APP695. Reconoce la región C-terminal del APP695, APP751 y APP770. Dilución 1:2000. Sigma **A8717**. Llamado en este estudio **Sigma-Ct**.
- **Anti-APP C-terminal (IgG1):** Anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón. Epítipo: aminoácidos 676-695 del APP695. Dilución 1:1000. Covance SIG-39152. Llamado en este estudio **C1/6.1**.

- **Anti-APP C-terminal (IgG):** Anticuerpo monoclonal desarrollado en conejo. Epítipo: aminoácido 750 del APP. Abcam ab32136. Dilución 1:1000. Llamado en este estudio **Y188**.
- **Anti-APP C-terminal (2D8):** desarrollado en rata. Epítipo: región N-terminal del A β humano. Dilución 1:50. Llamado en este estudio **2D8** [62].
- **Anti-APP C-terminal (2E9):** desarrollado en rata. Epítipo: fragmento del ectominio de APP próximo al punto de corte N-terminal del A β humano (N-PWHSFGADSV-C). Dilución 1:100. Llamado en este estudio **2E9**[62].
- **Anti-A β (IgG1):** Anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón. Epítipo: aminoácidos 1-16 del péptido β -amiloide. Covance SIG-39300. Dilución 1:2000. Llamado en este estudio **6E10**.
- **Anti-sAPP α (IgG_{2b}):** Anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón. Epítipo: C-terminal específico del sAPP α humano. Dilución 1:100. IBL 11088. Llamado en este estudio **IBL- α** .
- **Anti-sAPP β (IgG):** Anticuerpo policlonal desarrollado en conejo. Epítipo: C-terminal específico del sAPP β humano. IBL 18957. Dilución 1:100. Llamado en este estudio **IBL- β** .
- **Anti-KPI (IgG):** anticuerpo policlonal desarrollado en conejo. Epítipo: dominio KPI específico de las isoformas APP751 y APP750. Millipore AB5302. Dilución 1:500. Llamado en este estudio **KPI**.

Anticuerpo	Sitio de reconocimiento	Dilución	Especie
Anti-APP-Ct: Sigma-Ct (policlonal; Sigma Aldrich)	Aminoácidos 676-695 del C-terminal de APP695	1:2000	Conejo
Anti-APP-Ct: C1/6.1 (monoclonal; Covance)	Aminoácidos 676-695 del C-terminal de APP695	1:1000	Ratón
Anti-APP-Ct: Y188 (monoclonal; Abcam)	Aminoácido 750 del C-terminal de APP750	1:1000	Conejo
Anti-APP-Nt: Sigma-Nt (policlonal; Sigma Aldrich)	Aminoácidos 46-60 del N-terminal de APP695	1:1000	Conejo
Anti-sAPPα: IBL-α (monoclonal; IBL)	Anticuerpo conformacional contra el C-terminal específico del sAPP α	1:100	Ratón
Anti-sAPPβ: IBL-β (policlonal; IBL)	Anticuerpo conformacional contra el C-terminal específico del sAPP β	1:100	Conejo
Anti-APP-KPI: KPI (policlonal; Millipore)	Dominio KPI específico de las isoformas APP751 y APP750	1:500	Conejo
Anti-APP-Ct: 2D8	Ectominio de APP próximo al punto de corte N-terminal del A β humano (N-PWHSFGADSVP-C)	1:50	Rata
Anti-APP-Ct: 2E9	Región N-terminal del A β humano	1:100	Rata
Anti-Aβ: 6E10 (monoclonal; Covance)	Aminoácidos 1-16 del péptido A β . También reconoce el APP completo y el sAPP α	1:2000	Ratón

Tabla 3.1. Anticuerpos primarios. En la tabla se pueden observar los anticuerpos primarios utilizados en este estudio dirigidos contra la proteína APP humana. En ella se especifica el sitio de reconocimiento y las diluciones a las que se usaron. Si no se indica lo contrario, los anticuerpos reconocen las isoformas APP695, APP751 y APP770 sin distinción. APP-Ct: APP C-terminal; APP-Nt: APP N-terminal.

3.1.2. Anticuerpos secundarios

Todos los anticuerpos secundarios se utilizaron a una dilución 1:10000, y pertenecen a la marca comercial LI-COR® Biosciences Lincoln.

- **IRDye® 680RD (IgM):** anti-ratón desarrollado cabra. Número de catálogo 925-68180.
- **IRDye® 800CW (IgG):** anti-conejo desarrollado en cabra. Número de catálogo 925-32211.
- **IRDye® 680RD (IgG):** anti-conejo desarrollado de cabra. Número de catálogo 925-68071.
- **IRDye® 800CW (IgG):** anti-ratón desarrollado en cabra. Número de catálogo 926-32210.
- **IRDye® 800CW (IgG):** anti-rata desarrollado en cabra. Número de catálogo 925-32219.

Para evaluar la especificidad de los anticuerpos pan-específicos de APP, se detectó simultáneamente la inmunoreactividad de sAPP β y sAPP α en muestras de CSF. Las transferencias se incubaron luego con los anticuerpos secundarios conjugados apropiados (IRDye 680RD de cabra anti-ratón y IRDye800CW de cabra anti-conejo) y se analizaron mediante el sistema de imágenes infrarrojas Odyssey Clx (LI-COR).

Para demostrar la identidad de las bandas KPI de 120 y 100 kDa, se detectó simultáneamente la inmunoreactividad de dos anticuerpos en diferentes combinaciones en muestras de CSF: Sigma-Nt/KPI y 6E10/KPI. Las transferencias se sondearon con los anticuerpos secundarios conjugados apropiados (IRDye 800CW de cabra anti-ratón e IRDye 680RD de cabra anti-conejo) y se analizaron mediante el sistema de imágenes infrarrojas Odyssey Clx (LI-COR).

Para demostrar la identidad de los fragmentos APP-CTF, se detectó simultáneamente la inmunoreactividad de dos anticuerpos en diferentes combinaciones en muestras de CSF: Sigma-Ct/2E9 y (C1/6.1)/2D8. Las transferencias se sondearon con los anticuerpos secundarios conjugados apropiados (IRDye 680RD de cabra anti-conejo

e IRDye 800CW de cabra anti-rata para el doble marcaje Sigma-Ct/2E9; y IRDye 680RD de cabra anti-ratón e IRDye 800CW de cabra anti-rata para el doble marcaje (C1/6.1)/2D8, y se analizaron mediante el sistema de imágenes infrarrojas Odyssey Clx (LI-COR).

4. Análisis de APP mediante interacción con lectinas

Para la caracterización de los azúcares terminales presentes en la proteína APP obtenida de extractos cerebrales se realizó un estudio de interacción con lectinas. Las lectinas son glicoproteínas de naturaleza no inmune con una alta especificidad por los azúcares terminales y con capacidad para aglutinarlos [250]; la especificidad de las lectinas usadas en este estudio puede consultarse en la Tabla 3.2.

Para el ensayo de interacción se mezclaron, en microtubos de 0,5 mL, extractos de corteza cerebral (60 µg de muestra en un volumen final de 60 µL) con 30 µL de la lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) (Sigma C9017) o de *Phaseolus vulgaris* (PHA) (Vector AL113), inmovilizadas en sefarosa (ConA) o agarosa (PHA). La mezcla se incubó a 4°C durante toda la noche en agitación suave. La fracción de glicoproteína no ligada a las lectinas se separó por centrifugación a 400×g durante 3 minutos en tubos Spin-X (Costar 8163), y el sobrenadante se reservó para posterior análisis electroforético. La resina de agarosa conteniendo la fracción de glicoproteína ligada a la lectina se hirvió a 98°C durante 5 minutos en presencia de tampón de electroforesis, y se reservó para su posterior análisis.

En base a experimentos preliminares y a la propia experiencia del grupo de investigación, el cálculo del porcentaje de proteína APP que interacciona con la lectina en cuestión se realizó en la fracción no ligada, donde los resultados han mostrado una mayor reproducibilidad. De este modo, se realizó el análisis por western blot de las fracciones no ligadas a lectina de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado anterior (apartado 3). En todos los experimentos se incluyó una muestra de extracto de corteza cerebral sin interaccionar con ninguna lectina para el cálculo de la proteína total. Esta muestra se mantuvo en las mismas condiciones que el resto. El porcentaje de APP no ligado a lectinas para cada uno de los fragmentos N-terminal de APP se calculó como el cociente entre la inmunorreactividad de APP no ligada a lectina y la inmunorreactividad total para cada una de las bandas inmunoreactivas de APP.

Lectina	Especificidad
Canavalia ensiformis (Con A)	Residuos de α -D-manosil y α -D-glucosil
Phaseolus vulgaris (PHA)	Complejos bi- o tri-antenarios unidos por N-glicosilación a Asn, y ricos en galactosa

Tabla 3.2. Lectinas. En la tabla se muestra la especificidad de unión a los residuos terminales del azúcar indicado de las lectinas Con A y PHA utilizadas en este estudio.

5. Inmunoprecipitación de APP

Para la inmunoprecipitación, se realizó una incubación previa de la muestra de CSF con proteína A-Sefarosa durante 2 horas a 4°C para eliminar la mayor parte posible de pegada inespecífica (Sigma Aldrich Co). Las inmunoprecipitaciones se realizan o/n a 4°C incubando 150 μ L de CSF con diferentes anticuerpos anti-APP tal y como se indica en los resultados. Los anticuerpos se acoplaron previamente a la proteína A-Sefarosa usando diclorhidrato de dimetil pimelimidato (Sigma Aldrich Co). Se utilizó una IgG de conejo y una IgG de rata (Vector) como anticuerpos control para las inmunoprecipitaciones. Las proteínas precipitadas se lavaron con PBS y se eluyeron con tampón de glicina 0,1 M a pH 2,5. Tras la neutralización del pH, se desnaturalizaron los sobrenadantes y se sometieron a SDS-PAGE. Las membranas se sondearon con un anticuerpo alternativo anti-APP según lo indicado.

6. Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados usando el programa SigmaStat (Version 3.5; Systac Software Inc.), SPSS y R software. Los análisis se realizaron mediante la prueba *t* de Student o la prueba U de Mann-Whitney para comparaciones por pares y determinación de los valores *p* exactos. Para verificar la distribución normal de las muestras se empleó el test Kolmogorov-Smirnov. El estudio de las correlaciones entre las variables estudiadas se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

IV. Resultados

1. Alteraciones en los niveles de las distintas especies de APP presentes en el CSF de pacientes con la enfermedad de Alzheimer

Tal y como se ha comentado con anterioridad, el diagnóstico temprano y preciso de la AD es esencial para establecer terapias oportunas y efectivas. Debido a su importante papel en la patogenia de la enfermedad [251], el A β es uno de los biomarcadores más específicos para la AD. El aumento en la producción y deposición de A β 42 en el cerebro afectado por la AD probablemente se produce durante décadas antes de la aparición de síntomas [252]. Sin embargo, el A β se acumula en el parénquima cerebral como placas seniles, y ello se refleja probablemente en la reducción de su concentración en el CSF. En consecuencia, los cambios longitudinales en las especies de A β en el CSF son difíciles de interpretar, y de ahí la necesidad de biomarcadores adicionales, especialmente en las primeras etapas de la enfermedad. Del mismo modo, es difícil obtener información significativa sobre los posibles cambios en los niveles de A β en el CSF, información que podría ayudar a evaluar las terapias experimentales destinadas a reducir la producción de A β [253].

Por todo ello, en este estudio planteamos el análisis de sAPP α y sAPP β en el CSF mediante la técnica de western blot.

1.1. Niveles inalterados de sAPP α y sAPP β en el CSF de pacientes con la AD

Los largos fragmentos solubles derivados de la proteólisis de la APP, como son el sAPP α y el sAPP β , se han postulado como biomarcadores prometedores para el diagnóstico clínico de la AD en el CSF (ver apartado 3.2.). Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento sobre los niveles de estas proteínas en el CSF son poco concluyentes, además de contradictorios. Esto puede ser debido a que la mayoría de los estudios previos se han basado en determinaciones ELISA, pero dada la formación de heterómeros de estas proteínas en el CSF [231], su detección mediante esta técnica se ve comprometida. Por ello, para evitar la posible interferencia de la formación de complejos heteroméricos de esta proteína en el CSF, hemos determinado los niveles de sAPP α y sAPP β después de su separación electroforética en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE mediante la técnica de western blot, y la posterior utilización de anticuerpos pan-específicos contra los dominios exclusivos C-terminales de estos fragmentos que se generan tras el corte por la α - o β -secretasa (Figura 4.1. (A)).

Los CSFs de los pacientes con la AD y de los controles (NC) utilizados en este estudio (referenciados como LOAD en Material y Métodos), fueron previamente caracterizados mediante los biomarcadores clásicos de la AD como son el A β 42, el T-tau y el P-tau (ver Tabla 4.1.). Para la detección del sAPP α y el sAPP β , la especificidad de los anticuerpos fue corroborada con un ensayo simultáneo de fluorescencia (Figura 4.1. (B)). Estos ensayos revelaron un patrón de bandas similar, con una banda inferior más ancha de aproximadamente 100-110 kDa (a partir de ahora referida como banda de 100 kDa), y una banda superior con menor inmunoreactividad de unos 120-130 kDa (a partir de ahora referida como banda de 120 kDa). La incubación de las membranas con ambos anticuerpos simultáneamente, dio como resultado una colocalización moderada sólo en la banda de 120 kDa (Figura 4.1. (B)). Hay que tener en cuenta que las pequeñas diferencias detectadas en la migración electroforética de las proteínas cuando se utilizan distintos anticuerpos, posiblemente estén reflejando las pequeñas diferencias de tamaño entre el sAPP α y el sAPP β , aunque diferencias en la glicosilación también pueden contribuir a la diferente migración electroforética.

No se detectaron diferencias significativas entre los grupos control y AD respecto a los niveles estimados de inmunoreactividad de la banda de 100 kDa, ni de la de 120 kDa, ni para sAPP α ni para sAPP β (Figura 4.2.). Intentamos también determinar si existía una diferencia relativa en el cociente entre las bandas de 100 y 120 kDa, y para ello, calculamos la relación entre la inmunoreactividad de las banda inferior y superior (relación 100 kDa/120 kDa, o cociente APPr). De nuevo, no encontramos diferencias significativas entre los grupos control y AD (Figura 4.2.).

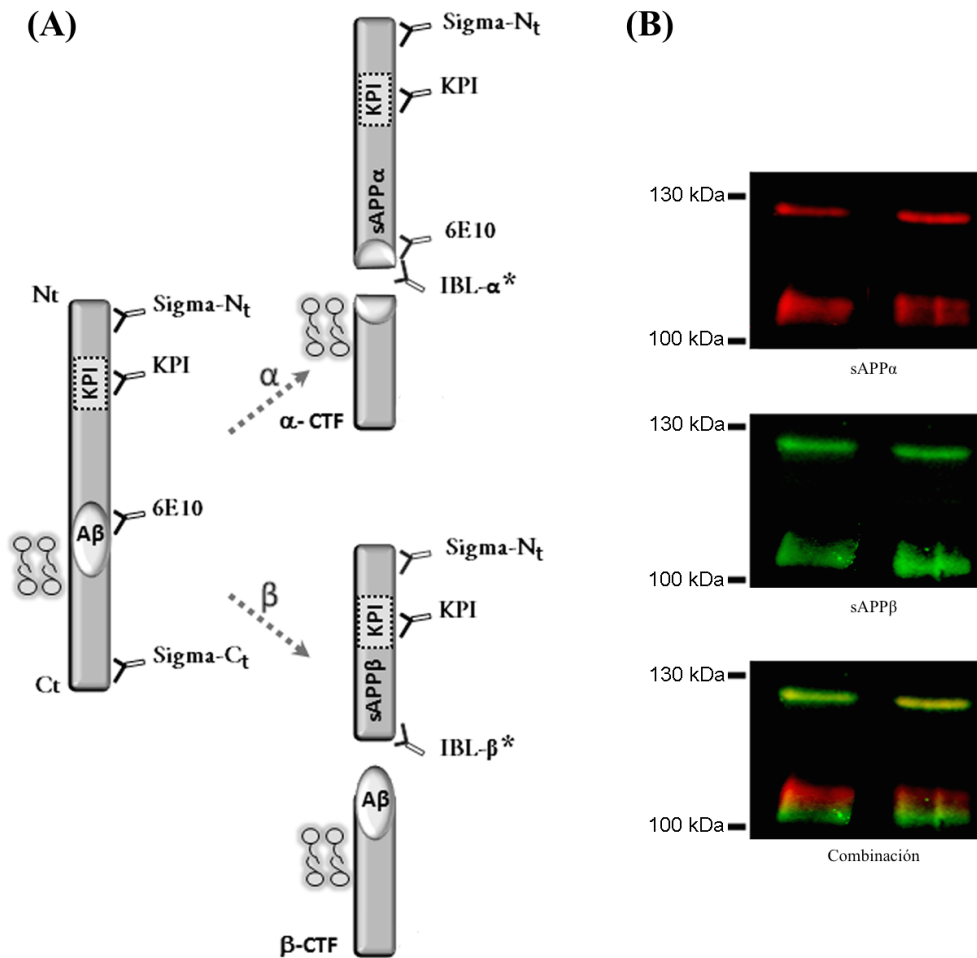


Figura 4.1. Representación del procesamiento de sAPPf y detección de sAPPα y sAPPβ mediante fluorescencia. (A) Representación esquemática del procesamiento de sAPPf por α-secretasa (vía no amiloidogénica) y β-secretasa (vía amiloidogénica), y de la generación de fragmentos grandes extracelulares: sAPPα y sAPPβ (no dibujados a escala). Se indican los epítomos para los anticuerpos utilizados en este estudio. El asterisco (*) indica los anticuerpos pan-específicos exclusivos del dominio C-terminal de sAPPα (IBL-α) y sAPPβ (IBL-β). (B) Se analizaron dos muestras de CSF de sujetos control para detectar sAPPα con el anticuerpo IBL-α y sAPPβ con IBL-β. La fluorescencia simultánea (suma) demuestra la especificidad de estos anticuerpos. La colocalización solo fue evidente para la banda de 120 kDa (amarillo).

Grupo	Edad (años)	Género	CSF Aβ42 (ng/L)	CSF T-tau (ng/L)	CSF P-tau (ng/L)
NC	69 ± 1	8M/12H	831 ± 30	251 ± 14	40 ± 2
AD	69 ± 3	15M/5H	424 ± 12*	762 ± 69*	100 ± 8*

Tabla 4.1. Datos clínicos, demográficos, y análisis de biomarcadores clásicos de la colección de CSFs usados en este estudio. M, mujeres; H, hombres; * $p < 0,001$. Las muestras de la AD están referenciadas como LOAD en el apartado de Material y Métodos.

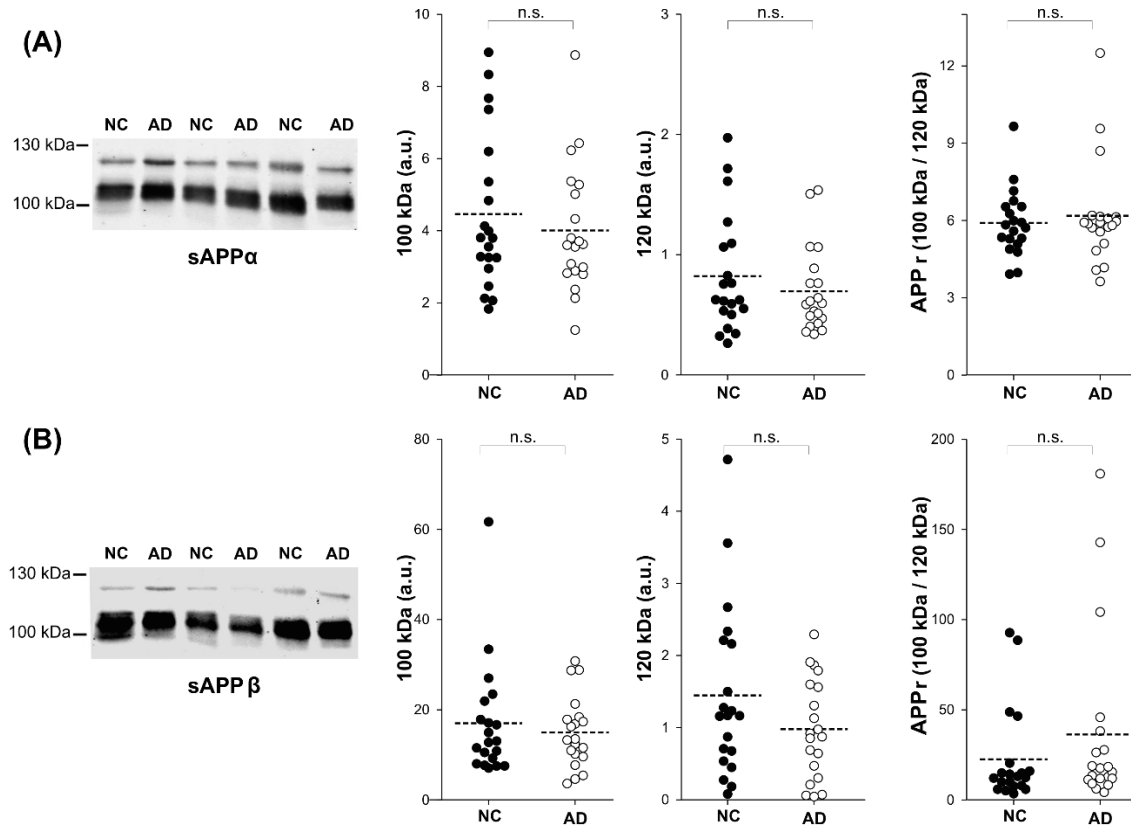


Figura 4.2. Niveles de sAPP α (A) y sAPP β (B) en el CSF de pacientes con AD. Western blots representativos de muestras de CSF humano de NC (círculos negros; n = 20) y de pacientes con AD de edad similar (círculos blancos; n = 20) incubados con un anticuerpo contra (A) sAPP α (IBL- α) o (B) sAPP β (IBL- β). Al lado de la imagen se muestra la cuantificación densitométrica de las bandas inferior y superior tanto de sAPP α como de sAPP β , y la relación derivada del cálculo del cociente de la inmunorreactividad entre las bandas inferior y superior para cada una de las muestras (APP r: 100 kDa/120 kDa). Los datos representan la media \pm SEM. Cada una de las muestras fue analizada por duplicado. n.s.: valor de p no significativo.

Curiosamente, algunos estudios han detectado una correlación positiva entre los niveles de sAPP α y sAPP β en el CSF [236], pero nosotros consideramos a priori que esta correlación, inexplicada e inesperada, podría ser en parte artefactual y estar relacionada con la existencia de heterómeros de estas proteínas en el CSF, y a su determinación mediante ELISA, que no discrimina dichos heterómeros [231]. Sin embargo, en este estudio en el que el análisis se realiza mediante SDS-PAGE, se confirma la correlación entre los niveles de sAPP α y sAPP β para ambas bandas, tanto en el grupo control como en la AD (Figura 4.3.). Además, tanto la inmunoreactividad de la banda superior como de la inferior de sAPP α , se correlacionó con los niveles de A β 42 en el grupo de control, mientras que esta correlación no se evidenció en los pacientes con la AD. Por otro lado, los niveles de sAPP α se correlacionaron con los de T-tau en las muestras patológicas, pero no en las muestras control (Figura 4.4. (A y B)). Del mismo modo, la correlación entre las bandas superior e inferior de sAPP β con T-tau solo se detectó en las muestras de pacientes con la AD (Figura 4.4. (C y D)), mientras que no hubo correlaciones claras entre el sAPP β y el A β 42, ni en el grupo control ni en el grupo con la AD.

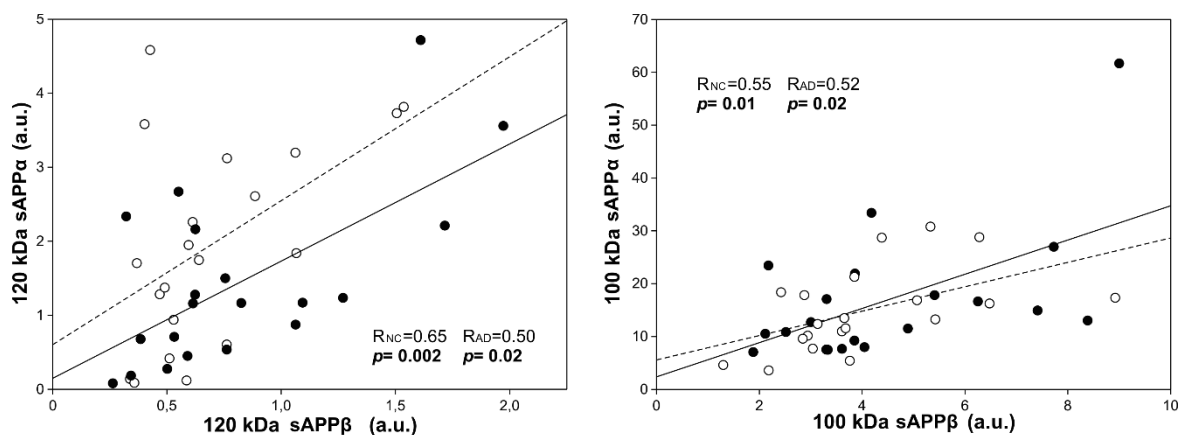


Figura 4.3. Correlación positiva entre sAPP α y sAPP β en muestras de CSF. Se analizaron muestras de CSF de 20 NC (círculos negros) y 20 pacientes con la AD (círculos blancos) con edad similar para detectar fragmentos sAPP α y sAPP β utilizando anticuerpos pan-específicos (ver Figura 4.2.). Se encontró una correlación positiva entre los niveles de sAPP α y de sAPP β para las bandas inferiores (~ 100 kDa) y superiores (~ 120 kDa) de APP en sujetos NC (línea continua) y con la AD (línea punteada). Se muestran el coeficiente de regresión lineal (R) y los valores de p para cada correlación.

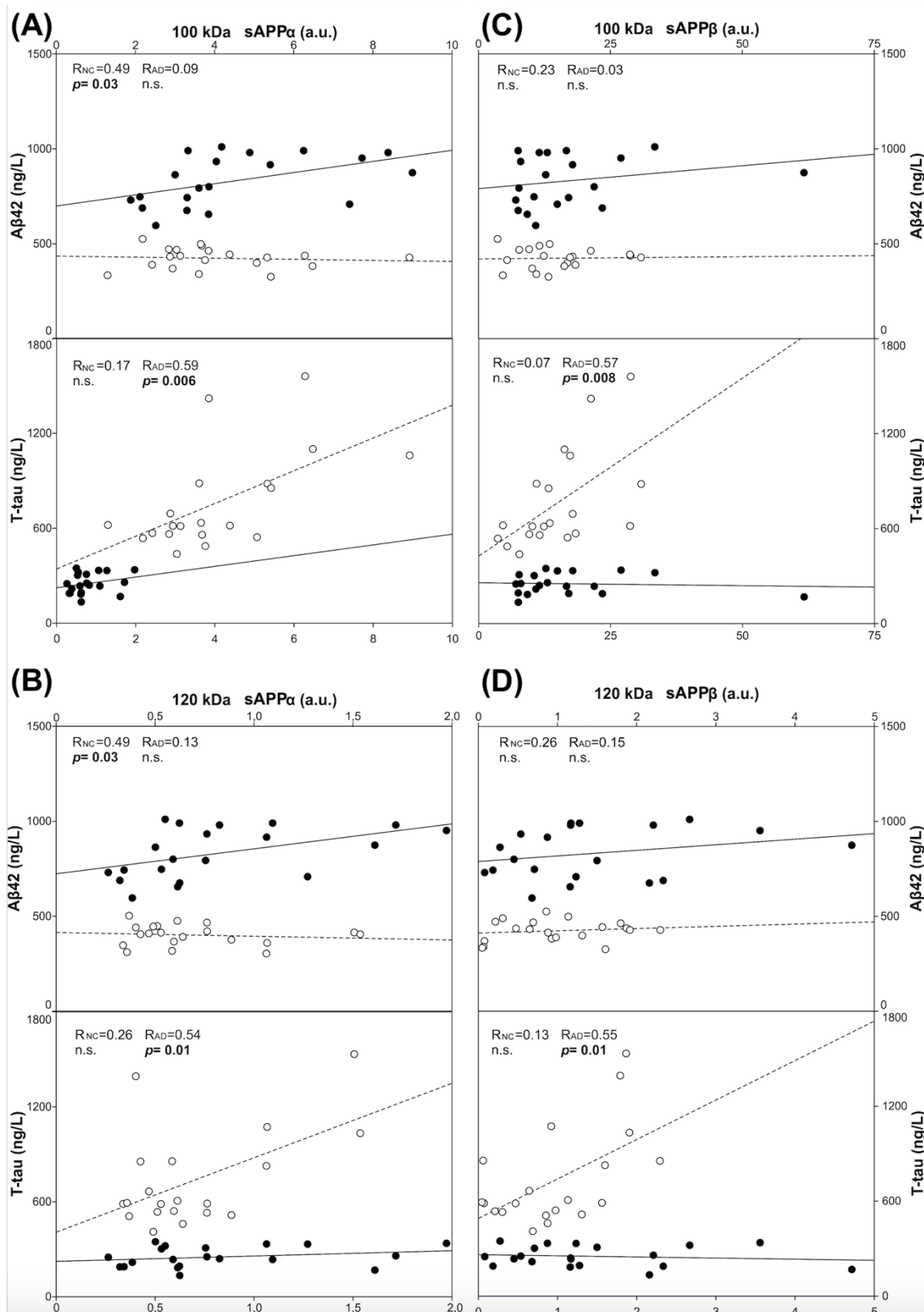


Figura 4.4. Correlación de sAPP α y sAPP β con los niveles de A β 42 y T-tau en muestras de CSF. Niveles para la banda de ~100 kDa; [(A) y (C)] y de ~120 kDa [(B) y (D)] de sAPP α (A, B) y sAPP β (C, D) en las muestras de CSF control (NC; círculos negros, líneas continuas) y de pacientes con la AD de edad similar (círculos blancos, líneas punteadas). Se usó una regresión lineal para evaluar la correlación de los sAPP con los niveles A β 42 y T-tau obtenidos mediante ELISA (ver Tabla 4.1.). Las correlaciones para P-tau fueron similares a las mostradas por T-tau (no se muestra). Se muestran el coeficiente de regresión lineal (R) y los valores de p para cada correlación. n.s., valor de p no significativo.

1.2. Desequilibrio entre las especies de APP en el CSF de pacientes con la AD

En un estudio anterior de nuestro grupo y mediante la utilización de anticuerpos específicos contra la región C-terminal de APP, se detectaron formas sin procesar de esta proteína en el CSF, y cuyo tamaño por SDS-PAGE fue similar al de los grandes fragmentos solubles de APP (sAPP α y sAPP β ; Figura 4.5. (A)). Estas bandas de aproximadamente 100 y 120 kDa se caracterizaron como especies solubles de APP sin procesar proteolíticamente, sAPPf [231]. Cuando determinamos los niveles de sAPPf en el CSF de la misma colección de sujetos, no encontramos diferencias significativas para ninguna de las dos bandas entre los sujetos del grupo control y con la AD (Figura 4.5. (A)). Sin embargo, sí se detectó una diferencia significativa en el cociente APPr (100 kDa/120 kDa) entre los controles y los sujetos con la AD (Figura 4.5. (A)). Por otro lado, tanto en el grupo control como en el de la AD, hubo correlación entre la banda de 100 kDa del sAPPf y la banda de similar masa molecular del sAPP α y sAPP β . Las correlaciones para la banda de 120 kDa del sAPPf también fueron positivas, excepto para el sAPP α del grupo control (Figura 4.5. (B)). Por último, ninguna de las bandas de sAPPf se correlacionó con los niveles de A β 42 y P-tau ni en el grupo control ni en el grupo con la AD. Sin embargo, las bandas sAPPf se relacionaron con los niveles de T-tau en el grupo con la AD, aunque no en el grupo control (Figura 4.5. (C)).

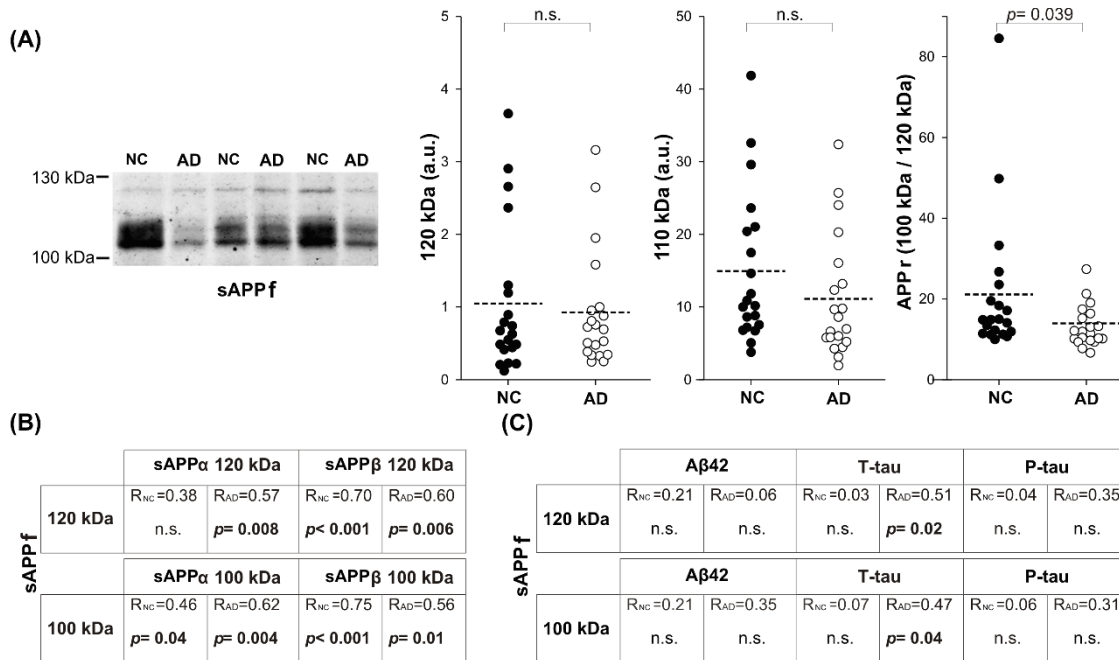


Figura 4.5. Inmunorreactividad de sAPPf en el CSF de controles y pacientes con la AD.

(A) Imagen de western blot representativo de muestras de CSF humano de controles (NC; círculos negros; $n=20$) y pacientes con la AD de edad similar (círculos blancos; $n=20$) resuelto con un anticuerpo anti-APP C-terminal (Sigma-Ct). Al lado de la imagen se muestra la cuantificación densitométrica para las bandas de ~120 y 100 kDa y el cociente APPr (100kDa/120 kDa) calculado tal y como se describe en la Figura 4.2. Los datos representan la media \pm SEM y los valores de p . Cada una de las muestras fue analizada por duplicado. (B) Coeficiente de regresión lineal (R) y valores de p para la correlación de sAPPf con sAPP α o sAPP β (bandas de 100 y 120 kDa). (C) Coeficiente de regresión lineal (R) y valores de p para la correlación de las bandas inferior y superior de sAPPf con los biomarcadores de la AD clásicos A β 42, T-tau y P-tau. n.s., valor de p no significativo.

1.3. Desequilibrio entre las especies APP-KPI en el CSF de pacientes con la AD

Finalmente, se utilizó un anticuerpo generado contra el dominio KPI de la proteína APP, presente únicamente en las variantes APP751 y APP770, para analizar el contenido en estas variantes en las muestras de CSF. De nuevo, se identificaron bandas inmunorreactivas a la región KPI de aproximadamente 100 y 120 kDa en el CSF, inmunorreactividad similar a la observada hasta el momento con los distintos anticuerpos utilizados contra APP (Figura 4.6. (A)).

Dado que el dominio KPI está presente en otras glicoproteínas cerebrales, verificamos la identidad de estas bandas en ensayos de fluorescencia simultáneos. Para este ensayo, utilizamos por un lado anticuerpos anti-KPI combinados con anticuerpos contra la región N-terminal de APP, y por otro lado, el mismo anticuerpo anti-KPI combinado con otro anti-APP, el anticuerpo 6E10, que reconoce un epítipo en la región N-terminal del péptido A β , detectando por lo tanto sAPPf y sAPP α , pero no sAPP β

(Figura 4.7.). La colocación entre los anticuerpos contra la región KPI y N-terminal de APP confirmó la identidad de las bandas inmunorreactivas a KPI de ~100 y 120 kDa como especies solubles de APP (sAPP-KPI). Por otro lado, como la colocación del anticuerpo KPI con 6E10 sólo era evidente para la banda de 120 kDa, y no para la de 100 kDa, se pudo deducir de estos experimentos que esta banda sAPP-KPI posiblemente corresponde a sAPP β , pero no a sAPP α . No pudimos realizar ensayos simultáneos de fluorescencia usando anticuerpos específicos contra sAPP β y la región KPI de APP, ya que ambos son anticuerpos policlonales desarrollados en conejo y por lo tanto, no se pueden distinguir mediante diferentes anticuerpos secundarios. En otros trabajos se han reportado formas sAPP-KPI de 110-100 kDa tanto en cerebro humano como en cultivos celulares [254][255][256].

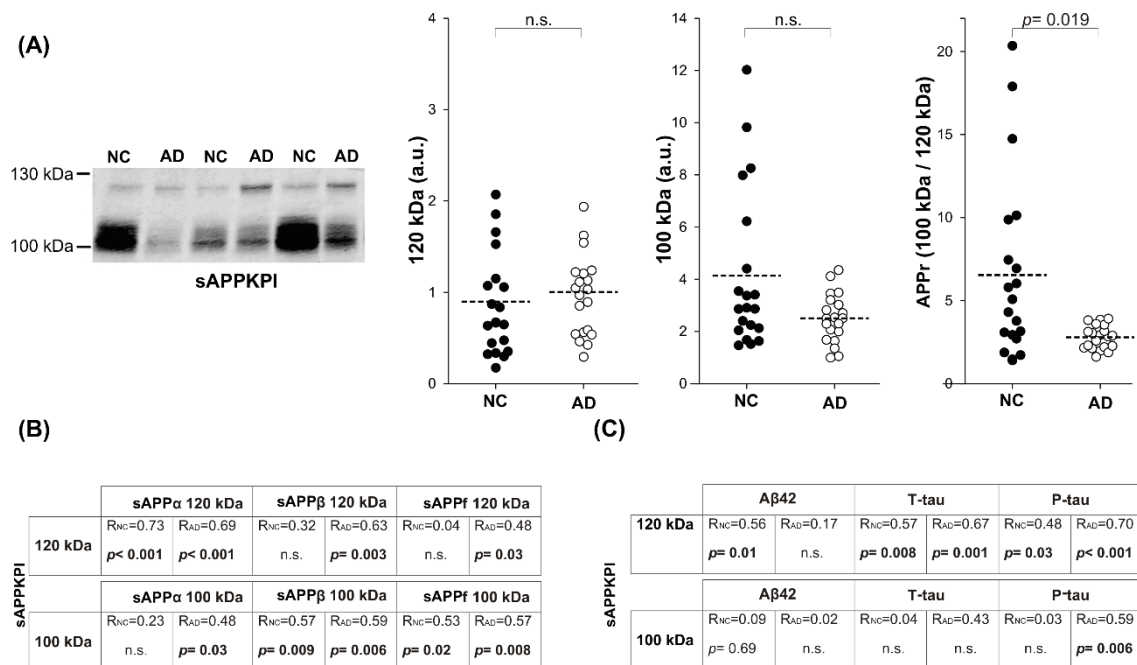


Figura 4.6. Inmunorreactividad de sAPP-KPI en CSF de controles y pacientes con la AD. (A) Blot representativo y cuantificación densitométrica para las bandas sAPP-KPI de ~100 y 120 kDa resueltas con un anticuerpo anti-KPI. Se analizó el CSF de 20 controles (NC; círculos negros) y 20 pacientes con la AD (círculos blancos). El cociente APPr (100 kDa/120 kDa) se calculó tal y como se describe en la Figura 4.2. Los datos representan la media \pm SEM y los valores de p . Cada una de las muestras fue analizada por duplicado. (B) Coeficiente de regresión lineal (R) y valores de p para la correlación de sAPP-KPI con sAPP α , sAPP β o sAPPf (bandas 100 y 120 kDa). (C) Coeficiente de regresión lineal (R) y valores de p para la correlación de las bandas 100 y 120 kDa de sAPPKPI con los biomarcadores de la AD clásicos A β 42, T-tau y P-tau. n.s., valor de p no significativo.

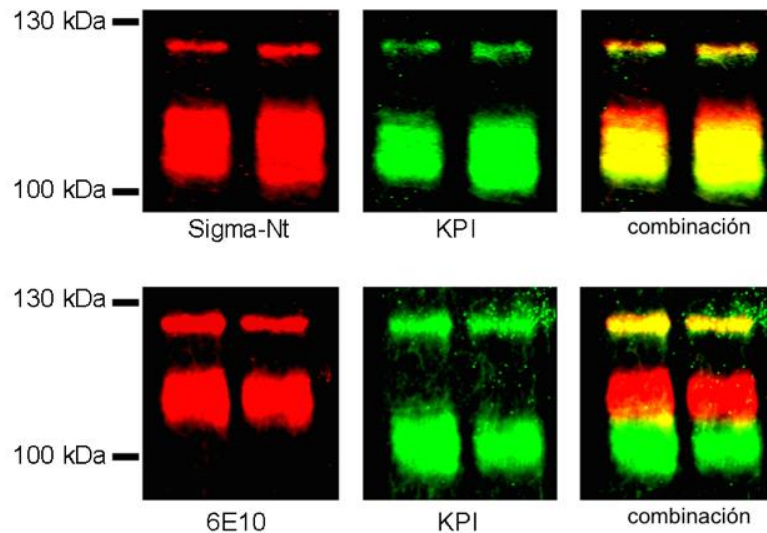


Figura 4.7. Fluorescencia simultánea con APP y KPI para la detección de las formas sAPP-KPI. Para detectar las formas sAPP-KPI se analizaron muestras de CSF de sujetos control mediante SDS-PAGE, y se sondearon simultáneamente con dos anticuerpos diferentes: anti-KPI combinado con un anti N-terminal de APP (Sigma-Nt); y anti-KPI combinado con el 6E10. La fluorescencia de los anticuerpos secundarios (IRDye 800CW cabra anti-conejo, verde; IRDye 680RD cabra anti-ratón, rojo) se detectó con el sistema Odyssey con fluorescencia simultánea (suma) que permite estudios de colocalización (amarillo).

Cuando se analizaron con anticuerpos anti-KPI alícuotas de la misma colección de CSFs de controles y pacientes con la AD, no se observaron cambios significativos en ninguno de los dos grupos (Figura 4.6. (A)), aunque nuevamente el cociente APP_r reveló un posible desequilibrio entre la banda de 100 kDa y la de 120 kDa en el CSF de pacientes con la AD (Figura 4.6. (A)). Además, cuando se evaluó la correlación de las bandas sAPP-KPI con el sAPP α , sAPP β o el sAPP f , la correlación en el CSF de los sujetos control fue más pobre que la observada en el grupo con la AD (Figura 4.6. (B)). Por último, la correlación de las bandas sAPP-KPI con los biomarcadores clásicos de la AD indicaron una relación más fuerte con T-tau o P-tau que con A β 42 (Figura 4.6. (C)).

2. La glicosilación de la proteína APP determina su procesamiento proteolítico y se muestra alterada en el cerebro de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer

A día de hoy, resulta difícil medir la alteración en las vías de procesamiento de la APP (amiloidogénica/no amiloidogénica) mediante la determinación de los niveles de A β cerebral, ya que éste queda secuestrado en placas y la solubilización y estimación de sus niveles totales es compleja. Dado que la APP de la superficie celular sufre una endocitosis

y reciclaje rápidos [257], la estimación de sus niveles (sin procesar proteolíticamente) también puede resultar compleja de interpretar, pudiendo no reflejar cambios en los niveles de expresión. En este contexto, se ha considerado que la determinación de los niveles de sAPP α y sAPP β en el CSF de sujetos con la AD, podría detectar el desequilibrio entre el procesamiento amiloidogénico/no amiloidogénico de APP, pero como se ha comentado anteriormente, los resultados hasta la fecha no han sido del todo satisfactorios [234][258]. Del mismo modo, también se han analizado alteraciones en los niveles de sAPP α y sAPP β en extractos de cerebros de pacientes con la AD [259][260][261], pero los resultados han sido pobres igualmente.

La glicosilación juega un papel fundamental en la determinación del tráfico y la localización subcelular final de las glicoproteínas. En el caso concreto de APP, esta sufre varias modificaciones co- y postraduccionales entre las que se encuentran la N- y la O-glicosilación. Del mismo modo, el procesamiento proteolítico de APP, a través de la vía amiloidogénica/no amiloidogénica, ocurre obviamente después de la glicosilación [90]. Tanto el tráfico como la localización subcelular final de APP son elementos cruciales que determinan su procesamiento en la superficie celular. Por ello, no es de extrañar que cambios en el estado de glicosilación se hayan relacionado con cambios en su procesamiento [42][44][262][263][264][265]. Sin embargo, poco se sabe de potenciales cambios en la glicosilación de APP en el cerebro de sujetos con la AD.

2.1. Caracterización y niveles de sAPP α y sAPP β en el cerebro de sujetos con la AD

La discriminación entre las diferentes especies de APP resulta complicada si nos basamos únicamente en una masa molecular distinta, ya que se predice que sAPP α o sAPP β son sólo ligeramente más pequeños que la APP de longitud completa, y por lo tanto, no se distinguen por separación electroforética [233]. Además, pequeñas diferencias en la migración electroforética también pueden atribuirse a diferencias en la glicosilación [266], o incluso reflejar formas inmaduras de la proteína [267]. En consecuencia, abordamos la discriminación de estas proteínas por SDS/PAGE utilizando anticuerpos pan-específicos generados contra el dominio exclusivo C-terminal de sAPP α y sAPP β [268].

Se espera que mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes las diferentes especies de APP y sus fragmentos N-terminales largos solubilizados de extractos cerebrales, migren en el entorno de entre 100 y 130 kDa [254][269]. Las

diferencias en la masa molecular deben corresponderse con la distinta migración de la variante predominante neuronal, la especie denominada APP695, y las isoformas APP751 y APP770, ambas portadoras del dominio KPI y prácticamente indistinguibles entre ellas por tamaño. Todas las variantes sufren el mismo procesamiento por secretasas y generan los mismos tipos de fragmentos, incluidos el sAPP α y el sAPP β . Como ya se ha mencionado, más allá de la ventaja que supone la separación electroforética para distinguir entre estas variantes, consideramos que el mejor abordaje es el uso de anticuerpos panespecíficos contra la región C-terminal exclusiva de sAPP α y sAPP β [268]. Además, tenemos la posibilidad de combinar parcialmente con un anticuerpo generado contra el dominio KPI presente en las variantes APP751 y APP770, que nos permitirá diferenciar entre estas especies KPI(+), en adelante APP-KPI, y las KPI(-), en adelante APP695. La Figura 4.1. muestra una representación esquemática de la longitud completa de APP y de los fragmentos N- y C-terminales determinados en este estudio, así como los epítomos reconocidos por los diferentes anticuerpos utilizados.

Lo primero que hicimos, fue determinar y cuantificar los niveles de las diferentes especies de sAPP α y sAPP β mediante la utilización de anticuerpos pan-específicos en extractos de cortezas de cerebro humano mediante la técnica SDS-PAGE/western blot. No obtuvimos diferencias significativas en cuanto a los niveles de las especies APP695 o APP-KPI derivadas tanto de sAPP α (Figura 4.8.), como de sAPP β (Figura 4.8.), entre las muestras control (n= 7) y con la AD (n= 7). Al establecer el cociente entre los niveles de APP695/APP-KPI para ambas especies, sAPP α y sAPP β , aunque ambas mostraron claras diferencias, tampoco obtuvimos diferencias significativas en la comparación de este cociente entre las muestras control y con la AD (Figura 4.8.). Los niveles de las bandas inmunorreactivas para sAPP α atribuidas a especies APP-695 y KPI se correlacionaron en ambos grupos, control ($R = 0.76$; $p = 0.048$) y con la AD ($R = 0.96$; $p < 0.001$), mientras que esta correlación no fue evidente entre las especies sAPP β ni en el grupo control ni en el de pacientes con la AD (NC: $R = 0.19$; $p = 0.69$; AD: $R = 0.57$; $p = 0.17$). No hubo correlaciones significativas entre sAPP α y sAPP β ni considerando las especies APP695, ni las APP-KPI, estimadas tanto en las muestras control como en las de la AD (correlaciones no mostradas).

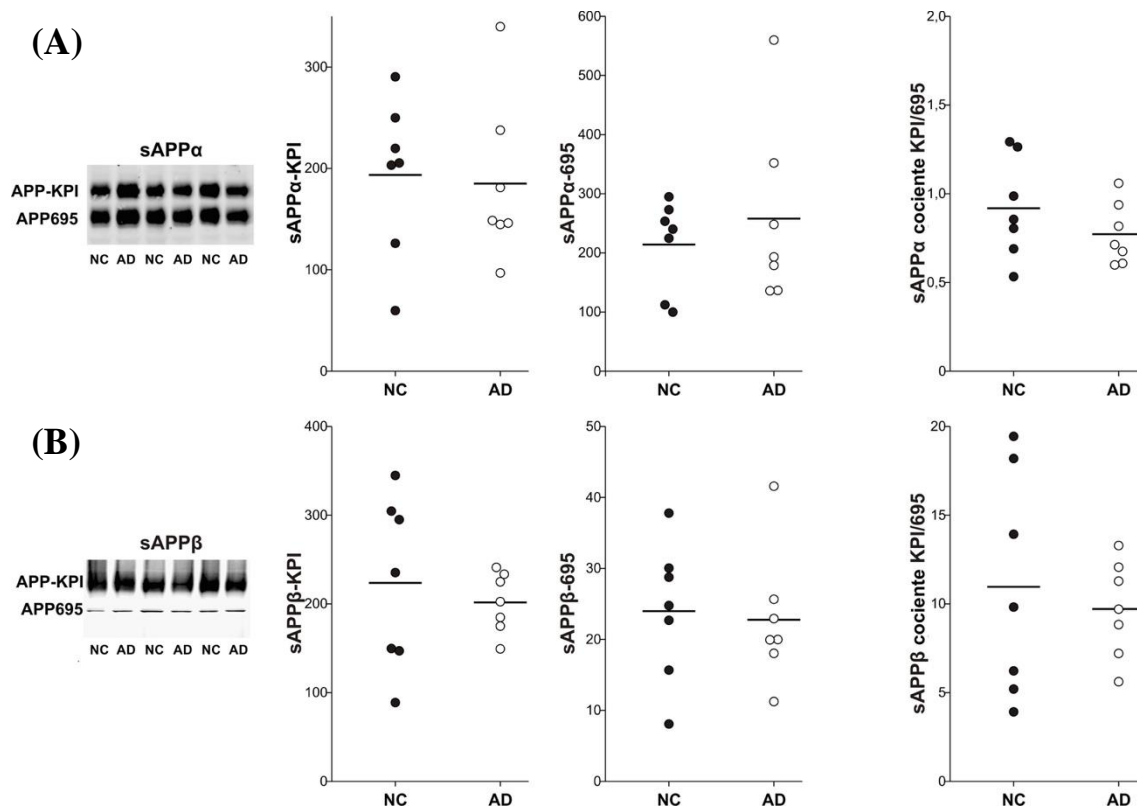


Figura 4.8. Niveles de las diferentes especies de sAPP α y sAPP β en cortezas de cerebro humano. Blots representativos de las muestras analizadas y cuantificación densitométrica para las bandas APP695 y APP-KPI. Se analizaron muestras de corteza frontal humana de 7 controles (NC; símbolos negros) y 7 pacientes con la AD (símbolos blancos) resueltas con anticuerpos anti-sAPP α (A) y anti-sAPP β (B). En la imagen se muestra la cuantificación densitométrica de las especies atribuidas a las variantes APP695 y APP-KPI. Los cálculos se realizaron por duplicado. También se muestra el cociente para sAPP α y para sAPP β (APP-KPI/APP695) calculado dividiendo el nivel de inmunoreactividad de las especies APP-KPI por el de la APP695 para cada muestra. Ninguna de las comparaciones resultó estadísticamente significativa.

2.2. Patrón de interacción de las especies sAPP α y sAPP β de cerebro humano con lectinas

Para comparar el patrón de glicosilación de sAPP α y sAPP β , se analizaron las mismas muestras de extractos de corteza frontal de controles (n= 7) y sujetos con la AD (n= 7) en cuanto a su interacción con las lectinas ConA (alta especificidad por manosas terminales) y PHA (alta especificidad por residuos de galactosa terminales) inmovilizadas. Las interacciones lectina-glicoproteína se analizaron en la fracción no ligada para estimar qué porcentaje de sAPP α y sAPP β no era reconocido por cada una de las lectinas (Tabla 4.2.). Dado que se supone un origen celular diferente para las isoformas derivadas de la especie APP695 (neuronal) y las APP-KPI (mayormente glial) [270], y que cada tipo celular tiene una maquinaria de glicosilación particular,

esperábamos detectar diferencias en las propiedades de unión de los fragmentos NTF derivados de las distintas especies. De acuerdo a esta presunción, los fragmentos sAPP β derivados tanto de APP695 como de APP-KPI, mostraron diferencias en su interacción con ambas lectinas, tanto en el grupo control como en el de pacientes con la AD; sin embargo, los distintos fragmentos sAPP α exhibieron un patrón similar de unión a Con A o PHA en ambos grupos (Tabla 4.2. y Figura 4.9.). Lo que resultó más interesante, fue constatar que el patrón de unión a lectinas variaba al comparar sAPP α y sAPP β , tanto para las especies derivadas de APP695, como para las derivadas de APP-KPI, y en ambos grupos, control y con la AD (Figura 4.10.). Este resultado sugiere que diferentes glicofomas de APP se procesan preferencialmente por la vía no amiloidogénica (α -secretasa) o por la amiloidogénica (β -secretasa). Además, esta determinación se da tanto en neuronas (APP695) como en células gliales (APP-KPI).

		Porcentaje de APP no unido a lectinas			
		sAPP α		sAPP β	
		ConA	PHA	ConA	PHA
NC	APP695	12.2 \pm 1.7 [7.3-20.6]	6.6 \pm 0.8 [4.3-9.4]	2.9 \pm 0.8 [0.3-7.1]	2.6 \pm 0.8 [0.2-6.8]
	APPKPI	13.7 \pm 2.1 [9.2-24.6]	5.7 \pm 0.8 [2.8-8.1]	40.4 \pm 4.6 [20.2-58.3]	37.0 \pm 3.2 [22.6-51.0]
AD	APP695	7.0 \pm 1.5 [2.4-12.9]	4.0 \pm 0.6 [1.8-6.8]	1.2 \pm 0.5 [0.1-3.7]	1.9 \pm 0.3 [1.0-3.1]
	APPKPI	7.7 \pm 1.3 [4.0-12.4]	3.8 \pm 0.6 [2.3-5.4]	57.1 \pm 8.5 [37.6-89.0]	56.7 \pm 9.7 [27.4-95.3]

Tabla 4.2. Glicosilación de sAPP α y sAPP β en extractos cerebrales de sujetos control y con la AD. Se incubaron los extractos cerebrales de los sujetos control (NC; n=7) y de los sujetos con la AD (n=7), con las lectinas inmovilizadas ConA o PHA. El sobrenadante obtenido, que contiene la fracción de glicoproteínas no reconocidas por las lectinas, se analizó mediante western blot utilizando anticuerpos pan-específicos para sAPP α y sAPP β , tal y como se describe en la Figura 4.1. Los datos representan los porcentajes (media \pm SEM) y los intervalos de la inmunoreactividad detectada en la fracción no unida a cada lectina en cuestión, tanto para sAPP α como para sAPP β ; estos valores se usaron para comparar las diferencias en la unión a lectinas entre especies y grupos (ver Figura 4.9. - Figura 4.10. - Figura 4.11.).

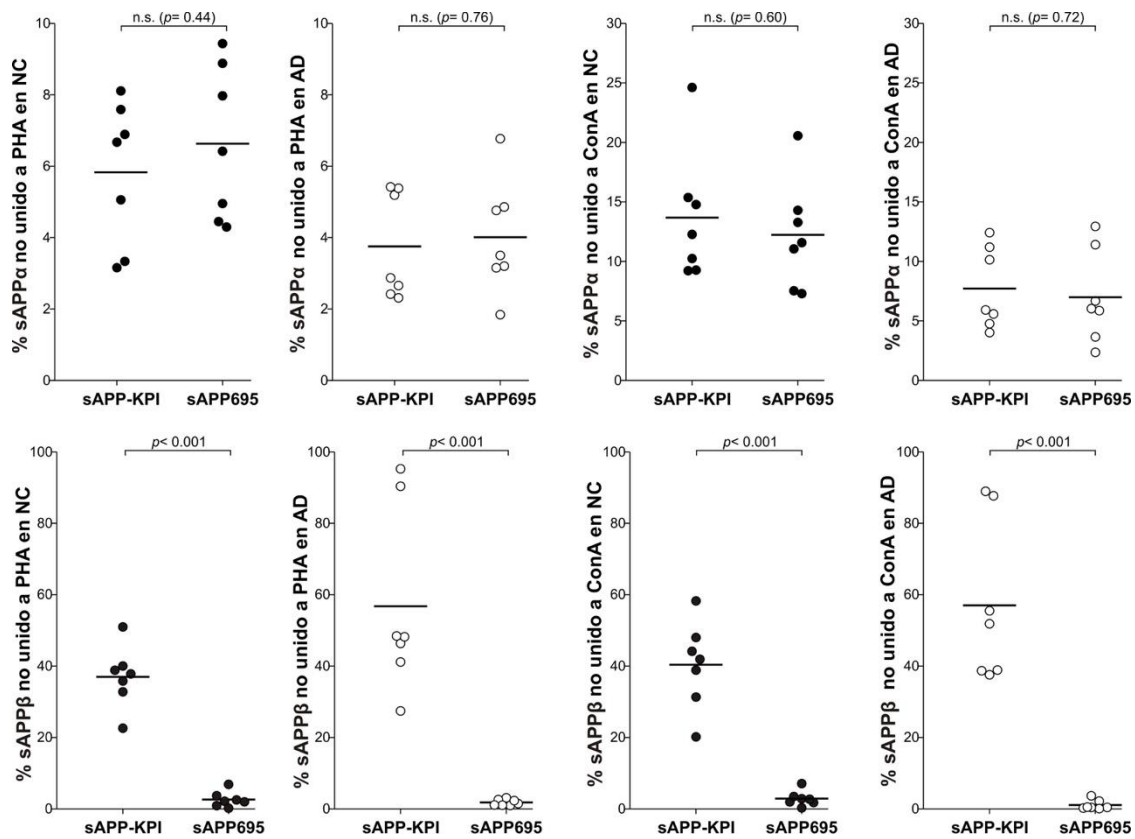


Figura 4.9. Interacción de las especies APP695 y APP-KPI derivadas de sAPP α y sAPP β con las lectinas ConA y PHA.

Finalmente, para estudiar si la glicosilación de APP difiere en extractos cerebrales de sujetos con la AD en comparación con los sujetos control, confrontamos el patrón de glicosilación de sAPP α y sAPP β (Figura 4.11.). Determinamos diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con la AD en cuanto a la interacción del sAPP α derivado de la APP695 con ConA y PHA; y también con ConA para el sAPP α derivado de las especies APP-KPI. No se detectaron diferencias significativas en la proporción de sAPP β que no se unió ni a ConA ni a PHA en muestras de pacientes con la AD en comparación con controles, ni para la especie APP695 ni para las especies APP-KPI. Estas diferencias indicaron que la glicosilación de APP en el cerebro con la AD está alterada y afecta principalmente a las glicofomas procesadas por la vía no amiloidogénica.

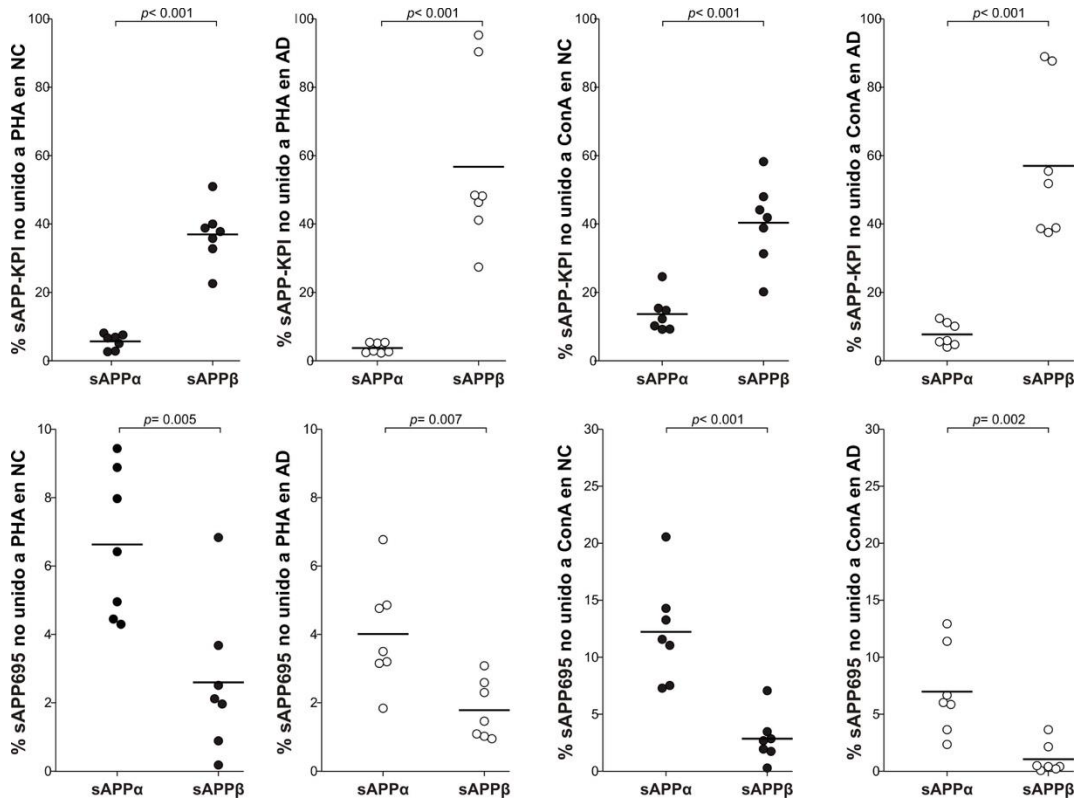


Figura 4.10. Patrón de unión a lectinas de sAPP α y sAPP β tanto para las especies derivadas de APP695 como para las derivadas de APP-KPI en NC y en la AD.

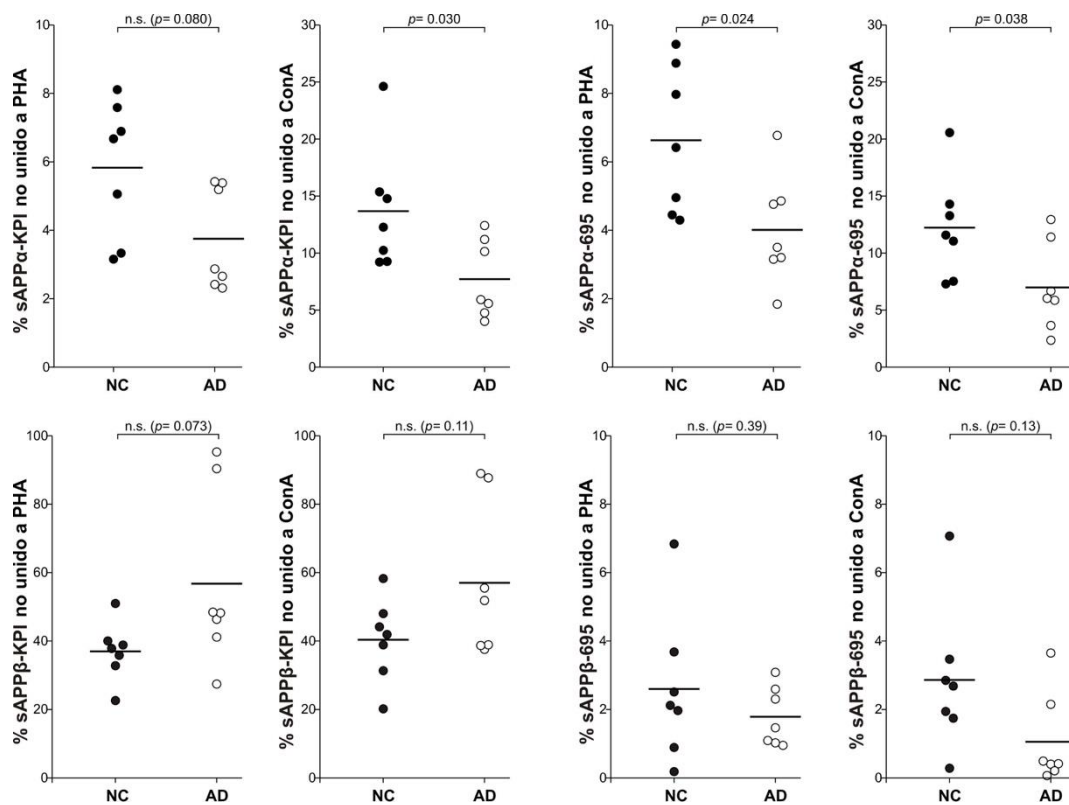


Figura 4.11. Patrón de glicosilación para cada especie sAPP α y sAPP β en la AD en comparación con NC.

3. Fragmentos C-terminales de APP en el CSF como biomarcadores potenciales para la enfermedad de Alzheimer

Otros biomarcadores alternativos para la AD podrían ser otros fragmentos resultantes del procesamiento proteolítico de la proteína APP.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, APP es una proteína transmembrana de tipo I constituida por un largo dominio extracelular N-terminal, un dominio transmembrana, y un corto dominio C-terminal intracelular. Generalmente, APP se escinde por ADAM10, que conduce a la vía no amiloidogénica, o por BACE1, que conduce a la vía amiloidogénica, generándose de este modo los largos fragmentos N-terminales, sAPP α y sAPP β , que como se ha comentado anteriormente, han sido considerados como potenciales biomarcadores. Sin embargo, como se ha explicado en el apartado anterior y en otros estudios, los niveles de sAPP α y sAPP β en el CSF no muestran cambios en la AD [256]. En cambio, lo que permanece inexplorado hasta la fecha es el análisis en el CSF de los fragmentos que restan, dado que se entiende que quedan circunscritos al interior celular. De hecho, los CTF restantes de APP ligados a la membrana (APP-CTF), productos de cualquiera de las vías proteolíticas, siempre son procesados por la enzima γ -secretasa generando un dominio intracelular más corto (AICD) [46].

Llegados a este punto, cabe recordar que APP también puede ser objeto de otras vías de procesamiento proteolítico alternativas [258], como la llevada a cabo por la δ -secretasa (una endopeptidasa de aspargina: AEP) [67] o por la η -secretasa (una metaloproteinasas) [62], generando metabolitos proteolíticos alternativos de diferente masa molecular (tanto fragmentos N-terminales como C-terminales).

3.1 Presencia de fragmentos solubles C-terminales de APP (APP-CTFs) en el CSF humano

Para determinar la posible presencia de especies de APP-CTF en el CSF humano, analizamos muestras de distintos individuos mediante western blot con tres anticuerpos distintos contra la región C-terminal de APP: Sigma-Ct, C1/6.1 y Y188 (ver Material y Métodos, apartado 3.1.1.). En la Figura 4.12. (A), se puede observar una representación esquemática de la proteína APP y los epítomos de reconocimiento para cada uno de los anticuerpos utilizados en esta parte del estudio.

Los ensayos realizados revelaron un patrón de bandas inmunorreactivas similar para los tres anticuerpos anti-CTF utilizados, con una banda predominante de ~25 kDa (Figura 4.12. (B)). Esta banda, también se observó con los anticuerpos 2D8 y 2E9, específicos contra un dominio extracelular cercano al dominio transmembrana (Figura 4.12. (A)). Dado el tamaño molecular del fragmento detectado, ~25 kDa, y la presencia de inmunoreactividad con todos los anticuerpos testeados, pudimos deducir que estábamos identificando un CTF de APP generado por la η -secretasa previamente denominado como CTF η (Figura 4.12. (Ay B)) [62]. Por otro lado, los anticuerpos 2D8 y 2E9 también detectaron otros fragmentos solubles de ~15 kDa descritos previamente [62], resultado del corte secuencial de APP primero por la η -secretasa y posteriormente por la α - o β -secretasa, y que han sido denominados como A η . Además, el anticuerpo 2D8 también detectó monómeros de A β .

Siguiendo con la caracterización de las bandas, las imágenes de doble marcaje fluorescente obtenidas con los anticuerpos Sigma-Ct y 2E9, sirvieron para corroborar que la banda principal de ~25 kDa es compatible con el CTF η y no es representativa de oligómeros de A β (Figura 4.13. (A)). El doble marcaje con los anticuerpos C1/6.1 y 2D8 confirmó dicha observación (Figura 4.13. (B)).

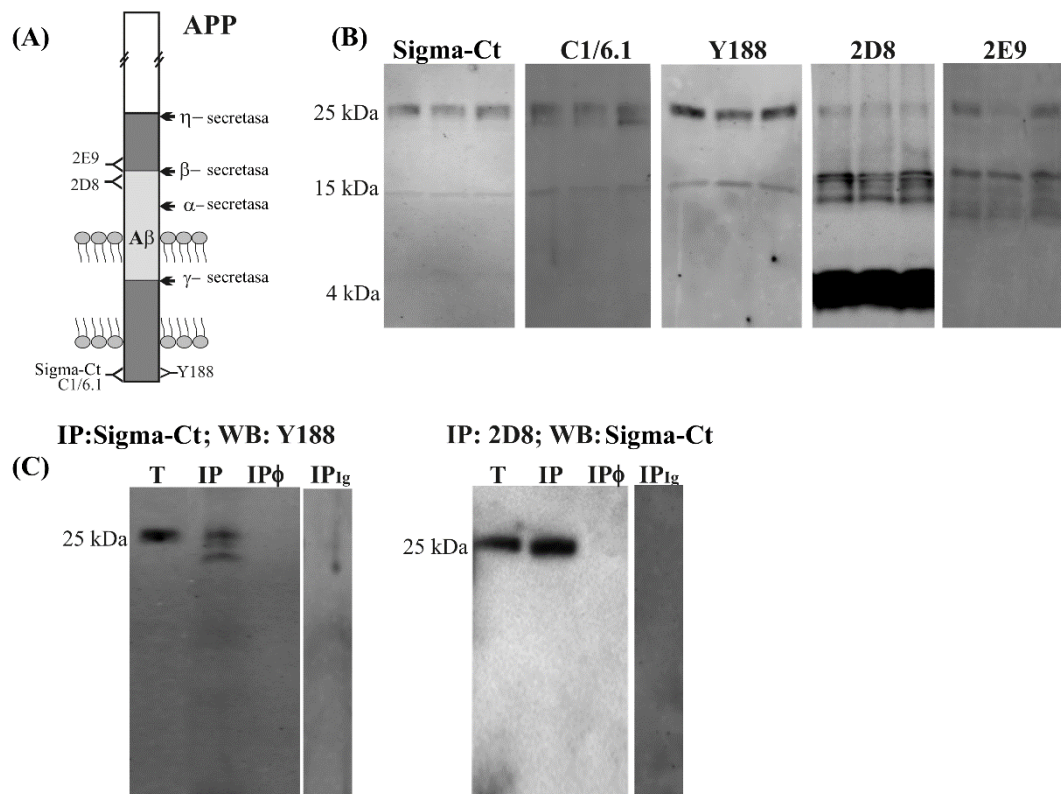


Figura 4.12. Presencia de CTFs solubles de APP en el CSF humano. (A) Representación esquemática del procesamiento de APP por secretasas, así como de los epítomos de reconocimiento de los anticuerpos utilizados en este estudio. (B) Blots representativos de tres muestras de CSF humano control resueltas con los anticuerpos indicados. Las muestras fueron las mismas en todos los geles. (C) Se inmunoprecipitaron alícuotas de CSF control (Total, T) con los distintos anticuerpos indicados en las imágenes, y la fracción de proteínas precipitadas (fracción unida, IP) se detectó con el anticuerpo alternativo indicado. Se analizaron en paralelo como controles negativos alícuotas de CSF incubadas con proteína A-Sefarosa en ausencia de anticuerpo de captura (IP Φ), o con una IgG irrelevante (IP_{Ig}; IgG de conejo para el anticuerpo Sigma-Ct e IgG de rata para el 2D8),

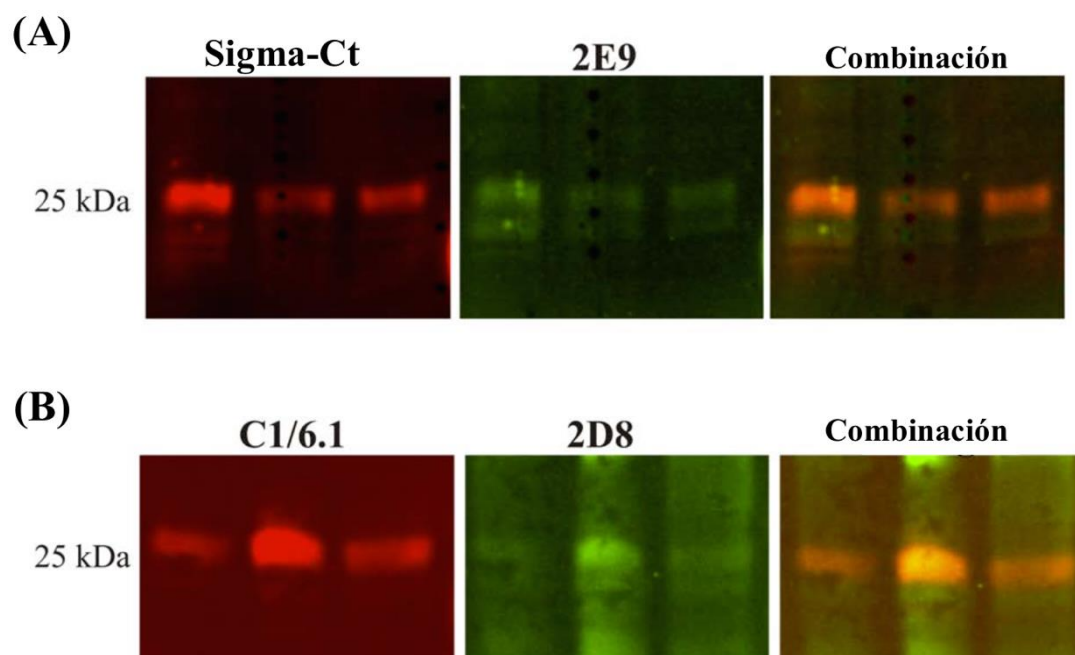


Figura 4.13. Análisis mediante SDS-PAGE y detección de fluorescencia de CTFs solubles de APP en el CSF humano. Para probar que la especie de ~25 kDa resuelta con diferentes anticuerpos es la misma, se analizaron tres alícuotas de CSF mediante SDS-PAGE y se resolvieron simultáneamente con los anticuerpos Sigma-Ct y 2E9 (A), o C1/6.1 y 2D8 (B). La fluorescencia de los anticuerpos secundarios se detectó de manera simultánea con el sistema Odyssey CLx Infrared Imaging (LI-COR) tal y como se indica en la metodología.

Por último, realizamos ensayo de inmunoprecipitación/western blot para corroborar la identidad de la banda de ~25 kDa en CSF humano (Figura 4.12. (C)). Debido a que mediante la técnica de SDS-PAGE la cadena ligera de inmunoglobulina migra a una masa molecular similar a la banda de 25 kDa detectada con los diferentes anticuerpos, para prevenir una interferencia inespecífica de esa cadena realizamos un protocolo de inmunoprecipitación que previene la separación de los anticuerpos de la resina, que es lo que ocurre si tras la inmunoprecipitación se hierve la resina directamente con el tampón de electroforesis. De este modo, utilizamos dihidroclorito de dimetil pimelidato para unir covalentemente los anticuerpos primarios a la proteína A-Sefarosa, y eluimos la muestra con tampón de glicina 0.1M a pH 2.5, que nos permite separar la proteína del anticuerpo sin desligar el mismo de la resina [271]. Tras neutralizar el pH del tampón de elución procedimos al análisis electroforético convencional por SDS/PAGE. De este modo, las muestras de CSF inmunoprecipitadas con el anticuerpo Sigma-Ct y resueltas por western blot con el anticuerpo Y188, confirmaron la identidad de la banda de ~25 kDa como APP-

CTF. La inmunoprecipitación alternativa con el anticuerpo 2D8 y posterior western blot con el Sigma-Ct respaldaron la identidad de dicha banda como CTF η (Figura 4.12. (C)).

3.2. El APP-CTF de ~25 kDa aumenta en el CSF de pacientes con la AD

Para evaluar si los niveles de APP-CTF solubles presentes en el CSF se encuentran alterados en la AD, se analizan muestras de distintas colecciones, descritas en el apartado 1.1. del Material y Métodos, FAD, dDS (con trisomía del cromosoma 21 que incluye el APP) y AD esporádico (LOAD).

En primer lugar, describiremos los resultados obtenidos en pacientes con la FAD, una forma de inicio temprano de la AD determinada genéticamente [272]. La FAD ofrece oportunidades únicas para analizar biomarcadores diagnósticos, dado que el diagnóstico de la enfermedad está garantizado. En la Tabla 4.3. se han incluido los datos clínicos y demográficos de estos pacientes, así como los niveles obtenidos de los biomarcadores clásicos de la AD analizados en el CSF.

Grupo	Edad (años)	Género	CSF A β 42 (pg/mL)	CSF T-tau (pg/mL)	CSF P-tau (pg/mL)
LOAD	71 \pm 2 [55-86]	15M/5H	412 \pm 19**	665 \pm 52 **	84 \pm 6**
NC	72 \pm 2 [57-88]	6M/14H	739 \pm 32	233 \pm 14	36 \pm 2
FAD	43 \pm 2 [31-49]	5M/2H	266 \pm 49**	883 \pm 204**	168 \pm 69*
NC	39 \pm 3 [25-47]	5M/2H	809 \pm 94	245 \pm 29	46 \pm 4
dDS	53 \pm 2 [47-57]	4M/3H	422 \pm 17*	767 \pm 170*	108 \pm 19*
NC	48 \pm 2 [47-53]	5M/2H	751 \pm 84*	160 \pm 26	33 \pm 5

Tabla 4.3. Datos clínicos y demográficos de los sujetos utilizados en este estudio, así como los niveles obtenidos en el CSF de los biomarcadores clásicos de la AD A β 42, T-tau y P-tau. Los datos se representan con la media \pm error estándar. Todos los grupos patológicos son comparados con los controles (NC) obtenidos del mismo hospital, y con un rango de edades similar al grupo patológico al que se compara. Los valores significativos son ** $p < 0,005$; * $p < 0,05$. FAD, pacientes con la AD autosómica dominante y portadores de la mutación *PSEN1* (3 portadores de la mutación L286P, y el resto corresponde a un caso portador de una de las siguientes mutaciones: S169P, L173F, L235R y L282R); en este caso, los NC se corresponden con sujetos sanos de la misma edad portadores del gen sin mutar, y procedentes de las mismas familias. dDS, pacientes con síndrome de Down y demencia de tipo Alzheimer. LOAD, pacientes con AD esporádico definidos como sujetos con síntomas cognitivos, y un perfil de los tres biomarcadores clásicos de CSF que indicaban la AD. M/H: n° mujeres/n° hombres.

Tras el análisis por western blot y la resolución mediante el anticuerpo Sigma-Ct, se confirmó la detección de la banda de ~25 kDa en todos los CSF analizados (Figura 4.14.). La inmunoreactividad de esta banda en el CSF de sujetos con FAD aumentó significativamente (95 ± 27 ; $p = 0.01$) en comparación con los niveles determinados en

los controles (NC), sujetos de las mismas familias y edad similar, pero portadores del gen silvestre sin mutar (Figura 4.14. (A) y Tabla 4.3.).

Los sujetos con síndrome de Down y demencia de tipo Alzheimer, dDS, también pueden considerarse una forma de la AD [273] determinada genéticamente, en este caso por la sobreexpresión de APP. De nuevo, se produjo un aumento significativo (68 ± 18 ; $p = 0.01$) en la inmunorreactividad de la banda APP-CTF de ~ 25 kDa, resuelta con el anticuerpo Sigma-Ct, en las muestras de CSF de pacientes con dDS en comparación con sus NC de edad similar (Figura 4.14. (B) y Tabla 4.3.).

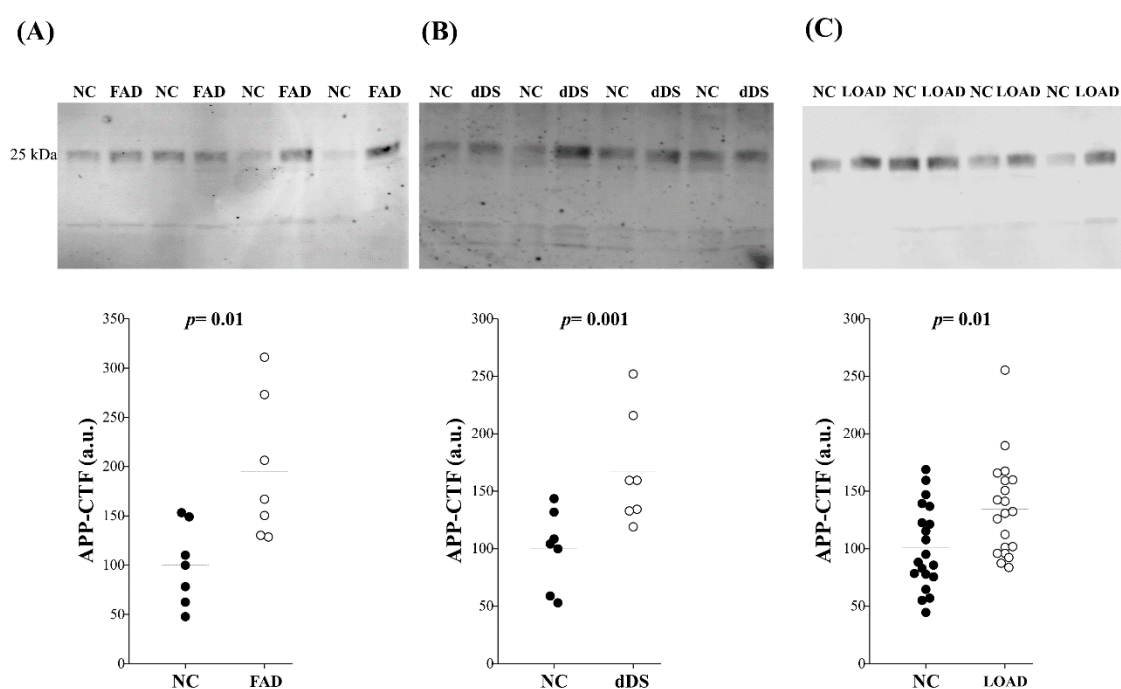


Figura 4.14. Los niveles de la banda de APP-CTF de ~ 25 kDa se encuentran elevados en el CSF de los sujetos con la AD. (A) Blot representativo de la banda de APP-CTF de ~ 25 kDa en las muestras de CSF de 7 FAD sintomáticos (círculos blancos) y 7 controles (NC; círculos negros) de la misma familia y edad similar, pero portadores del gen sin mutar. También se muestra la cuantificación densitométrica de la inmunoreactividad de la banda de ~ 25 kDa. (B) Blot representativo de la banda de APP-CTF de ~ 25 kDa y su cuantificación en las muestras de CSF de 7 sujetos con Síndrome de Down y demencia de tipo Alzheimer (círculos blancos) (dDS) y 7 NC (círculos negros) de edades similares. (C) Blot representativo de la banda de APP-CTF de ~ 25 kDa y su cuantificación en las muestras de CSF de 20 sujetos con AD esporádico, LOAD (círculo abierto), y 20 sujetos NC (círculo cerrado) de edades similares. El anticuerpo utilizado para el estudio fue el Sigma-Ct. En las gráficas se muestran los valores de p .

Por último, se evaluaron las diferencias en los niveles de inmunorreactividad de la banda APP-CTF de ~ 25 kDa en sujetos con la AD esporádica (LOAD) en comparación con controles (NC) de la misma edad (Tabla 4.3.). De nuevo, la inmunorreactividad total para esta banda detectada con el anticuerpo Sigma-Ct aumentó significativamente en el CSF de los sujetos con LOAD en comparación con sus controles (35 ± 9 ; $p = 0.01$) (Figura 4.14. (C) y Tabla 4.3.).

Las muestras de CSF de sujetos con LOAD, también se testaron en paralelo con el anticuerpo 2D8, confirmando un incremento prácticamente idéntico para esta banda ($35 \pm 9\%$; $p = 0.01$), y correlacionándose con la estimación de los niveles calculados con el anticuerpo Sigma-Ct ($R = 0.73$; $p < 0.001$; Figura 4.15.). No hubo correlaciones claras entre la inmunoreactividad de la banda APP-CTF de ~25 kDa y los niveles de los biomarcadores clásicos, A β 42, T-tau o P-tau, en los controles o en LOAD considerados individualmente (Figura 4.16.). Sólo cuando se agruparon los controles y LOAD, surgió una correlación positiva entre los niveles de inmunoreactividad de la banda APP-CTF de ~25 kDa con los niveles de T-tau y de P-tau (Figura 4.16.).

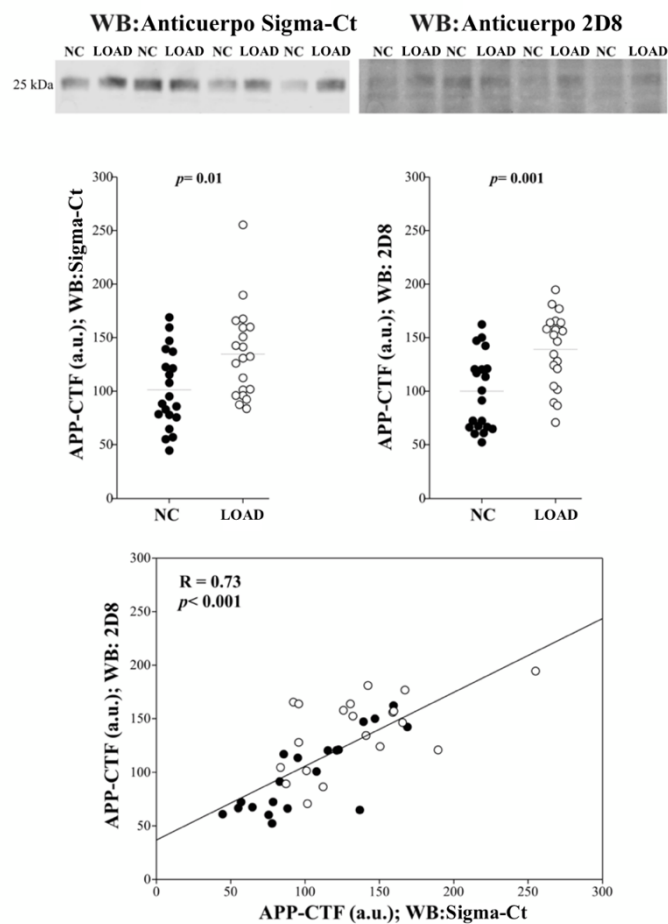


Figura 4.15. Confirmación del aumento de APP-CTF de ~25 kDa en el CSF de sujetos con la AD esporádica (LOAD). Blot representativo y cuantificación densitométrica del APP-CTF de 25 kDa en las muestras de CSF de 20 sujetos con LOAD y 20 controles (NC) de edad similar, resueltas con el anticuerpo Sigma-Ct (mismos datos que en la Figura 4.14.) y con el anticuerpo 2D8. Se obtuvo correlación positiva cuando se confrontaron los niveles de inmunoreactividad de los mismos sujetos detectados con ambos anticuerpos. Se muestran el coeficiente de regresión lineal (R) y los valores de p .

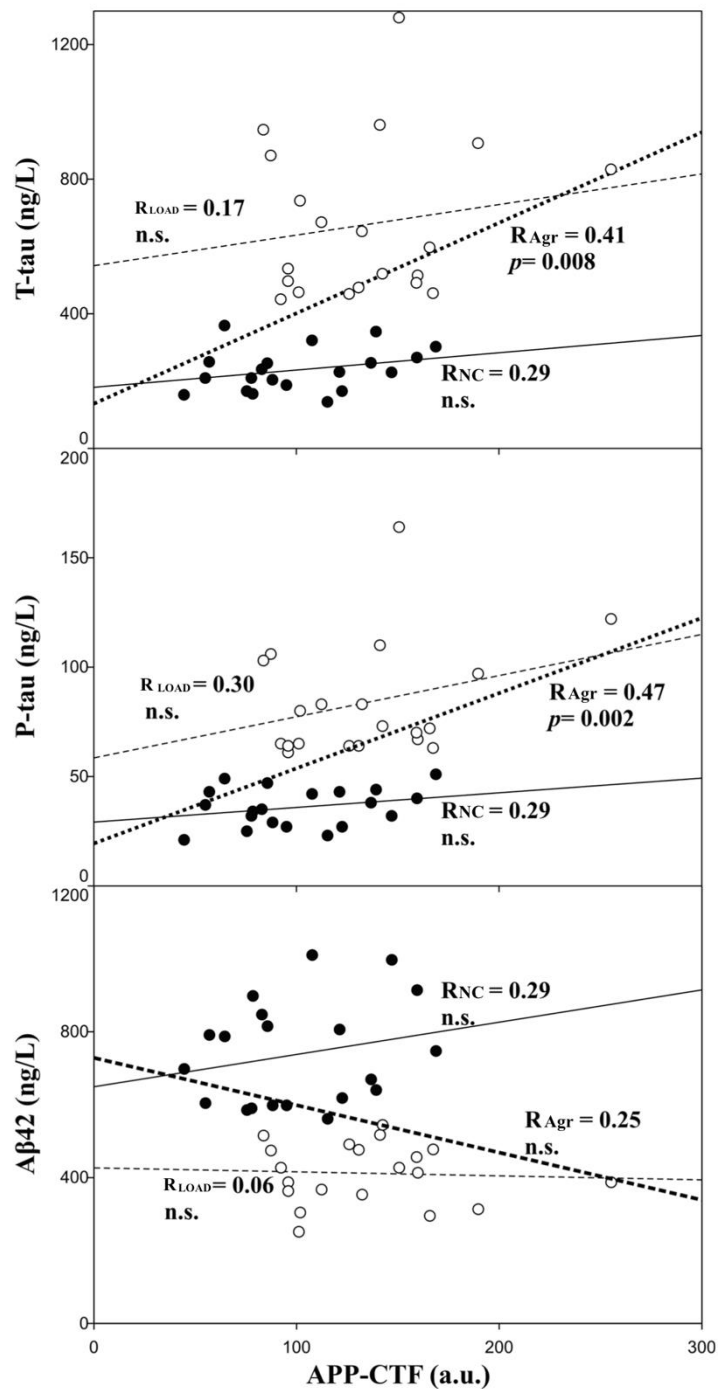


Figura 4.16. Correlación de APP-CTF de ~25 kDa con los niveles de Aβ42, T-tau y P-tau en muestras de CSF. Se usó una regresión lineal para evaluar la correlación entre el nivel de inmunoreactividad del APP-CTF de 25 kDa (Figura 4.14.) y los niveles de Aβ42, T-tau y P-tau obtenidos por ELISA (ver Tabla 4.3.) en las muestras de pacientes con LOAD (círculos blancos, línea punteada fina) y de controles cognitivamente normales de la misma edad (NC: círculos negros, líneas continuas). También se muestran las regresiones lineales resultantes de la agrupación de muestras con LOAD y NC (agrupados, Agr: línea punteada gruesa). Se muestran el coeficiente de regresión lineal (R) y los valores de p para cada correlación (n.s.: valor de p no significativo).

V. Discusión

El diagnóstico temprano y preciso de la AD es esencial para establecer terapias efectivas y para monitorizar la progresión de la enfermedad. Por ello, ambos retos, realizar un diagnóstico precoz, antes de que se hayan producido cambios patológicos irreversibles, y encontrar tratamientos curativos que modifiquen el curso de la enfermedad, están íntimamente relacionados.

En esta tesis nos hemos centrado en contribuir al desarrollo de nuevos biomarcadores que ayuden al diagnóstico precoz de la AD. La comunidad científica dispone básicamente de dos estrategias para llevar a cabo un diagnóstico precoz: el uso de pruebas de imagen funcionales, que ofrecen una imagen *in vivo* del cerebro humano que refleja con bastante precisión la distribución de proteínas cerebrales; y el uso de biomarcadores, que suelen determinarse en el CSF por tener una mejor correlación patogénica con una patología del CNS que otros líquidos biológicos como la sangre.

Los biomarcadores bioquímicos son moléculas que se emplean como indicadores de un estado biológico. En medicina son útiles para detectar la presencia de una enfermedad (biomarcadores diagnósticos), o para valorar la respuesta a un tratamiento específico (biomarcadores pronósticos). En este contexto, el método diagnóstico más favorable para la AD sería el que se realizara de una forma fiable en las primeras etapas de la enfermedad, con la medición de las proteínas implicadas en las vías patogénicas y en su progresión. Se han estudiado múltiples proteínas como biomarcadores en el CSF de enfermos con la AD, pero de todas ellas, las que se utilizan como método diagnóstico consensuado son A β , T-tau y P-tau. El principal inconveniente de estas proteínas radica en su falta de utilidad en etapas preclínicas, y en la falta de estandarización de los protocolos utilizados para su medición. Por todo ello, existe una necesidad real de definir nuevos biomarcadores que permitan realizar un diagnóstico precoz de la AD.

El primer paso para cumplir nuestro objetivo ha sido avanzar en la caracterización bioquímica de la proteína APP para su mejora y aplicabilidad como biomarcador. Para ello, hemos precisado de muestras de corteza cerebral frontal y de CSF de pacientes con la AD. De manera sorprendente, a pesar de la relevancia de APP en la AD, y del avance en el desarrollo de anticuerpos específicos contra alguna de sus isoformas, todavía está pendiente una completa caracterización bioquímica de esta proteína. La mejora en su caracterización conllevaría la optimización o el rediseño de los protocolos de determinación, pero también permitiría avanzar en el conocimiento de los desequilibrios fisiopatológicos que llevan al desarrollo de la AD. Así, las diversas especies producidas mediante el procesamiento de APP, bien por la vía amiloidogénica de la β/γ -secretasa

o por la no amiloidogénica de la α/γ -secretasa, podrían tener funciones celulares contrapuestas [274]. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios se han centrado en los efectos contrapuestos del sAPP α y del propio A β , ya que este generado en exceso exhibe efectos tóxicos y amiloidogénicos, mientras que el sAPP α actúa regulando la proliferación celular, el desarrollo del CNS y la neuroprotección. Queda mucho por saber no sólo de estas especies, sino también de la función de la proteína completa en sus diferentes variantes, de otros fragmentos menos estudiados como el sAPP β , o incluso de los CTF e ICD; así como de fragmentos de APP producto de otras vías de procesamiento. Una mejora en la caracterización de todos los componentes que forman el intrincado escenario fisiológico de APP podría ser fundamental para avanzar en su conocimiento.

Siguiendo con el relato de esta tesis, el primer paso que se llevó a cabo fue estudiar si las formas sAPP α y sAPP β , así como de la proteína APP completa presente en el CSF (sAPPf), pueden ser utilizadas para el diagnóstico de la AD, ya que hasta el momento los estudios en este sentido son controvertidos. De hecho, aunque siempre se ha considerado que la estimación de los niveles en el CSF de sAPP α y sAPP β puede ser un biomarcador prometedor, los distintos estudios, en algunas ocasiones, lejos de ser concluyentes han resultado contradictorios. La mayoría de los estudios llevados a cabo hasta la fecha se basan en ensayos ELISA, que, aún fundamentados en anticuerpos de alta especificidad, no discriminarían entre algunos fragmentos cuando estas proteínas forman agregados. De hecho, previo al desarrollo de estos ELISA, los primeros estudios realizados mediante la técnica de western blot indicaron una ligera disminución de sAPP α en el CSF de sujetos con la AD [232][275]. Posteriormente, mediante ensayos ELISA también se observó disminución de sAPP α en el CSF de la AD [276][277][278][279], aunque algunos estudios no mostraron cambios significativos [280][281][282][283] y otros mostraron niveles aumentados [236][284][285][286]. Por su parte, y de manera inesperada, la mayoría de los estudios de sAPP β realizados mediante ELISA o no mostraron cambios o mostraron una disminución de los niveles en el CSF de pacientes con la AD [235][278][279][282][287], aunque hubo algún estudio que indicó un aumento [286]. Un estudio reciente sobre el nivel de sAPP α y sAPP β en un número importante de muestras de CSF ventricular postmortem (con confirmación histológica), indicó pocas diferencias, aunque ambos fragmentos sAPP α y sAPP β aparecían ligeramente elevados en CSF de sujetos con la AD en comparación con los controles [288].

Una correcta evaluación de los niveles de sAPP α y sAPP β en CSF, además de por interés diagnóstico, también podría ser de interés para monitorizar el efecto bioquímico de los fármacos dirigidos contra la generación de A β en los ensayos, en

particular para los inhibidores de β - o γ -secretasa. En este sentido, en un estudio reciente la inhibición de la β -secretasa dio como resultado un descenso significativo de sAPP β , pero también un incremento en la concentración de sAPP α en CSF, lo que sugiere que la inhibición de la β -secretasa provoca un incremento compensatorio en la estimulación de la vía no amiloidogénica de APP [136][137][138].

Diversos factores pueden poner en duda la fiabilidad de las determinaciones de APP en CSF mediante ELISA. En primer lugar, nuestro grupo ha descrito recientemente la presencia de sAPPf en CSF humano [231]. Algunos de los kits de ELISA empleados para evaluar sAPP α se basan en el uso del anticuerpo 6E10, o anticuerpos similares, que reconocen la parte N-terminal del péptido A β sin trincar [282]. En consecuencia, estos anticuerpos reconocen sAPP α pero también sAPPf, cuya co-existencia en el CSF se desconocía hasta hace poco. También se ha descrito recientemente que APP puede ser objeto de otros procesamientos proteolíticos alternativos que generarían fragmentos que no serían discriminados por estos u otros ELISA [271]. De hecho, se han descrito diversos fragmentos N-terminales de APP en el CSF humano [62][67][232][233][289][290] y, por lo tanto, estos fragmentos alternativos también pueden ser responsables de los resultados divergentes obtenidos por ELISA. Conjuntamente, del estudio previo de nuestro grupo se deduce que las distintas especies de sAPP presente en el CSF se asocian en complejos heteroméricos que interferirían en las determinaciones por ELISA, incluso basándose en anticuerpos pan-específicos contra el extremo C-terminal truncado y exclusivo de sAPP α y sAPP β [231]. Por todas estas razones, y a pesar de las desventajas del análisis mediante western blot en términos de reproducibilidad y análisis cuantitativo, decidimos realizar un estudio electroforético para estudiar los niveles de las distintas especies de sAPP α y sAPP β , así como de sAPPf, en el CSF de sujetos con la AD.

Esta aproximación permite que distintas especies con un dominio epitópico común se identifiquen por separado si tienen una masa molecular suficientemente distinta. La proteína APP generalmente se detecta mediante electroforesis en extracto cerebral o en CSF humano como un grupo de especies de entre 100 y 130 kDa [254]. Las diferencias en la masa molecular posiblemente representan variantes de esta proteína, la APP695, 695 aminoácidos, expresada mayormente en neuronas, y las variantes portadoras del dominio proteico KPI, las APP751 y APP770, 751 y 770 aminoácidos respectivamente, expresadas mayormente en células gliales (indistinguibles por separación electroforética) [291]. Esta aproximación teórica debe ejercitarse con cautela ya que pequeñas diferencias

en la masa molecular, y por tanto en la migración electroforética de especies de APP, pueden atribuirse a diferencias en la glicosilación [266], o también pueden reflejar formas inmaduras de la proteína [267]. De hecho, el pronóstico es que las formas sAPP α y sAPP β generadas de la misma variante, se diferencian ligeramente de la APP sin procesar proteolíticamente [233]. En consecuencia, las diferentes especies de APP y sus correspondientes sAPP α y sAPP β , no pueden ser discriminados en el CSF por separación electroforética, y se deben usar anticuerpos pan-específicos para identificarlas, anticuerpos que además han sido desarrollados recientemente contra el C-terminal truncado exclusivo de sAPP α o sAPP β [292]. En este sentido, para la validación de nuestro estudio hemos realizado un ensayo de especificidad de ambos anticuerpos contra sAPP α y sAPP β mediante análisis simultáneo por western blot y revelado por fluorescencia. Esta aproximación también tiene sus limitaciones, si bien un patrón de bandeo distinto por dos anticuerpos indica que representan proteínas o especies diferentes, la identificación superpuesta no puede aceptarse como prueba de identidad incuestionable debido a las limitaciones de la separación electroforética, tal y como hemos mencionado. Asimismo, alguna combinación de anticuerpos está limitada por las especies en las que se generan, ya que el análisis simultáneo requiere que los anticuerpos secundarios fluorescentes sean contra especies distintas para no generar señal “cruzada”. Aún con estas limitaciones, nuestro estudio demuestra la eficacia del uso de estos anticuerpos en nuestro ensayo.

En este complejo escenario, y con las herramientas metodológicas de la separación electroforética y el uso de anticuerpos específicos, confrontamos la determinación de los niveles de las especies sAPP α , sAPP β y sAPPf, además de las variantes sAPP-KPI. Para este estudio, las muestras de CSF de sujetos con la AD y de los controles se caracterizaron en base a su perfil de biomarcadores para T-tau, P-tau y A β 42. Los estudios de seguimiento demuestran que los puntos de corte establecidos tienen una especificidad superior al 90% para la AD [242]. No obstante, estos ensayos fueron ciegos, y carecíamos del detalle diagnóstico clínico de los controles, salvo que eran sospechosos de demencia. En cuanto a nuestro análisis, no se observaron cambios en los niveles de las especies sAPP α o sAPP β en CSF al comparar muestras de la AD y controles, ni tampoco en la relación de las proporciones entre las formas de ~100 y 120 kDa (APP r). Además, aunque sospechábamos acerca de la correlación positiva entre los niveles de sAPP α y sAPP β reportada mediante ELISA [235][236], ya que inicialmente la habíamos atribuido a la existencia de heterómeros [231], nuestro estudio también identificó dicha correlación.

Asimismo, en el grupo control encontramos diferentes asociaciones de sAPP α y de sAPP β con los biomarcadores clásicos de la AD (A β 42, T-tau o P-tau), y curiosamente, estas correlaciones se perdían aparentemente en las muestras de la AD.

Sí que pudimos detectar diferencias entre muestras de la AD y controles en el cociente APP r , que refleja la inmunoreactividad de las bandas de ~100 y 120 kDa, tanto al resolver con anticuerpos contra la región C-terminal original de APP, que sirve para evaluar las especies sAPP f , o contra el dominio KPI, que obviamente sirve para definir las variantes sAPP-KPI. Un estudio previo de otro grupo en plaquetas había sugerido el interés de realizar este tipo de relación entre las distintas especies de APP [293]. Dado que el mecanismo por el cual una proteína transmembrana (sAPP f) aparece en el CSF es desconocido, resulta difícil interpretar este desequilibrio existente entre las especies sin procesar, aunque parece indicar una mayor expresión de APP en células gliales, o menor en neuronales, asumiendo la identidad de la banda de 100 kDa como APP695 y la de 120 kDa como APP-KPI, pero es necesaria una caracterización más completa de las diferentes especies, ya que las bandas de 100 y 120 kDa podrían representar también diferentes glicofomas, o formas maduras e inmaduras de la misma variante de APP. Para las especies definidas como sAPP-KPI, nuestra caracterización parcial sugiere que la banda de 100 kDa representa probablemente un fragmento de sAPP β , pero en este caso, al menos 3 especies serían inmunoreactivas, por lo que la de 120 kDa no se puede precisar si está también constituida por sAPP α , además de por sAPP f , por lo que la interpretación del desequilibrio es todavía más compleja. Todavía queda pendiente una completa caracterización de las distintas especies de sAPP en el CSF, pero nuestros datos indican sutiles alteraciones en la expresión y/o el procesamiento proteolítico de APP en la condición patológica, mereciendo un análisis más detallado mediante herramientas y protocolos más refinados.

Este tipo de estudios es necesario para mejorar la caracterización de las especies de APP en el CSF, aunque ya hemos comentado las desventajas de usar western blot para inferir si la proteína en cuestión es un buen biomarcador con fines clínicos. La técnica de western blot presenta serias limitaciones tanto en el número de muestras que se pueden analizar, como en los medios para normalizar los datos y poder compararlos entre los ensayos. Este tipo de ensayos, por lo tanto, presenta dificultades en el uso de curvas de calibración para estimar las concentraciones de los componentes, dada la falta de normalización entre ensayos. Por lo tanto, la vía más adecuada tras extraer toda la información de este tipo de técnicas sería la de refinar los protocolos ELISA para evaluar

una sola especie o fragmento de APP. De este modo, podría investigarse la posibilidad de realizar un pretratamiento químico a las muestras destinado a desagregar oligómeros, tal y como se reportó recientemente para el A β [294]. Dichas modificaciones podrían hacer del ELISA un procedimiento más preciso para medir sAPP, superando la posible interferencia de los heterómeros. De todos modos, nuestros datos sobre las diferencias en la contribución de las principales bandas de ~100 y 120 kDa para diferentes especies de APP en el CSF, indican que la situación es aún más compleja y que requeriría diseños de anticuerpos con mayor capacidad discriminatoria. También se tendría que contemplar la posibilidad de que la composición y/o niveles de los heterómeros de APP del CSF muestren alteraciones en sujetos con la AD, algo que no hemos abordado en nuestros estudios.

Algo que sí hemos tenido la ocasión de abordar en esta tesis ha sido el estudio de los niveles de sAPP α y sAPP β en extractos de cortezas cerebrales de pacientes con la AD y controles. El valor de los niveles de sAPP α y sAPP β en cerebro es sensiblemente menor en comparación con los realizados en el CSF. Esto podría ser debido a la complejidad en la interpretación de la correspondencia de los fragmentos de APP y de las diferentes variantes (hasta hace muy poco se desconocía la existencia de sAPPf en el CSF). Sí que existen más estudios acerca de los niveles de expresión de APP en cerebro de sujetos con la AD, pero han resultado ser muy poco concluyentes, con indicación de aumentos moderados [295], sin cambios significativos [296] o incluso disminución del ARNm de APP [297][298]. Algo que tampoco se aclara cuando se analizan por separado los ARNm codificadores de APP695 [295][299][300] o de las especies APP-KPI [301][302], donde los estudios también indicaron tendencias contrapuestas.

En nuestro estudio, y a pesar de sus limitaciones por los motivos ya expuestos, de nuevo optamos por la técnica western blot para un análisis cuantitativo respecto a los ensayos ELISA. De cualquier modo, no obtuvimos cambios significativos para ninguna de las bandas caracterizadas de ~100 o 120 kDa ni para sAPP α ni para sAPP β al comparar sus niveles en extractos cerebrales de sujetos con la AD y los controles. Este resultado, junto con los estudios anteriores, indican claramente la dificultad de interpretar cambios en la expresión y/o procesamiento en el cerebro humano de APP, posiblemente debido a su rapidísimo procesamiento en membrana, y por la rápida síntesis de *ново* demostrada para el ARNm de APP [257].

Asimismo, decidimos iniciar un nuevo abordaje para intentar discernir la posibilidad de cambios en el procesamiento proteolítico de APP cerebral en sujetos

aquejados de la AD. Dado que tanto la localización subcelular como las interacciones proteicas que determinan la funcionalidad de una proteína y su ulterior procesamiento están mediadas por la glicosilación, decidimos explorar el estado de glicosilación de sAPP α y sAPP β mediante su interacción a lectinas específicas en su reconocimiento de ciertos azúcares terminales. Los restos de oligosacáridos presentes en las glicoproteínas dependen de la maquinaria enzimática específica del tipo celular particular; y diferentes isoformas de la misma proteína pueden mostrar diversos patrones de glicosilación incluso en el mismo tipo celular [303]. Pero hasta donde sabemos, todavía no ha sido investigado un patrón de glicosilación de APP alterado en el cerebro con la AD. En nuestro estudio, hemos encontrado tanto resultados esperables como otros más novedosos que consideramos de interés. En primer lugar, encontramos diferentes patrones de glicosilación entre los derivados sAPP β atribuidos a la APP695 y a las variantes APP-KPI. Este resultado era esperable, porque tal y como se ha comentado, diversos estudios indican distinto origen celular de estas variantes, por lo que era esperable un patrón de glicosilación diferencial derivado de la maquinaria de glicosilación particular de cada tipo celular. Que hayamos caracterizado este cambio sólo en sAPP β y no en sAPP α , puede ser debido a que sólo hemos realizado el estudio con dos lectinas, siendo probable que la extensión del análisis a otras lectinas específicas de otros restos de azúcares terminales permita caracterizar diferencias para el sAPP α originado del APP695 y del APP-KPI. De manera más interesante, hemos demostrado que sAPP α y sAPP β expresan diferencias en la unión a las lectinas al comparar las especies originadas de las mismas variantes, luego presumiblemente en el mismo tipo celular. Ello sugiere que la célula genera diferentes glicofomas de APP ya predeterminadas a ser procesadas por las vías proteolíticas diferentes (no amiloidogénica o amiloidogénica), y que esta característica es generalizable a neuronas y células gliales. Por último, lo más relevante en términos patológicos, ha sido constatar que existen alteraciones en el patrón de glicosilación de sAPP α al comparar la AD y los controles, lo que podría ser ilustrativo sobre una alteración en el patrón de procesamiento proteolítico de APP en el cerebro patológico. Sin duda alguna, es altamente interesante un estudio más completo, así como explorar si estas alteraciones en la interacción con lectinas son útiles para refinar el potencial diagnóstico como biomarcador del CSF.

Respecto al significado de estas alteraciones en la glicosilación, los estudios actuales muestran que los modelos de la AD tanto *in vitro* como *in vivo* exhiben una reducción de los niveles globales de O-glicosilación que se correlacionan con el mal

funcionamiento mitocondrial, el subsecuente daño de la función bioenergética mitocondrial, y la pérdida de la viabilidad celular [88][89]. Queda por esclarecer si este fenómeno se correlaciona con nuestros resultados indicativos de un patrón de glicosilación alterada para APP en el cerebro de sujetos con la AD. También sería interesante determinar si el metabolismo alterado de O-glicosilación/mitocondrial, o cualquiera que sea la vía, afecta a un número reducido de glicoproteínas o constituye un fenómeno más generalizado que requeriría de estrategias de intervención terapéutica.

Si anteriormente hemos comentado la relativa escasez de estudios de sAPP α y sAPP β en el cerebro humano con la AD, algo semejante ocurre con el CTF α y el CTF β , ya que tampoco se han estudiado en profundidad, posiblemente porque los fragmentos intracelulares de APP se procesan rápidamente por la γ -secretasa y/o se degradan a través de la autofagia y la vía endosomal-lisosomal [304][305][306]. Además, la especificidad de las bandas inmunoreactivas para APP-CTF ha sido cuestionada de forma recurrente [307]. No obstante, nuestro grupo está interesado en el estudio de los niveles de CTF α y CTF β en extractos cerebrales de sujetos con la AD, estudio que actualmente estamos desarrollando, y en este sentido, durante el periodo de realización de esta tesis hemos tenido ocasión de incluir un estudio original sobre la detectabilidad de fragmentos APP-CTF en el CSF humano. Sorprendentemente, el APP-CTF más abundante identificado en el CSF humano ha sido un fragmento de ~25 kDa, que por tamaño en inmunoreactividad a distintos anticuerpos, se ha atribuido a un CTF caracterizado recientemente como resultado de un procesamiento proteolítico alternativo de APP por la η -secretasa (CTF η) [62][308]. Tal y como hemos comentado, las vías mejor caracterizadas del procesamiento proteolítico de APP se producen a través de la α - o la β -secretasa, lo que generaría el CTF α o el CTF β respectivamente, ambos con una masa molecular inferior a 15 kDa. Pero, también se han descrito vías alternativas de procesamiento [62][67][289]. Estas vías llevarían a la generación de fragmentos alternativos de APP, algunos de los cuales han sido identificados previamente en el CSF humano conteniendo el ectodominio N-terminal [290]. En este sentido, es necesario una confirmación más precisa para la asignación del fragmento APP-CTF de 25-kDa como CTF η mediante el desarrollo de anticuerpos pan-específicos contra el extremo N-terminal truncado específico de CTF η . Una aproximación clásica implicaría la confirmación por espectrometría de masas tras inmunoprecipitación con anticuerpos C-terminales para APP. Sin embargo, los intentos previos para inmunoprecipitar fragmentos APP-CTF no han resultado fructíferos [290], y en este sentido, nuestros experimentos, aunque positivos en este aspecto, han resultado complejos y en un principio con intentos

desalentadores. Pero lo más relevante, es que dado que la proteína APP sin procesar (sAPPf) del CSF forma heterómeros, los ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti C-terminales de APP inmunoprecipitarían además del APP-CTF, el sAPPf y también co-inmunoprecipitarían sAPP β y sAPP α [231], por lo que la identificación de péptidos hidrolíticos de parte de la secuencia del CTF η no sería concluyente. Este mismo razonamiento también sería aplicable al desarrollo de un ensayo ELISA específico.

Hay que tener en cuenta que aunque los APP-CTF por definición son especies residentes de membrana, y por lo tanto no se espera encontrarlos en el CSF, nuestro grupo ha caracterizado previamente tanto sAPPf como otras proteínas transmembrana sin procesar proteolíticamente en el CSF [231][309]. No obstante, estudios previos de otros grupos no detectaron fragmentos cortos C-terminales de APP en el medio de células cultivadas [20]; aunque otros estudios sí sugirieron la liberación al medio de fragmentos de APP-CTF más grandes en células neurales en cultivo [310]. Además, se ha descrito la existencia de APP-CTF en exosomas de células cultivadas [311], así como de AICD [312]. Se desconocen los mecanismos por los cuales estas proteínas unidas a la membrana alcanzaron el CSF, y si están asociadas a exosomas o libres en el fluido; en este sentido, no hay que descartar que procedan, al menos en parte, de muerte neuronal/glial. Con respecto a la fuente celular del APP-CTF de 25 kDa caracterizado en el CSF, se ha documentado la presencia de fragmentos de APP, incluido un CTF de 25 kDa, en las neuronas del hipocampo [62], pero también en otros tipos celulares, incluidas las células endoteliales microvasculares [290]. El origen celular de este APP-CTF de 25 kDa también podría ser relevante para definir su potencial como un biomarcador de la AD.

Es una incógnita porque este APP-CTF de 25 kDa, que se supone que no es el generado mayoritariamente en el cerebro, sí sea el más abundante en el CSF. Hoy en día se asume que el procesamiento de APP por η -secretasa está parcialmente en equilibrio dinámico con la proteólisis mediada por la α - y β -secretasa [62][313][314]. La forma en que las secretasas compiten por el sustrato de APP y la influencia de la compartimentación subcelular de APP y secretasas está continuamente en discusión [315]. En consecuencia, se puede especular que si el APP-CTF de 25 kDa es realmente un CTF η , su mayor abundancia en el CSF podría estar relacionada con la compartimentación de secretasas, quizás en exosomas, que conllevaría un procesamiento más lento del CTF η respecto del CTF α y del CTF β .

Respecto a los niveles asociados a la condición patológica, hemos demostrado valores elevados en la AD esporádica respecto a los controles, y también en el CSF de sujetos con FAD y dDS, que ofrecen incluso una mayor discriminación al comparar con sus respectivos controles. Todos los ensayos de colecciones distintas fueron comparados con controles obtenidos por el mismo equipo, y se refieren a sujetos de edad similar. En el futuro deberá examinarse la posibilidad de que los niveles de APP-CTF varíen con la edad en condiciones no patológicas. En cualquier caso, estas formas de la AD determinadas genéticamente sirven para confirmar la asociación a la condición patológica de elevados niveles de APP-CTF de 25 kDa en el CSF.

En nuestro análisis estadístico, los altos niveles de APP-CTF de 25 kDa en el CSF se correlacionaron con una mayor concentración de T-tau y P-tau, pero no se correlacionaron con los niveles de A β 42. Se cree que el aumento de la concentración de T-tau en el CSF refleja la neurodegeneración, mientras que se supone que P-tau se asociaría propiamente a la patología neurofibrilar. Por el contrario, la disminución general de la concentración de A β 42 en los CSF de los pacientes no es ilustrativa de los desequilibrios en el procesamiento de APP en el cerebro, ya que en paralelo con el aumento en la generación de A β 42, también se produce una mayor agregación de A β en placas. Por lo tanto, las correlaciones positivas del APP-CTF de 25 kDa con T-tau y P-tau sugieren una correlación con el proceso patológico de la AD. De todos modos, las correlaciones mencionadas resultaron positivas solo cuando se consideraron todas las muestras, y no en los grupos control o con la AD considerados por separado. Por lo tanto, estas correlaciones obtenidas al agrupar los controles y los afectados por la patología, podrían ser un artefacto por la desviación propia de valores en los sujetos con la AD. Se requiere un análisis adicional con un mayor número de muestras antes de extraer conclusiones relevantes.

Por lo tanto, para definir el verdadero potencial del APP-CTF de 25 kDa detectable en el CSF como un biomarcador, sería valioso replicar nuestro hallazgo actual utilizando técnicas fácilmente cuantitativas y replicativas como los ensayos ELISA. Sin embargo, ya se ha comentado que actualmente no son aplicables en función de los protocolos y anticuerpos accesibles. De cualquier modo, incluso con las desventajas de la transferencia por western blot para un análisis cuantitativo, consideramos que la determinación de los niveles de APP-CTF en el CSF puede constituir un posible nuevo biomarcador de la AD. Para corroborar su potencial serán necesarios ensayos de especificidad, incluyendo grupos de otras demencias y desórdenes neurológicos. No obstante, nuestros hallazgos actuales proporcionan

evidencia suficiente para justificar más estudios sobre la determinación de APP-CTF como un posible nuevo biomarcador de diagnóstico de la AD.

Por todo ello, consideramos que los hallazgos expuestos en este trabajo contribuyen a iluminar un campo de investigación con muchas incógnitas por resolver, pero que ofrece nuevas oportunidades y perspectivas de estudio en el campo de la proteína APP y su procesamiento en la AD.

VI. Conclusiones

1. En el CSF humano y mediante western blot, confirmamos la existencia de especies de alrededor de 100 y 120 kDa de sAPP α y sAPP β , probablemente producto de variantes no portadoras (APP65) y portadoras del dominio KPI. Especies de tamaño similar se determinaron al resolver las muestras con anticuerpos contra la región C-terminal, demostrando la co-existencia en el CSF de sAPPf, la especie sin procesar proteolíticamente.
2. Los niveles de las especies de 100 y 120 kDa de sAPP α y sAPP β no mostraron cambios en el CSF de sujetos con la AD al comparar con los controles. Tampoco para la sAPPf, ni al determinar los niveles de APP con anticuerpos anti-KPI.
3. La proporción de especies de 100 y 120 kDa de sAPP α o sAPP β en el CSF tampoco mostró alteración al comparar sujetos con la AD y controles, pero sí cuando se determinó para las especies sAPPf y sAPP-KPI, lo que podría indicar alteraciones en expresión y/o procesamiento.
4. No existen diferencias significativas entre los niveles de sAPP α y sAPP β , determinadas por western blot, en extractos cerebrales de sujetos con la AD al comparar con los controles.
5. Las especies sAPP α y sAPP β solubilizadas de extractos cerebrales exhiben diferencias en su unión a lectinas.
6. El patrón de glicosilación de sAPP α extraído de corteza frontal difiere en extractos de la AD al comparar con controles.
7. En el CSF humano son identificables fragmentos C-terminales de APP. El más abundante de ellos se corresponde con un fragmento de 25 kDa, fragmento compatible por su tamaño y reactividad a anticuerpos con el producto del procesamiento proteolítico de APP por la η -secretasa (CTF η).
8. Los niveles de APP-CTF de 25 kDa fueron superiores en el CSF de sujetos portadores de mutaciones en *PSEN1* al comparar con familiares no portadores y de edad similar.
9. Los niveles de APP-CTF de 25 kDa fueron superiores en el CSF de sujetos dementes con síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21 que incluye el gen *APP*) al ser comparados con controles de edad pareada.
10. Los niveles de APP-CTF de 25 kDa fueron superiores en el CSF de sujetos con la AD esporádica al ser comparados con controles de edad pareada.

VII. Publicaciones

Artículo 1: Alterations in the Balance of Amyloid- β Protein Precursor Species in the Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's Disease Patients

Inmaculada Lopez-Font, **Claudia P. Boix**, Henrik Zetterberg, Kaj Blennow and Javier Sáez-Valero.

Publicado en **Journal of Alzheimer's disease**. 2017. DOI: 10.3233/JAD-161275

Research Article

**Alterations in the balance of amyloid- β precursor protein species
in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients**

Inmaculada Lopez-Font^{1,2*}, Claudia P. Boix^{1,2}, Henrik Zetterberg^{3,4}, Kaj Blennow³ and
Javier Sáez-Valero^{1,2*}

¹Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC, 03550 Sant Joan d'Alacant, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain; ³Clinical Neurochemistry Laboratory, Inst. of Neuroscience and Physiology, University of Gothenburg, Mölndal Campus, Sweden; ⁴Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, Queen Square, London, United Kingdom.

***To whom correspondence should be addressed:** Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Av. Ramón y Cajal s/n, Sant Joan d'Alacant, E-03550, Spain. Tel.: +34 965919580, Fax: +34 965919561.

Emails: j.saez@umh.es; ilopez@umh.es

Running head: *Amyloid- β proteins in CSF*

Abstract

We recently demonstrated that soluble forms of the amyloid- β precursor protein (sA β PP) assemble into multimeric complexes in cerebrospinal fluid (CSF), which contributes to the underestimation of specific sA β PP species when assessed by ELISA. To circumvent this issue, we analyzed by SDS-PAGE large fragments of sA β PP and their variants in the CSF from Alzheimer's disease (AD; n=20) and control (n=20) subjects, probing with specific antibodies against particular domains. Similar levels of sA β PP α and sA β PP β protein were found in CSF samples from AD and controls, yet there appeared to be a shift in the balance of the soluble full-length A β PP (sA β PPf) species in AD samples, with a decrease in the proportion of the lower (~100 kDa) band relative to the upper (~120 kDa) band. Similar differences were observed in the contribution of the major KPI-immunoreactive A β PP species. CSF samples also displayed differences in the correlations of A β PP species with classical AD biomarkers, particularly with respect to the A β 42 peptide. The differences reveal alterations that probably reflect pathophysiological changes in the brain.

Key words: Alzheimer's disease; A β PP; sA β PPf; sA β PP α ; sA β PP β ; KPI;

Cerebrospinal fluid; biomarker.

1. Introduction

Early and accurate diagnosis of Alzheimer's disease (AD) is essential to establish timely and effective therapies, and to follow the progression of the disease. Due to its stipulated role in the disease [1], the amyloid- β peptide ($A\beta$) that accumulates in the brain parenchyma as senile plaques, which is reflected by reduced lumbar cerebrospinal fluid (CSF) concentrations of the protein, is likely to be one of the more specific biomarkers for AD. Increase in the production and deposition of $A\beta_{42}$ in the AD-affected brain probably occur in parallel decades prior to the appearance of symptoms [2]. Accordingly, longitudinal changes in CSF $A\beta$ species are difficult to interpret and additional biomarkers are needed, especially at early disease stages. Similarly, it is difficult to gain significant information about the potential changes in CSF $A\beta$ levels that could help assess experimental therapies aimed at reducing $A\beta$ production [3].

Other possible core biomarkers for AD are the ecto-domain fragments of amyloid- β precursor protein ($A\beta$ PP) that result from amyloidogenic and non-amyloidogenic $A\beta$ PP processing by secretases. $A\beta$ PP is a large type I transmembrane glycoprotein that is alternatively cleaved by α -secretase (in the non-amyloidogenic pathway) or β -secretase (the amyloidogenic pathway), which provokes the secretion of large $sA\beta$ PP α and $sA\beta$ PP β fragments, respectively. The C-terminal fragments (CTF) that persist in the membrane after such cleavage are then processed by γ -secretase. In the amyloidogenic pathway, further γ -secretase cleavage also releases the $A\beta$ peptide, whereas when $A\beta$ PP molecules are cleaved by α -secretase within the $A\beta$ domain, the generation of this $A\beta$ peptide is precluded [4]. Apart from these fragments, soluble full-length $A\beta$ PP ($sA\beta$ PPf) is also known to exist in the CSF and plasma [5-7].

In this context, $sA\beta$ PP α and $sA\beta$ PP β have been studied as potential biomarkers for AD, yet no consistent changes in the CSF levels of these fragments have been

identified [8]. In fact, the pattern of A β PP species in the CSF is even more complex than that indicated above, as there are three A β PP isoforms produced in the brain as a result of alternative exon splicing [9]. These splice variants encode: A β PP695, the neuronal predominant variant; A β PP751, mostly expressed in astrocytes and glial cells, and harboring an amino acid insert homologous to a Kunitz-type trypsin inhibitor (KPI); and A β PP770, which is widely expressed in peripheral tissues but minimally in the brain, and that also contains the KPI domain and an additional domain with homology to the MRC OX-2 antigen [10]. Early Western blot studies demonstrated that the soluble KPI-containing and KPI-free A β PP isoforms are readily detected in CSF [11, 12].

The evaluation of biomarkers in CSF presently relies on ELISA immunoassays. However, we recently demonstrated that all the sA β PP species in the CSF assemble into heteromers, including sA β PP α and sA β PP β , and this affects their assessment by the available ELISAs [7]. In order to circumvent this issue and with the goal of evaluating the potential of CSF-sA β PP species to serve as AD biomarkers, we evaluated the levels of large sA β PP fragments and their variants using denaturing SDS-PAGE. However, the expected pattern of CSF-sA β PP fragments resolved in this way, and detected in Western blots, is intricate, with several different forms and large proteolytic fragments displaying similar molecular masses of which make them mostly indistinguishable by electrophoretic analysis. Thus, we performed the characterization of CSF-sA β PP species by probing with specific antibodies for A β PP raised against different pan-specific domains.

2. Materials and methods

2.1. Patients

Lumbar CSF samples were obtained from 20 patients with AD (5 men and 15 women, mean age 69 ± 3 years) and 20 age-matched controls (12 men and 8 women, mean age 69 ± 2 years). The AD patients had cognitive deterioration and a CSF biomarker profile indicative of AD, including increased T-tau (>400 pg/mL) and P-tau (>70 pg/mL) together with low A β 42 (<550 pg/mL) concentrations in CSF; while controls were patients who sought medical advice because of memory complaints but had normal levels of all three classical CSF biomarkers (T-tau < 350 pg/mL, P-tau < 60 pg/mL, and A β 42 > 550 pg/mL), thereby excluding early AD pathology [13]. The CSF samples used for the present study were de-identified left-over aliquots from clinical routine analyses, following a procedure approved by the Ethics Committee at University of Gothenburg. This study was also approved by the ethics committee of the Miguel Hernandez University.

2.2. Western blotting

CSF samples (30 μ L) were boiled at 95 °C for 5 min and resolved by 7.5% SDS-PAGE. The sA β PP species in the samples were detected with the following antibodies: a polyclonal anti-A β PP C-terminal antiserum (1:2,000; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; named here Sigma-Ct); a monoclonal anti-A β PP 6E10 that reacts with both sA β PP β and sA β PP α , as well as with free A β (1:2,000; Covance; named here 6E10); a monoclonal anti-A β PP N-terminal (1:500; Sigma Aldrich; named here Sigma-Nt), a polyclonal anti-sA β PP β antiserum specific to the C-terminus of sA β PP β (1:50; IBL, Hamburg, Germany; named here IBL- β); a monoclonal anti-sA β PP α specific to the C-terminus of sA β PP α (1:50; IBL; named here IBL- α); and a polyclonal anti-KPI antiserum specific to the KPI domain of A β PP (1:500; Millipore; named here KPI).

When appropriate, a control CSF sample was used to normalize the immunoreactive

signal between immunoblots. Band intensities were analyzed using LI-COR software (Image Studio Lite).

To assess the specificity of the pan-specific A β PP antibodies, CSF samples were resolved to simultaneously detect the immunoreactivity of sA β PP α and sA β PP β . The blots were then probed with the appropriately conjugated secondary antibodies (IRDye 680RD goat anti-mouse and IRDye 800CW goat anti-rabbit: LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Germany) and analyzed on an Odyssey Clx Infrared Imaging System (LI-COR).

To test the identity of the 120 and 100 kDa KPI bands, CSF samples were resolved to simultaneously detect the immunoreactivity of two antibodies in different combinations: Sigma-Nt/KPI and 6E10/KPI. The blots were probed with the appropriate conjugated secondary antibodies (IRDye 800CW goat anti-mouse and IRDye 680RD goat anti-rabbit: LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Germany) and analyzed on an Odyssey Clx Infrared Imaging System (LI-COR).

2.3. Measurement of T-tau, P-tau and A β 42 by ELISA

Total tau (T-tau), phosphorylated tau (P-tau) and A β 1-42 (A β 42) concentrations in CSF were measured using INNOTEST ELISA methods (Fujirebio Europe). All samples were analyzed as part of clinical routine, by board certified laboratory technicians following strict procedures for batch-bridging, analyses and quality control of individual ELISA plates, as described previously in detail [14].

2.4. Statistical analysis

All the data were analyzed using SigmaStat (Version 2.0; SPSS, Inc.) using a Student's

t test (two-tailed) or a Mann-Whitney U test for single pairwise comparisons, and

determining the exact p values. The results are presented as means \pm SEM and the correlation between variables was assessed by linear regression analyses.

3. Results

3.1. *Unaltered sA β PP α and sA β PP β levels in AD CSF*

To date, studies of sA β PP α and sA β PP β levels in CSF as potential biomarkers for AD have generated inconclusive results. These studies have generally employed ELISA to measure these proteins. Since sA β PP exists as heteromers in CSF [7], the detection of A β PP α and sA β PP β by ELISA is likely to be compromised. To avoid potential interference of the heteromeric complexes formed in CSF, we determined the levels of sA β PP α and sA β PP β after their separation by SDS/PAGE and detected these proteins in Western blots probed with different pan-specific antibodies (Supplemental Fig. 1A).

We first measured the sA β PP α and sA β PP β in CSF from AD and control subjects characterized for classical biomarkers (see Table 1). These soluble A β PP fragments were detected using antibodies that recognize their exclusive C-terminal domains; the specificity of which was corroborated by a simultaneous assay of fluorescence (Supplemental Fig. 1B). Probing immunoblots with the antibodies against sA β PP α and sA β PP β revealed a similar banding pattern, with a broad lower band of approximately 100-110 and a faint upper band of 120-130 kDa. These bands are referred to here always as “100 kDa” and “120 kDa” bands, nonetheless minor differences in electrophoretic migration were detected when they were probed with different antibodies. There was moderate co-localization of only the 120 kDa but not the more abundant 100 kDa band when the membranes were probed with the sA β PP α and sA β PP β antibodies together (Supplemental Fig. 1B). There were no clear differences between AD and control subjects in the lower or upper bands for sA β PP α or sA β PP β

(Fig. 1A, B), and thus, we also attempted to assess whether there was a relative difference in the balance between the 100 and 120 kDa bands. As such, we calculated the ratio between the immunoreactivity of the lower and the upper A β PP bands (100 kDa/120 kDa ratio, or A β PPr), and again, there was apparently no difference in the A β PPr between control and AD subjects (Fig. 1A, B).

Interestingly, the amounts of sA β PP α or sA β PP β appear to be tightly correlated in CSF [15]; but we had previously demonstrated that heteromers containing sA β PP β and sA β PP α exist in CSF, which may underlie this correlation [7]. Anyhow, the SDS/PAGE data confirms the correlation between sA β PP α and sA β PP β for the lower and upper bands, both in the control and AD groups (Supplemental Fig. 2). In addition, the amount of the lower and upper sA β PP α -immunoreactive bands correlated with the levels of A β 42 in the control group, while this correlation was not evident in the AD subjects. By contrast, the levels of sA β PP α were correlated with those of T-tau in pathological but not in control samples (Fig. 2A, B). Similarly, correlations between the lower and upper sA β PP β bands with T-tau were only detected in AD samples (Fig. 2C, D), while there were no clear correlations between sA β PP β and A β 42 in either the control or AD subjects.

3.2. Altered balance of 100 and 120 kDa sA β PP bands in AD CSF

In accordance with our previous study, an antibody raised against the unprocessed C-terminal of the full-length A β PP also detected proteins in CSF resolved by SDS-PAGE that were similar in molecular mass to the large sA β PP fragments (Fig. 3A). These bands of ~100 and 120 kDa were characterized as the lower and upper sA β PPf bands [7]. When the levels of sA β PPf were determined in fresh aliquots of the control and AD CSF samples, there were no significant differences for the lower or the upper band (Fig.

3A). By contrast, an imbalance was evident in the pathological group regarding the proportion of the lower band with respect to the upper band, producing a change in the A β PPr (Fig. 3A). In both the control and AD groups, there was a correlation between the lower sA β PPf bands and the lower sA β PP α and sA β PP β bands, and while the upper bands were also generally related, this was not the case for the sA β PPf and sA β PP α in control CSF (Fig. 3B). None of the sA β PPf bands were correlated with the levels of A β 42 in the control or AD groups, although the sA β PPf bands were related to the T-tau levels in the AD but not the control CSF samples (Fig. 3C).

3.3. Altered balance of KPI amyloid- β proteins in AD CSF

Finally, an antibody raised against the KPI domain present in the A β PP751 and A β PP770 variants was used to probe the CSF samples. KPI immunoreactive bands of ~100 and 120 kDa were detected in CSF, similar molecular masses to those observed with anti-A β PP antibodies (Fig. 4A). Since the KPI domain is present in several other brain glycoproteins, we first checked the identity of these bands in a simultaneous fluorescence assays. For this assay, we first used the anti KPI antibody combined with the anti A β PP N-terminal antibody, and then with the 6E10 antibody that recognized an epitope in the N-terminal region of A β peptide, detecting sA β PPf and sA β PP α but not sA β PP β (Supplemental Fig. 3). Co-localization between the KPI and the A β PP N-terminal antibodies confirmed the identity of the 100 and 120 kDa KPI-immunoreactive bands as sA β PP species (sA β PP_{KPI}). As co-localization of the KPI antibody with 6E10 was only evident for the 120 kDa and not the 100 kDa band, this sA β PP_{KPI} band probably corresponds to sA β PP β (or another large N-terminal fragment) but not sA β PP α . Simultaneous assays of fluorescence using a pan-specific sA β PP β antibody with the KPI antibody cannot be performed because both are rabbit polyclonal antisera

and they cannot therefore be distinguished with different secondary antibodies. Nevertheless, 110–100-kDa forms of sA β PP_{KPI} have been reported previously in human brain and cultured cells [16-18].

When aliquots of CSF samples were probed with the anti-KPI antibody, no significant changes were evident between AD and control subjects (Fig. 4A), although again the A β PP_r for sA β PP_{KPI} revealed a possible imbalance between the 100 kDa and the 120 kDa band in AD CSF (Fig. 4A). Moreover, when the correlation of the sA β PP_{KPI} bands with the sA β PP α or sA β PP β fragment or with sA β PP_f was assessed, the correlations in the CSF from the control subjects were poorer than those observed in the AD group (Fig. 4B). Again the correlations of sA β PP_{KPI} bands with classical AD biomarker indicate a stronger relationship between these variants and T-tau or P-tau than for A β 42 (Fig. 4C).

4. Discussion

In this study, we attempted to define differences in the sA β PP species in the CSF of AD patients that may serve as biomarkers for this disease. Similar studies have been performed previously, as CSF levels of sA β PP α and sA β PP β are thought to be promising candidate biomarkers. However, most of these studies were based on ELISA assays, which have produced some conflicting results. The earliest studies based on Western blotting analysis indicated that the AD pathology is associated with a slight decrease in sA β PP α in the CSF [11, 19]. Similar decreases in sA β PP α in the CSF were subsequently observed using ELISA assays [12, 20-22] or no significant change [23- 26], although its levels were shown to increase in other studies [15, 27-29].

Unexpectedly, most ELISA studies showed no change or even a decrease in sA β PP β in the CSF in association with AD [21, 22, 25, 30, 31], in contrast to the increase reported

elsewhere [29]. A recent study of sA β PP α and sA β PP β levels in a large number of post-mortem ventricular CSF samples indicated there was a large overlap, with both large sA β PP fragments upregulated in AD CSF compared to controls [32].

Several issues may put in doubt the reliability of ELISA measurements of CSF A β PP species. First, we have described the presence of sA β PPf in human CSF [7], and some of the ELISA kits employed for assessing sA β PP α rely on the 6E10 antibody or similar antibodies that recognize the N-terminal part of the A β peptide [25].

Accordingly, these antibodies will bind to sA β PP α but also to sA β PPf, which may be responsible for some of the discrepancies reported with different ELISA kits. Moreover, A β PP can undergo alternative proteolytic processing, potentially generating alternative proteolytic metabolites [33]. All the canonical and non-canonical extracellular N-terminal A β PP fragments are present in human CSF [11, 34-38] and thus, other N-terminal A β PP fragments generated by alternative proteolytic processing of A β PP may also be responsible for the divergent results obtained by ELISA due to the different antibody specificities for distinct domains. Furthermore, sA β PP species associate in heteromeric complexes [7] and the existence of such heteromers may reduce the accuracy of ELISA, even if they are based on pan-specific antibodies against the exclusive C-terminus of sA β PP α and sA β PP β . For all these reasons, and despite the disadvantages of Western blotting for quantitative analysis, we used a SDS-PAGE based approach to study these proteins here instead of ELISA.

Such an SDS/PAGE based analysis of sA β PP species allows the different species carrying a common epitope of the protein to be identified separately, especially if they have a distinct molecular mass. A β PP is usually detected in brain extract by SDS/PAGE as a group of 100-130 kDa proteins [16] the differences in molecular mass possibly representing splice variants of the predominant A β PP695, and of the KPI-

forms A β PP751 and A β PP770. However, small differences in electrophoretic migration can also be attributed to differences in glycosylation [39] or they may reflect immature forms of the protein [40]. Moreover, sA β PP α or sA β PP β are predicted to be only ~5-10 kDa smaller than full-length A β PP in the CSF [34]. Accordingly, large sA β PP fragments cannot be discriminated in CSF by SDS/PAGE and specific antibodies must be used to probe the blotted proteins. Recently, pan-specific antibodies against the C-terminus exclusive to sA β PP α and sA β PP β were validated using peptide competitors [41]. In our hands, simultaneous fluorescence assays also demonstrated the specificity of these pan-specific sA β PP α and sA β PP β antibodies. As different sA β PP species co-immunoprecipitate due to the formation of heteromers, this restricts the verification of the immunoreactive bands by immunoprecipitation [7]. Here, we circumvent this issue by simultaneously assaying the fluorescence associated with antibody binding.

However, whilst the failure of two antibodies to co-localize indicates they represent different proteins or species, co-location cannot be accepted as unquestionable proof of identity. Likewise, some combination of antibodies is limited by the different species in which they are generated.

In this extremely complex scenario, we affronted the biochemical dissection of sA β PP α , sA β PP β , sA β PPf and sA β PP_{KPI} variants in AD CSF compared to age-matched controls. After ruling out and excluding individuals with competing causes of dementia, the selection of the controls was based on a control biomarker profile for T-tau, P-tau and A β 42. Follow-up studies demonstrate that established cut-points result >90% specific for AD [13]. No changes were observed in sA β PP α and sA β PP β in the CSF from AD and controls. Surprisingly, we corroborated the positive correlation between the sA β PP α and sA β PP β reported using ELISA [15, 30], and that we had initially attributed to the existence of heteromers [7]. This positive correlation was not identified

in an earlier study assessing sA β PP α and sA β PP β levels in Western blots, although this may be due to the use of the 6E10 antibody to identify sA β PP α [21]. More interestingly, in control samples we found different associations of sA β PP α and sA β PP β with classical AD biomarkers, A β 42, T-tau or P-tau, and interestingly these correlations were apparently disturbed in AD samples. Characterization of these differences in the association of classical AD biomarkers with sA β PP α and sA β PP β variants confirmed the subtle alterations in the expression and proteolytic processing of A β PP in the pathological condition, meriting more detailed analysis with refined tools and protocols.

In addition, by defining a quotient that reflects the immunoreactivity of the 100 kDa and 120 kDa bands, the A β PP r , we found differences in the sA β PP α and sA β PP β variants between AD and control samples. The A β PP r highlights differences in the major 100 and 120 kDa bands that could not be envisaged through ELISA. A previous report in platelets also indicated differences in the evolution of different species and the interest in defining this kind of ratio between A β PP species [42]. The alteration in the A β PP r for sA β PP α reflects only unprocessed species and since the mechanism by which sA β PP α appears in CSF is yet to be determined, this imbalance may be difficult to interpret. A more complete characterization of the different species is necessary, as the 100 and 120 kDa bands could represent different glycoforms, or mature and immature forms of the same A β PP variant, as well as different splicing variants. This altered expression may also reflect post-translational processing. Intriguingly, the A β PP r for KPI species also revealed alterations in proteolytic processing since the 100 kDa sA β PP β band probably represents a sA β PP β fragment.

Here, we justify the study of CSF-sA β PP by SDS/PAGE instead of ELISA, although the disadvantages of using SDS/PAGE interfere in the translation of a biomarker for clinical purposes. Western blotting is limited in the number of samples

that can be assayed, and in the means to normalize the data and compare between assays. It is also a time consuming technique, subject to inter-assay variation and the difficulties of using calibration curves to estimate the concentrations of the analytes. Therefore, it would be useful to refine ELISA protocols in order to evaluate a single species or A β PP fragment, and to improve the performance of such analyses. The possibility of introducing chemical pre-treatment of samples aimed at disaggregating oligomers should be investigated, as reported recently for A β [43]. Such modifications could make ELISA a more accurate procedure to measure sA β PP, overcoming the potential interference of heteromers. Anyhow, our data about differences in the contribution of major 100 and 120 kDa bands for different A β PP species in AD CSF, as well differences in the association of classical AD biomarkers respect to controls, must be subject to confirm by another techniques with greater reliability for the quantification. Further studies should also assess the specificity of the changes in CSF from patients with variety of senile dementias.

In conclusion, our data indicate that current ELISA protocols are not suitable to evaluate CSF A β PPs as biomarkers for AD. Although A β PP has been studied extensively, our current understanding of the complex patterns of A β PP expression in the brain, taking into account the splice variants, translational modifications and its intricate proteolytic processing, are unlikely to reflect the whole picture. Discerning the changes suffered by A β PP in the pathological AD brain should favor its use as a CSF biomarker. In this regard, developing new ELISA protocols will be challenging but together with a more complete biochemical study of sA β PPs in the CSF, may serve to provide alternative core biomarkers for AD.

Disclosure statement

The authors have no competing interests to disclose in relation to this article.

Acknowledgments

This study was funded in part by the EU BIOMARKAPD-Joint Programme on Neurodegenerative Diseases (JPND), by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII grant PI11/03026 and PI15/00665, co-financed by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional under the aegis of JPND), and through CIBERNED (ISCIII).

References

- [1] Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**, 184-5.
- [2] Jansen WJ, Ossenkoppele R, Knol DL, Tijms BM, Scheltens P, Verhey FR, Visser PJ; Amyloid Biomarker Study Group, Aalten P, Aarsland D, Alcolea D, Alexander M, Almdahl IS, Arnold SE, Baldeiras I, Barthel H, van Berckel BN, Bibeau K, Blennow K, Brooks DJ, van Buchem MA, Camus V, Cavedo E, Chen K, Chetelat G, Cohen AD, Drzezga A, Engelborghs S, Fagan AM, Fladby T, Fleisher AS, van der Flier WM, Ford L, Förster S, Fortea J, Foskett N, Frederiksen KS, Freund-Levi Y, Frisoni GB, Froelich L, Gabryelewicz T, Gill KD, Gkatzima O, Gómez-Tortosa E, Gordon MF, Grimmer T, Hampel H, Hausner L, Hausner L, Hellwig S, Herukka SK, Hildebrandt H, Ishihara L, Ivanoiu A, Jagust WJ, Johannsen P, Kandimalla R, Kapaki E, Klimkowicz-Mrowiec A, Klunk WE, Köhler S, Koglin N, Kornhuber J, Kramberger MG, Van Laere K, Landau SM, Lee DY, de Leon M, Lisetti V, Lleó A, Madsen K, Maier W, Marcusson J, Mattsson N, de Mendonça A, Meulenbroek O, Meyer PT, Mintun MA, Mok V, Molinuevo JL, Møllergård HM, Morris JC, Mroczko B, Van der Mussele S, Na DL, Newberg A, Nordberg A, Nordlund A, Novak GP, Paraskevas GP, Parnetti L, Perera G, Peters O, Popp J, Prabhakar S, Rabinovici GD, Ramakers IH, Rami L, Resende de Oliveira C, Rinne JO, Rodrigue KM, Rodríguez-Rodríguez E, Roe CM, Rot U, Rowe CC, Rütther E, Sabri O, Sanchez-Juan P, Santana I, Sarazin M, Schröder J, Schütte C, Seo SW, Soetewey F, Soininen H, Spuru L, Struyfs H, Teunissen CE, Tsolaki M, Vandenberghe R, Verbeek MM, Villemagne VL, Vos SJ, van Waalwijk van Doorn LJ, Waldemar G, Wallin A, Wallin ÅK, Wiltfang J, Wolk DA, Zboch M, Zetterberg H (2015) Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: a meta-analysis. *JAMA* **313**, 1924-38.
- [3] Lleó A, Cavedo E, Parnetti L, Vanderstichele H, Herukka SK, Andreasen N, Ghidoni R, Lewczuk P, Jeromin A, Winblad B, Tsolaki M, Mroczko B, Visser PJ, Santana I, Svenningsson P, Blennow K, Aarsland D, Molinuevo JL, Zetterberg H, Mollenhauer B (2015) Cerebrospinal fluid biomarkers in trials for Alzheimer and Parkinson diseases. *Nat Rev Neurol* **11**, 41-55.
- [4] Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S (2012) Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006270.
- [5] Bush AI, Martins RN, Rumble B, Moir R, Fuller S, Milward E, Currie J, Ames D, Weidemann A, Fischer P (1990) The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is released by human platelets. *J Biol Chem* **265**, 15977-83.
- [6] Efthimiopoulos S, Vassilacopoulou D, Ripellino JA, Tezapsidis N, Robakis NK (1996) Cholinergic agonists stimulate secretion of soluble full-length amyloid precursor protein in neuroendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 8046-50.
- [7] Cuchillo-Ibañez I, Lopez-Font I, Boix-Amorós A, Brinkmalm G, Blennow K, Molinuevo JL, Sáez-Valero J (2015) Heteromers of amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid. *Mol Neurodegener* **10**, 2.
- [8] Olsson B, Lautner R, Andreasson U, Öhrfelt A, Portelius E, Bjerke M, Hölttä M, Rosén C, Olsson C, Strobel G, Wu E, Dakin K, Petzold M, Blennow K, Zetterberg H (2016) CSF and blood biomarkers for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* **15**, 673-84.
- [9] Tanaka S, Nakamura S, Ueda K, Kameyama M, Shiojiri S, Takahashi Y, Kitaguchi N, Ito H (1988) Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **157**, 472-9.
- [10] Evin G, Li QX (2012) Platelets and Alzheimer's disease: Potential of APP as a biomarker. *World J Psychiatry* **2**, 102-13.
- [11] Palmert MR, Siedlak SL, Podlisny MB, Greenberg B, Shelton ER, Chan HW, Usiak M, Selkoe DJ, Perry G, Younkin SG (1989) The beta-amyloid protein precursor of Alzheimer disease has soluble derivatives found in human brain and cerebrospinal fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 6338-42.
- [12] Prior R, Mönning U, Schreiter-Gasser U, Weidemann A, Blennow K, Gottfries CG, Masters CL, Beyreuther K (1991) Quantitative changes in the amyloid beta A4 precursor protein in Alzheimer cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett* **124**, 69-73.
- [13] 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. *Lancet Neurol* **5**, 228-34.
- [14] Palmqvist S, Zetterberg H, Blennow K, Vestberg S, Andreasson U, Brooks DJ, Owenius R, Hägerström D, Wollmer P, Minthon L, Hansson O (2014) Accuracy of Brain Amyloid Detection

- in Clinical Practice Using Cerebrospinal Fluid β -Amyloid 42: A Cross-Validation Study Against Amyloid Positron Emission Tomography. *JAMA Neurol* **71**,1282-9.
- [15] Lewczuk P, Kamrowski-Kruck H, Peters O, Heuser I, Jessen F, Popp J, Bürger K, Hampel H, Frölich L, Wolf S, Prinz B, Jahn H, Luckhaus Ch, Pernecky R, Hüll M, Schröder J, Kessler H, Pantel J, Gertz HJ, Klafki HW, Kölsch H, Reulbach U, Esselmann H, Maler JM, Bibl M, Kornhuber J, Wiltfang J (2010) Soluble amyloid precursor proteins in the cerebrospinal fluid as novel potential biomarkers of Alzheimer's disease: a multicenter study. *Mol Psychiatry* **15**, 138-45.
- [16] Moir RD, Lynch T, Bush AI, Whyte S, Henry A, Portbury S, Multhaup G, Small DH, Tanzi RE, Beyreuther K, Masters CL (1988) Relative increase in Alzheimer's disease of soluble forms of cerebral Abeta amyloid protein precursor containing the Kunitz protease inhibitory domain. *J Biol Chem* **273**, 5013-9.
- [17] Refolo LM, Salton SR, Anderson JP, Mehta P, Robakis NK (1989) Nerve and epidermal growth factors induce the release of the Alzheimer amyloid precursor from PC 12 cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun* **164**, 664-70.
- [18] Van Nostrand WE, Farrow JS, Wagner SL, Bhasin R, Goldgaber D, Cotman CW, Cunningham DD (1991) The predominant form of the amyloid beta-protein precursor in human brain is protease nexin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**,10302-6.
- [19] Van Nostrand WE, Wagner SL, Shankle WR, Farrow JS, Dick M, Rozemuller JM, Kuiper MA, Wolters EC, Zimmerman J, Cotman CW (1992) Decreased levels of soluble amyloid beta-protein precursor in cerebrospinal fluid of live Alzheimer disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 2551-5.
- [20] Lannfelt L, Basun H, Wahlund LO, Rowe BA, Wagner SL (1995) Decreased alpha-secretase-cleaved amyloid precursor protein as a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Nat Med* **1**, 829-32.
- [21] Sennvik K, Fastbom J, Blomberg M, Wahlund LO, Winblad B, Benedikz E (2000) Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* **278**,169-72.
- [22] Rosén C, Andreasson U, Mattsson N, Marcusson J, Minthon L, Andreassen N, Blennow K, Zetterberg H (2012) Cerebrospinal fluid profiles of amyloid beta-related biomarkers in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* **14**, 65-73.
- [23] Hock C, Golombowski S, Müller-Spahn F, Naser W, Beyreuther K, Mönning U, Schenk D, Vigo-Pelfrey C, Bush AM, Moir R, Tanzi RE, Growdon JH, Nitsch RM (1998) Cerebrospinal fluid levels of amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease and major depression - inverse correlation with dementia severity. *Eur Neurol* **39**, 111-8.
- [24] Olsson A, Höglund K, Sjögren M, Andreassen N, Minthon L, Lannfelt L, Buerger K, Möller HJ, Hampel H, Davidsson P, Blennow K (2003) Measurement of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid from Alzheimer patients. *Exp Neurol* **183**, 74-80.
- [25] Zetterberg H, Andreasson U, Hansson O, Wu G, Sankaranarayanan S, Andersson ME, Buchhave P, Londos E, Umek RM, Minthon L, Simon AJ, Blennow K (2008) Elevated cerebrospinal fluid BACE1 activity in incipient Alzheimer disease. *Arch Neurol* **65**, 1102-7.
- [26] Brinkmalm G, Brinkmalm A, Bourgeois P, Persson R, Hansson O, Portelius E, Mercken M, Andreasson U, Parent S, Lipari F, Ohrfelt A, Bjerke M, Minthon L, Zetterberg H, Blennow K, Nutu M (2013) Soluble amyloid precursor protein alpha and beta in CSF in Alzheimer's disease. *Brain Res* **1513**, 117-26.
- [27] Lewczuk P, Popp J, Lelental N, Kölsch H, Maier W, Kornhuber J, Jessen F (2012) Cerebrospinal fluid soluble amyloid-beta protein precursor as a potential novel biomarkers of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **28**, 119-25.
- [28] Pernecky R, Tsolakidou A, Arnold A, Diehl-Schmid J, Grimmer T, Förstl H, Kurz A, Alexopoulos P (2011) CSF soluble amyloid precursor proteins in the diagnosis of incipient Alzheimer disease. *Neurology* **77**, 35-8.
- [29] Taverna M, Straub T, Hampel H, Rujescu D, Lichtenthaler SF (2013) A new sandwich immunoassay for detection of the alpha-secretase cleaved, soluble amyloid-beta protein precursor in cerebrospinal fluid and serum. *J Alzheimers Dis* **37**, 667-8.
- [30] Gabelle A, Roche S, Gény C, Bennys K, Labauge P, Tholance Y, Quadrio I, Tiers L, Gor B, Chaulet C, Vighetto A, Croisile B, Krolak-Salmon P, Touchon J, Perret-Liaudet A, Lehmann S (2010) Correlations between soluble alpha/beta forms of amyloid precursor protein and Abeta38, 40, and 42 in human cerebrospinal fluid. *Brain Res* **1357**, 175-83.

- [31] Savage MJ, Holder DJ, Wu G, Kaplow J, Siuciak JA, Potter WZ; Foundation for National Institutes of Health (FNIH) Biomarkers Consortium CSF Proteomics Project Team for Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2015) Soluble BACE-1 Activity and sA β PP β Concentrations in Alzheimer's Disease and Age-Matched Healthy Control Cerebrospinal Fluid from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative-1 Baseline Cohort. *J Alzheimers Dis* **46**, 431-40.
- [32] Hartl D, Gu W, Mayhaus M, Pichler S, Schöpe J, Wagenpfeil S, Riemenschneider M (2015) Amyloid- β Protein Precursor Cleavage Products in Postmortem Ventricular Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's Disease Patients. *J Alzheimers Dis* **47**, 365-72.
- [33] Andrew RJ, Kellett KA, Thinakaran G, Hooper NM (2016) A Greek Tragedy: the Growing Complexity of Alzheimer Amyloid Precursor Protein Proteolysis. *J Biol Chem* **291**, 19235-44.
- [34] Ghiso J, Tagliavini F, Timmers WF, Frangione B (1989) Alzheimer's disease amyloid precursor protein is present in senile plaques and cerebrospinal fluid: immunohistochemical and biochemical characterization. *Biochem Biophys Res Commun* **163**, 430-37.
- [35] Portelius E, Brinkmalm G, Tran A, Andreasson U, Zetterberg H, Westman-Brinkmalm A, Blennow K, Ohrfelt A (2010) Identification of novel N-terminal fragments of amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid. *Exp Neurol* **223**, 351-8.
- [36] Vella LJ, Cappai R (2012) Identification of a novel amyloid precursor protein processing pathway that generates secreted N-terminal fragments. *FASEB J* **26**, 2930-40.
- [37] Zhang Z, Song M, Liu X, Su Kang S, Duong DM, Seyfried NT, Cao X, Cheng L, Sun YE, Ping Yu S, Jia J, Levey AI, Ye K (2015) Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nat Commun* **6**, 8762.
- [38] Willem M, Tahirovic S, Busche MA, Ovsepian SV, Chafai M, Kootar S, Hornburg D, Evans LD, Moore S, Daria A, Hampel H, Müller V, Giudici C, Nuscher B, Wenninger-Weinzierl A, Kremmer E, Heneka MT, Thal DR, Giedraitis V, Lannfelt L, Müller U, Livesey FJ, Meissner F, Herms J, Konnerth A, Marie H, Haass C (2015) η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature* **526**, 443-7.
- [39] Buxbaum JD, Thinakaran G, Koliatsos V, O'Callahan J, Slunt HH, Price DL, Sisodia SS (1998) Alzheimer amyloid protein precursor in the rat hippocampus: transport and processing through the perforant path. *J Neurosci* **18**, 9629-37.
- [40] Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* **57**, 115-26.
- [41] van Waalwijk van Doorn LJ, Koel-Simmelink MJ, Haußmann U, Klafki H, Struyfs H, Linning P, Knölker HJ, Twaalfhoven H, Kuiperij HB, Engelborghs S, Scheltens P, Verbeek MM, Vanmechelen E, Wiltfang J, Teunissen CE (2016) Validation of soluble amyloid- β precursor protein assays as diagnostic CSF biomarkers for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* **137**, 112-21.
- [42] Padovani A, Pastorino L, Borroni B, Colciaghi F, Rozzini L, Monastero R, Perez J, Pettenati C, Mussi M, Parrinello G, Cottini E, Lenzi GL, Trabucchi M, Cattabeni F, Di Luca M (2001) Amyloid precursor protein in platelets: a peripheral marker for the diagnosis of sporadic AD. *Neurology* **57**, 2243-8.
- [43] Janssen L, Sobott F, De Deyn PP, Van Dam D (2015) Signal loss due to oligomerization in ELISA analysis of amyloid-beta can be recovered by a novel sample pre-treatment method. *MethodsX* **2**, 112-23.

Table 1: Clinical and demographic data, and classic CSF biomarkers.

Group	Age (years)	Gender	CSF Aβ42 (ng/L)	CSF T-tau (ng/L)	CSF P-tau (ng/L)
NC	69 \pm 1	8F/12M	831 \pm 30	251 \pm 14	40 \pm 2
AD	69 \pm 3	15F/5M	424 \pm 12*	762 \pm 69*	100 \pm 8*

Female (F); Male (M). * $p < 0.001$.

Figures

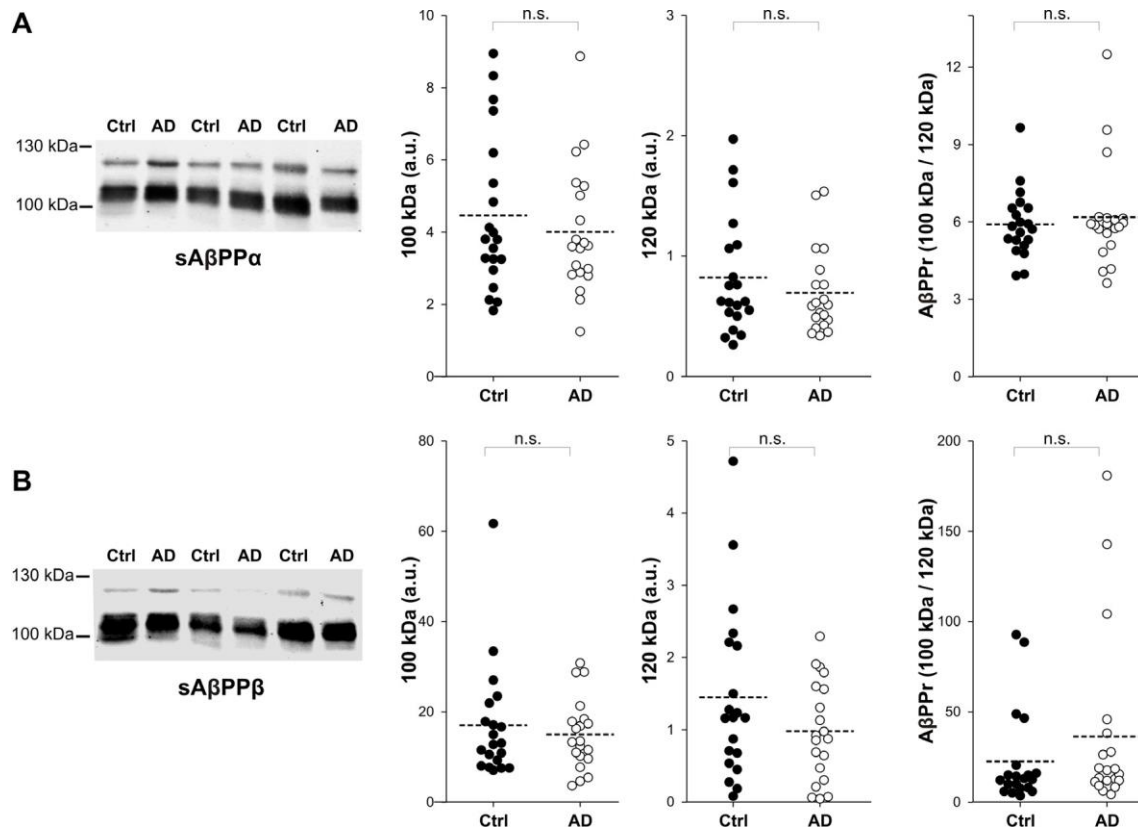


Figure 1. Levels of sAβPPα and sAβPPβ in AD CSF. (A) Representative western blots of human CSF samples from age-matched cognitively normal controls (Ctrl, closed symbol; n=20) and AD patients (open symbol; n= 20) probed with an antibody against (A) sAβPPα (IBL-α) or (B) sAβPPβ (IBL-β). Densitometric quantification of the lower (~100 kDa) and the upper (~120 kDa) AβPP bands is shown, and the ratio derived from the immunoreactivity for the lower band relative to that for the upper band in each sample (AβPPr: 100 kDa/120 kDa). The data represent the means ± SEM (calculations performed in duplicate). n.s.: non-significant *p* value.

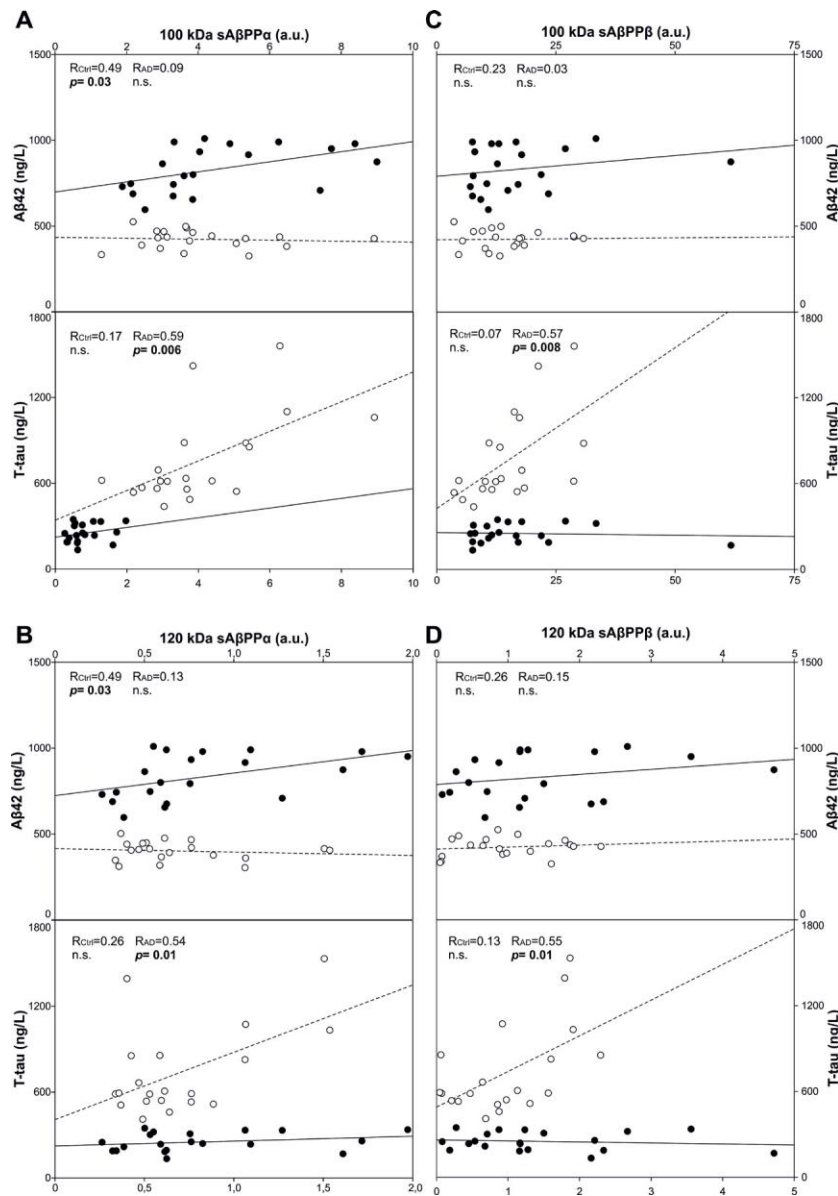


Figure 2. Correlation of sAβPPα and sAβPPβ with Aβ42 and T-tau levels in CSF samples. Levels for the lower (~100 kDa; **A** and **C** panels) and upper band (~120 kDa; **B** and **D** panels) of sAβPPα (**A**, **B**) and sAβPPβ (**C**, **D**) in the samples from age- matched cognitively normal controls (Ctrl: closed symbol, solid lines) and AD patients (open symbol, dotted lines). A linear regression was used to assess the correlation between the Aβ42 and T-tau levels obtained by ELISA (see Table 1). Correlations for P-tau were similar to those displayed for T-tau (not shown). The linear regression coefficient (R) and *p* values for each correlation are shown (n.s.: non-significant *p* value).

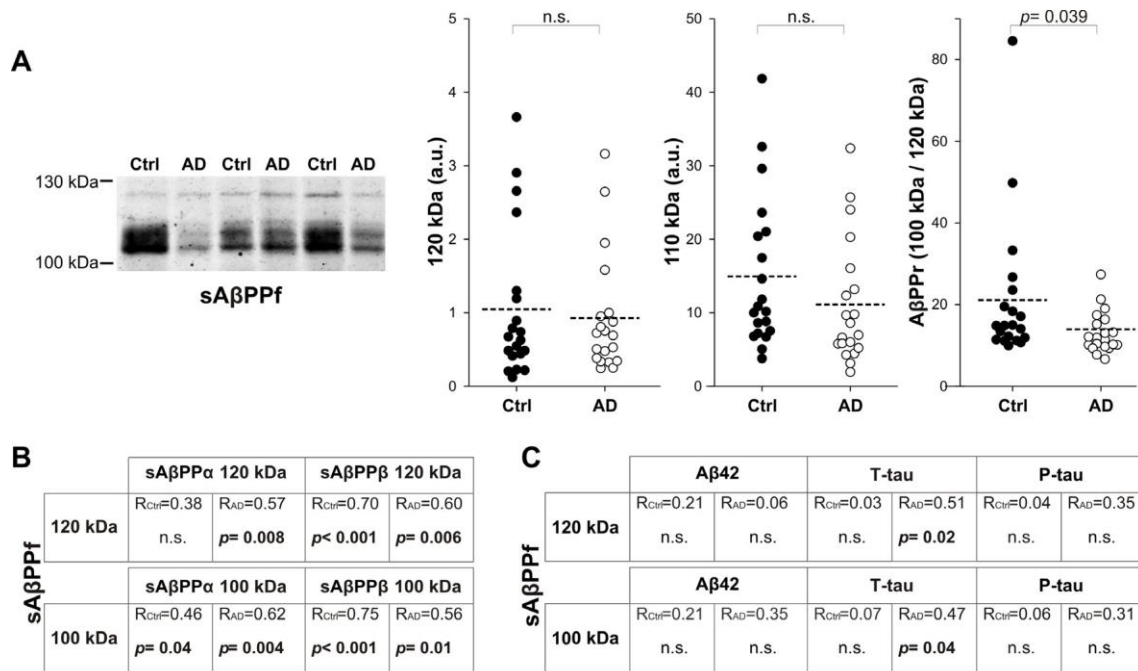


Figure 3. The levels of sAβPPf immunoreactivity in CSF from controls and AD subjects. The sAβPPf immunoreactivity in CSF samples from 20 controls (Ctrl; closed symbol) and 20 AD patients (open symbol). **(A)** Representative blot of sAβPPf probed with an anti-AβPP C-terminal antibody (Sigma-Ct) and densitometric quantification for the ~100 and 120 kDa bands. The AβPPr was calculated as described in Fig. 1. The data represent the means \pm SEM and the p values (performed in duplicate). **(B)** Linear regression coefficient (R) and p values for the correlation of sAβPPf with sAβPPα or sAβPPβ (lower and upper bands). **(C)** Linear regression coefficient (R) and p values (n.s.: non-significant p value) for correlation of sAβPPf lower and upper bands with the classical AD biomarkers Aβ42, T-tau and P-tau.

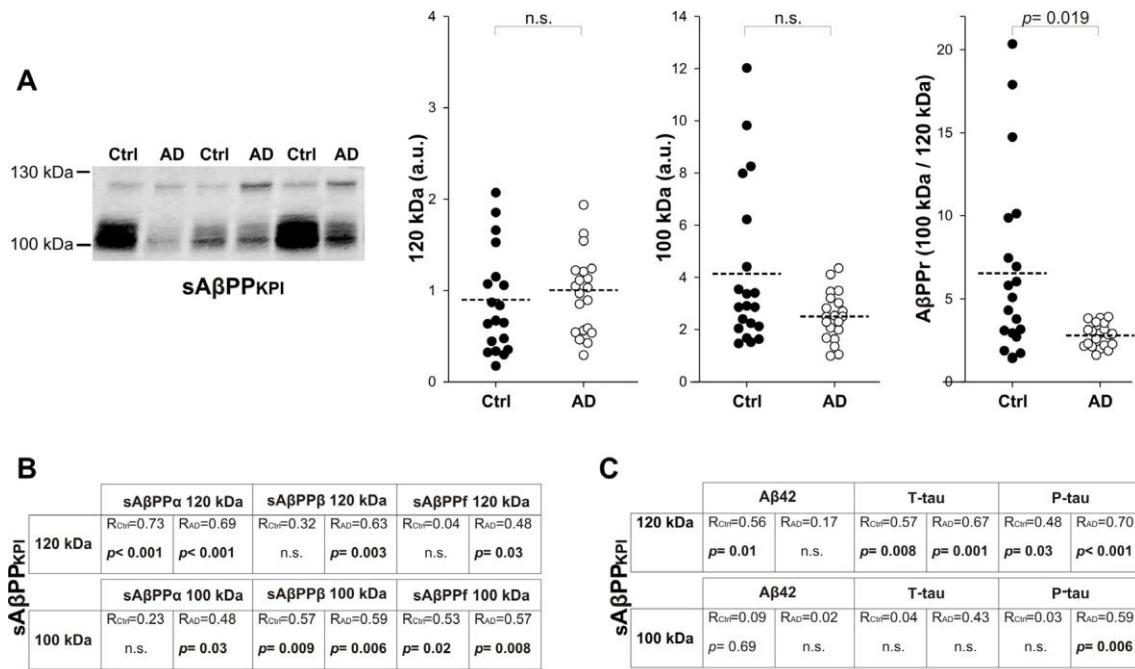
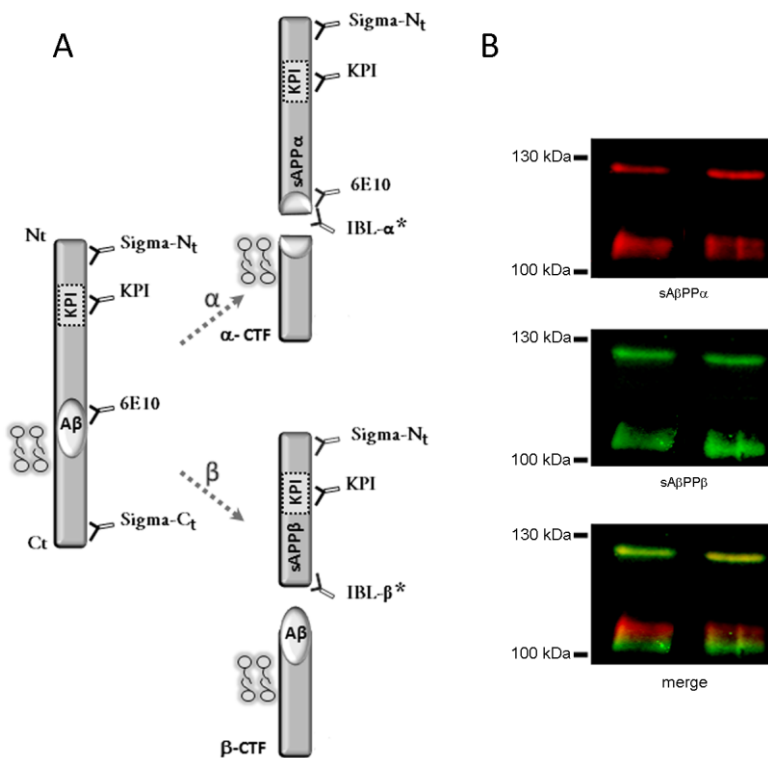
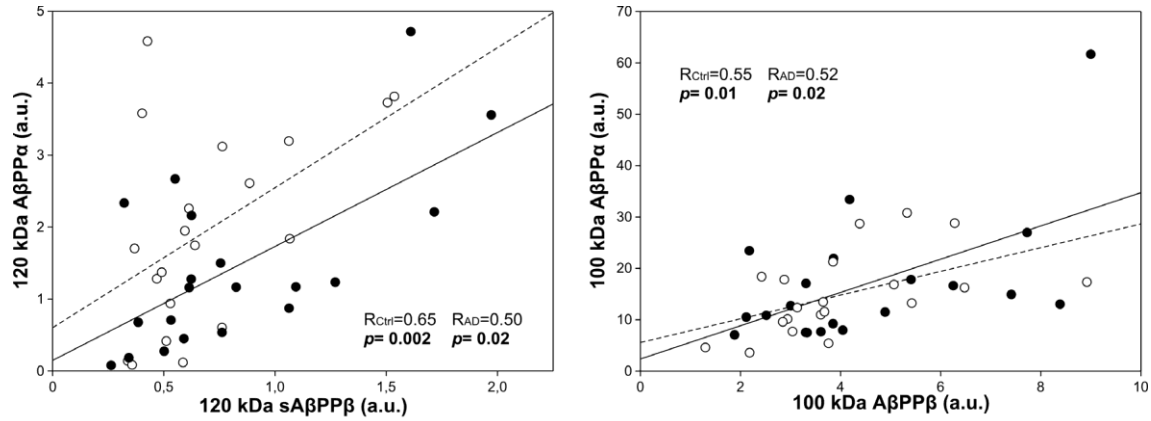


Figure 4. The sAβPP_{KPI} immunoreactivity in CSF from controls and AD subjects.

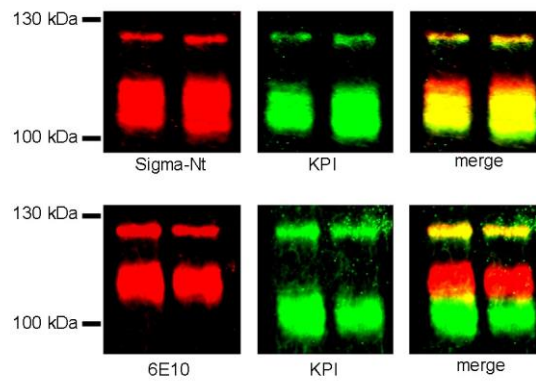
(A) Representative blot and densitometric quantification for the ~100 and 120 kDa sAβPP_{KPI} bands probed with an anti-KPI antibody in 20 controls (Ctrl; closed symbol) and 20 AD patients (open symbol). The AβPP_r was calculated as described in Fig. 1, and the data represent the means \pm SEM and p values (performed in duplicate). (B) Linear regression coefficient (R) and p values for the correlation of sAβPP_{KPI} with sAβPP α , sAβPP β or sAβPP f (lower and upper bands). (C) Linear regression coefficient (R) and p values (n.s.: non-significant p value) for the correlation of sAβPP_{KPI} lower and upper bands with the classical AD biomarkers Aβ42, T-tau and P-tau.



Supplemental Figure 1. Representation of full-length A β PP processing and fluorescence detection of sA β PP α and sA β PP β . (A) Schematic representation of the processing of full-length A β PP by α -secretase (non-amyloidogenic pathway) and β -secretase (amyloidogenic pathway), and the generation of extracellular large sA β PP α and sA β PP β fragments (not drawn to scale). The epitopes for the antibodies used in this study are indicated. The asterisk (*) indicates the pan-specific antibodies exclusive to the C-terminus of sA β PP α (IBL- α) and sA β PP β (IBL- β). (B) Two CSF samples from control subjects were probed for sA β PP α with the IBL- α antibody and for sA β PP β with the IBL- β antibody. Simultaneous fluorescence (merge) demonstrates the specificity of these antibodies and co-localization (yellow) was only evident for the 120 kDa band.



Supplemental Figure 2. Positive correlation between sAβPPα and sAβPPβ in CSF samples. CSF samples from 20 age-matched controls (Ctrl: closed symbol) and 20 AD patients (open symbol) were assayed for sAβPPα and sAβPPβ fragments using pan-specific antibodies (see Fig. 1). A positive correlation between sAβPPα and sAβPPβ levels was found for the lower (~100 kDa) and upper (~120 kDa) AβPP bands in both NC (solid line) and AD subjects (dotted line). Linear regression coefficient (R) and *p* values for each correlation are shown (n.s.: non-significant *p* value).



Supplemental Figure 3. Simultaneous fluorescence with KPI and A β PP for the detection of sA β PP_{KPI}. To detect sA β PP_{KPI}, two CSF samples from control subjects were analyzed by SDS-PAGE and simultaneously probed with two different antibodies: anti-KPI combined with an anti A β PP N-terminal (Sigma-Nt); and anti-KPI combined with the 6E10. The fluorescence of the secondary antibodies (IRDye 800CW goat anti-rabbit, green; IRDye 680RD goat anti-mouse, red) was detected with the Odyssey CLx Infrared Imaging system (LI-COR), with simultaneous fluorescence (merge) demonstrating co-localization (yellow).

Artículo 2: C-terminal fragments of the amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid as potential biomarkers for Alzheimer disease

María-Salud García-Ayllón, Inmaculada Lopez-Font, **Claudia P. Boix**, Juan Fortea, Raquel Sánchez-Valle, Alberto Lleó, José-Luis Molinuevo, Henrik Zetterberg, Kaj Blennow and Javier Sáez-Valero.

Publicado en **Scientific Reports**. 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-02841-7

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

C-terminal fragments of the amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid as potential biomarkers for Alzheimer disease

María-Salud García-Ayllón^{1,2,3}, Inmaculada Lopez-Font^{1,2}, Claudia P. Boix^{1,2}, Juan Fortea^{2,4,5}, Raquel Sánchez-Valle⁶, Alberto Lleó^{2,4}, José-Luis Molinuevo⁶, Henrik Zetterberg^{7,8,9}, Kaj Blennow^{7,8} & Javier Sáez-Valero^{1,2}

This study assesses whether C-terminal fragments (CTF) of the amyloid precursor protein (APP) are present in cerebrospinal fluid (CSF) and their potential as biomarkers for Alzheimer's disease (AD). Immunoprecipitation and simultaneous assay by Western blotting using multiplex fluorescence imaging with specific antibodies against particular domains served to characterize CTFs of APP in human CSF. We demonstrate that APP-CTFs are detectable in human CSF, being the most abundant a 25-kDa fragment, probably resulting from proteolytic processing by η -secretase. The level of the 25-kDa APP-CTF was evaluated in three independent CSF sample sets of patients and controls. The CSF level of this 25-kDa CTF is higher in subjects with autosomal dominant AD linked to *PSEN1* mutations, in demented Down syndrome individuals and in sporadic AD subjects compared to age-matched controls. Our data suggest that APP-CTF could be a potential diagnostic biomarker for AD.

Accumulation of the β -amyloid peptide ($A\beta$) in the brain is an early and specific phenomenon associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD)¹. Many reports support that the determination of $A\beta_{42}$ in cerebrospinal fluid (CSF) is a core biomarker for AD². While the amount of the pathological species of $A\beta$ is increased in the AD brain, their levels in CSF are decreased, probably due to increased brain deposition. To enable monitoring early disturbance in amyloid precursor protein (APP) and $A\beta$ mis-metabolism additional biomarkers are needed.

Other plausible biomarkers for AD are additional fragments resulting from the processing of the amyloid precursor protein (APP). APP is a large type I transmembrane spanning protein consisting of a large N-terminal extracellular domain, a hydrophobic transmembrane domain, and a short intracellular C-terminal domain. APP is usually cleaved by α -secretase (ADAM10; leading to non-amyloidogenic pathway), or by β -secretase (BACE1; leading to amyloidogenic pathway), which causes the secretion of large sAPP α and sAPP β N-terminal fragments (NTFs). CSF levels of sAPP α and sAPP β show no change in AD³. The membrane remaining C-terminal fragments (CTFs) are always processed by γ -secretase generating shortest intracellular domain (AICD) peptides (for a review see Haass *et al.*⁴).

APP can also undergo alternative proteolytic processing pathways (for a review see Andrew *et al.*⁵). Thereby, concerted cleavage of β -secretase and α -secretase result in the secretion of sAPP β and shorter $A\beta$ peptides⁶. The presence in CSF of short NTF derivatives of APP, which generation does not involve α -secretase or BACE, has been also demonstrated⁷. More interestingly in the context of this report, a recently discovered alternative

¹Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC, 03550, Sant Joan d'Alacant, Alicante, España. ²Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Sant Joan d'Alacant, 03550, Alicante, España. ³Unidad de Investigación, Hospital General Universitario de Elche, FISABIO, Elche, Spain. ⁴Memory Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. ⁵Down Medical Center, Fundació Catalana Síndrome de Down, Barcelona, Spain. ⁶Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clinic, 08036, Barcelona, Spain. ⁷Clinical Neurochemistry Laboratory, Sahlgrenska University Hospital, Mölndal, Sweden. ⁸Institute of Neuroscience and Physiology, University of Gothenburg, Mölndal Campus, Sweden. ⁹Department of Molecular Neuroscience, Institute of Neurology, University College London, London, UK. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.S. (email: j.saez@umh.es)

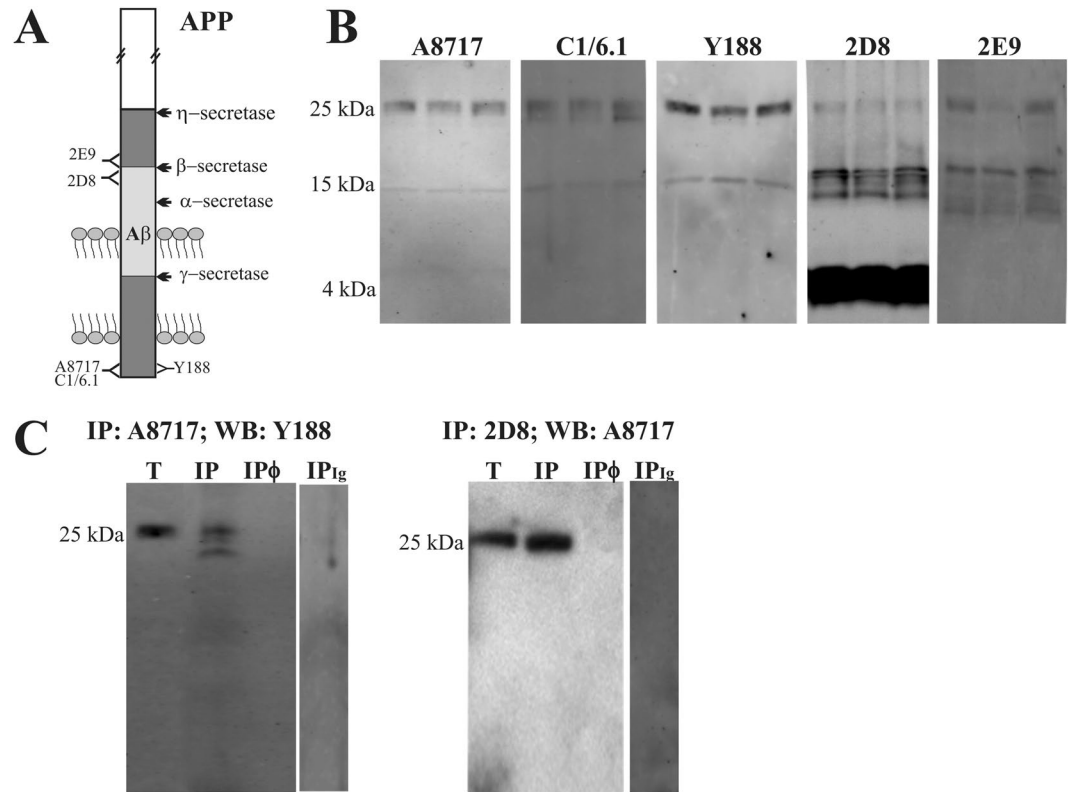


Figure 1. Soluble CTFs of APP are present in human CSF. **(A)** Schematic representation of full-length APP processing by secretases. The epitopes for the antibodies used in this study are indicated. **(B)** Western blotting of three human CSF samples from non-demented controls subjects, resolved with the indicated antibody (samples were the same between different blots). **(C)** CSF aliquots (Total, T) were immunoprecipitated with the indicated antibody, and precipitated proteins (bound fraction, IP) were immunoblotted with the indicated alternative antibody. CSF aliquots incubated with protein A-Sepharose in the absence of capture-antibody (IP ϕ) or with an irrelevant IgG (IP_{Ig}; a rabbit IgG for A8717 IP and a rat IgG for 2D8 IP), were analyzed in parallel as negative controls.

physiological APP processing pathway driven by an asparagine endopeptidase (AEP) named δ -secretase⁸ or by a metalloproteinase named η -secretase⁹ will generate alternative proteolytic metabolites, including NTFs and CTFs, of different molecular mass.

In addition to the different species of A β , all the large extracellular APP-NTFs have been studied in human CSF^{9–11}; but the presence of APP-CTFs in CSF has not been reported to date. In this study we investigated if APP-CTFs are detectable in CSF, characterized the major APP-CTF immunoreactive band, and determined whether the levels of this peptide fragment are altered in autosomal dominant AD (ADAD), Down syndrome subjects with Alzheimer's type dementia (dDS), and sporadic AD subjects (sAD).

Results

APP-CTFs are present in human CSF. To determine the presence of APP-CTFs in human CSF, we first examined human CSF samples by Western blotting using three different anti-CTF antibodies (a schematic representation of APP and epitopes for antibodies is represented in Fig. 1A). This three APP-CTF antibodies demonstrated specificity in assess the accumulation of C-terminal fragments of APP in cells transfected with a construct that encodes the C-terminal 99 amino acids of APP (amino acids 597–695; blots not shown). Immunoblotting revealed a similar pattern of immunoreactive bands, with a predominant band of ~25 kDa (Fig. 1B). This band was also observed with the 2D8 and 2E9 antibodies, both against an extracellular domain close to the transmembrane domain, thus recognizing a η -secretase-generated CTF-APP (CTF η)⁹. 2D8 and 2E9 also detected other soluble fragments around ~15 kDa, termed A η , generated after concerted cleavage by η -secretase and α/β -secretases⁹. 2D8 antibody also detected A β monomers. Multiplex fluorescence imaging with the A8717 and 2E9 antibodies indicated that the major 25 kDa band is compatible with the CTF η ; similar co-labelling was revealed with antibodies C1/6.1 and 2D8 (Supplemental Fig. 1). To further examine the identity of CTF bands in human CSF, we performed immunoprecipitation/Western blot analysis (Fig. 1C). Since in SDS-PAGE the immunoglobulin light chain migrates at similar molecular mass that the APP-CTF 25-kDa band, we used dimethyl pimelimidate dihydrochloride to covalently link primary antibodies to protein A Sepharose, and eluted with 0.1 M glycine buffer at pH 2.5, in order to prevent the co-elution of the antibody along with the target protein¹². CSF samples were immunoprecipitated using the A8717 antibody and blotted with the Y188 antibody, confirming the identity

Group	Age (years)	Gender	CSF A β 42 (pg/mL)	CSF T-tau (pg/mL)	CSF P-tau (pg/mL)
sAD	71 \pm 2 [55–86]	15F/5M	412 \pm 19**	665 \pm 52**	84 \pm 6**
NC	72 \pm 2 [57–88]	6F/14M	739 \pm 32	233 \pm 14	36 \pm 2
ADAD	43 \pm 2 [31–49]	5F/2M	266 \pm 49**	883 \pm 204**	168 \pm 69*
NC	39 \pm 3 [25–47]	5F/2M	809 \pm 94	245 \pm 29	46 \pm 4
dDS	53 \pm 2 [43–57]	4F/3M	422 \pm 17*	767 \pm 170*	108 \pm 19*
NC	48 \pm 2 [47–53]	5F/2M	751 \pm 84*	160 \pm 26	33 \pm 5

Table 1. Clinical, demographic data and classic CSF biomarker levels. The *PSEN1* mutations included in this study from ADAD cases (autosomal dominant AD subjects) corresponded to 3 carriers of L286P, and one S169P, L173F, L235R and L282R. The data represent the means \pm SEM, and for age the range of values is also indicated. All the pathological groups were compared with age-matched NC obtained from the same Hospital. Significantly different ** $p < 0.005$; * $p < 0.05$ from the NC group.

of the 25-kDa band as an APP-CTF. Immunoprecipitating with 2D8 antibody and blotting with A8717 antibody supported the identity of the 25-kDa band as a CTF η .

The 25-kDa APP-CTF is increased in AD CSF. To assess whether APP-CTF levels are altered in AD, we first analyzed CSF samples from autosomal dominant AD (ADAD), an early-onset form of genetically determined AD¹³. Clinical, demographic data and classic CSF biomarker levels are included in Table 1. Genetically determined AD offers unique opportunities to analyze diagnostic biomarkers particularly given that diagnosis is guaranteed. The 25-kDa band was detected with A8717 antibody in all CSF analyzed (Fig. 2A). The immunoreactivity of the 25-kDa APP-CTF band in the CSF from ADAD subjects increased (95 \pm 27%; $p = 0.01$) compared to those in age-matched NC composed by non-mutation carriers from the same families (Fig. 2A). Down syndrome subjects with Alzheimer's type dementia (dDS) can be also considered a form of genetically determined AD¹³. Once more, an increase (68 \pm 18%; $p = 0.01$) in the intensity of the 25-kDa APP-CTF band, resolved with A8717 antibody, was determined in CSF samples from dDS patients, comparing these to age-matched NC (Fig. 2B). Finally, we also have assessed potential differences in the level of the 25-kDa APP-CTF band in sporadic AD subjects (sAD) compared to aged-matched controls (see Table 1). We found that the total immunoreactivity for this band, detected with the A8717 antibody, increased (35 \pm 9%; $p = 0.01$) in sAD compared to age-matched NC subjects (Fig. 2C). CSF samples from sAD subjects also showed a similar increment for the 25-kDa band when they were analyzed with the 2D8 antibody (35 \pm 9%; $p = 0.01$), correlating tightly with the estimation of the levels calculated with the A8717 antibody ($R = 0.73$; $p < 0.001$; Supplemental Fig. 2). There were no clear correlations between the level of the 25-kDa APP-CTF band and the levels of classical biomarkers, A β 42, T-tau or P-tau, in either the control or sAD groups considered individually (Supplemental Fig. 3). Only when control and sAD subjects were pooled, a positive correlation emerged between immunoreactivity levels of the 25-kDa APP-CTF band with T-tau, and with P-tau levels (Supplemental Fig. 3).

Discussion

Here, we demonstrate that APP-CTFs are detectable in human CSF. Particularly, the most abundant soluble APP-CTF, a 25-kDa fragment, is attributed to a CTF recently characterize as the result of proteolytic processing by η -secretase (CTF η)⁹. Canonical APP proteolysis occurs via α - and β -secretases, resulting in CTF α and CTF β with a molecular mass lower than 15 kDa; but novel APP-CTF that migrates \sim 25 kDa has also been described¹⁴. In addition to the described alternative pathways for APP^{7–9}, other cleavages for APP could occur since non-canonical N-terminal APP fragments have been also identified in human CSF¹⁵. The precise characterization of the APP-CTF 25-kDa fragment as a CTF η requires further confirmation. In this regard, the development of pan-specific antibodies against the predicted N-terminus of CTF η could be valuable. Similarly to the reported by others¹⁵, attempts to immunoprecipitate the 25-kDa APP-CTF for sequencing were not fruitful. Since soluble full-length APP protein is also present in CSF, forming heteromers that co-immunoprecipitate with more abundant sAPP β and sAPP α ¹⁶, an enrichment process based in available APP C-terminal antibodies could result of lower efficient and specificity for APP-CTFs. Similar handicap will difficult development of a specific ELISA assay (discussed below).

As an intermediate of proteolytic process, the presence of any APP-CTF in CSF was unexpected. Anyhow, the presence in CSF of soluble forms of full-length membrane proteins containing the transmembrane and intracellular domains is not an unusual finding^{16,17}. Early studies failed to detect short C-terminal fragments of APP in the medium of cultured cells¹⁸; but others suggested the release of largest APP-CTF fragments from cultured neural cells¹⁹. Moreover, a series of APP-CTFs was found to be secreted within exosomes in cultured cells²⁰, as well AICD²¹. The mechanisms by which these membrane-bound proteins reached the CSF are unknown; but neuronal death may be also a major contributing factor. Regarding the cellular source of the soluble 25-kDa APP-CTF found in CSF, the presence of hitherto undocumented APP fragments, including a 25-kDa CTF, has been documented in hippocampal neurons⁹, but also across other multiple cell types, including bovine brain microvascular endothelial cells¹⁵. Since the δ -secretase enzyme AEP is a widely distributed²², we could not discard a non-neural source for the 25-kDa APP-CTF found in CSF. The cellular origin of the 25-kDa APP-CTF could be also relevant in order to define their potential as an AD biomarker.

Different APP C-terminal antibodies confirmed the 25 kDa as the predominant band in human CSF. As stated, these APP proteolytic fragments are derived from a constitutive processing step driven by a η -secretase that is

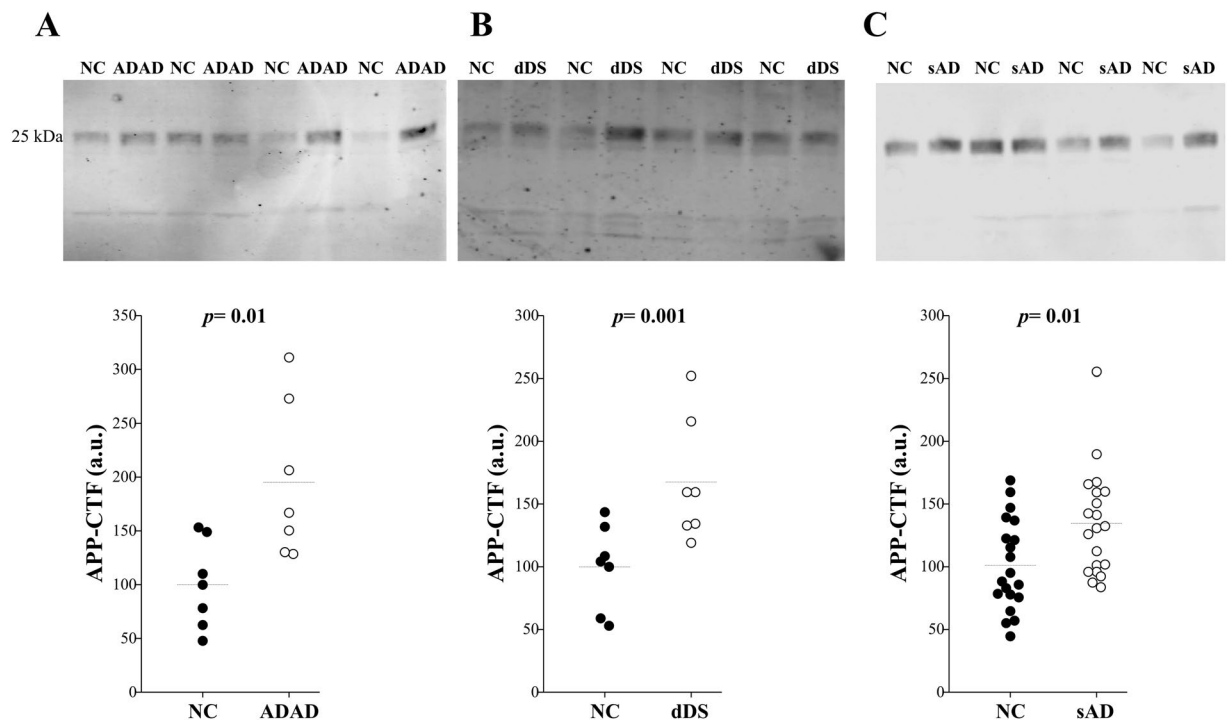


Figure 2. Higher levels of the 25-kDa APP-CTF band in the CSF of AD subjects. (A) Representative blot of the 25-kDa APP-CTF in the CSF samples from 7 symptomatic ADAD and 7 age-matched NC, which were from the same families that ADAD subjects but that did not carry mutations (black symbol; see also Table 1). Densitometric quantification of the immunoreactivity from the 25-kDa band is also shown. (B) Representative blot and densitometric quantification in CSF from 7 DS subjects with dementia of the Alzheimer's type (dDS) and 7 age-matched NC. (C) Representative blot and densitometric quantification of the immunoreactivity from the 25-kDa APP-CTF in CSF samples from 20 sAD and 20 age-matched NC subjects. Immunodetections for (A, B, C) were performed with the A8717 antibody. p values are displayed.

partially in dynamic equilibrium with α - and β -secretase-mediated proteolysis^{9,23,24}. The current canonical views about APP-related cleavage events are likely a partial understanding of the overall process. How secretases compete for the APP substrate and whether subcellular compartmentalization of APP and secretases is responsible of the dynamic equilibrium between secretases is under discussion²⁵. Thus, one may speculate that the particular abundance of the 25-kDa CTF η in CSF is related with compartmentalization of secretases, resulting in prolonged time of residence of these CTF η in comparison with canonical CTF α and CTF β . Anyhow, the other fragments derived of the further processing of CTF η by α - and β -secretases, the A η - α and A η - β fragments, have been also identified in human CSF with levels similar than those for A β ⁹.

Our determination of the 25-kDa APP-CTF levels by Western blotting displayed overlapping values between sAD and controls, whereas superior discrimination was obtained for ADAD and dDS subjects, compared to their respective controls. Interestingly, APP CTF β levels are also elevated in frontal cortex brain homogenates obtained from ADAD patients²⁶. Further studies will indicate if distinct pattern of APP processing in ADAD and sAD affect the generation of different APP-CTFs. Given that this is the first report that address the levels of APP-CTF in CSF, in order to prevent influence of pre-analytical confounding factors, in our study each pathological group was compared with age-matched controls obtained from the same center, with same volume of CSF taken, stored in aliquot of same volume and for similar period of time; and avoiding freeze/thaw cycles. Further studies are required to determine whether limiting pre-analytical confounding factors (discussed in del Campo *et al.*²⁷), have a significant impact on the measured levels of APP-CTF by Western blotting. The possibility that APP-CTF levels varies with age should also be considered and deserve a specific study with a larger number of samples.

In our statistical analysis high levels of the 25-kDa APP-CTF in CSF correlated with increased concentration of T-tau and P-tau, but failed to correlate with A β 42 levels. Increased concentration of T-tau in CSF is believed to reflect neurodegeneration whereas P-tau is supposed to reflect tangle pathology. Otherwise, the overall decrease in A β 42 concentration in the CSF patients is not illustrative of imbalances in the brain APP processing, since in parallel with the increase in the generation of A β 42, there will be an increment in A β aggregation with subsequent deposition. Thus, the positive correlations of the 25-kDa APP-CTF with T-tau and P-tau suggest a correlation with AD pathological process, but it is not possible to interpret links with altered APP processing. Anyhow, the mentioned correlations resulted positive only when all samples were considered, and not in control or sAD groups considered separately. Thus, these correlations obtained by pooling controls and demented subject, could be artefactual, driven by the anchoring effect of the control values. Further analysis with a large number of samples is required.

In term to define the true potential of the 25-kDa APP-CTF as a CSF biomarker, it will be valuable to replicate our present finding using techniques such as ELISA. However, this desirable outcome will be challenging. As advanced above, we have described that the soluble full-length APP, containing the C-terminal domain, also exists in CSF as heteromeric complexes compromising other sAPP species¹⁶, and transmembrane domain, as well intracellular C-terminal domain could participate in APP dimerization (discussed in Isbertet *et al.*²⁸). Indeed, intracellular CTF aggregates have been described with the participation of A β ²⁹ and heparan sulfate degradation products³⁰, suggesting that other APP fragments and other proteolytic sub-products could interact with APP-CTFs. Thus, future studies should develop custom pan-specific antibodies targeting the predicted N-terminal sequence of the APP-CTFs present in CSF, maybe including pretreatment methods designed to disaggregate peptides³¹, for preventing co-precipitation of other APP fragments. Anyhow, even the disadvantages of Western blotting for quantitative analysis, we considered demonstrated that accumulation of APP-CTFs in CSF constitute a potential new biomarker of AD.

In resume, to our knowledge, the possibility that APP-CTFs can be assessed in the CSF has thus far not been considered. In this study, we demonstrate noticeable amounts of APP-CTFs in human CSF. Particularly, a 25-kDa APP-CTF appears increased in genetically determined AD, as well as in sAD. Our present findings provide sufficient evidence to justify further studies on the determination of APP-CTFs as a potential new diagnostic biomarker of AD.

Material and Methods

Patients. Lumbar CSF samples were obtained from autosomal dominant AD (ADAD) subjects that were all carriers of *PSEN1* mutations and who were part of the Genetic Counseling Program for familiar dementia (PICOGEN) at the Hospital Clínic (Barcelona, Spain). This group included 7 subjects carrying *PSEN1* mutations, and 7 age-matched non-mutation carriers from the same families (non-disease controls: NC). We also included lumbar CSF samples from 7 Down syndrome subjects with Alzheimer's type dementia (dDS), along with 7 age-matched NC obtained from the Hospital Sant Pau (Barcelona, Spain). In addition, 20 subjects with sporadic AD (sAD) defined as patients with cognitive symptoms and a CSF biomarker profile indicating AD (high total tau and phosphorylated tau together with low A β ₄₂ levels; see Table 1) and 20 age-matched controls defined as patients with non-specific symptoms without neurochemical evidence of AD were also obtained from the Clinical Neurochemistry Laboratory (Mölndal, Sweden). All AD patients fulfilled the 2011 NIA-AA criteria for dementia³². This study was approved by the ethic committee at the Miguel Hernandez University and it was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients (or their nearest relatives) and controls gave informed consent to participate in the study.

Western blotting and immunoprecipitation. Samples of CSF (30 μ L) were denatured at 98 °C for 5 min and were resolved by electrophoresis on 16.5% Tris-Tricine gels. Following electrophoresis, proteins were blotted onto nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell Bioscience, GmbH, Dassel, Germany). CTFs of APP were detected using the following anti-APP C-terminal antibodies: C1/6.1 (mouse monoclonal; Covance Inc, Princeton, USA), A8717 (rabbit polyclonal; Sigma Aldrich Co, St. Louis, MO), and Y188 (rabbit monoclonal; Abcam, Cambridge, UK), as well as with the rat antibodies 2D8 and 2E9⁹. Multiplex fluorescence with two of the independent antibodies served to assess the specificity of the bands. Blots were then probed with the appropriate conjugated secondary antibodies (IRDye 680RD goat anti-rabbit; IRDye 680RD goat anti-mouse; and IRDye 800CW goat anti-rat from LI-COR Biosciences Lincoln) and imaged on an Odyssey Clx Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences). Band intensities were analyzed using LI-COR software (Image Studio Lite). A control CSF sample was used to normalize the immunoreactive signal between blots.

For immunoprecipitation, samples were precleared for 2 h at 4 °C by incubation with protein A-Sepharose (Sigma Aldrich Co). Immunoprecipitations were performed overnight at 4 °C by incubating 150 μ L of CSF with the indicated anti-APP antibody. The antibody was previously coupled to protein A-Sepharose using dimethyl pimelimidate dihydrochloride (Sigma Aldrich Co). A rabbit IgG and a rat IgG (Vector) were used as control antibodies for immunoprecipitations. Precipitated proteins were washed with PBS and eluted with 0.1 M glycine buffer at pH 2.5. After pH neutralization, supernatants were denatured in Laemmli sample buffer at 98 °C for 5 min and subjected to SDS-PAGE. The membranes were then probed with an alternative anti-APP antibody.

Measurement of T-tau, P-tau and A β ₄₂ by ELISA. Total tau (T-tau), phosphorylated tau (P-tau) and A β _{1–42} (A β ₄₂) concentrations in CSF were measured using INNOTEST ELISA methods (Fujirebio Europe, Gent, Belgium).

Statistical analysis. All data were analyzed using SigmaStat (Version 3.5; Systac Software Inc.) by Student's *t* test (two-tailed) for determination of exact *p* values. Correlation was assessed by linear regression. Results are presented as means \pm SEM.

References

- Scheltens, P. *et al.* Alzheimer's disease. *Lancet* **388**, 505–517 (2016).
- Blennow, K., Mattsson, N., Schöll, M., Hansson, O. & Zetterberg, H. Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* **36**, 297–309 (2015).
- Olsson, B. *et al.* CSF and blood biomarkers for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* **15**, 673–684 (2016).
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G. & Sisodia, S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006270 (2012).
- Andrew, R. J., Kellett, K. A., Thinakaran, G. & Hooper, N. M. A Greek Tragedy: the Growing Complexity of Alzheimer Amyloid Precursor Protein Proteolysis. *J Biol Chem*. **291**, 19235–19244 (2016).
- Portelius, E. *et al.* A novel pathway for amyloid precursor protein processing. *Neurobiol Aging* **32**, 1090–1098 (2011).

7. Portelius, E. *et al.* Identification of novel N-terminal fragments of amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid. *Exp Neurol* **223**, 351–358 (2010).
8. Zhang, Z. *et al.* Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nat Commun* **6**, 8762 (2015).
9. Willem, M. *et al.* η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature* **526**, 443–447 (2015).
10. Palmert, M. R. *et al.* The beta-amyloid protein precursor of Alzheimer disease has soluble derivatives found in human brain and cerebrospinal fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 6338–6342 (1989).
11. Ghiso, J., Tagliavini, F., Timmers, W. F. & Frangione, B. Alzheimer's disease amyloid precursor protein is present in senile plaques and cerebrospinal fluid: immunohistochemical and biochemical characterization. *Biochem Biophys Res Commun* **163**, 430–437 (1989).
12. Moser, J. J., Chan, E. K. & Fritzlter, M. J. Optimization of immunoprecipitation-western blot analysis in detecting GW182-associated components of GW/P bodies. *Nat Protoc* **4**, 674–685 (2009).
13. Dubois, B. *et al.* Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol* **13**, 614–629 (2014).
14. Wang, H. *et al.* Cathepsin L Mediates the Degradation of Novel APP C-Terminal Fragments. *Biochemistry*. **54**, 2806–2816 (2015).
15. Vella, L. J. & Cappai, R. Identification of a novel amyloid precursor protein processing pathway that generates secreted N-terminal fragments. *FASEB J* **26**, 2930–2940 (2012).
16. Cuchillo-Ibañez, I. *et al.* Heteromers of amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid. *Mol Neurodegener* **10**, 2 (2015).
17. García-Ayllón, M. S. *et al.* CSF Presenilin-1 complexes are increased in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* **1**, 46 (2013).
18. Haass, C. *et al.* Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* **359**, 322–325 (1992).
19. Baskin, F., Rosenberg, R. N. & Greenberg, B. D. Increased release of an amyloidogenic C-terminal Alzheimer amyloid precursor protein fragment from stressed PC-12 cells. *J Neurosci Res* **29**, 127–132 (1991).
20. Sharples, R. A. *et al.* Inhibition of gamma-secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes. *FASEB J* **22**, 1469–1478 (2008).
21. Vingtxdeux, V. *et al.* Alkalinizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. *J Biol Chem* **282**, 18197–18205 (2007).
22. Chen, J. M., Dando, P. M., Stevens, R. A., Fortunato, M. & Barrett, A. J. Cloning and expression of mouse legumain, a lysosomal endopeptidase. *Biochem J* **335**, 111–117 (1998).
23. Haass, C., Koo, E. H., Mellon, A., Hung, A. Y. & Selkoe, D. J. Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* **357**, 500–503 (1992).
24. Lauritzen, I. *et al.* Intraneuronal aggregation of the β -CTF fragment of APP (C99) induces A β -independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathol* **132**, 257–276 (2016).
25. Gandhi, S., Refolo, L. M. & Sambamurti, K. Amyloid precursor protein compartmentalization restricts beta-amyloid production: therapeutic targets based on BACE compartmentalization. *J Mol Neurosci* **24**, 137–143 (2004).
26. Pera, M. *et al.* Distinct patterns of APP processing in the CNS in autosomal-dominant and sporadic Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* **125**, 201–213 (2013).
27. del Campo, M. *et al.* Recommendations to standardize preanalytical confounding factors in Alzheimer's and Parkinson's disease cerebrospinal fluid biomarkers: an update. *Biomark Med* **6**, 419–430 (2012).
28. Isbert, S. *et al.* APP dimer formation is initiated in the endoplasmic reticulum and differs between APP isoforms. *Cell Mol Life Sci* **69**, 1353–1375 (2012).
29. Woltjer, R. L. *et al.* Role of glutathione in intracellular amyloid-alpha precursor protein/carboxy-terminal fragment aggregation and associated cytotoxicity. *J Neurochem* **93**, 1047–1056 (2005).
30. Cheng, F. *et al.* Suppression of amyloid beta A11 antibody immunoreactivity by vitamin C: possible role of heparan sulfate oligosaccharides derived from glypican-1 by ascorbate-induced, nitric oxide (NO)-catalyzed degradation. *J Biol Chem* **286**, 27559–27572 (2011).
31. Janssen, L., Sobott, F., De Deyn, P. P. & Van Dam, D. Signal loss due to oligomerization in ELISA analysis of amyloid-beta can be recovered by a novel sample pre-treatment method. *MethodsX* **2**, 112–123 (2015).
32. McKhann, G. M. *et al.* The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **7**, 263–269 (2011).

Acknowledgements

We thank Drs C. Haass and M. Willem (Biomedical Center, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich, Germany) for the generous gift of the 2D8 and 2E9 antibodies. This study was funded in part by the EU BIOMARKAPD-Joint Programming on Neurodegenerative Diseases (JPND) project, by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII grants PI11/03026 and PI15/00665 to JSV, PI11/02425 and PI14/01126 to JF, PI11/03035 and PI14/1561 to AL, PI08/0036 and PI12/00013 to RSV, and PI11/03023 to JLM), co-financed by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional, under the aegis of JPND, and through CIBERNED, ISCIII. This work was also supported by the Fundació Catalana de Síndrome de Down, by a “Marató TV3” grant (20141210) and a grant from the Griffols Foundation, Spain (to JF); and the Torsten Söderberg Foundation, Sweden (to KB). JSV also acknowledges financial support from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, through the “Severo Ochoa” Programme for Centres of Excellence in R&D (SEV- 2013-0317).

Author Contributions

J.S.V., M.S.G.A., A.L., K.B., H.Z. and J.L.M. were involved with the conception, design, and interpretation of data. M.S.G.A., I.L.F. and C.P.B. performed the experiments. J.S.V., I.L.F. and M.S.G.A. were involved with data analysis. K.B., H.Z., J.L.M., A.L., R.S.V. and J.F. collected the clinical material. J.S.V., J.L.M., A.L., R.S.V., K.B. and J.F. provided general overall supervision of the study, and acquired funding. All authors contributed to the drafting and critical revision of the manuscript and have given final approval of the version to be published.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-02841-7

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



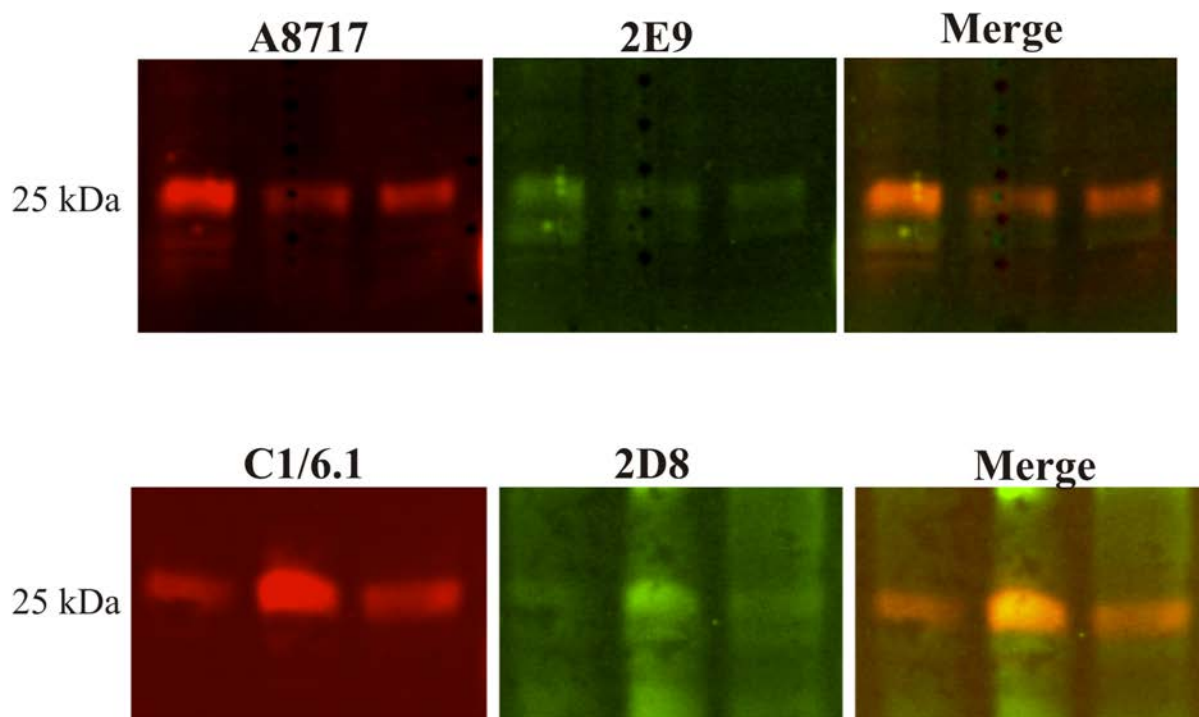
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

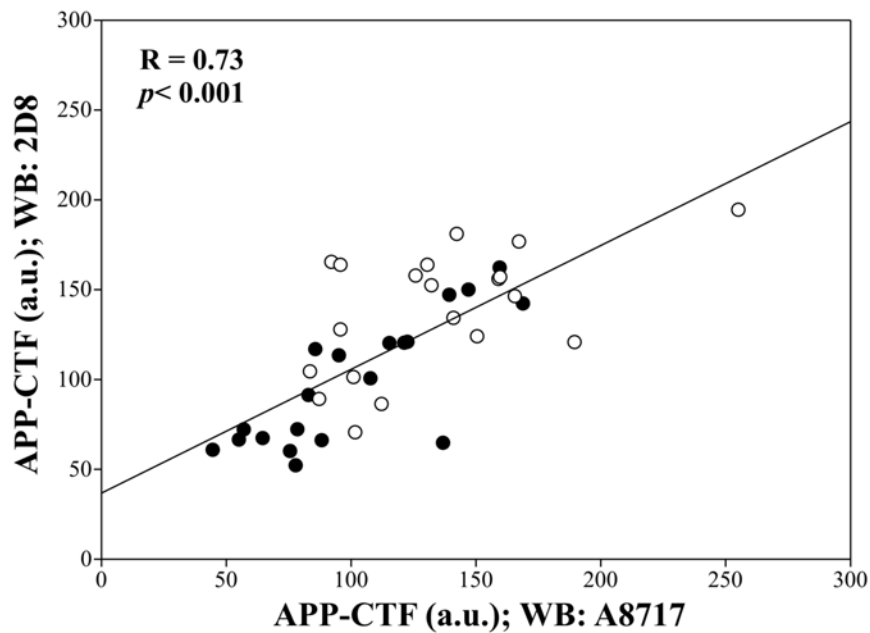
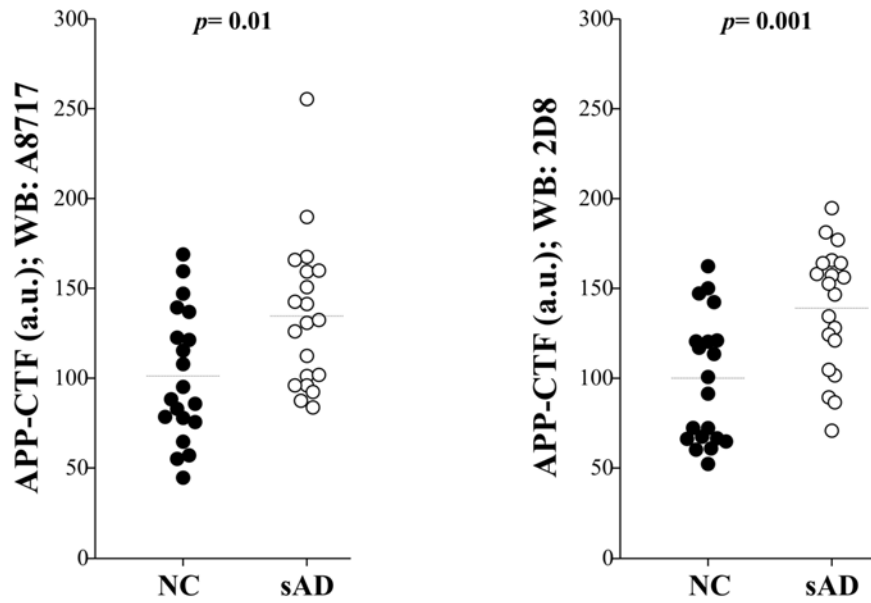
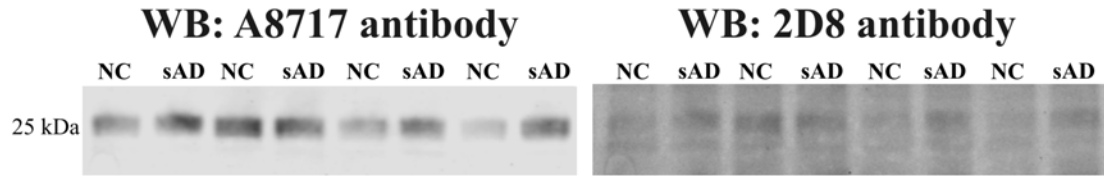
Supplementary Figures

C-terminal fragments of the amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid as potential biomarkers for Alzheimer disease.

María-Salud García-Ayllón^{1,2,3}; Inmaculada Lopez-Font^{1,2}; Claudia P. Boix^{1,2}; Juan Fortea^{2,4,5}; Raquel Sánchez-Valle⁶; Alberto Lleó^{2,4}; José-Luis Molinuevo⁶; Henrik Zetterberg^{7,8,9}; Kaj Blennow^{7,8}; Javier Sáez-Valero^{1,2,*}.

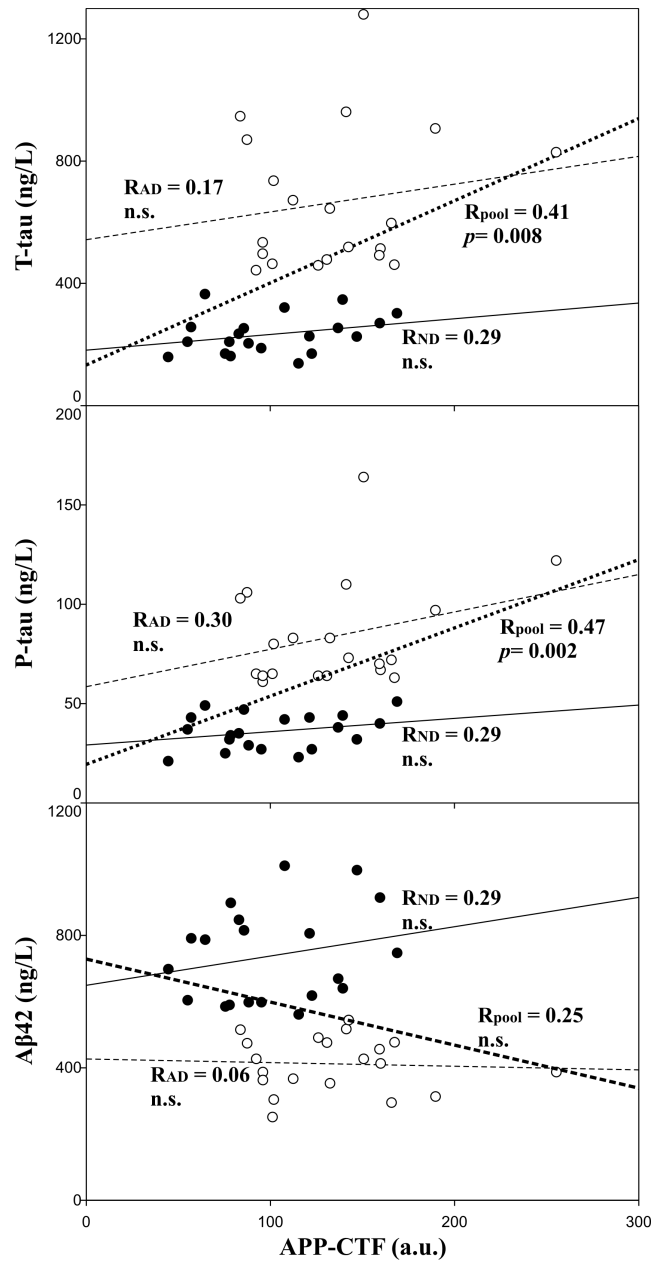


Supplemental Figure 1. SDS-PAGE analysis and fluorescence detection of soluble CTFs of APP in human CSF. To probe that the 25-kDa specie resolved with different antibodies is the same, three aliquots of CSF were analyzed by SDS-PAGE and resolved with (A) A8717 and 2E9 antibodies, or (B) C1/6.1 and 2D8 antibodies, simultaneously. The fluorescence of the secondary antibodies was detected with the Odyssey CLx Infrared Imaging system (LI-COR).



Supplemental Figure 2. Corroboration of the increase in the 25-kDa APP-CTF in the CSF of sAD subjects. Representative blot and densitometric quantification

of the 25-kDa APP-CTF in the CSF samples from 20 probable sAD 20 age-matched NC subjects blotted with the A8717 antibody (same data that in Fig. 2) and with the 2D8 antibody. A positive correlation was obtained when immunoreactive levels estimated with both antibodies from the same subjects were confronted. Regression linear coefficient (R) and *p* values are displayed.



Supplemental Figure 3. Correlation of the 25-kDa APP-CTF with Aβ42, T-tau and P-tau levels in CSF samples. A linear regression was used to assess the correlation between the immunoreactivity level of the 25-kDa APP-CTF (Fig. 2) and Aβ42, T-tau and P-tau levels obtained by ELISA (see Table 1), in the samples from age-matched cognitively normal controls (NC: closed symbol, solid lines) and sAD patients (open symbol, dotted lines). The linear regressions resulted by pooling NC and sAD samples are also showed (thickened lines). The linear regression coefficient (R) and *p* values for each correlation are shown (n.s.: non-significant *p* value).

VIII. Anexos

Anexo A. Escala de deterioro global (GDS-FAST)

Estadio	Fase clínica	Características FAST	Comentarios
GDS 1. Ausencia de déficit cognitivo.	Normal. MEC: 30-35	Ausencia de déficits funcionales objetivos o subjetivos.	No hay deterioro cognitivo subjetivo ni objetivo.
GDS 2. Déficit cognitivo muy leve.	Normal para su edad. Olvido MEC: 25-30	Déficit funcional subjetivo.	Quejas de pérdida de memoria de objetos, nombres de personas, citas, etc. No se objetiva déficit en el examen clínico ni en su medio laboral o situaciones sociales. Hay pleno conocimiento y valoración de la sintomatología.
GDS 3. Déficit cognitivo leve.	Deterioro límite. MEC: 20-27	Déficit en tareas ocupacionales y sociales complejas y que generalmente lo observan familiares y amigos.	Primeros defectos claros. Manifestación en una o más de estas áreas: <ul style="list-style-type: none"> - Haberse perdido en un lugar no familiar - Evidencia de rendimiento laboral pobre - Dificultad para recordar palabras y nombres - Tras la lectura retiene escaso material - Olvida la ubicación, pierde o coloca erróneamente objetos de valor - Escasa capacidad para recordar a personas nuevas que ha conocido El déficit de concentración es evidente para el clínico en una entrevista exhaustiva. La negación como mecanismo de defensa, o el desconocimiento de los defectos, empieza a manifestarse.
GDS 4. Déficit cognitivo moderado.	Enfermedad de Alzheimer leve. MEC: 16-23	Déficits observables en tareas complejas como el control de los aspectos económicos personales o planificación de comidas cuando hay invitados.	Defectos manifiestos en: <ul style="list-style-type: none"> - Olvido de hechos cotidianos o recientes - Déficit en el recuerdo de su historia personal - Dificultad de concentración evidente en operaciones de resta de 7 en 7 - Incapacidad para planificar viajes, finanzas o actividades complejas Frecuentemente no hay defectos en: <ul style="list-style-type: none"> - Orientación en tiempo y persona - Reconocimiento de caras y personas familiares - Capacidad de viajar a lugares conocidos Labilidad afectiva. Mecanismo de negación domina el cuadro.

GDS 5. Déficit cognitivo moderadamente grave.	Enfermedad de Alzheimer moderada. MEC: 10-19	Decremento de la habilidad en escoger la ropa adecuada en cada estación del año o según las ocasiones.	Necesita asistencia en determinadas tareas, no en el aseo ni en la comida, pero sí para elegir su ropa. Es incapaz de recordar aspectos importantes de su vida cotidiana (dirección, teléfono, nombres de familiares). Es frecuente cierta desorientación en tiempo o en lugar. Dificultad para contar en orden inverso desde 40 de 4 en 4, o desde 20 de 2 en 2. Sabe su nombre y generalmente el de su esposa e hijos.
GDS 6. Déficit cognitivo grave.	Enfermedad de Alzheimer moderadamente grave. MEC: 0-12	Decremento en la habilidad para vestirse, bañarse y lavarse; específicamente, pueden identificarse 5 subestadios siguiente: a) Disminución de la habilidad de vestirse solo b) Disminución de la habilidad para bañarse solo c) Disminución de la habilidad para lavarse y arreglarse solo d) Disminución de la continencia urinaria e) Disminución de la continencia fecal	Olvida a veces el nombre de su esposa de quien depende para vivir. Retiene algunos datos del pasado. Desorientación temporo espacial. Dificultad para contar de 10 en 10 en orden inverso o directo. Puede necesitar asistencia para actividades de la vida diaria. Puede presentar incontinencia. Recuerda su nombre y diferencia los familiares de los desconocidos. Ritmo diurno frecuentemente alterado. Presenta cambios de la personalidad y la afectividad (delirio, síntomas obsesivos, ansiedad, agitación o agresividad y abulia cognoscitiva)
GDS 7. Déficit cognitivo muy grave	Enfermedad de Alzheimer grave. MEC: 0	Pérdida del habla y la capacidad motora. Se especifican 6 subestadios: a) Capacidad de habla limitada aproximadamente a 6 palabras b) Capacidad de habla limitada a una única palabra c) Pérdida de la capacidad para caminar solo sin ayuda d) Pérdida de la capacidad para sentarse y levantarse sin ayuda e) Pérdida de la capacidad para sonreír f) Pérdida de la capacidad para mantener la cabeza erguida	Pérdida progresiva de todas las capacidades verbales. Incontinencia urinaria. Necesidad de asistencia a la higiene personal y alimentación. Pérdida de funciones psicomotoras como la deambulaci3n. Con frecuencia se observan signos neurol3gicos.

Tabla A. Escala de deterioro global (GDS-FAST).
--

Anexo B. Genes/loci asociados a la AD

	Cromosoma	Región	Gen/locus	Frecuencia	Efecto	Referencia
Genes autosómicos dominantes	1	1q42.13	<i>PSEN2</i>	Raro	Peligroso	[317]
	14	14q24.2	<i>PSENI</i>	Raro	Peligroso	[317]
	21	21q21.3	<i>APP</i>	Raro	Peligroso	[317]
Genees susceptibles a LOAD	4	4q23	<i>UNC5C</i>	Raro	Peligroso	[318]
	6	6p21-1	<i>TREM2</i>	Raro	Peligroso	[319][320]
	7	7q21.2	<i>AKAP9¹</i>	Raro	Peligroso	[321]
	7	7q	<i>AC099552.4*</i>	Raro	Peligroso	[320]
	15	15q21.3	<i>ADAM10</i>	Raro/común	Peligroso/protector	[322][323]
	15	15q26.3	<i>TM2D3</i>	Raro	Peligroso	[324]
	16	16q24.1	<i>PLCG2</i>	Raro	Protector	[325]
	17	17q21.32	<i>ABI3</i>	Raro	Peligroso	[325]
	19	19q13.32	<i>APOE</i>	Común	Peligroso/protector	[322][326][327][328]
	19	19q13.2	<i>PLD3</i>	Raro	Peligroso	[329]
	21	21q21.3	<i>APP</i>	Raro	Protector	[330]
Loci susceptible a LOAD	1	1q32.2	<i>CR1</i>	Común	Peligroso	[322][326]
	2	2q37.1	<i>INPP5D/SHIP1</i>	Común	Peligroso	[322][326]
	5	5q31.3	<i>HBEGF/PFDN1^{2,3}</i>	Común	Peligroso	[331][332]
	5	5q14.3	<i>MEF2C/TMEM161B</i>	Común	Protector	[326]
	6	6p12.3	<i>CD2AP/ADGRF2</i>	Común	Peligroso	[322][326][327][328]
	6	6p21.32	<i>HLA-DRB1/HLA-DQB1</i>	Común	Peligroso	[322][326]
	7	7p12.1	<i>COBL¹</i>	Raro	Protector	[333]
	7	7p14.1	<i>NME8/EPDR1</i>	Común	Protector	[326]
	7	7q22.1	<i>NYAP1/PILRA/STAG3</i>	Común	Protector	[320][322][326]
	7	7q34-q35	<i>EPHA1/TAS2R60</i>	Común	Protector	[322][326]
	8	8p21.2	<i>PTK2B</i>	Común	Peligroso	[322][326]
	8	8p21.2	<i>CLU/APOJ</i>	Común/raro	Peligroso/protector	[322][326]

Loci susceptible a LOAD	10	10p14	<i>ECHDC3/USP6NL</i> ^{2,3}	Común	Peligroso	[322][331][332]
	11	11p11.2	<i>SPII/CELF1</i>	Común	Peligroso/protector	[322][326]
	11	11q12.1	<i>MS4A2/MS4A6A</i>	Común	Protector	[322][326][327][328]
	11	11q14.2	<i>PICALM</i>	Común	Protector	[322][326]
	11	11q24.1	<i>SORL1</i>	Común/raro	Peligroso/protector	[322][326]
	13	13q33.1	<i>SLC10A2/METTL21EP</i> ¹	Raro	Protector	[333]
	14	14q22.1	<i>FERMT2</i>	Común	Peligroso	[322][326]
	14	14q32.12	<i>SLC24A4/RIN3</i>	Común	Protector	[322][326]
	15	15q21.2	<i>SPPL2A/TRPM7</i> ³	Común	Protector	[332]
	15	15q22.31	<i>TRIP4</i>	Raro	Peligroso	[334]
	16	16p12.3	<i>IQCK/DEF8</i>	Común	Protector	[322]
	17	17p13.2	<i>SCIPM/ZNF594/USP6</i> ³	Común	Protector	[332]
	17	17q21.31	<i>KANSL1/MAPT</i> ⁴	Común	Protector	[335]
	17	17q22	<i>TSPOAP1/BZRAP1-ASI</i> ²	Común	Protector	[331]
	17	17q23.3	<i>ACE</i>	Raro	Peligroso	[322]
	18	18q12.1	<i>DSG2/DSG3</i>	Común	Protector	[326]
	19	19p13.3	<i>ABCA7</i>	Raro/común	Peligroso	[320][322][326][328]
	19	19p13.3	<i>NFIC</i> ^{2,5}	Común	Protector	[331]
	19	19q13.41	<i>CD33/SIGLECLI</i>	Común	Protector	[326][327][328]
	20	20q13.31	<i>CASS4/GSTF1</i>	Común	Protector	[322][326]
21	21q21.3	<i>ADAMTS1/ADAMTS5</i>	Común	Protector	[322]	

Tabla B. Genes/loci asociados a AD. *ARN no codificado, ¹único en raza negra africana, ²GWAS transétnico, ³GWAS por proxy (GWAX), ⁴GWAS entre los no-*APOE4*, ⁵interacción con *APOE4*. Modificado de [98]

IX. Bibliografía

- [1] Nobel Foundation (s.f.). The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1906. *The Nobel Prize*. Disponible en <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1906/summary/>. Consultado el 5 de junio de 2019.
- [2] La paciente Auguste Deter. (s.f.). [Figura]. Disponible en https://es.wikipedia.org/wiki/Alois_Alzheimer. Consultado el 10 de noviembre de 2019.
- [3] Alzheimer, A. (1987). *About a peculiar disease of the cerebral cortex*. (L. Jarvik y H. Greenson, trad.). *Alzheimer Dis Assoc Disord* (1):3-8. (Obra original publicada en 1907).
- [4] Berchtold, N. C., & Cotman, C. W. (1998). Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiology of aging*, 19(3), 173-189.
- [5] Vallespín, G. T. (2015). Enfermedades neurodegenerativas. *Actualización en Medicina de Familia*, 11 (7), 374-383.
- [6] Martínez-Lage, P., Martín-Carrasco, M., Arrieta, E., Rodrigo, J., & Formiga, F. (2018). Mapa de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias en España. Proyecto MapEA. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 53(1), 26-37.
- [7] Organización Mundial de la Salud (s.f.). Demencia. *World Health Organization*. Disponible en <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>. Consultado el 7 de junio de 2019.
- [8] Rojas, G., de Guevara, D. L., Jaimovich, R., Brunetti, E., Faure, E., & Gálvez, M. (2016). Neuroimágenes en demencias. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 27(3), 338-356.
- [9] Alzheimer's Association. (2018). 2018 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 14(3), 367-429.
- [10] Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet*, 368(9533), 387-403.
- [11] Niu, H., Álvarez-Álvarez, I., Guillén-Grima, F., & Aguinaga-Ontoso, I. (2017). Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis. *Neurología*, 32(8), 523-532.
- [12] Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., & Arrighi, H. M. (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia*, 3(3), 186-191.
- [13] Bernhardt, M. (2005). Envejecimiento: cambios bioquímicos y funcionales del sistema nervioso central. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 43(4), 297-304.
- [14] Muñoz-Collado, S. (s.f.). Las demencias corticales: Alzheimer, Pick, cuerpos de Lewy y atrofas lobares. *Psicoactiva*. Disponible en <https://www.psicoactiva.com/blog/las-demencias-corticales-enfermedad-alzheimer-pick-atrofas-lobares-cuerpos-lewy/>. Consultado el 15 de mayo de 2019.
- [15] Zetterberg, H., Blennow, K., & Hanse, E. (2010). Amyloid β and APP as biomarkers for Alzheimer's disease. *Experimental gerontology*, 45(1), 23-29.
- [16] Thal, D. R., Ghebremedhin, E., Orantes, M., & Wiestler, O. D. (2003). Vascular pathology in Alzheimer disease: correlation of cerebral amyloid angiopathy and arteriosclerosis/lipohyalinosis with cognitive decline. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 62(12), 1287-1301.

- [17] Hansen, L. A., Masliah, E., Galasko, D., & Terry, R. D. (1993). Plaque-only Alzheimer disease is usually the Lewy body variant, and vice versa. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 52(6), 648-654.
- [18] Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., ... & Finch, C. E. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 21(3), 383-421.
- [19] Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *science*, 297(5580), 353-356.
- [20] Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., ... & Selkoe, D. J. (1992). Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359(6393), 322.
- [21] Näslund, J., Schierhorn, A., Hellman, U., Lannfelt, L., Roses, A. D., Tjernberg, L. O., ... & Greengard, P. (1994). Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(18), 8378-8382.
- [22] Younkin, S. G. (1995). Evidence that A β 42 is the real culprit in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 37(3), 287-288.
- [23] Rábano, A., Jiménez-Huete, A., Acevedo, B., Calero, M., Ghiso, J., Valdés, I., ... & Méndez, E. (2005). Diversity of senile plaques in Alzheimer's disease as revealed by a new monoclonal antibody that recognizes an internal sequence of the A β peptide. *Current Alzheimer Research*, 2(4), 409-417.
- [24] Scholz, T., & Mandelkow, E. (2014). Transport and diffusion of Tau protein in neurons. *Cellular and molecular life sciences*, 71(16), 3139-3150.
- [25] Sokolow, S., Henkins, K. M., Bilousova, T., Gonzalez, B., Vinters, H. V., Miller, C. A., ... & Gyllys, K. H. (2015). Pre-synaptic C-terminal truncated tau is released from cortical synapses in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 133(3), 368-379.
- [26] Lv, Z. Y., Tan, C. C., Yu, J. T., & Tan, L. (2017). Spreading of pathology in Alzheimer's disease. *Neurotoxicity research*, 32(4), 707-722.
- [27] Arendt, T., Stieler, J. T., & Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain research bulletin*, 126, 238-292.
- [28] Spires-Jones, T. L., Stoothoff, W. H., de Calignon, A., Jones, P. B., & Hyman, B. T. (2009). Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue. *Trends in neurosciences*, 32(3), 150-159.
- [29] Wang, W., Moerman-Herzog, A. M., Slaton, A., & Barger, S. W. (2017). Presenilin 1 mutations influence processing and trafficking of the ApoE receptor apoER2. *Neurobiology of aging*, 49, 145-153.
- [30] Iqbal, K., Alonso, A. D. C., Chen, S., Chohan, M. O., El-Akkad, E., Gong, C. X., ... & Tanimukai, H. (2005). Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1739(2-3), 198-210.
- [31] Bloom, G. S. (2014). Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA neurology*, 71(4), 505-508.

- [32] Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2009). Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nature reviews Drug discovery*, 8(10), 783.
- [33] Glenner, G. G., & Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 120(3), 885-890.
- [34] Yuksel, M., & Tacal, O. (2019). Trafficking and proteolytic processing of amyloid precursor protein and secretases in Alzheimer's disease development: An up-to-date review. *European journal of pharmacology*, 172415.
- [35] Sandbrink, R., Masters, C. L., & Beyreuther, K. (1994). Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 269(2), 1510-1517.
- [36] Golde, T. E., Estus, S., Usiak, M., Younkin, L. H., & Younkin, S. G. (1990). Expression of β amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron*, 4(2), 253-267.
- [37] Tang, K., Wang, C., Shen, C., Sheng, S., Ravid, R., & Jing, N. (2003). Identification of a novel alternative splicing isoform of human amyloid precursor protein gene, APP639. *European Journal of Neuroscience*, 18(1), 102-108.
- [38] Beyreuther, K., Pollwein, P., Multhaup, G., Mönning, U., König, G., Dyrks, T., ... & Masters, C. L. (1993). Regulation and Expression of the Alzheimer's β /A4 Amyloid Protein Precursor in Health, Disease, and Down's Syndrome a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 695(1), 91-102.
- [39] Greenfield, J. P., Tsai, J., Gouras, G. K., Hai, B., Thinakaran, G., Checler, F., ... & Xu, H. (1999). Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer β -amyloid peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(2), 742-747.
- [40] Agostinho, P., Pliassova, A., Oliveira, C. R., & Cunha, R. A. (2015). Localization and trafficking of amyloid- β protein precursor and secretases: Impact on Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 45(2), 329-347.
- [41] Jiang, S., Li, Y., Zhang, X., Bu, G., Xu, H., & Zhang, Y. W. (2014). Trafficking regulation of proteins in Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*, 9(1), 6.
- [42] Jacobsen, K. T., & Iverfeldt, K. (2011). O-GlcNAcylation increases non-amyloidogenic processing of the amyloid- β precursor protein (APP). *Biochemical and biophysical research communications*, 404(3), 882-886.
- [43] Jean-Louis, T., Rockwell, P., & Figueiredo-Pereira, M. E. (2018). Prostaglandin J2 promotes O-GlcNAcylation raising APP processing by α - and β -secretases: relevance to Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 62, 130-145.
- [44] Nakamura, N., & Kurosaka, A. (2019). Mucin-type glycosylation as a regulatory factor of amyloid precursor protein processing. *The Journal of Biochemistry*, 165(3), 205-208.
- [45] Kerr, M. L., & Small, D. H. (2005). Cytoplasmic domain of the β -amyloid protein precursor of Alzheimer's disease: Function, regulation of proteolysis, and implications for drug development. *Journal of neuroscience research*, 80(2), 151-159.

- [46] Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., & Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(5), a006270.
- [47] Caporaso, G. L., Takei, K., Gandy, S. E., Matteoli, M., Mundigl, O., Greengard, P., & De Camilli, P. (1994). Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *Journal of Neuroscience*, 14(5), 3122-3138.
- [48] Nordstedt, C., Caporaso, G. L., Thyberg, J., Gandy, S. E., & Greengard, P. (1993). Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 268(1), 608-612.
- [49] Vassar, R., Kovacs, D. M., Yan, R., & Wong, P. C. (2009). The β -secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *Journal of Neuroscience*, 29(41), 12787-12794.
- [50] Olsson, F., Schmidt, S., Althoff, V., Munter, L. M., Jin, S., Rosqvist, S., ... & Lundkvist, J. (2014). Characterization of intermediate steps in amyloid beta (A β) production under near-native conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 289(3), 1540-1550.
- [51] Takami, M., Nagashima, Y., Sano, Y., Ishihara, S., Morishima-Kawashima, M., Funamoto, S., & Ihara, Y. (2009). γ -Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of β -carboxyl terminal fragment. *Journal of Neuroscience*, 29(41), 13042-13052.
- [52] Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., & Zetterberg, H. (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 6(3), 131.
- [53] Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Teplow, D. B., & Selkoe, D. J. (1993). Beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 268(5), 3021-3024.
- [54] Hartmann, T., Bieger, S. C., Brühl, B., Tienari, P. J., Ida, N., Allsop, D., ... & Beyreuther, K. (1997). Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A β 40/42 amyloid peptides. *Nature medicine*, 3(9), 1016.
- [55] Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T. R., Keller, P., Geiger, K. D., Verkade, P., & Simons, K. (2006). Alzheimer's disease β -amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11172-11177.
- [56] Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(9), 1205.
- [57] Esteve, A. S. (2018). *Secretases as potential biomarkers and therapeutic target for alzheimer's disease* (Doctoral dissertation, Universidad Miguel Hernández de Elche).
- [58] Thinakaran, G., & Koo, E. H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), 29615-29619.
- [59] Bien, J., Jefferson, T., Čaušević, M., Jumpertz, T., Munter, L., Multhaup, G., ... & Pietrzik, C. U. (2012). The metalloprotease meprin β generates amino terminal-truncated amyloid β peptide species. *Journal of Biological Chemistry*, 287(40), 33304-33313.

- [60] Schönherr, C., Bien, J., Isbert, S., Wichert, R., Prox, J., Altmeyen, H., ... & Glatzel, M. (2016). Generation of aggregation prone N-terminally truncated amyloid β peptides by meprin β depends on the sequence specificity at the cleavage site. *Molecular neurodegeneration*, 11(1), 19.
- [61] Schlenzig, D., Cynis, H., Hartlage-Rübsamen, M., Zeitschel, U., Menge, K., Fothe, A., ... & Buchholz, M. (2018). Dipeptidyl-Peptidase Activity of Meprin β Links N-truncation of A β with Glutaminyl Cyclase-Catalyzed pGlu-A β Formation. *Journal of Alzheimer's Disease*, (Preprint), 1-17.
- [62] Willem, M., Tahirovic, S., Busche, M. A., Ovsepian, S. V., Chafai, M., Kootar, S., ... & Hampel, H. (2015). η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature*, 526(7573), 443.
- [63] Ahmad, M., Takino, T., Miyamori, H., Yoshizaki, T., Furukawa, M., & Sato, H. (2006). Cleavage of amyloid- β precursor protein (APP) by membrane-type matrix metalloproteinases. *Journal of biochemistry*, 139(3), 517-526.
- [64] Baranger, K., Bonnet, A. E., Girard, S. D., Paumier, J. M., García-González, L., Elmana, W., ... & Moschke, K. (2017). MT5-MMP promotes Alzheimer's pathogenesis in the frontal cortex of 5xFAD mice and APP trafficking in vitro. *Frontiers in molecular neuroscience*, 9, 163.
- [65] Baranger, K., Marchalant, Y., Bonnet, A. E., Crouzin, N., Carrete, A., Paumier, J. M., ... & Moschke, K. (2016). MT5-MMP is a new pro-amyloidogenic proteinase that promotes amyloid pathology and cognitive decline in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Cellular and molecular life sciences*, 73(1), 217-236.
- [66] Paumier, J. M., Py, N. A., García-González, L., Bernard, A., Stephan, D., Louis, L., ... & Rivera, S. (2018). Proamyloidogenic effects of membrane type 1 matrix metalloproteinase involve MMP-2 and BACE-1 activities, and the modulation of APP trafficking. *The FASEB Journal*, 33(2), 2910-2927.
- [67] Zhang, Z., Song, M., Liu, X., Kang, S. S., Duong, D. M., Seyfried, N. T., ... & Jia, J. (2015). Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nature communications*, 6, 8762.
- [68] Zhang, Z., Obiany, O., Dall, E., Du, Y., Fu, H., Liu, X., ... & Schubert, M. (2017). Inhibition of delta-secretase improves cognitive functions in mouse models of Alzheimer's disease. *Nature communications*, 8, 14740.
- [69] Zhang, Z., Li, X. G., Wang, Z. H., Song, M., Yu, S. P., Kang, S. S., ... & Wang, J. Z. (2018). δ -Secretase-cleaved Tau stimulates A β production via upregulating STAT1-BACE1 signaling in Alzheimer's disease. *Molecular psychiatry*, 1.
- [70] Cataldo, A. M., Thayer, C. Y., Bird, E. D., Wheelock, T. R., & Nixon, R. A. (1990). Lysosomal proteinase antigens are prominently localized within senile plaques of Alzheimer's disease: evidence for a neuronal origin. *Brain research*, 513(2), 181-192.
- [71] Hook, V., Kindy, M., & Hook, G. (2007). Cysteine protease inhibitors effectively reduce in vivo levels of brain β -amyloid related to Alzheimer's disease. *Biological chemistry*, 388(2), 247-252.
- [72] Hook, V. Y., Kindy, M., & Hook, G. (2008). Inhibitors of cathepsin B improve memory and reduce β -amyloid in transgenic Alzheimer disease mice expressing the wild-

type, but not the Swedish mutant, β -secretase site of the amyloid precursor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 7745-7753.

[73] Hook, V. Y., Kindy, M., Reinheckel, T., Peters, C., & Hook, G. (2009). Genetic cathepsin B deficiency reduces β -amyloid in transgenic mice expressing human wild-type amyloid precursor protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 386(2), 284-288.

[74] Kindy, M. S., Yu, J., Zhu, H., El-Amouri, S. S., Hook, V., & Hook, G. R. (2012). Deletion of the cathepsin B gene improves memory deficits in a transgenic Alzheimer's disease mouse model expressing A β PP containing the wild-type β -secretase site sequence. *Journal of Alzheimer's Disease*, 29(4), 827-840.

[75] Sundelöf, J., Sundström, J., Hansson, O., Eriksdotter-Jönhagen, M., Giedraitis, V., Larsson, A., ... & Kilander, L. (2010). Higher cathepsin B levels in plasma in Alzheimer's disease compared to healthy controls. *Journal of Alzheimer's Disease*, 22(4), 1223-1230.

[76] Tiribuzi, R., Crispolti, L., Porcellati, S., Di Lullo, M., Florenzano, F., Pirro, M., ... & Orlicchio, A. (2014). miR128 up-regulation correlates with impaired amyloid β (1-42) degradation in monocytes from patients with sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 35(2), 345-356.

[77] Mueller-Stener, S., Zhou, Y., Arai, H., Roberson, E. D., Sun, B., Chen, J., ... & Gan, L. (2006). Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron*, 51(6), 703-714.

[78] Wang, C., Sun, B., Zhou, Y., Grubb, A., & Gan, L. (2012). Cathepsin B degrades amyloid- β in mice expressing wild-type human amyloid precursor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 39834-39841.

[79] Embury, C. M., Dyavarshetty, B., Lu, Y., Wiederin, J. L., Ciborowski, P., Gendelman, H. E., & Kiyota, T. (2017). Cathepsin B improves ss-amyloidosis and learning and memory in models of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 12(2), 340-352.

[80] Wu, Z., Ni, J., Liu, Y., Teeling, J. L., Takayama, F., Collcutt, A., ... & Nakanishi, H. (2017). Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in mice. *Brain, behavior, and immunity*, 65, 350-361.

[81] Tarp, M. A., & Clausen, H. (2008). Mucin-type O-glycosylation and its potential use in drug and vaccine development. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1780(3), 546-563.

[82] Torres, C. R., & Hart, G. W. (1984). Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *Journal of Biological Chemistry*, 259(5), 3308-3317.

[83] Varki, A., Freeze, H. H., & Gagneux, P. (2009). Evolution of glycan diversity. In *Essentials of Glycobiology. 2nd edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[84] Vosseller, K., Trinidad, J. C., Chalkley, R. J., Specht, C. G., Thalhammer, A., Lynn, A. J., ... & Schoepfer, R. (2006). O-linked N-acetylglucosamine proteomics of postsynaptic density preparations using lectin weak affinity chromatography and mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(5), 923-934.

- [85] Sakaidani, Y., Ichiyanagi, N., Saito, C., Nomura, T., Ito, M., Nishio, Y., ... & Okajima, T. (2012). O-linked-N-acetylglucosamine modification of mammalian Notch receptors by an atypical O-GlcNAc transferase Eogt1. *Biochemical and biophysical research communications*, 419(1), 14-19.
- [86] Shi, J., Gu, J. H., Dai, C. L., Gu, J., Jin, X., Sun, J., ... & Gong, C. X. (2015). O-GlcNAcylation regulates ischemia-induced neuronal apoptosis through AKT signaling. *Scientific reports*, 5, 14500.
- [87] Kim, S. J., Yoo, W. S., Choi, M., Chung, I., Yoo, J. M., & Choi, W. S. (2016). Increased O-GlcNAcylation of NF- κ B enhances retinal ganglion cell death in streptozotocin-induced diabetic retinopathy. *Current eye research*, 41(2), 249-257.
- [88] Pinho, T. S., Correia, S. C., Perry, G., Ambrósio, A. F., & Moreira, P. I. (2019). Diminished O-GlcNAcylation in Alzheimer's disease is strongly correlated with mitochondrial anomalies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1865(8), 2048-2059.
- [89] Pinho, T. S., Verde, D. M., Correia, S. C., Cardoso, S. M., & Moreira, P. I. (2018). O-GlcNAcylation and neuronal energy status: implications for Alzheimer's disease. *Ageing research reviews*, 46, 32-41.
- [90] Tomita, S., Kirino, Y., & Suzuki, T. (1998). Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway Identification of intracellular compartments in which APP cleavage occurs without using toxic agents that interfere with protein metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 273(11), 6277-6284.
- [91] Pålsson, P., Shakin-Eshleman, S. H., & Spitalnik, S. L. (1992). N-linked glycosylation of β -amyloid precursor protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 189(3), 1667-1673.
- [92] Schedin-Weiss, S., Winblad, B., & Tjernberg, L. O. (2014). The role of protein glycosylation in Alzheimer disease. *The FEBS journal*, 281(1), 46-62.
- [93] Kleene, R., & Schachner, M. (2004). Glycans and neural cell interactions. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(3), 195.
- [94] Ohtsubo, K., & Marth, J. D. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 126(5), 855-867.
- [95] Yazaki, M., Tagawa, K., Maruyama, K., Sorimachi, H., Tsuchiya, T., Ishiura, S., & Suzuki, K. (1996). Mutation of potential N-linked glycosylation sites in the Alzheimer's disease amyloid precursor protein (APP). *Neuroscience letters*, 221(1), 57-60.
- [96] Jack Jr, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., ... & Liu, E. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 14(4), 535-562.
- [97] Fundación Pasqual Maragall. (07-03-2019). Las fases de la enfermedad de Alzheimer [Entrada en un blog]. Hablemos del Alzheimer. Recuperado de <https://blog.fpmaragall.org/las-fases-de-la-enfermedad-de-alzheimer>.
- [98] Kamboh, M. I. (2018). A brief synopsis on the genetics of Alzheimer's disease. *Current genetic medicine reports*, 6(4), 133-135.

- [99] Fundación Alzheimer España (noviembre 2015). Clasificación de Demencias. *Fundación Alzheimer España*. Disponible en <http://www.alzfae.org/fundacion/145/clasificacion-demencias>. Consultado el 13 de julio de 2019.
- [100] Zhu, X. C., Tan, L., Wang, H. F., Jiang, T., Cao, L., Wang, C., ... & Yu, J. T. (2015). Rate of early onset Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Annals of translational medicine*, 3(3).
- [101] Zahs, K. R., & Ashe, K. H. (2015). More than a FAD: the in vivo effects of disease-linked presenilin-1 mutations. *Neuron*, 85(5), 893-895.
- [102] Cacace, R., Sleegers, K., & Van Broeckhoven, C. (2016). Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimer's & Dementia*, 12(6), 733-748.
- [103] Balasa, M., Gelpi, E., Antonell, A., Rey, M. J., Sanchez-Valle, R., Molinuevo, J. L., & Llado, A. (2011). Clinical features and APOE genotype of pathologically proven early-onset Alzheimer disease. *Neurology*, 76(20), 1720-1725.
- [104] Koedam, E. L., Lauffer, V., van der Vlies, A. E., van der Flier, W. M., Scheltens, P., & Pijnenburg, Y. A. (2010). Early-versus late-onset Alzheimer's disease: more than age alone. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(4), 1401-1408.
- [105] Mendez, M. F. (2012). Early-onset Alzheimer's disease: nonamnestic subtypes and type 2 AD. *Archives of medical research*, 43(8), 677-685.
- [106] Giri, M., Zhang, M., & Lü, Y. (2016). Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status. *Clinical interventions in aging*, 11, 665.
- [107] Bird, T. D. (2008). Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genetics in Medicine*, 10(4), 231.
- [108] Bertram, L., & Tanzi, R. E. (2008). Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(10), 768.
- [109] Ates, M. P., Karaman, Y., Guntekin, S., & Ergun, M. A. (2016). Analysis of genetics and risk factors of Alzheimer's Disease. *Neuroscience*, 325, 124-131.
- [110] Gatz, M., Reynolds, C. A., Fratiglioni, L., Johansson, B., Mortimer, J. A., Berg, S., ... & Pedersen, N. L. (2006). Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Archives of general psychiatry*, 63(2), 168-174.
- [111] Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G., ... & Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261(5123), 921-923.
- [112] Holtzman, D. M., Herz, J., & Bu, G. (2012). Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(3), a006312.
- [113] Ward, A., Crean, S., Mercaldi, C. J., Collins, J. M., Boyd, D., Cook, M. N., & Arrighi, H. M. (2012). Prevalence of apolipoprotein E4 genotype and homozygotes (APOE e4/e4) among patients diagnosed with Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology*, 38(1), 1-17.
- [114] Alzheimer's Association. (2018). 2018 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 14(3), 367-429.

- [115] Koistinaho, M., Lin, S., Wu, X. I. N., Esterman, M., Koger, D., Hanson, J., ... & Paul, S. M. (2004). Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid- β peptides. *Nature medicine*, *10*(7), 719.
- [116] Hoe, H. S., Pocivavsek, A., Dai, H., Chakraborty, G., Harris, D. C., & Rebeck, G. W. (2006). Effects of apoE on neuronal signaling and APP processing in rodent brain. *Brain research*, *1112*(1), 70-79.
- [117] Reed, B., Villeneuve, S., Mack, W., DeCarli, C., Chui, H. C., & Jagust, W. (2014). Associations between serum cholesterol levels and cerebral amyloidosis. *JAMA neurology*, *71*(2), 195-200.
- [118] Zambón, D., Quintana, M., Mata, P., Alonso, R., Benavent, J., Cruz-Sánchez, F., ... & Bachman, D. (2010). Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. *The American journal of medicine*, *123*(3), 267-274.
- [119] Di Paolo, G., & Kim, T. W. (2011). Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nature Reviews Neuroscience*, *12*(5), 284.
- [120] Castellano, J. M., Kim, J., Stewart, F. R., Jiang, H., DeMattos, R. B., Patterson, B. W., ... & Goate, A. M. (2011). Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Science translational medicine*, *3*(89), 89ra57-89ra57.
- [121] Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Goedert, M., Weisgraber, K. H., Dong, L. M., Jakes, R., ... & Roses, A. D. (1994). Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(23), 11183-11186.
- [122] Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M. B., ... & Zlokovic, B. V. (2008). apoE isoform-specific disruption of amyloid β peptide clearance from mouse brain. *The Journal of clinical investigation*, *118*(12), 4002-4013.
- [123] Levi, O., Jongen-Relo, A. L., Feldon, J., Roses, A. D., & Michaelson, D. M. (2003). ApoE4 impairs hippocampal plasticity isoform-specifically and blocks the environmental stimulation of synaptogenesis and memory. *Neurobiology of disease*, *13*(3), 273-282.
- [124] Lopera, F. (2016). La enfermedad de Alzheimer familiar. *Desde la Biblioteca*, (51), 63-73.
- [125] Chiang, K., & Koo, E. H. (2014). Emerging therapeutics for Alzheimer's disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*, *54*, 381-405.
- [126] Folch, J., Ettcheto, M., Petrov, D., Abad, S., Pedrós, I., Marin, M., ... & Camins, A. (2018). Una revisión de los avances en la terapéutica de la enfermedad de Alzheimer: estrategia frente a la proteína β -amiloide. *Neurología*, *33*(1), 47-58.
- [127] Francis, P. T., Nordberg, A., & Arnold, S. E. (2005). A preclinical view of cholinesterase inhibitors in neuroprotection: do they provide more than symptomatic benefits in Alzheimer's disease?. *Trends in pharmacological sciences*, *26*(2), 104-111.
- [128] Huang, Y., & Mucke, L. (2012). Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*, *148*(6), 1204-1222.
- [129] Cruz-Relaño, A. B. (2016). La musicoterapia como tratamiento no farmacológico para la enfermedad de Alzheimer.
- [130] American Psychiatric Association. (2010). *Practice guideline for the treatment of patients with Alzheimer's disease and other dementias*. American Psychiatric Publishing.

- [131] Woods, B., Spector, A., Jones, C., Orrell, M., & Davies, S. (2005). Reminiscence therapy for dementia (Cochrane Review). *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2.
- [132] Peak, J. S., & Cheston, R. I. (2002). Using simulated presence therapy with people with dementia. *Aging & mental health*, 6(1), 77-81.
- [133] Robinson, L., Hutchings, D., Dickinson, H. O., Corner, L., Beyer, F., Finch, T., ... & Bond, J. (2007). Effectiveness and acceptability of non-pharmacological interventions to reduce wandering in dementia: a systematic review. *International Journal of Geriatric Psychiatry: A journal of the psychiatry of late life and allied sciences*, 22(1), 9-22.
- [134] Thies, W., & Bleiler, L. (2013). Alzheimer's association. *Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimers Dement*, 9(2), 208e245.
- [135] Vassar, R., & Kandalepas, P. C. (2011). The β -secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Alzheimer's research & therapy*, 3(3), 20.
- [136] Menting, K. W., & Claassen, J. A. (2014). β -secretase inhibitor; a promising novel therapeutic drug in Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 6, 165.
- [137] Yan, R., & Vassar, R. (2014). Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *The Lancet Neurology*, 13(3), 319-329.
- [138] Chiang, K., & Koo, E. H. (2014). Emerging therapeutics for Alzheimer's disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 54, 381-405.
- [139] U.S. Department of Health & Human Services. (s.f.). E2609 for MCI and Early Alzheimer's (Mission AD1). *National Institute on Aging*. Disponible en <https://www.nia.nih.gov/alzheimers/clinical-trials/e2609-mci-and-early-alzheimers-mission-ad1#targetText=E2609%20is%20a%20BACE%20inhibitor,symptoms%2C%20and%20slow%20disease%20progression>. Consultado el 12 de mayo de 2019.
- [140] Bernier, F., Sato, Y., Matijevic, M., Desmond, H., McGrath, S., Burns, L., ... & Albala, B. (2013). Clinical study of E2609, a novel BACE1 inhibitor, demonstrates target engagement and inhibition of BACE1 activity in CSF. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 9(4), P886.
- [141] Devos, D., Moreau, C., Devedjian, J. C., Kluza, J., Petrault, M., Laloux, C., ... & Duhamel, A. (2014). Targeting chelatable iron as a therapeutic modality in Parkinson's disease. *Antioxidants & redox signaling*, 21(2), 195-210.
- [142] Forman, M., Kleijn, H. J., Dockendorf, M., Palcza, J., Tseng, J., Canales, C., ... & Scott, J. (2013). The novel BACE inhibitor MK-8931 dramatically lowers CSF beta-amyloid in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 9(4), P139.
- [143] Portelius, E. (2013). The A β 5-40/A β 1-34 ratio reflects BACE1 inhibition in human cerebrospinal fluid. In *th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases*.
- [144] Landreth, G., Jiang, Q., Mandrekar, S., & Heneka, M. (2008). PPAR γ agonists as therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 5(3), 481-489.
- [145] Craft, S. (2009). The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: two roads converged. *Archives of neurology*, 66(3), 300-305.

- [146] Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P., & Kivipelto, M. (2010). Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *The Lancet Neurology*, 9(7), 702-716.
- [147] Gold, M., Alderton, C., Zvartau-Hind, M., Ritchie, S., Saunders, A., Craft, S., ... & Sawchak, S. (2009). Effects of rosiglitazone as monotherapy in APOE4-stratified subjects with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 5(4), P86.
- [148] Tang, J. J. (2009). Beta-secretase as target for amyloid-reduction therapy. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 5(4), P74.
- [149] Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., Sabbagh, M., & Zhong, K. (2019). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 5, 272-293.
- [150] P Imbimbo, B., & AM Giardina, G. (2011). γ -secretase inhibitors and modulators for the treatment of Alzheimer's disease: disappointments and hopes. *Current topics in medicinal chemistry*, 11(12), 1555-1570.
- [151] Wolfe, M. S. (2012). γ -Secretase as a target for Alzheimer's disease. In *Advances in pharmacology* (Vol. 64, pp. 127-153). Academic Press.
- [152] Doody, R. S., Raman, R., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., ... & Aisen, P. S. (2013). A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 369(4), 341-350.
- [153] Tagami, S., Yanagida, K., Kodama, T. S., Takami, M., Mizuta, N., Oyama, H., ... & Sakaguchi, G. (2017). Semagacestat is a pseudo-inhibitor of γ -secretase. *Cell reports*, 21(1), 259-273.
- [154] Tong, G., Wang, J. S., Sverdllov, O., Huang, S. P., Slemmon, R., Croop, R., ... & Berman, R. M. (2012). Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, single-ascending dose study of the oral γ -secretase inhibitor BMS-708163 (Avagacestat): tolerability profile, pharmacokinetic parameters, and pharmacodynamic markers. *Clinical therapeutics*, 34(3), 654-667.
- [155] Coric, V., Salloway, S., van Dyck, C., Kerselaers, W., Kaplita, S., Curtis, C., ... & Sharma, S. K. (2013). A phase II study of the gamma-secretase inhibitor avagacestat (BMS-708163) in predementia Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 9(4), P283.
- [156] Eriksen, J. L., Sagi, S. A., Smith, T. E., Weggen, S., Das, P., McLendon, D. C., ... & Golde, T. E. (2003). NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target γ -secretase and lower A β 42 in vivo. *The Journal of clinical investigation*, 112(3), 440-449.
- [157] Pasqualetti, P., Bonomini, C., Dal Forno, G., Paulon, L., Sinforiani, E., Marra, C., ... & Rossini, P. M. (2009). A randomized controlled study on effects of ibuprofen on cognitive progression of Alzheimer's disease. *Aging clinical and experimental research*, 21(2), 102-110.
- [158] Lee, B. H., Lee, C. C., & Wu, S. C. (2014). Ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum*) improves hyperglycaemia and memory impairments in a Wistar rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(11), 2266-2273.

- [159] Pitt, J., Thorner, M., Brautigan, D., Larner, J., & Klein, W. L. (2013). Protection against the synaptic targeting and toxicity of Alzheimer's-associated A β oligomers by insulin mimetic chiro-inositols. *The FASEB Journal*, 27(1), 199-207.
- [160] Tan, J., Obregon, D., Rezai-Zadeh, K., Bai, Y., Sun, N., Hou, H., ... & Town, T. (2006). P4-267: ADAM10 activation is required for green tea EGCG-induced alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 2(3), S595.
- [161] Vellas, B., Sol, O., J Snyder, P., Ousset, P. J., Haddad, R., Maurin, M., ... & P Pando, M. (2011). EHT0202 in Alzheimer's disease: a 3-month, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Current Alzheimer Research*, 8(2), 203-212.
- [162] Holthoewer, D., Endres, K., Schuck, F., Hiemke, C., Schmitt, U., & Fahrenholz, F. (2012). Acitretin, an enhancer of alpha-secretase expression, crosses the blood-brain barrier and is not eliminated by P-glycoprotein. *Neurodegenerative Diseases*, 10(1-4), 224-228.
- [163] Tippmann, F., Hundt, J., Schneider, A., Endres, K., & Fahrenholz, F. (2009). Up-regulation of the α -secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *The FASEB Journal*, 23(6), 1643-1654.
- [164] Endres, K., Fahrenholz, F., Lotz, J., Hiemke, C., Teipel, S., Lieb, K., ... & Fellgiebel, A. (2014). Increased CSF APPs- α levels in patients with Alzheimer disease treated with acitretin. *Neurology*, 83(21), 1930-1935.
- [165] Gauthier, S., Aisen, P. S., Ferris, S. H., Saumier, D., Duong, A., Haine, D., ... & Sampalis, J. (2009). Effect of tramiprosate in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: exploratory analyses of the MRI sub-group of the Alphase study. *JNHA-The Journal of Nutrition, Health and Aging*, 13(6), 550-557.
- [166] Aisen, P. S., Gauthier, S., Ferris, S. H., Saumier, D., Haine, D., Garceau, D., ... & Sampalis, J. (2011). Tramiprosate in mild-to-moderate Alzheimer's disease—a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre study (the Alphase Study). *Archives of medical science: AMS*, 7(1), 102.
- [167] F-Prime. (14 de junio de 2019). Therapeutics: ELND005. *Alzforum Networking for a cure*. Disponible en <https://www.alzforum.org/therapeutics/elnd005>. Consultado el 10 de julio de 2019.
- [168] Bilikiewicz, A., & Gaus, W. (2004). Colostrinin 1 (a naturally occurring, proline-rich, polypeptide mixture) in the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 6(1), 17-26.
- [169] Aytan, N., Choi, J. K., Carreras, I., Kowall, N. W., Jenkins, B. G., & Dedeoglu, A. (2013). Combination therapy in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Experimental neurology*, 250, 228-238.
- [170] Matlack, K. E., Tardiff, D. F., Narayan, P., Hamamichi, S., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., & Lindquist, S. (2014). Clioquinol promotes the degradation of metal-dependent amyloid- β (A β) oligomers to restore endocytosis and ameliorate A β toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(11), 4013-4018.
- [171] Nalivaeva, N. N., Fisk, L. R., Belyaev, N. D., & Turner, A. J. (2008). Amyloid-degrading enzymes as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 5(2), 212-224.

- [172] Higuchi, M., Iwata, N., & Saido, T. C. (2005). Understanding molecular mechanisms of proteolysis in Alzheimer's disease: progress toward therapeutic interventions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1751(1), 60-67.
- [173] Deane, R. J. (2012). Is RAGE still a therapeutic target for Alzheimer's disease?. *Future medicinal chemistry*, 4(7), 915-925.
- [174] J Baranello, R., L Bharani, K., Padmaraju, V., Chopra, N., K Lahiri, D., H Greig, N., ... & Sambamurti, K. (2015). Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 12(1), 32-46.
- [175] Deane, R., Sagare, A., & Zlokovic, B. V. (2008). The role of the cell surface LRP and soluble LRP in blood-brain barrier A β clearance in Alzheimer's disease. *Current pharmaceutical design*, 14(16), 1601-1605.
- [176] Bates, K. A., Verdile, G., Li, Q. X., Ames, D., Hudson, P., Masters, C. L., & Martins, R. N. (2009). Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid- β peptide: implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Molecular psychiatry*, 14(5), 469.
- [177] Galasko, D., Bell, J., Mancuso, J. Y., Kupiec, J. W., Sabbagh, M. N., van Dyck, C., ... & Aisen, P. S. (2014). Clinical trial of an inhibitor of RAGE-A β interactions in Alzheimer disease. *Neurology*, 82(17), 1536-1542.
- [178] Wiessner, C., Wiederhold, K. H., Tissot, A. C., Frey, P., Danner, S., Jacobson, L. H., ... & Zurini, M. (2011). The second-generation active A β immunotherapy CAD106 reduces amyloid accumulation in APP transgenic mice while minimizing potential side effects. *Journal of Neuroscience*, 31(25), 9323-9331.
- [179] Muhs, A., Hickman, D. T., Pihlgren, M., Chuard, N., Giriens, V., Meerschman, C., ... & Bechinger, B. (2007). Liposomal vaccines with conformation-specific amyloid peptide antigens define immune response and efficacy in APP transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(23), 9810-9815.
- [180] Liu, B., Frost, J. L., Sun, J., Fu, H., Grimes, S., Blackburn, P., & Lemere, C. A. (2013). MER5101, a novel A β 1-15: DT conjugate vaccine, generates a robust anti-A β antibody response and attenuates A β pathology and cognitive deficits in APP^{swE/PS1 Δ E9} transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, 33(16), 7027-7037.
- [181] Panza, F., Solfrizzi, V., Imbimbo, B. P., & Logroscino, G. (2014). Amyloid-directed monoclonal antibodies for the treatment of Alzheimer's disease: the point of no return?. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 14(10), 1465-1476.
- [182] Panza, F., Solfrizzi, V., Imbimbo, B. P., Tortelli, R., Santamato, A., & Logroscino, G. (2014). Amyloid-based immunotherapy for Alzheimer's disease in the time of prevention trials: the way forward. *Expert review of clinical immunology*, 10(3), 405-419.
- [183] Doody, R. S., Thomas, R. G., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., ... & Siemers, E. (2014). Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 370(4), 311-321.
- [184] Novakovic, D., Feligioni, M., Scaccianoce, S., Caruso, A., Piccinin, S., Schepisi, C., ... & Nisticò, R. (2013). Profile of gantenerumab and its potential in the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Design, Development and Therapy*, 7, 1359.

- [185] Bohrmann, B., Baumann, K., Benz, J., Gerber, F., Huber, W., Knoflach, F., ... & Rothe, C. (2012). Gantenerumab: a novel human anti-A β antibody demonstrates sustained cerebral amyloid- β binding and elicits cell-mediated removal of human amyloid- β . *Journal of Alzheimer's Disease*, 28(1), 49-69.
- [186] Dodel, R., Rominger, A., Bartenstein, P., Barkhof, F., Blennow, K., Förster, S., ... & Wiltfang, J. (2013). Intravenous immunoglobulin for treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial. *The Lancet Neurology*, 12(3), 233-243.
- [187] Relkin, N. R., Szabo, P., Adamiak, B., Burgut, T., Monthe, C., Lent, R. W., ... & Weksler, M. E. (2009). 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. *Neurobiology of aging*, 30(11), 1728-1736.
- [188] Szabo, P., Mujalli, D. M., Rotondi, M. L., Sharma, R., Weber, A., Schwarz, H. P., ... & Relkin, N. (2010). Measurement of anti-beta amyloid antibodies in human blood. *Journal of neuroimmunology*, 227(1-2), 167-174.
- [189] Pei, J. J., Sjögren, M., & Winblad, B. (2008). Neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease: from molecular mechanisms to identification of drug targets. *Current opinion in psychiatry*, 21(6), 555-561.
- [190] Green, K. N., Steffan, J. S., Martinez-Coria, H., Sun, X., Schreiber, S. S., Thompson, L. M., & LaFerla, F. M. (2008). Nicotinamide restores cognition in Alzheimer's disease transgenic mice via a mechanism involving sirtuin inhibition and selective reduction of Thr231-phosphotau. *Journal of Neuroscience*, 28(45), 11500-11510.
- [191] F-Prime. (13 de septiembre de 2019). Therapeutics: Elenbecestat. *Alzforum Networking for a cure*. Disponible en <https://www.alzforum.org/therapeutics/elenbecestat>. Consultado el 1 de octubre de 2019.
- [192] Cortés, J. J. B., del Pozo, J. M. G., Naberán, E., & Ruipérez, I. (2000). TAC craneal en el estudio diagnóstico de pacientes con deterioro cognitivo: utilidad de criterios clínicos para mejorar su eficacia. *Revista española de geriatría y gerontología: Organo oficial de la Sociedad Española de Geriatría y Gerontología*, 35(2), 70-76.
- [193] López-Álvarez, J., & Agüera-Ortiz, L. F. (2015). Nuevos criterios diagnósticos de la demencia y la enfermedad de Alzheimer: una visión desde la psicogeriatría. *Psicogeriatría*, 5(1), 3-14.
- [194] Valls-Pedret, C., Molinuevo, J. L., & Rami, L. (2010). Diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer: fase prodrómica y preclínica. *Rev Neurol*, 51(8), 471-480.
- [195] Monge-Argilés, J. A., Sánchez-Payá, J., Muñoz-Ruiz, C., Pampliega-Pérez, A., Montoya-Gutiérrez, F. J., & Leiva-Santana, C. (2010). Biomarcadores en LCR de pacientes con deterioro cognitivo leve: metaanálisis de su capacidad predictiva para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol*, 50, 193-200.
- [196] Barrera-López, F. J., López-Beltrán, E. A., Baldivieso-Hurtado, N., Maple-Alvarez, I. V., López-Moraila, M. A., & Murillo-Bonilla, L. M. (2018). Diagnóstico actual de la enfermedad de Alzheimer. *Revista de Medicina Clínica*, 2(2), 57-73.
- [197] Ascendo Consulting Sanidad & Farma. (2016). Proyecto MapEA: Mapa de recursos para enfermos de Alzheimer. *Lilly*. Disponible en

<https://www.lilly.es/global/img/es/pacientes/mapea/mapea-comunidad-valenciana.pdf>.

Consultado el 3 de septiembre de 2019.

- [198] Folstein, M. F., Folstein, S. E., & McHugh, P. R. (1975). "Mini-mental state": a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of psychiatric research*, 12(3), 189-198.
- [199] Lobo, A., Gómez, A., & Folstein, M. F. (1979). El "Mini-examen cognocitivo" en pacientes geriátricos. *Folia neuropsiquiátrica: Revista de psicología, psiquiatría y ciencias afines*, 14(1), 245-251.
- [200] Vertesi, A., Lever, J. A., Molloy, D. W., Sanderson, B., Tuttle, I., Pokoradi, L., & Principi, E. (2001). Standardized Mini-Mental State Examination. Use and interpretation. *Canadian Family Physician*, 47(10), 2018-2023.
- [201] Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. (2001). Assessment: neuropsychological testing of adults considerations for neurologists. *Archives of Clinical Neuropsychology*, 16(3), 255-269.
- [202] Eslinger, P. J., & Rizzo, M. (2004). *Principles and practice of Behavioral Neurology and Neuropsychology*. WB Saunders.
- [203] Narayanan, L., & Murray, A. D. (2016). What can imaging tell us about cognitive impairment and dementia?. *World journal of radiology*, 8(3), 240.
- [204] Rojas, G., de Guevara, D. L., Jaimovich, R., Brunetti, E., Faure, E., & Gálvez, M. (2016). Neuroimágenes en demencias. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 27(3), 338-356.
- [205] Barkhof, F., Fox, N. C., Bastos-Leite, A. J., & Scheltens, P. (2011). Normal ageing. In *Neuroimaging in Dementia* (pp. 43-57). Springer, Berlin, Heidelberg.
- [206] Ogawa, S., Lee, T. M., Kay, A. R., & Tank, D. W. (1990). Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(24), 9868-9872.
- [207] Jezzard, P., Matthews, P. M., & Smith, S. M. (Eds.). (2001). *Functional MRI: an introduction to methods* (Vol. 61). Oxford: Oxford university press.
- [208] Buckner, R. L. (1998). Event-related fMRI and the hemodynamic response. *Human brain mapping*, 6(5-6), 373-377.
- [209] Rosen, B. R., Buckner, R. L., & Dale, A. M. (1998). Event-related functional MRI: past, present, and future. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(3), 773-780.
- [210] Rosales, R., Rojas, G., Gálvez, M., Gallardo, P., & Badilla, L. (2006). Obtención de mapas corticales de áreas motora y visual, con resonancia magnética cerebral funcional. *Revista chilena de radiología*, 12(4), 164-169.
- [211] Faro SH, Mohamed FB (eds). *Functional MRI. Basic Principles and Clinical Applications*. 2006 Springer Science+Business
- [212] Petersen, R. C., Roberts, R. O., Knopman, D. S., Boeve, B. F., Geda, Y. E., Ivnik, R. J., ... & Jack, C. R. (2009). Mild cognitive impairment: ten years later. *Archives of neurology*, 66(12), 1447-1455.

- [213] Cerami, C., Della Rosa, P. A., Magnani, G., Santangelo, R., Marcone, A., Cappa, S. F., & Perani, D. (2015). Brain metabolic maps in Mild Cognitive Impairment predict heterogeneity of progression to dementia. *NeuroImage: Clinical*, 7, 187-194.
- [214] Kato, T., Inui, Y., Nakamura, A., & Ito, K. (2016). Brain fluorodeoxyglucose (FDG) PET in dementia. *Ageing research reviews*, 30, 73-84.
- [215] Hoffman, J. M., Welsh-Bohmer, K. A., Hanson, M., Crain, B., Hulette, C., Earl, N., & Coleman, R. E. (2000). FDG PET imaging in patients with pathologically verified dementia. *Journal of Nuclear Medicine*, 41(11), 1920-1928.
- [216] Guidotti, C., Farioli, D., Gaeta, M. C., Giovannini, E., Lazzeri, P., Meniconi, M., & Ciarmiello, A. (2013). SPECT radiopharmaceuticals for dementia. *Current radiopharmaceuticals*, 6(4), 192-207.
- [217] Parnetti, L., Eusebi, P., & Lleó, A. (2016). Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Target Engagement and Efficacy in Clinical Trials for Alzheimer's and Parkinson's Diseases. In *The Right Therapy for Neurological Disorders* (Vol. 39, pp. 117-123). Karger Publishers.
- [218] Mattsson, N., Carrillo, M. C., Dean, R. A., Devous Sr, M. D., Nikolcheva, T., Pesini, P., ... & Bain, L. J. (2015). Revolutionizing Alzheimer's disease and clinical trials through biomarkers. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, 1(4), 412-419.
- [219] Heurling, K., Leuzy, A., Zimmer, E. R., Lubberink, M., & Nordberg, A. (2016). Imaging β -amyloid using [18 F] flutemetamol positron emission tomography: from dosimetry to clinical diagnosis. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 43(2), 362-373.
- [220] Arnold, S. E., Hyman, B. T., Flory, J., Damasio, A. R., & Van Hoesen, G. W. (1991). The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cerebral cortex*, 1(1), 103-116.
- [221] de Souza, L. C., Lehericy, S., Dubois, B., Stella, F., & Sarazin, M. (2012). Neuroimaging in dementias. *Current Opinion in Psychiatry*, 25(6), 473-479.
- [222] van der Lee, S. J., Wolters, F. J., Ikram, M. K., Hofman, A., Ikram, M. A., Amin, N., & van Duijn, C. M. (2018). The effect of APOE and other common genetic variants on the onset of Alzheimer's disease and dementia: a community-based cohort study. *The Lancet Neurology*, 17(5), 434-444.
- [223] Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., DeKosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., ... & Meguro, K. (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *The Lancet Neurology*, 6(8), 734-746.
- [224] Custodio, N. (2018). Los nuevos criterios para el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer no dependen de los síntomas clínicos. *Revista de Neuro-Psiquiatría*, 81(2), 55-57.
- [225] De Leon, M. J., Segal, S., Tarshish, C. Y., DeSanti, S., Zinkowski, R., Mehta, P. D., ... & Saint Louis, L. A. (2002). Longitudinal cerebrospinal fluid tau load increases in mild cognitive impairment. *Neuroscience letters*, 333(3), 183-186.

- [226] De Leon, M. J., DeSanti, S., Zinkowski, R., Mehta, P. D., Pratico, D., Segal, S., ... & Clark, C. M. (2006). Longitudinal CSF and MRI biomarkers improve the diagnosis of mild cognitive impairment. *Neurobiology of aging*, 27(3), 394-401.
- [227] Jack Jr, C. R., Knopman, D. S., Jagust, W. J., Shaw, L. M., Aisen, P. S., Weiner, M. W., ... & Trojanowski, J. Q. (2010). Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *The Lancet Neurology*, 9(1), 119-128.
- [228] Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M., de Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S., & Van der Flier, W. M. (2016). Alzheimer's disease. *Lancet*, 388(10043), 505-17.
- [229] Fagan, A. M., Roe, C. M., Xiong, C., Mintun, M. A., Morris, J. C., & Holtzman, D. M. (2007). Cerebrospinal fluid tau/ β -amyloid42 ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Archives of neurology*, 64(3), 343-349.
- [230] Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., & Zetterberg, H. (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 6(3), 131.
- [231] Cuchillo-Ibañez, I., Lopez-Font, I., Boix-Amorós, A., Brinkmalm, G., Blennow, K., Molinuevo, J. L., & Sáez-Valero, J. (2015). Heteromers of amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid. *Molecular neurodegeneration*, 10(1), 2.
- [232] Palmert, M. R., Podlisny, M. B., Witker, D. S., Oltersdorf, T., Younkin, L. H., Selkoe, D. J., & Younkin, S. G. (1989). The beta-amyloid protein precursor of Alzheimer disease has soluble derivatives found in human brain and cerebrospinal fluid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6338-6342.
- [233] Ghiso, J., Tagliavini, F., Timmers, W. F., & Frangione, B. (1989). Alzheimer's disease amyloid precursor protein is present in senile plaques and cerebrospinal fluid: immunohistochemical and biochemical characterization. *Biochemical and biophysical research communications*, 163(1), 430-437.
- [234] Perneczky, R., Alexopoulos, P., & Kurz, A. (2014). Soluble amyloid precursor proteins and secretases as Alzheimer's disease biomarkers. *Trends in molecular medicine*, 20(1), 8-15.
- [235] Gabelle, A., Roche, S., Gény, C., Bennys, K., Labauge, P., Tholance, Y., ... & Vighetto, A. (2010). Correlations between soluble α/β forms of amyloid precursor protein and A β 38, 40, and 42 in human cerebrospinal fluid. *Brain research*, 1357, 175-183.
- [236] Lewczuk, P., Kamrowski-Kruck, H., Peters, O., Heuser, I., Jessen, F., Popp, J., ... & Prinz, B. (2010). Soluble amyloid precursor proteins in the cerebrospinal fluid as novel potential biomarkers of Alzheimer's disease: a multicenter study. *Molecular psychiatry*, 15(2), 138.
- [237] Mulugeta, E., Londos, E., Hansson, O., Ballard, C., Skogseth, R., Minthon, L., ... & Aarsland, D. (2011). Cerebrospinal fluid levels of sAPP α and sAPP β in Lewy body and Alzheimer's disease: clinical and neurochemical correlates. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011.
- [238] Alexopoulos, P., Tsolakidou, A., Roselli, F., Arnold, A., Grimmer, T., Westerteicher, C., ... & Perneczky, R. (2012). Clinical and neurobiological correlates of soluble amyloid precursor proteins in the cerebrospinal fluid. *Alzheimer's & Dementia*, 8(4), 304-311.

- [239] Efthimiopoulos, S., Vassilacopoulou, D., Ripellino, J. A., Tezapsidis, N., & Robakis, N. K. (1996). Cholinergic agonists stimulate secretion of soluble full-length amyloid precursor protein in neuroendocrine cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15), 8046-8050.
- [240] Tezapsidis, N., Li, H. C., Ripellino, J. A., Efthimiopoulos, S., Vassilacopoulou, D., Sambamurti, K., ... & Robakis, N. K. (1998). Release of nontransmembrane full-length Alzheimer's amyloid precursor protein from the luminal surface of chromaffin granule membranes. *Biochemistry*, 37(5), 1274-1282.
- [241] Scheuermann, S., Hamsch, B., Hesse, L., Stumm, J., Schmidt, C., Beher, D., ... & Multhaup, G. (2001). Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33923-33929.
- [242] 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.
- [243] Palmqvist, S., Zetterberg, H., Blennow, K., Vestberg, S., Andreasson, U., Brooks, D. J., ... & Hansson, O. (2014). Accuracy of brain amyloid detection in clinical practice using cerebrospinal fluid β -amyloid 42: a cross-validation study against amyloid positron emission tomography. *JAMA neurology*, 71(10), 1282-1289.
- [244] Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*, 82(4), 239-259.
- [245] McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., & Stadlan, E. M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group* under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 34(7), 939-939.
- [246] Mirra, S. S., Gearing, M., McKeel Jr, D. W., Crain, B. J., Hughes, J. P., Van Belle, G., ... & Participating Neuropathologists. (1994). Interlaboratory comparison of neuropathology assessments in Alzheimer's disease: a study of the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 53(3), 303-315.
- [247] World Medical Association. (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects JAMA 2013; 310: 2191–2194. *Crossref, Medline*.
- [248] Del Campo, M., Mollenhauer, B., Bertolotto, A., Engelborghs, S., Hampel, H., Simonsen, A. H., ... & Molinuevo, J. L. (2012). Recommendations to standardize preanalytical confounding factors in Alzheimer's and Parkinson's disease cerebrospinal fluid biomarkers: an update. *Biomarkers in medicine*, 6(4), 419-430.
- [249] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680.
- [250] Lis, H., & Sharon, N. (1986). Lectins as molecules and as tools. *Annual review of biochemistry*, 55(1), 35-67.
- [251] Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184-186.

- [252] Jansen, W. J., Ossenkuppele, R., Knol, D. L., Tijms, B. M., Scheltens, P., Verhey, F. R., ... & Alexander, M. (2015). Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: a meta-analysis. *Jama*, *313*(19), 1924-1938.
- [253] Lleó, A., Cavedo, E., Parnetti, L., Vanderstichele, H., Herukka, S. K., Andreasen, N., ... & Tsolaki, M. (2015). Cerebrospinal fluid biomarkers in trials for Alzheimer and Parkinson diseases. *Nature Reviews Neurology*, *11*(1), 41.
- [254] Moir, R. D., Lynch, T., Bush, A. I., Whyte, S., Henry, A., Portbury, S., ... & Masters, C. L. (1998). Relative increase in Alzheimer's disease of soluble forms of cerebral A β amyloid protein precursor containing the Kunitz protease inhibitory domain. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(9), 5013-5019.
- [255] Refolo, L. M., Salton, S. R., Anderson, J. P., Mehta, P., & Robakis, N. K. (1989). Nerve and epidermal growth factors induce the release of the Alzheimer amyloid precursor from PC 12 cell cultures. *Biochemical and biophysical research communications*, *164*(2), 664-670.
- [256] Van Nostrand, W. E., Farrow, J. S., Wagner, S. L., Bhasin, R., Goldgaber, D., Cotman, C. W., & Cunningham, D. D. (1991). The predominant form of the amyloid beta-protein precursor in human brain is protease nexin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(22), 10302-10306.
- [257] Selkoe, D. J., Yamazaki, T., Citron, M., Podlisny, M. B., Koo, E. H., Teplow, D. B., & Haass, C. (1996). The Role of APP Processing and Trafficking Pathways in the Formation of Amyloid β -Protein a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *777*(1), 57-64.
- [258] 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.
- [259] Russo, C., Salis, S., Dolcini, V., Venezia, V., Song, X. H., Teller, J. K., & Schettini, G. (2001). Amino-terminal modification and tyrosine phosphorylation of [corrected] carboxy-terminal fragments of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease and Down's syndrome brain. *Neurobiology of disease*, *8*(1), 173-180.
- [260] Pera, M., Alcolea, D., Sánchez-Valle, R., Guardia-Laguarta, C., Colom-Cadena, M., Badiola, N., ... & Blesa, R. (2013). Distinct patterns of APP processing in the CNS in autosomal-dominant and sporadic Alzheimer disease. *Acta neuropathologica*, *125*(2), 201-213.
- [261] Pulina, M. V., Hopkins, M., Haroutunian, V., Greengard, P., & Bustos, V. (2019). C99 selectively accumulates in vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*.
- [262] Nakagawa, K., Kitazume, S., Oka, R., Maruyama, K., Saido, T. C., Sato, Y., ... & Hashimoto, Y. (2006). Sialylation enhances the secretion of neurotoxic amyloid- β peptides. *Journal of neurochemistry*, *96*(4), 924-933.
- [263] Chun, Y. S., Park, Y., Oh, H. G., Kim, T. W., Yang, H. O., Park, M. K., & Chung, S. (2015). O-GlcNAcylation promotes non-amyloidogenic processing of amyloid- β protein precursor via inhibition of endocytosis from the plasma membrane. *Journal of Alzheimer's Disease*, *44*(1), 261-275.

- [264] Akasaka-Manyá, K., Kawamura, M., Tsumoto, H., Saito, Y., Tachida, Y., Kitazume, S., ... & Hashimoto, Y. (2017). Excess APP O-glycosylation by GalNAc-T6 decreases A β production. *The Journal of Biochemistry*, 161(1), 99-111.
- [265] Liu, F., Xu, K., Xu, Z., de las Rivas, M., Wang, C., Li, X., ... & Hurtado-Guerrero, R. (2017). The small molecule luteolin inhibits N-acetyl- α -galactosaminyltransferases and reduces mucin-type O-glycosylation of amyloid precursor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 292(52), 21304-21319.
- [266] Buxbaum, J. D., Thinakaran, G., Koliatsos, V., O'Callahan, J., Slunt, H. H., Price, D. L., & Sisodia, S. S. (1998). Alzheimer amyloid protein precursor in the rat hippocampus: transport and processing through the perforant path. *Journal of Neuroscience*, 18(23), 9629-9637.
- [267] Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L., & Beyreuther, K. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*, 57(1), 115-126.
- [268] Lopez-Font, I., Boix, C. P., Zetterberg, H., Blennow, K., & Sáez-Valero, J. (2017). Alterations in the balance of amyloid- β protein precursor species in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(4), 1281-1291.
- [269] Selkoe, D. J., Podlisny, M. B., Joachim, C. L., Vickers, E. A., Lee, G., Fritz, L. C., & Oltersdorf, T. (1988). Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110-to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(19), 7341-7345.
- [270] Menendez-Gonzalez, M., Perez-Pinera, P., Martinez-Rivera, M., Calatayud, M. T., & Menes, B. B. (2005). APP processing and the APP-KPI domain involvement in the amyloid cascade. *Neurodegenerative diseases*, 2(6), 277-283.
- [271] Andrew, R. J., Kellett, K. A., Thinakaran, G., & Hooper, N. M. (2016). A Greek tragedy: the growing complexity of Alzheimer amyloid precursor protein proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 291(37), 19235-19244.
- [272] Moser, J. J., Chan, E. K., & Fritzler, M. J. (2009). Optimization of immunoprecipitation-western blot analysis in detecting GW182-associated components of GW/P bodies. *Nature protocols*, 4(5), 674.
- [273] Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Hampel, H., Molinuevo, J. L., Blennow, K., ... & Cappa, S. (2014). Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *The Lancet Neurology*, 13(6), 614-629.
- [274] Chasseigneaux, S., & Allinquant, B. (2012). Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *Journal of neurochemistry*, 120, 99-108.
- [275] Van Nostrand, W. E., Wagner, S. L., Shankle, W. R., Farrow, J. S., Dick, M., Rozemuller, J. M., ... & Cotman, C. W. (1992). Decreased levels of soluble amyloid beta-protein precursor in cerebrospinal fluid of live Alzheimer disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(7), 2551-2555.
- [276] Prior, R., Mönning, U., Schreiter-Gasser, U., Weidemann, A., Blennow, K., Gottfries, C. G., ... & Beyreuther, K. (1991). Quantitative changes in the amyloid β A4 precursor protein in Alzheimer cerebrospinal fluid. *Neuroscience letters*, 124(1), 69-73.

- [277] Lannfelt, L., Basun, H., Wahlund, L. O., Rowe, B. A., & Wagner, S. L. (1995). Decreased α -secretase-cleaved amyloid precursor protein as a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Nature medicine*, *1*(8), 829.
- [278] Sennvik, K., Fastbom, J., Blomberg, M., Wahlund, L. O., Winblad, B., & Benedikz, E. (2000). Levels of α - and β -secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neuroscience letters*, *278*(3), 169-172.
- [279] Rosén, C., Andreasson, U., Mattsson, N., Marcusson, J., Minthon, L., Andreasen, N., ... & Zetterberg, H. (2012). Cerebrospinal fluid profiles of amyloid β -related biomarkers in Alzheimer's disease. *Neuromolecular medicine*, *14*(1), 65-73.
- [280] Hock, C., Golombowski, S., Müller-Spahn, F., Naser, W., Beyreuther, K., Mönning, U., ... & Tanzi, R. E. (1998). Cerebrospinal fluid levels of amyloid precursor protein and amyloid β -peptide in Alzheimer's disease and major depression—inverse correlation with dementia severity. *European neurology*, *39*(2), 111-118.
- [281] Olsson, A., Höglund, K., Sjögren, M., Andreasen, N., Minthon, L., Lannfelt, L., ... & Blennow, K. (2003). Measurement of α - and β -secretase cleaved amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid from Alzheimer patients. *Experimental neurology*, *183*(1), 74-80.
- [282] Zetterberg, H., Andreasson, U., Hansson, O., Wu, G., Sankaranarayanan, S., Andersson, M. E., ... & Simon, A. J. (2008). Elevated cerebrospinal fluid BACE1 activity in incipient Alzheimer disease. *Archives of neurology*, *65*(8), 1102-1107.
- [283] Brinkmalm, G., Brinkmalm, A., Bourgeois, P., Persson, R., Hansson, O., Portelius, E., ... & Öhrfelt, A. (2013). Soluble amyloid precursor protein α and β in CSF in Alzheimer's disease. *Brain research*, *1513*, 117-126.
- [284] Lewczuk, P., Popp, J., Lelental, N., Kölsch, H., Maier, W., Kornhuber, J., & Jessen, F. (2012). Cerebrospinal fluid soluble amyloid- β protein precursor as a potential novel biomarkers of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *28*(1), 119-125.
- [285] Perneczky, R., Tsolakidou, A., Arnold, A., Diehl-Schmid, J., Grimmer, T., Förstl, H., ... & Alexopoulos, P. (2011). CSF soluble amyloid precursor proteins in the diagnosis of incipient Alzheimer disease. *Neurology*, *77*(1), 35-38.
- [286] Taverna, M., Straub, T., Hampel, H., Rujescu, D., & Lichtenthaler, S. F. (2013). A new sandwich immunoassay for detection of the α -secretase cleaved, soluble amyloid- β protein precursor in cerebrospinal fluid and serum. *Journal of Alzheimer's Disease*, *37*(4), 667-678.
- [287] Savage, M. J., Holder, D. J., Wu, G., Kaplow, J., Siuciak, J. A., & Potter, W. Z. (2015). Soluble BACE-1 activity and sA β PP β concentrations in Alzheimer's disease and age-matched healthy control cerebrospinal fluid from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative-1 baseline cohort. *Journal of Alzheimer's Disease*, *46*(2), 431-440.
- [288] Hartl, D., Gu, W., Mayhaus, M., Pichler, S., Schöpe, J., Wagenpfeil, S., & Riemenschneider, M. (2015). Amyloid- β protein precursor cleavage products in postmortem ventricular cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Journal of Alzheimer's Disease*, *47*(2), 365-372.

- [289] Portelius, E., Brinkmalm, G., Tran, A., Andreasson, U., Zetterberg, H., Westman-Brinkmalm, A., ... & Öhrfelt, A. (2010). Identification of novel N-terminal fragments of amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid. *Experimental neurology*, 223(2), 351-358.
- [290] Vella, L. J., & Cappai, R. (2012). Identification of a novel amyloid precursor protein processing pathway that generates secreted N-terminal fragments. *The FASEB Journal*, 26(7), 2930-2940.
- [291] Zhang, H., Ma, Q., Zhang, Y. W., & Xu, H. (2012). Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *Journal of Neurochemistry: REVIEW*, 120, 9-21.
- [292] van Waalwijk van Doorn, L. J., Koel-Simmelink, M. J., Haußmann, U., Klafki, H., Struyfs, H., Linning, P., ... & Scheltens, P. (2016). Validation of soluble amyloid- β precursor protein assays as diagnostic CSF biomarkers for neurodegenerative diseases. *Journal of neurochemistry*, 137(1), 112-121.
- [293] Padovani, A., Pastorino, L., Borroni, B., Colciaghi, F., Rozzini, L., Monastero, R., ... & Cottini, E. (2001). Amyloid precursor protein in platelets: a peripheral marker for the diagnosis of sporadic AD. *Neurology*, 57(12), 2243-2248.
- [294] Janssen, L., Sobott, F., De Deyn, P. P., & Van Dam, D. (2015). Signal loss due to oligomerization in ELISA analysis of amyloid-beta can be recovered by a novel sample pre-treatment method. *MethodsX*, 2, 112-123.
- [295] Palmert, M. R., Golde, T. E., Cohen, M. L., Kovacs, D. M., Tanzi, R. E., Gusella, J. F., ... & Younkin, S. G. (1988). Amyloid protein precursor messenger RNAs: differential expression in Alzheimer's disease. *Science*, 241(4869), 1080-1084.
- [296] Farnsworth, B., Peuckert, C., Zimmermann, B., Jazin, E., Kettunen, P., & Emilsson, L. S. (2016). Gene Expression of Quaking in Sporadic Alzheimer's Disease Patients is Both Upregulated and Related to Expression Levels of Genes Involved in Amyloid Plaque and Neurofibrillary Tangle Formation. *Journal of Alzheimer's Disease*, 53(1), 209-219.
- [297] Clark, A. W., Krekoski, C. A., Parhad, I. M., Liston, D., Julien, J. P., & Hoar, D. I. (1989). Altered expression of genes for amyloid and cytoskeletal proteins in Alzheimer cortex. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 25(4), 331-339.
- [298] Tharp, W. G., Lee, Y. H., Greene, S. M., Vincelle, E., Beach, T. G., & Pratley, R. E. (2012). Measurement of Altered A β PP Isoform Expression in Frontal Cortex of Patients with Alzheimer's Disease by Absolute Quantification Real-Time PCR. *Journal of Alzheimer's Disease*, 29(2), 449-457.
- [299] Johnson, S. A., Pasinetti, G. M., May, P. C., Ponte, P. A., Cordell, B., & Finch, C. E. (1988). Selective reduction of mRNA for the β -amyloid precursor protein that lacks a Kunitz-type protease inhibitor motif in cortex from Alzheimer brains. *Experimental neurology*, 102(2), 264-268.
- [300] Jacobsen, J. S., Blume, A. J., & Vitek, M. P. (1991). Quantitative measurement of alternatively spliced amyloid precursor protein mRNA expression in Alzheimer's disease and normal brain by S1 nuclease protection analysis. *Neurobiology of aging*, 12(5), 585-592.

- [301] Tanaka, S., Nakamura, S., Ueda, K., Kameyama, M., Shiojiri, S., Takahashi, Y., ... & Ito, H. (1988). Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications*, 157(2), 472-479.
- [302] Preece, P., Virley, D. J., Costandi, M., Coombes, R., Moss, S. J., Mudge, A. W., ... & Cairns, N. J. (2004). Amyloid precursor protein mRNA levels in Alzheimer's disease brain. *Molecular brain research*, 122(1), 1-9.
- [303] Sáez-Valero, J., Sberna, G., McLean, C. A., & Small, D. H. (1999). Molecular isoform distribution and glycosylation of acetylcholinesterase are altered in brain and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 72(4), 1600-1608.
- [304] Bustos, V., Pulina, M. V., Kelahmetoglu, Y., Sinha, S. C., Gorelick, F. S., Flajolet, M., & Greengard, P. (2017). Bidirectional regulation of A β levels by Presenilin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(27), 7142-7147.
- [305] González, A. E., Muñoz, V. C., Cavieres, V. A., Bustamante, H. A., Cornejo, V. H., Januário, Y. C., ... & Hay, R. T. (2017). Autophagosomes cooperate in the degradation of intracellular C-terminal fragments of the amyloid precursor protein via the MVB/lysosomal pathway. *The FASEB Journal*, 31(6), 2446-2459.
- [306] Evrard, C., Kienlen-Campard, P., Opsomer, R., Tasiaux, B., Octave, J. N., Buée, L., ... & Vingtdeux, V. (2018). Contribution of the endosomal-lysosomal and proteasomal systems in Amyloid-beta Precursor Protein derived fragments processing. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 435.
- [307] Haytural, H., Lundgren, J. L., Köse, T. B., Jordà-Siquer, T., Kalcheva, M., Seed Ahmed, M., ... & Frykman, S. (2019). Non-specific detection of a major western blotting band in human brain homogenates by a multitude of amyloid precursor protein antibodies. *Frontiers in aging neuroscience*, 11, 273.
- [308] Wang, H., Sang, N., Zhang, C., Raghupathi, R., Tanzi, R. E., & Saunders, A. (2015). Cathepsin L mediates the degradation of novel APP C-terminal fragments. *Biochemistry*, 54(18), 2806-2816.
- [309] García-Ayllón, M. S., Campanari, M. L., Brinkmalm, G., Rábano, A., Alom, J., Saura, C. A., ... & Sáez-Valero, J. (2013). CSF Presenilin-1 complexes are increased in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica communications*, 1(1), 46.
- [310] Baskin, F., Rosenberg, R. N., & Greenberg, B. D. (1991). Increased release of an amyloidogenic C-terminal Alzheimer amyloid precursor protein fragment from stressed PC-12 cells. *Journal of neuroscience research*, 29(1), 127-132.
- [311] Sharples, R. A., Vella, L. J., Nisbet, R. M., Naylor, R., Perez, K., Barnham, K. J., ... & Hill, A. F. (2008). Inhibition of γ -secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes. *The FASEB Journal*, 22(5), 1469-1478.
- [312] Vingtdeux, V., Hamdane, M., Loyens, A., Gelé, P., Drobeck, H., Bégard, S., ... & Sergeant, N. (2007). Alkalizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. *Journal of Biological Chemistry*, 282(25), 18197-18205.

- [313] Haass, C., Koo, E. H., Mellon, A., Hung, A. Y., & Selkoe, D. J. (1992). Targeting of cell-surface β -amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*, 357(6378), 500.
- [314] Lauritzen, I., Pardossi-Piquard, R., Bourgeois, A., Pagnotta, S., Biferi, M. G., Barkats, M., ... & Checler, F. (2016). Intraneuronal aggregation of the β -CTF fragment of APP (C99) induces A β -independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta neuropathologica*, 132(2), 257-276.
- [315] Gandhi, S., Refolo, L. M., & Sambamurti, K. (2004). Amyloid precursor protein compartmentalization restricts β -amyloid production. *Journal of Molecular Neuroscience*, 24(1), 137-143.
- [316] Alzтивista (2018). Escala de Deterioro Global. *Alzтивista Alzheimer*. Disponible en <https://alzтивista.wordpress.com/2018/01/26/escala-de-deterioro-global/>. Consultado el 20 de abril de 2019.
- [317] Lanoiselée, H. M., Nicolas, G., Wallon, D., Rovelet-Lecrux, A., Lacour, M., Rousseau, S., ... & Quillard-Muraine, M. (2017). APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: a genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS medicine*, 14(3), e1002270.
- [318] Li, Q., Wang, B. L., Sun, F. R., Li, J. Q., Cao, X. P., & Tan, L. (2018). The role of UNC5C in Alzheimer's disease. *Annals of translational medicine*, 6(10).
- [319] Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeва, E., Majounie, E., ... & Hazrati, L. (2013). TREM2 variants in Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 368(2), 117-127.
- [320] Bis, J. C., Jian, X., Kunkle, B. W., Chen, Y., Hamilton-Nelson, K. L., Bush, W. S., ... & Marcora, E. (2018). Whole exome sequencing study identifies novel rare and common Alzheimer's-associated variants involved in immune response and transcriptional regulation. *Molecular psychiatry*, 1-17.
- [321] Logue, M. W., Schu, M., Vardarajan, B. N., Farrell, J., Bennett, D. A., Buxbaum, J. D., ... & Goate, A. (2014). Two rare AKAP9 variants are associated with Alzheimer's disease in African Americans. *Alzheimer's & Dementia*, 10(6), 609-618.
- [322] Kunkle, B. W., Grenier-Boley, B., Sims, R., Bis, J. C., Naj, A. C., Boland, A., ... & Frizatti, A. (2018). Meta-analysis of genetic association with diagnosed Alzheimer's disease identifies novel risk loci and implicates Abeta, Tau, immunity and lipid processing. *bioRxiv*, 294629.
- [323] Kim, M., Suh, J., Romano, D., Truong, M. H., Mullin, K., Hooli, B., ... & Moir, R. D. (2009). Potential late-onset Alzheimer's disease-associated mutations in the ADAM10 gene attenuate α -secretase activity. *Human molecular genetics*, 18(20), 3987-3996.
- [324] Jakobsdottir, J., van der Lee, S. J., Bis, J. C., Chouraki, V., Li-Kroeger, D., Yamamoto, S., ... & DeStefano, A. L. (2016). Rare functional variant in TM2D3 is associated with late-onset Alzheimer's disease. *PLoS genetics*, 12(10), e1006327.
- [325] Sims, R., Van Der Lee, S. J., Naj, A. C., Bellenguez, C., Badarinarayan, N., Jakobsdottir, J., ... & Martin, E. R. (2017). Rare coding variants in PLAG2, ABI3, and TREM2 implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nature genetics*, 49(9), 1373.

- [326] Lambert, J. C., Ibrahim-Verbaas, C. A., Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., ... & Grenier-Boley, B. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature genetics*, *45*(12), 1452.
- [327] Naj, A. C., Jun, G., Beecham, G. W., Wang, L. S., Vardarajan, B. N., Buross, J., ... & Larson, E. B. (2011). Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nature genetics*, *43*(5), 436.
- [328] Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J. C., Carrasquillo, M. M., ... & Dowzell, K. (2011). Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics*, *43*(5), 429.
- [329] Cruchaga, C., Karch, C. M., Jin, S. C., Benitez, B. A., Cai, Y., Guerreiro, R., ... & Jeng, A. T. (2014). Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. *Nature*, *505*(7484), 550.
- [330] Jonsson, T., Atwal, J. K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P. V., & Bjornsson, S. Jo nsson EG, Palotie A, Behrens TW, Magnusson OT, Kong A, Thorsteinsdottir U, Watts RJ, Stefansson K. 2012. A mutation in APP protects against alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*, *488*, 96-99.
- [331] Jun, G. R., Chung, J., Mez, J., Barber, R., Beecham, G. W., Bennett, D. A., ... & Cruchaga, C. (2017). Transethnic genome-wide scan identifies novel Alzheimer's disease loci. *Alzheimer's & Dementia*, *13*(7), 727-738.
- [332] Liu, J. Z., Erlich, Y., & Pickrell, J. K. (2017). Case-control association mapping by proxy using family history of disease. *Nature genetics*, *49*(3), 325.
- [333] Mez, J., Chung, J., Jun, G., Kriegel, J., Bourlas, A. P., Sherva, R., ... & Byrd, G. S. (2017). Two novel loci, COBL and SLC10A2, for Alzheimer's disease in African Americans. *Alzheimer's & Dementia*, *13*(2), 119-129.
- [334] Ruiz, A., Heilmann, S., Becker, T., Hernández, I., Wagner, H., Thelen, M., ... & Harold, D. (2014). Follow-up of loci from the International Genomics of Alzheimer's Disease Project identifies TRIP4 as a novel susceptibility gene. *Translational psychiatry*, *4*(2), e358.
- [335] Jun, G., Ibrahim-Verbaas, C. A., Vronskaya, M., Lambert, J. C., Chung, J., Naj, A. C., ... & Harold, D. (2016). A novel Alzheimer disease locus located near the gene encoding tau protein. *Molecular psychiatry*, *21*(1), 108.