



www.neurobiomarcadores.com

MÓDULO 6

Biomarcadores en investigación básica y la tecnología de 'single molecule array' (SIMOA)

Lección 1

Investigación traslacional y biomarcadores emergentes en la enfermedad de Alzheimer

Dr. Estibaliz Capetillo González de Zárate

Departamento de Neurociencias, Facultad de Farmacia,
Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa.
Achucarro Basque Center for Neuroscience Fundazioa, Parque Científico UPV/EHU, Leioa

1. Introducción

El diagnóstico definitivo de la enfermedad de Alzheimer (EA) se realiza histopatológicamente *post mortem* y se caracteriza por los depósitos de los agregados del péptido β -amiloide ($A\beta$) en las denominadas placas seniles y por los ovillos neurofibrilares (*neurofibrillary tangles* -NFT-) debido a la acumulación de la proteína tau hiperfosforilada. El diagnóstico de la EA se basa en síntomas clínicos, evaluación cognitiva y otras causas de la demencia. Mientras que los valores de biomarcadores en el líquido cefalorraquídeo (LCR) ($A\beta$ 1-42, tau total y tau fosforilada) indican el estado de la enfermedad, la tomografía por emisión de positrones (*positron emission tomography* -PET-) de $A\beta$ y de tau pueden monitorizar los cambios patológicos en pacientes vivos con EA.

Según la hipótesis de la cascada de $A\beta$, la acumulación de formas agregadas de $A\beta$ inducen neurotoxicidad y degeneración⁽¹⁾; lo que la cuantificación de la deposición de $A\beta$ por PET o de los niveles de $A\beta$ 1-42 en el LCR en personas vivas se pueden considerar indicadores de la EA.

El uso de técnicas de imagen y biomarcadores del LCR proporciona evidencia objetiva de la neuropatología subyacente del deterioro cognitivo y las características de los biomarcadores del LCR en EA correlacionan estrechamente con las medidas en modalidades de imagen, incluidas la resonancia magnética (RM) y la PET –revisado en⁽²⁾–.

En 2018, se publicaron las últimas directrices del National Institute on Aging y la Alzheimer's Association (NIA-AA) americanos, que establecieron el marco de investigación para el diagnóstico de EA, que consiste en los depósitos de $A\beta$ (A), la patología tau (T) y neurodegeneración o lesión neuronal (N)⁽³⁾ (**Figura 1**). Según la clasificación ATN, si el único biomarcador que se evidencia anormal es $A\beta$, se asignaría biológicamente como “cambio patológico de Alzheimer”; si el biomarcador que se evidencia anómalo es tau y/o de neurodegeneración sin $A\beta$, la anormalidad se asignaría como “cambio patológico no relacionado con el Alzheimer”. Si ambos son anómalos y se observa patología $A\beta$ y tau, al individuo se le puede asignar como “enfermedad de Alzheimer”, y un individuo puede ser asignado biológicamente como “Alzheimer y sospecha concomitante con cambios patológicos no asociados a Alzheimer” cuando se observan tanto la anomalía $A\beta$ como la neurodegeneración⁽³⁾. Por lo tanto, la ausencia de anomalía de $A\beta$ en el análisis de biomarcadores puede hacer referencia a enfermedades neurodegenerativas distintas del

Alzheimer, como la demencia con cuerpos de Lewy y la demencia frontotemporal. Este diagnóstico de la EA se basa en biomarcadores de neuroimagen y en el LCR (**Figura 1**).

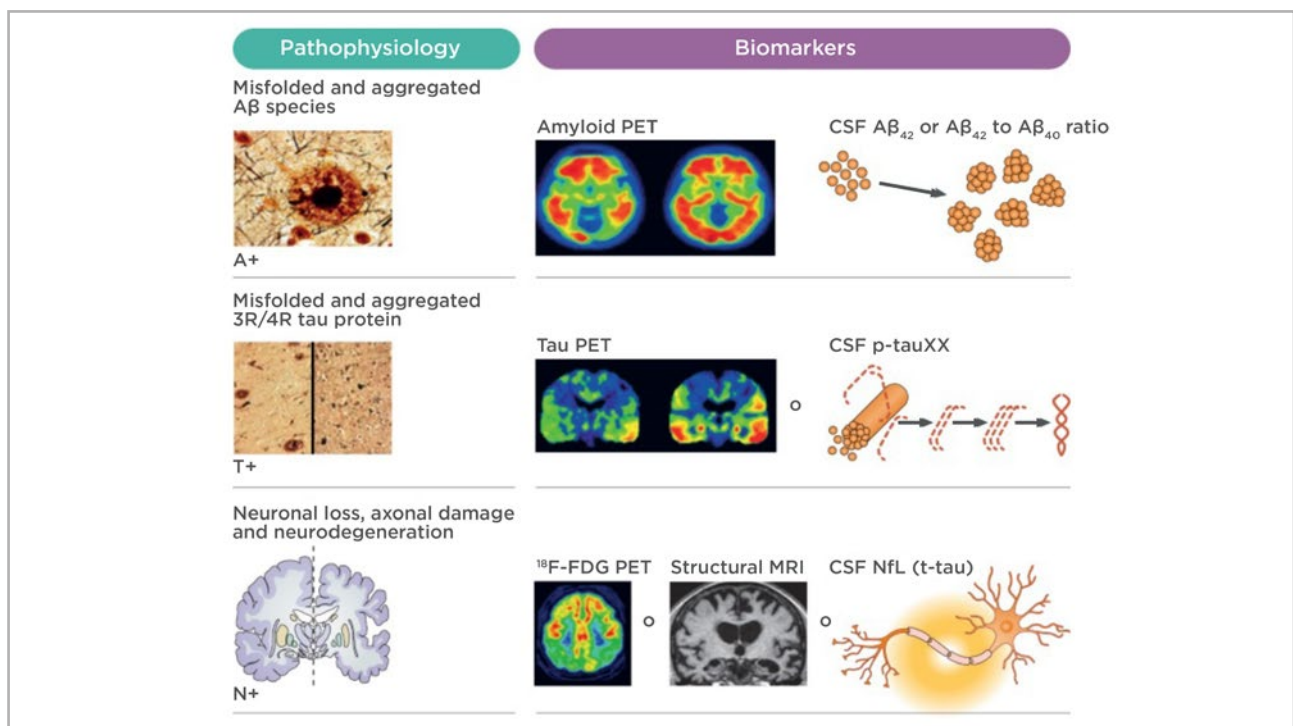


Figura 1. Sistema de clasificación ATN en el marco de la investigación de la enfermedad de Alzheimer (EA). La patofisiología de la EA consiste en los depósitos de especies de Aβ agregada (A+), la patología tau representada por las formas de tau agregadas y con un plegamiento anómalo (T+) y neurodegeneración, degeneración axonal y pérdida neuronal (N+). Los biomarcadores para la detección de la patología asociada al Aβ (A+) son la tomografía por emisión de positrones (PET) de amiloide y los niveles anómalos de distintas especies de Aβ en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Los biomarcadores para la detección de la patología asociada a tau (T+) son la PET de tau o los niveles anómalos de distintas especies de tau fosforilada en LCR. Finalmente, los biomarcadores para la detección de la patología asociada a la neurodegeneración (N+) son el PET de F-FDG, la resonancia o los niveles de neurofilamento (NfL) o tau total en LCR. Adaptado de Hampel H, Cummings J, Blennow K, Gao P, Jack CR, Vergallo A. Developing the ATX(N) classification for use across the Alzheimer disease continuum. Nat Rev Neurol. 2021;17(9):580-9. PMID: 34239130.

El gran progreso en los desarrollos tecnológicos incrementando la sensibilidad y/o especificidad de los ensayos ha permitido el avance de la cuantificación de estos biomarcadores tanto en LCR como su detección en sangre. Actualmente, entre las tecnologías más relevantes para medir biomarcadores en sangre se encuentra

la tecnología ultrasensible SIMOA (Tabla 1). Mediante el uso de estas tecnologías novedosas, se han detectado varios biomarcadores en sangre asociados a la clasificación ATN que podrían facilitar el diagnóstico precoz de los pacientes con la EA⁽⁴⁾. Así, aunque los biomarcadores actuales para el diagnóstico de EA se basan en neuroimagen y evaluación del LCR, existen algunas limitaciones, como la invasividad de la punción lumbar para la recolección del LCR, menor accesibilidad y coste de las imágenes de PET. Debido a estas limitaciones, los biomarcadores basados en sangre aportarían varias ventajas, como ser menos invasivos, más accesibles y rentables.

Técnica	Características
ELISA	- La concentración de proteínas se mide mediante pares de anticuerpos (captura y detección) capaces de capturar específicamente el analito de interés en los pocillos de una placa y generar inmunocomplejos de tipo sándwich (anticuerpo de captura-analito-anticuerpo de detección) - El anticuerpo de detección está marcado con una enzima que cataliza la conversión de un sustrato en un producto, lo que genera fluorescencia o un cambio de color proporcional a la cantidad de analito dentro de la muestra (rango de nmol/L o pmol/L)
Inmunoensayos de electroquimioluminiscencia	- Basado en anticuerpos, similar a ELISA - El anticuerpo de detección se marca con una molécula electroquímicamente activa que genera una señal de electroquimioluminiscencia que es proporcional a la cantidad de analito dentro de la muestra - Tecnología más sensible que ELISA y requiere menos pasos de lavado, pero esto provoca cierta pérdida de la señal del indicador
SIMOA	- Basado en anticuerpos, similar a ELISA - Los inmunocomplejos de tipo sándwich se acoplan a bolas magnéticas en lugar de a una placa sólida - Cada bola individual se carga en su propio pocillo individual con el sustrato correspondiente y, a continuación, se genera una señal de fluorescencia - El volumen muy bajo de los pocillos (alrededor de 40 fL) asegura una alta concentración local de señal fluorescente, lo que permite la detección de moléculas individuales - Técnica que puede medir proteínas en concentraciones muy bajas (rango fmol/L) - Sensibilidad de 100 a 1.000 veces mayor que ELISA
Espectrometría de masas por inmunoprecipitación	- Los anticuerpos acoplados a bolas se utilizan para aislar el analito de interés de las muestras - El analito se cuantifica mediante espectrometría de masas
Sensor inmunoinfrarrojo	- Detectar cambios estructurales en las proteínas (por ejemplo, plegamiento incorrecto de proteínas) - Detectar cambios en la estructura secundaria de los péptidos β amiloides

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

Tabla 1. Tecnologías comúnmente utilizadas para mediciones de biomarcadores en sangre.

Existe una gran necesidad de un diagnóstico adecuado y preciso acerca de la EA, porque va más allá de proporcionar información diagnóstica y pronóstica sobre la enfermedad al clínico y al paciente. Un paso aún más crítico será proporcionar la atención adecuada y estrategias de tratamiento u oportunidades para participar en ensayos clínicos. La etiología subyacente y el patrón espaciotemporal (es decir, el estadio de la enfermedad y la región donde se encuentra la patología) son difíciles de determinar sin biomarcadores bioquímicos y de imagen; por lo tanto, la identificación de biomarcadores de la EA para apoyar el diagnóstico clínico es tan esencial como una estrategia terapéutica.

En esta lección describimos los biomarcadores centrales de la EA, así como los biomarcadores emergentes detectados en LCR y sangre que son actualmente novedosos.



2. Biomarcadores de referencia de la enfermedad de Alzheimer ($A\beta$, tau)

El $A\beta$ como componente principal de las placas extracelulares y la proteína tau hiperfosforilada (p-tau) como componente de los ovillos neurofibrilares se consideran los biomarcadores centrales y de referencia de la EA.

2.1. Péptido β -amiloide en líquido cefalorraquídeo y plasma

El péptido $A\beta$ es el resultado del procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP), una glicoproteína transmembrana que lleva a cabo una amplia gama de funciones biológicas en el sistema nervioso central (SNC). El péptido $A\beta$ tiene una longitud de entre 37 y 49 aminoácidos, siendo el mayoritario el $A\beta$ de 40 aminoácidos ($A\beta_{40}$). Sin embargo, son los monómeros de $A\beta_{42}$ los que mayoritariamente tienden a agregarse debido a su estructura, formando oligómeros que darán lugar a protofibras y fibrillas, y eventualmente generarán placas seniles. Las especies oligoméricas de $A\beta$, resultantes de la agregación de monómeros de $A\beta$, causan efectos neurotóxicos.

Los pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL) muestran niveles de $A\beta_{42}$ reducidos en el LCR años antes de la conversión a EA con demencia y permanecen bajos a lo largo del curso de la enfermedad ⁽⁴⁾. Los niveles bajos de $A\beta_{42}$ en el LCR correlacionan estrechamente con la carga $A\beta$ en la neocorteza y en el hipocampo en estudios *post mortem*, así como con la deposición de $A\beta$ cortical medida por PET. Así, la reducción en los niveles de $A\beta_{42}$ en LCR probablemente sea el resultado de la retención selectiva de $A\beta_{42}$ en las placas de $A\beta$. Sin embargo, es el valor de la proporción de $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ en el LCR lo que mejora la predicción de la deposición de $A\beta$ cortical y permite la diferenciación entre EA y otras demencias en comparación con la medida solo de $A\beta_{42}$, probablemente debido a una normalización de las diferencias interindividuales en $A\beta$ y su liberación al LCR –revisado en ⁽⁴⁾–.

La implementación de tecnología avanzada, como la espectrometría de masas y los inmunoensayos ultrasensibles como el SIMOA, está mostrando resultados

prometedores para la detección de A β en sangre. Recientemente, se ha publicado que la proporción de A β 42/40 en sangre puede identificar niveles anómalos de amiloide en LCR o PET en el continuo de la EA, con una precisión que oscila entre el 82 y el 97% para ensayos de espectrometría de masas y entre el 62 y el 79% para inmunoensayos. El rendimiento es aún mejor en aquellos con demencia que en aquellos con DCL y mejoró después de la corrección de los portadores del alelo APOE ϵ 4.

Así, en las formas esporádicas de la EA, en consonancia con los datos de A β en LCR o por PET, los niveles bajos de A β 42/40 o la presencia de A β 1-42 agregado en sangre se asocian con deterioro cognitivo y riesgo de progresión a la EA entre personas cognitivamente sanas, personas con deterioro cognitivo subjetivo o personas con DCL –revisado en ⁽⁴⁾–.

Sin embargo, al contrario que en las formas esporádicas de la EA, en las formas genéticas de la EA, tanto en portadores de las mutaciones autosómicas dominantes y en individuos con síndrome de Down, los niveles de A β 1-42 en sangre parecen estar elevados y la concentración de A β 1-42 y la ratio A β 42/40 no correlacionan con los niveles en el LCR –revisado en ⁽⁴⁾–.

2.2. Proteína tau hiperfosforilada

Tau es una proteína asociada a microtúbulos y el componente principal de los NFT. Tau sigue muchas modificaciones postraduccionales, incluida la fosforilación, con más de 40 lugares de fosforilación. El equilibrio entre la fosforilación y la desfosforilación de tau regula el transporte axonal a través de los microtúbulos. En condiciones patológicas, la hiperfosforilación de tau da lugar a cambios conformacionales que permiten su agregación y la formación de los NFT.

El aumento en los niveles de t-tau y p-tau en el LCR parece reflejar aumento de la secreción de tau total y fosforilado de las neuronas afectadas por la EA. Los trabajos más recientes se están centrando en el estudio de p-tau en plasma, pero esto todavía es un reto debido a su baja concentración y la dificultad para detectarla. La evaluación de los biomarcadores plasmáticos de ATN (A β 42/40, p-tau217 y cadena ligera de neurofilamentos –NfL–) ha mostrado resultados prometedores en la mejora de la predicción del deterioro cognitivo en poblaciones de ancianos sin deterioro cognitivo ⁽⁵⁾ ⁽⁶⁾, sugiriendo que la detección de A β 42/40 y p-tau217



como biomarcadores en plasma podrían ser ventajosa en la práctica clínica, la investigación y el desarrollo de fármacos como marcadores de pronóstico de futura patología de la EA. Además, p-tau181 correlaciona significativamente con el A β cerebral y la PET de fluorodesoxiglucosa (FDG-PET), y podría usarse como un biomarcador predictivo para la fisiopatología del Alzheimer ⁽⁷⁾. Los niveles de p-tau181 en plasma correlacionan significativamente con los de p-tau181 en el LCR en la demencia de tipo Alzheimer ⁽⁸⁾. También, p-tau181, p-tau217 y NfL en plasma están asociados con el diagnóstico patológico y clínico, por lo que se ha sugerido su uso en la futura preselección de diagnósticos clínicos en la EA ⁽⁹⁾. Entre estos, p-tau217 en plasma tiene una precisión diagnóstica significativamente mayor para la EA clínica que p-tau181 y NfL en plasma, pero no ha mostrado una distinción significativa con p-tau en LCR ni con la PET de tau ⁽⁶⁾.

Una buena correlación de los biomarcadores en sangre y los biomarcadores centrales y de referencia en el LCR y/o de imagen cerebral garantizará de forma sólida el diagnóstico y el pronóstico de la EA.

3. Otras proteínas como biomarcadores asociados a la enfermedad de Alzheimer

3.1. Neurodegeneración (cadena ligera de neurofilamentos)

La NfL es una proteína de andamiaje axonal. Los neurofilamentos son esenciales tanto para el crecimiento como para la estabilidad de los axones y también para la organización y la función sináptica en el SNC. La NfL ha sido clasificada como una alternativa “N” en el marco “ATN”. Los avances tecnológicos como el desarrollo de la tecnología ultrasensible SIMOA han permitido medir la concentración de NfL en muestras de sangre. La NfL plasmática elevada puede anticipar la neurodegeneración cerebral, que aumenta y se correlaciona con la futura atrofia, hipometabolismo y deterioro cognitivo ^{(2) (4)}. De este modo, la NfL en plasma podría considerarse un biomarcador en sangre para la detección y el seguimiento de la neurodegeneración en la EA.

Cabe señalar que el aumento de NfL periférica en la sangre y en el LCR no es específico de la EA y todavía se desconocen los mecanismos asociados a su liberación y tráfico desde el SNC a la sangre periférica. Los resultados más relevantes obtenidos mediante la tecnología SIMOA en relación con la NfL como biomarcador en sangre se describen en detalle en la lección 3 de este módulo.

3.2. Biomarcadores gliales

Las neuronas no pueden sobrevivir sin el apoyo de las células gliales y se han sugerido varios biomarcadores de la EA en el LCR y la sangre que se originan a partir de células gliales.

3.2.1. Biomarcadores asociados a los astrocitos

Los astrocitos son un tipo de célula glial del SNC con funciones diversas y vitales, incluidas la participación en la modulación de la actividad neuronal y la

transmisión sináptica, la sinaptogénesis, la homeostasis de iones, el control de la barrera hematoencefálica (*blood-brain barrier* -BBB-) y la comunicación inter- e intracelular.

En situaciones patológicas como en la EA, los astrocitos sufren una serie de alteraciones morfológicas y funcionales que dan lugar a lo que se denominan astrocitos reactivos. Los astrocitos reactivos sobreexpresan proteínas específicas que pueden ser liberadas en el compartimento extracelular, que posteriormente se pueden medir en el LCR de individuos vivos. Entre los biomarcadores más relevantes indicadores de la reactividad de los astrocitos en el LCR se encuentran la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y la proteína 1 similar a quitinasa-3 (YKL-40) **(Figura 2)** -revisado en ⁽¹⁰⁾-.

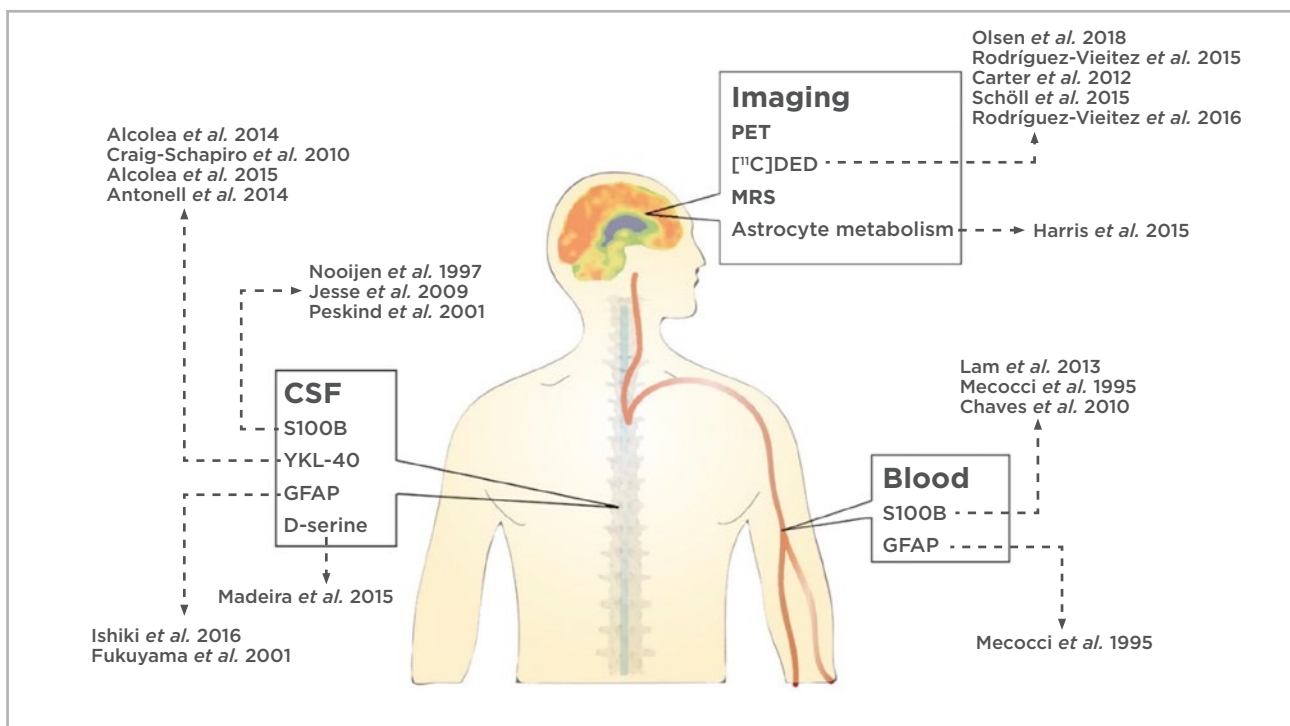


Figura 2. Biomarcadores astrogliales de fluidos e imagen en la enfermedad de Alzheimer (EA). La reactividad de los astrocitos en la EA se puede evaluar mediante biomarcadores de fluidos -sangre (Blood) y líquido cefalorraquídeo (CSF)- y técnicas de neuroimagen: radiotrazadores para tomografía por emisión de positrones (PET) y espectroscopía de resonancia (MRS). En esta lección nos centraremos en la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y la proteína 1 similar a quitinasa-3 (YKL-40). Adaptado de Carter SF ⁽¹⁰⁾.

La GFAP es una proteína del citoesqueleto de los astrocitos que juega un papel importante en la activación y la degeneración astrocítica. Las concentraciones de GFAP en plasma y suero están elevadas en individuos dentro del continuo clínico de la EA y en otras enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple –revisado en ⁽¹⁰⁾–.

Otro biomarcador del LCR es la proteína YKL-40, que se sobreexpresa en un subconjunto de astrocitos en la EA. El papel fisiológico exacto de YKL-40 en el SNC no está claro, pero se cree que está involucrada en la activación del sistema inmunitario innato. En pacientes con la EA, YKL-40 está elevada en el LCR incluso en etapas tempranas y correlaciona con p-tau y t-tau en el LCR –revisado en ⁽¹⁰⁾–.

Un trabajo publicado recientemente indica que los niveles de GFAP en el LCR, además de estar elevados, se asocian con una carga elevada de A β por PET, pero no de tau. Por el contrario, los niveles más altos de YKL-40 en el LCR se asocian con una carga elevada de tau por PET, pero no con una carga de A β . Además, un estudio estructural realizado mediante un modelo ha indicado que GFAP e YKL-40 en el LCR median los efectos de A β y tau, respectivamente, en la atrofia del hipocampo, que se asocia además con el deterioro cognitivo ⁽¹¹⁾. El daño astrocítico podría comenzar durante la etapa presintomática de la EA y se asocia con la carga de amiloide inicialmente.

Sin embargo, hay que indicar que el GFAP podría ser un potencial biomarcador de otros tipos de demencia, porque los astrocitos no solo participan en la fisiopatología de la EA.

3.2.2. Biomarcadores asociados a la microglía

La microglía son las células inmunitarias principales del SNC y juegan un papel fisiológico clave en el mantenimiento de su homeostasis. Son células que están estrechamente relacionadas con la patología amiloide y tau, la neuroinflamación y la sinapsis, y se han propuesto varios biomarcadores que se asocian con la microglía (**Figura 3**).

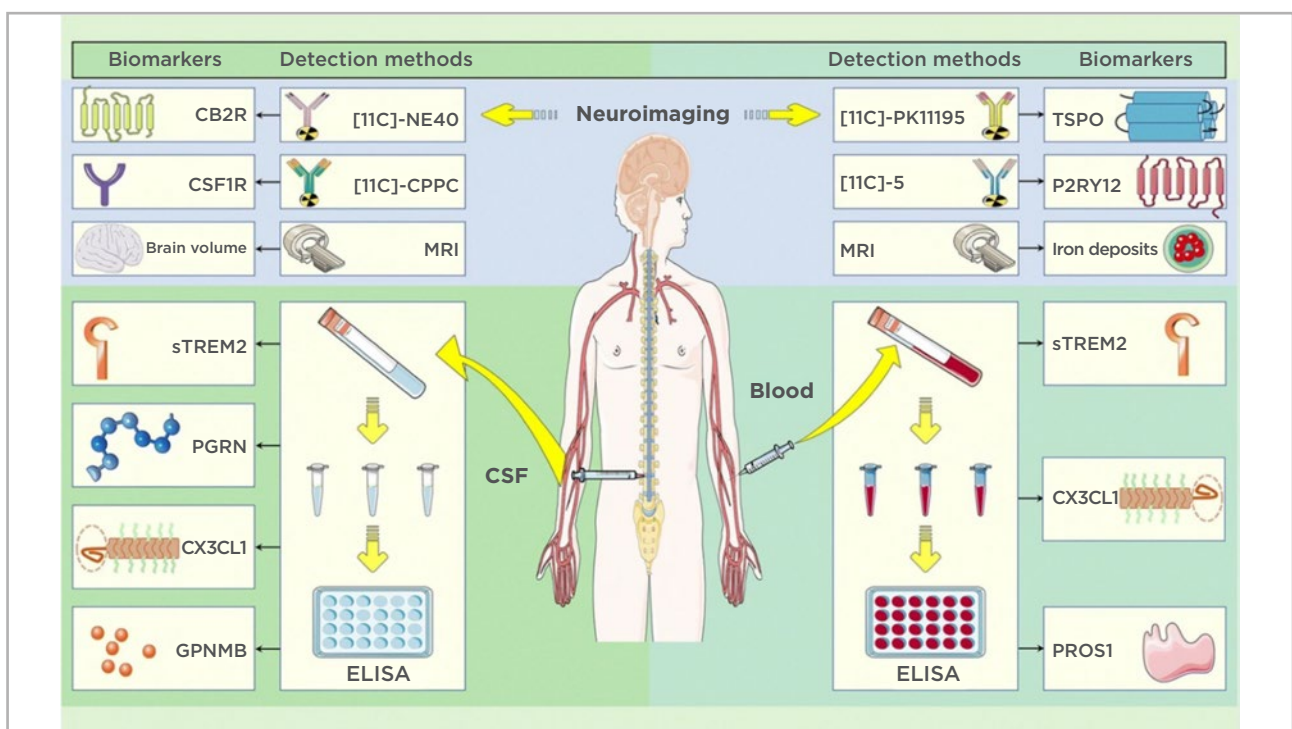


Figura 3. Biomarcadores microgliales de fluidos e imagen en la enfermedad de Alzheimer (EA).

La reactividad de la microglía en la EA se puede evaluar mediante biomarcadores de fluidos (sangre y líquido cefalorraquídeo -LCR-) y técnicas de neuroimagen (tomografía por emisión de positrones -PET- y resonancia magnética -RM-). Los trazadores de PET [11C]-NE40, [11C]-5 y [11C]-CPPC detectan alteraciones en CB2R, P2RY12 y CSF1R, ubicados en la membrana celular externa. [11C]- PK11195 PET detecta alteraciones en TSP0 localizadas en el exterior de la membrana mitocondrial. Los depósitos de hierro y el cambio de volumen cerebral pueden ser detectados por RM. La mayoría de los biomarcadores en sangre y LCR puede ser detectado por ELISA. En esta lección nos centraremos en el receptor desencadenante expresado en las células mieloides 2 (TREM2), en la fractalcina (CX3CL1) y la progranulina (PRGN). Adaptado de Zhang PF ⁽¹²⁾.

Uno de los genes de riesgo de la EA, el receptor desencadenante expresado en las células mieloides 2 (*TREM2*) se expresa principalmente en la superficie de la microglía. La escisión de TREM2 por metaloproteinasa libera TREM2 soluble

(sTREM2), que aumenta en el continuo de la EA, en comparación con controles sanos –revisado en ⁽¹²⁾–. Así, sTREM2 en biofluidos es un biomarcador potencial de la EA que refleja la activación microglial en el cerebro con la EA.

CX3CL1 (también conocida como fractalcina) y progranulina (PRGN) también se han propuesto como otros biomarcadores microgliales de la EA, aunque los resultados son controvertidos. Los cambios en CX3CL1 a lo largo de las etapas de la EA son dinámicos y posiblemente reflejan los distintos roles de la microglía en la progresión de la EA. Dado que el cerebro de la EA tiene baja capacidad lisosomal y autofágica, la elevación de PRGN en la EA puede ser un evento temprano en la progresión de la neuropatología –revisado en ⁽¹²⁾–.

La relevancia clínica de los biomarcadores gliales en la EA debe evaluarse más a fondo y queda por esclarecer la asociación con los criterios de diagnóstico ATN.

3.2.3. Biomarcadores sinápticos

Las sinapsis son el lugar de comunicación cerebral donde la información se transmite entre las neuronas y son imprescindibles para la formación de la memoria. La degeneración sináptica es un evento patológico temprano en la EA que se manifiesta por la reducción de las proteínas pre- y postsináptica, y es lo que mejor se correlaciona con el deterioro cognitivo. La evaluación de las proteínas sinápticas en el LCR, que pueden reflejar disfunción en pacientes con trastornos cognitivos, es un área de gran interés. En la actualidad, la investigación está centrada en la detección de la patología sináptica del LCR para mejorar el diagnóstico de la EA en una etapa temprana, así como para monitorizar la progresión clínica.

Hoy por hoy y asociados a la EA, se han destacado 3 biomarcadores presinápticos, la proteína 43 asociada al crecimiento (GAP-43), la proteína 25 asociada a sinaptosomas (SNAP-25) y la sinaptotagmina-1, y un biomarcador postsináptico, la neurogranina (NGRN) **(Figura 4)** –revisado en ⁽¹³⁾–.

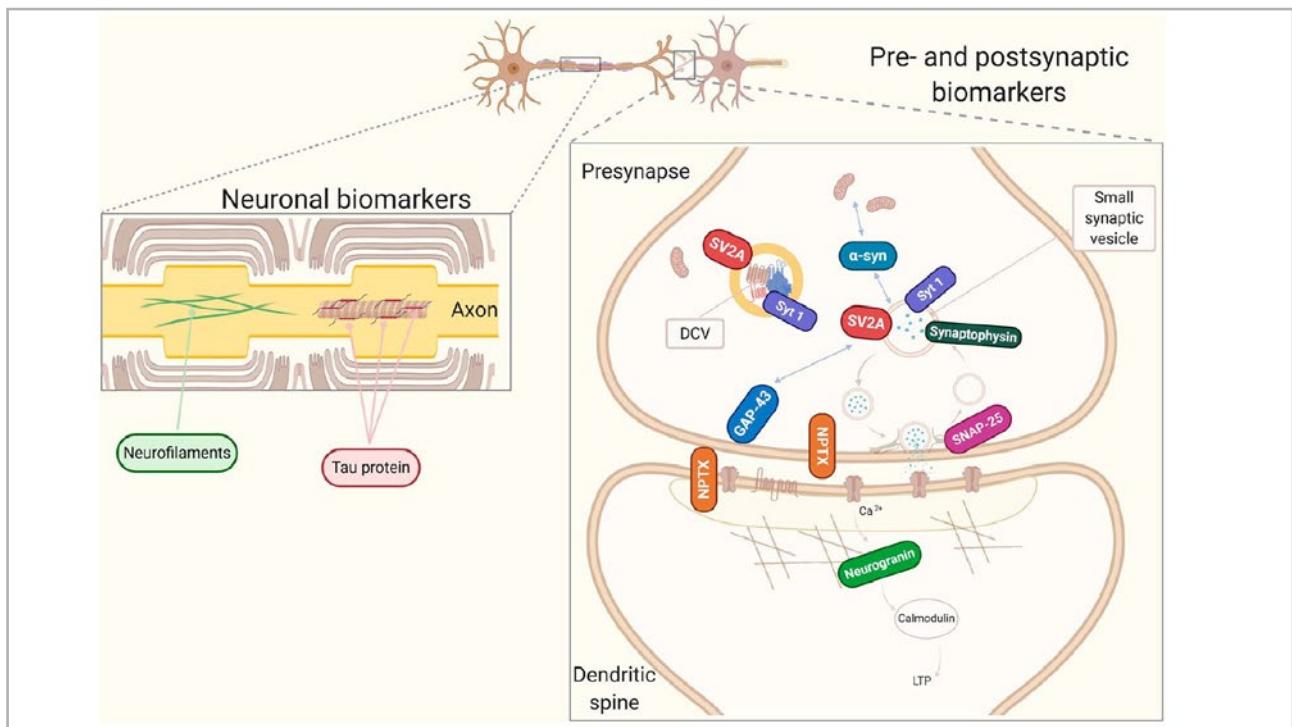


Figura 4. Localización de los biomarcadores sinápticos y neuronales. Los principales biomarcadores presinápticos en estudio son la sinaptotagmina-1 (syt 1), sinaptofisina, proteína asociada a sinaptosomas 25 (SNAP-25), SV2A, la α -sinucleína (α -syn) y proteína 43 asociada al crecimiento (GAP-43). Los biomarcadores postsinápticos en estudio son la neurogranina y las pentraxinas neuronales (NPTX). Dentro de los biomarcadores neuronales se encuentran la proteína tau y los neurofilamentos. En esta lección nos centraremos en GAP-43, SNAP-25 sinaptotagmina-1 y la neurogranina. DCV: vesículas de núcleo denso; LTP: potenciación a largo plazo; NPTX: pentraxina neuronal. Adaptado de Camporesi E ⁽¹³⁾.

La proteína GAP-43 interactúa con la sinaptofisina y SNAP-25, facilitando el reciclaje de vesículas sinápticas. Los niveles de GAP-43 en el LCR aumentan significativamente en pacientes preclínicos y con EA en comparación con controles. Asimismo, los niveles alterados de GAP-43 en el LCR también se han detectado en la esclerosis múltiple progresiva, en inflamación, en accidentes cerebrovasculares y en enfermedad de Parkinson, pero no en demencia frontotemporal -revisado en ⁽¹³⁾-.

La proteína SNAP-25, junto con las proteínas de membrana asociadas a vesículas (VAMP) y sintaxinas, forma los complejos SNARE, que median el anclaje de las vesículas sinápticas a la membrana presináptica, permitiendo así la fusión de vesículas mediada por calcio durante la exocitosis. Se han detectado niveles

elevados de SNAP-25 en el LCR en la EA, incluso en etapas muy tempranas. También se encuentra elevada en pacientes de Parkinson y pacientes con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) esporádica y se ha asociado con varias enfermedades psiquiátricas como trastorno por déficit de atención con hiperactividad, esquizofrenia y trastorno bipolar –revisado en ⁽¹³⁾–.

La sinaptotagmina-1 es una proteína asociada a vesículas que, en respuesta a la unión de calcio a concentraciones elevadas, desencadena la fusión de vesículas presinápticas. Aunque inicialmente se publicó que sus niveles en el LCR podían estar reducidos en la EA, trabajos más recientes confirman que la concentración de sinaptotagmina-1 es significativamente mayor en pacientes con EA y DCL.

La NGRN es una proteína postsináptica que se expresa principalmente en la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala y el cuerpo estriado. Los niveles de NGRN están elevados en el LCR de pacientes con EA en comparación con controles. Este aumento parece ser específico para la EA, ya que el LCR de los pacientes con otras enfermedades neurodegenerativas, a excepción de CJD, no muestran tal aumento. También se ha demostrado que el aumento de la NGRN en el LCR durante la EA prodrómica podría ser predictivo de una progresión más rápida hacia la EA –revisado en ⁽¹³⁾–.

Los biomarcadores sinápticos podrían vincular la degeneración sináptica con el estado cognitivo y el declive del paciente, y podrían implementarse junto con pruebas cognitivas para tener una idea más precisa de los síntomas del paciente, especialmente en las etapas iniciales. Sin embargo, estos biomarcadores no amiloides parecen no ser específicos de la EA y, por lo tanto, son probablemente complementarios de los biomarcadores de referencia de la EA para la determinación de la patología amiloide o de neurodegeneración.

4. Biomarcadores emergentes

4.1. MicroARN

Los microARN (miARN) son pequeños ácidos nucleicos no codificantes (de alrededor de 20 nucleótidos) que son capaces de regular postranscripcionalmente la expresión génica al unirse a secuencias complementarias de ácido ribonucleico mensajero diana (mARN).

Los miARN han despuntado como biomarcadores prometedores, rentables y no invasivos para la EA, ya que pueden detectarse fácilmente en diferentes biofluidos, particularmente en la sangre (como forma libre o dentro de los exosomas). Varios trabajos de investigación han señalado a los miARN como potenciales biomarcadores en sangre (plasma y suero) para la EA y el DCL, y para discriminar entre pacientes con EA y sin EA con alta sensibilidad y especificidad –revisado en (2)–. Se ha propuesto un panel de 12 miARN en sangre que discrimina la EA de otras enfermedades del SNC y permite distinguir entre pacientes con EA y con DCL con una precisión del 76%, que se aproxima al 80% de precisión con p-tau181 en sangre –revisado en (14)–. Además, el miARN-12 podría diferenciar a los individuos sanos de los de EA con una precisión del 93%, una especificidad del 95% y una sensibilidad del 92% –revisado en (14)–.

Sin embargo, aunque los miARN en la circulación periférica reflejan la fisiopatología de la EA y sirven como buenos biomarcadores de EA, recientemente se ha descubierto que también están asociados con otras patologías de la enfermedad (como, por ejemplo, miR-125b y miR-455-3p involucrados en el cáncer) y que existen inconsistencias entre diferentes estudios –revisado en (2)–. La baja cantidad relativa de ARN total de una muestra de sangre, la construcción sesgada de bibliotecas de miARN y la variabilidad del procesamiento de la muestra podrían explicar los resultados inconsistentes que se han obtenido con los miARN descubiertos utilizando las bibliotecas construidas a partir de los resultados de secuenciación de siguiente generación.

A diferencia de los biomarcadores de referencia de la EA, los biomarcadores de miARN en sangre requieren un estudio longitudinal para identificar características comunes y reproducibles antes de convertirse en un biomarcador de EA con validez clínica.

4.2. Exosomas

Los exosomas son un tipo de vesículas extracelulares (VE) pequeñas liberadas por casi todos los tipos de células al espacio extracelular a través de la fusión de la membrana plasmática y cuerpos multivesiculares. Los exosomas cruzan la barrera hematoencefálica sin pérdida de su contenido (mARN, miARN, proteínas y lípidos), llegando así a muchos fluidos biológicos, como la sangre.

Las vesículas extracelulares más estudiadas en sangre han sido las derivadas de neuronas. Se ha descrito que estos exosomas contienen A β 42, t-tau, p-tau181, miARN y proteínas autolisosomales y sinápticas que podrían tener capacidad para predecir el desarrollo de la EA en la etapa preclínica –revisado en⁽²⁾–. Cabe resaltar un metaanálisis realizado recientemente considerando los estudios publicados hasta la fecha, que muestra los biomarcadores derivados de exosomas como potenciales biomarcadores para la EA y el DCL⁽¹⁵⁾.

Sin embargo, la pureza de las VE está siendo cuestionada, ya que el protocolo de aislamiento de VE derivadas de neuronas utiliza anticuerpos anti-L1CAM que también se pueden expresar en otros tejidos más allá del cerebro (por ejemplo en el riñón) y pueden existir tanto en forma transmembrana como soluble –revisado en⁽¹⁶⁾–. Esto podría explicar los resultados contradictorios obtenidos entre estudios.

Teniendo en cuenta el importante valor de los exosomas como biomarcadores, es importante caracterizar la naturaleza exacta de las preparaciones de VE derivadas de neuronas, así como de otros tipos celulares como los distintos tipos de células gliales. Así, es necesario un método estandarizado para el aislamiento y la preparación del fluido biológico, un método optimizado de aislamiento de VE con alta pureza y alto rendimiento, y un buen método analítico para el análisis de biomoléculas en las VE (por ejemplo, miARN y proteínas) para la aplicación clínica de biomarcadores de VE. Por lo tanto, para que los exosomas se puedan convertir en potenciales biomarcadores de la EA en la práctica clínica, es necesario el diseño de estudios estandarizados para su replicación y validación.

4.3. Lípidos

Los lípidos representan un grupo diverso de biomoléculas que están estructural y funcionalmente involucradas en una amplia variedad de procesos celulares y funciones tisulares. El cerebro, después del tejido adiposo, es el órgano con mayor contenido en lípidos. Los lípidos principales del cerebro se pueden categorizar en fosfolípidos, esfingolípidos, glicerolípidos, ácidos grasos y esteroides, donde los fosfolípidos representan ~ 50% del contenido total de lípidos –revisado en ⁽¹⁷⁾–.

Los niveles plasmáticos de colesterol, triglicéridos, esfingolípidos, fosfolípidos y diversos derivados del colesterol están alterados en la EA, lo que los convierte en potenciales biomarcadores de la enfermedad. Se han detectado varios lípidos como posibles biomarcadores, ya que han mostrado una fuerte asociación con los biomarcadores de referencia de EA (por ejemplo, en relación con p-tau/A β 42 en el LCR) y varios estudios del metabolismo sanguíneo han resaltado el papel de los compuestos lipídicos –fosfatidilcolinas (PC), fosfatidilinositoles (PI) y fosfatidiletanolamina (PE)– en la EA preclínica –revisado en ⁽²⁾–. Además, el análisis de paneles de lípidos podría predecir la fenotipo conversión de DCL a EA con una alta precisión y la proporción de PC respecto a lisofosfatidilcolinas en plasma podría diferenciar controles de la EA y el DCL preclínico –revisado en ⁽²⁾–. Sin embargo, la patología que se encuentra detrás de esos lípidos, su origen en el cerebro y la contribución de los lípidos periféricos necesitan ser estudiados en profundidad.

Así, la alteración de los lípidos en sangre se observa en fases tempranas de la EA, lo que podría proporcionar información sobre los procesos bioquímicos implicados en la patogenia de la EA. Los estudios de lípidos plasmáticos como biomarcadores de EA se encuentran en una etapa temprana y es posible que la cuantificación de un panel de lípidos pudiera tener ventajas respecto a las medidas individuales.

4.4. Biomarcadores genéticos

Entre las variantes genéticas asociadas a la EA esporádica, el alelo APOE ϵ 4 es el mayor factor de riesgo genético. Por el contrario, la presencia del alelo ϵ 2 se asocia con el papel protector de ApoE y el alelo ϵ 3 es neutral. Además, el alelo APOE ϵ 4 juega un papel como modulador de la relación entre el A β en plasma y las placas de amiloide en el cerebro. El patrón de expresión de proteínas plasmáticas medidas por inmunoensayos múltiples se diferencia por el genotipo de APOE, lo que puede



indicar la importancia del genotipo APOE en el análisis en sangre de biomarcadores. Por otro lado, el uso de secuenciación de siguiente generación, estudios GWAS recientes o el metaanálisis ha sugerido variantes genéticas adicionales asociadas con la EA. Entre ellas, las variantes genéticas de los genes *ABCA7*, *BIN1*, *CD33*, *CLU*, *CR1*, *EPHA1*, *PICALM* y *TREM2* se han asociado significativamente con la progresión de la EA preclínica⁽¹⁸⁾. El papel de estas variantes genéticas en la patogenia y la progresión en la EA está en estudio –revisado en⁽²⁾–.

El avance en el conocimiento de la función de estos genotipos en la clasificación clínica usando el marco ATN podría aportar información relevante. Es importante resaltar que, de forma similar a lo descrito para los biomarcadores de astrocitos, algunas de las variantes genéticas también muestran asociaciones específicas con los biomarcadores de referencia. Los genotipos de APOE están asociados con la deposición de A β (A) en lugar de la patología tau (T), mientras que los genotipos TREM2 están asociados con la patología tau y son dependientes del estadio en lugar de los depósitos de A β preclínica⁽²⁾⁽¹⁹⁾.

Conclusiones

En esta lección se han descrito los biomarcadores centrales de la EA, así como los biomarcadores emergentes detectados en LCR y sangre que son actualmente novedosos (**Figura 5**). Las conclusiones principales son las siguientes:

- El marco ATN de investigación para el diagnóstico de EA incluye los depósitos de A β (A), la patología tau (T) y la neurodegeneración (N), y se basa en biomarcadores de neuroimagen (PET de A β , tau y FDG) y biomarcadores detectados en el LCR (reducción de A β 42/40 e incremento de p-tau y NfL).
- El incremento de la sensibilidad y/o la especificidad mediante nuevas tecnologías como el SIMOA permite detectar los biomarcadores centrales de la EA en plasma y el estudio de su correlación con los biomarcadores incluidos en los criterios ATN establecidos.
- La identificación de biomarcadores en sangre podría permitir sustituir la evaluación del LCR (técnica invasiva y poco accesible) y la imagen por PET (técnica de alto coste) por la evaluación de la sangre obtenida mediante una extracción de sangre, reduciendo los costes y mejorando la accesibilidad.
- En el cerebro de los pacientes de la EA ocurren cambios asociados con los astrocitos (GFAP y YKL40), la microglía (sTREM2, CX3CL1 y PGRN) y cambios sinápticos, que se perfilan como potenciales biomarcadores tanto en LCR como en plasma.
- Los miARN, los exosomas, los lípidos y las alteraciones genéticas están en estudio como biomarcadores emergentes en LCR y/o plasma, aunque es necesaria una mayor validación y replicación.
- Los resultados muestran que algunos biomarcadores se asocian específicamente con la patología de A β (por ejemplo, GFAP y genotipos de APOE), mientras que otros se asocian más con la patología tau (por ejemplo, YKL40 y los genotipos TREM2).

En conclusión, los avances en la detección de biomarcadores son cruciales, ya que pueden ayudar a comprender los procesos patológicos subyacentes porque diferentes dianas podrían reflejar diferentes mecanismos, ayudando así al diagnóstico.

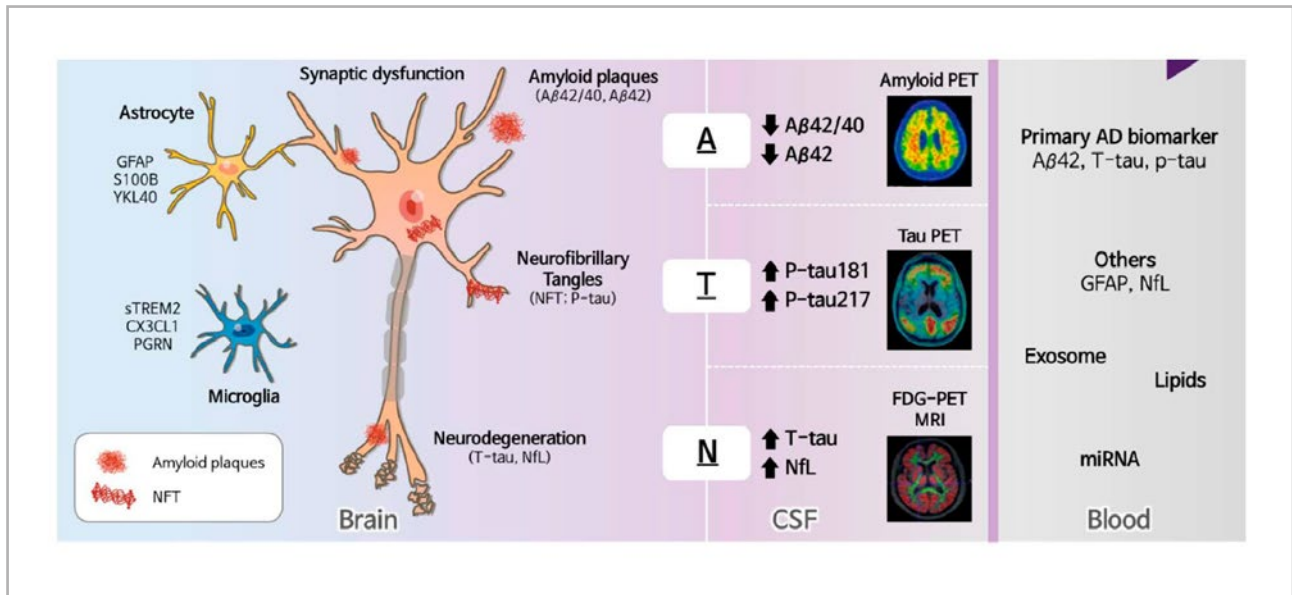


Figura 5. Esquema resumen de los biomarcadores actuales y emergentes de la enfermedad de Alzheimer (EA). Los criterios de diagnóstico actuales para la investigación se basan en el sistema de clasificación ATN, que incluye los biomarcadores centrales y de referencia de la EA. La A representa la histopatología cerebral de las placas de $A\beta$ y tiene la tomografía por emisión de positrones (PET) de $A\beta$ como biomarcador de imagen y la reducción de $A\beta_{42}/40$ en el líquido cefalorraquídeo (LCR) como biomarcador. La T representa la histopatología cerebral asociada a los ovillos neurofibrilares (NFL) por la agregación de tau fosforilada y se detecta en persona vivas mediante la PET de tau y el incremento de p-tau181 y p-tau217. La N representa la neurodegeneración y se detecta por PET de fluorodesoxiglucosa (FDG-PET) e incremento de tau total y neurofilamentos de cadena ligera (NfL). Además de la histopatología central de la EA, las placas y ovillos, en el cerebro de los pacientes de EA ocurren cambios asociados con los astrocitos (GFAP y YKL40), la microglía (sTREM2, CX3CL1 y progranulina -PGRN-) y cambios sinápticos, entre otros. Estos cambios, junto con otros posibles biomarcadores como son los miARN, los exosomas, los lípidos y alteraciones genéticas, están actualmente en estudio como potenciales biomarcadores en LCR y/o plasma. Adaptado de Mankhong S ⁽²⁾.

Bibliografía

1. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 2016 Jun 1;8(6):595-608. [\[Pubmed\]](#)
2. Mankhong S, Kim S, Lee S, Kwak HB, Park DH, Joa KL, Kang JH. Development of Alzheimer's Disease Biomarkers: From CSF- to Blood-Based Biomarkers. *Biomedicines*. 2022 Apr 5;10(4):850. [\[Pubmed\]](#)
3. Jack CR Jr, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al.; Contributors. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018 Apr;14(4):535-62. [\[Pubmed\]](#)
4. Teunissen CE, Verberk IMW, Thijssen EH, Vermunt L, Hansson O, Zetterberg H, et al. Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease: towards clinical implementation. *Lancet Neurol*. 2022 Jan;21(1):66-77. [\[Pubmed\]](#)
5. Pereira JB, Janelidze S, Stomrud E, Palmqvist S, van Westen D, Dage JL, et al. Plasma markers predict changes in amyloid, tau, atrophy and cognition in non-demented subjects. *Brain*. 2021 Oct 22;144(9):2826-36. [\[Pubmed\]](#)
6. Palmqvist S, Janelidze S, Quiroz YT, Zetterberg H, Lopera F, Stomrud E, et al. Discriminative Accuracy of Plasma Phospho-tau217 for Alzheimer Disease vs Other Neurodegenerative Disorders. *JAMA*. 2020 Aug 25;324(8):772-81. [\[Pubmed\]](#)
7. Shen XN, Huang YY, Chen SD, Guo Y, Tan L, Dong Q, Yu JT; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Plasma phosphorylated-tau181 as a predictive biomarker for Alzheimer's amyloid, tau and FDG PET status. *Transl Psychiatry*. 2021 Nov 13;11(1):585. [\[Pubmed\]](#)
8. Tatebe H, Kasai T, Ohmichi T, Kishi Y, Takeya T, Waragai M, et al. Quantification of plasma phosphorylated tau to use as a biomarker for brain Alzheimer pathology: pilot case-control studies including patients with Alzheimer's disease and down syndrome. *Mol Neurodegener*. 2017 Sep 4;12(1):63. [\[Pubmed\]](#)
9. Brickman AM, Manly JJ, Honig LS, Sánchez D, Reyes-Dumeyer D, Lantigua RA, et al. Plasma p-tau181, p-tau217, and other blood-based Alzheimer's disease biomarkers in a multi-ethnic, community study. *Alzheimers Dement*. 2021 Aug;17(8):1353-64. [\[Pubmed\]](#)
10. Carter SF, Herholz K, Rosa-Neto P, Pellerin L, Nordberg A, Zimmer ER. Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Trends Mol Med*. 2019 Feb;25(2):77-95. [\[Pubmed\]](#)
11. Ferrari-Souza JP, Ferreira PCL, Bellaver B, Tissot C, Wang YT, Leffa DT, et al. Astrocyte biomarker signatures of amyloid- β and tau pathologies in Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2022 Nov;27(11):4781-9. [\[Pubmed\]](#)
12. Zhang PF, Hu H, Tan L, Yu JT. Microglia Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*. 2021 Jul;58(7):3388-404. [\[Pubmed\]](#)



13. Camporesi E, Nilsson J, Brinkmalm A, Becker B, Ashton NJ, Blennow K, Zetterberg H. Fluid Biomarkers for Synaptic Dysfunction and Loss. *Biomark Insights*. 2020 Aug 21;15:1177271920950319. [\[Pubmed\]](#)
14. Walgrave H, Zhou L, De Strooper B, Salta E. The promise of microRNA-based therapies in Alzheimer's disease: challenges and perspectives. *Mol Neurodegener*. 2021 Nov 6;16(1):76. [\[Pubmed\]](#)
15. Xing W, Gao W, Lv X, Xu X, Zhang Z, Yan J, et al. The Diagnostic Value of Exosome-Derived Biomarkers in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Meta-Analysis. *Front Aging Neurosci*. 2021 Mar 1;13:637218. [\[Pubmed\]](#)
16. Vaz M, Soares Martins T, Henriques AG. Extracellular vesicles in the study of Alzheimer's and Parkinson's diseases: Methodologies applied from cells to biofluids. *J Neurochem*. 2022 Nov;163(4):266-309. [\[Pubmed\]](#)
17. Yin F. Lipid metabolism and Alzheimer's disease: clinical evidence, mechanistic link and therapeutic promise. *FEBS J*. 2023 Mar;290(6):1420-53. [\[Pubmed\]](#)
18. Kang JH, Korecka M, Figurski MJ, Toledo JB, Blennow K, Zetterberg H, et al.; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative 2 Biomarker Core: A review of progress and plans. *Alzheimers Dement*. 2015 Jul;11(7):772-91. [\[Pubmed\]](#)
19. Suárez-Calvet M, Kleinberger G, Araque Caballero MÁ, Brendel M, Rominger A, Alcolea D, et al. sTREM2 cerebrospinal fluid levels are a potential biomarker for microglia activity in early-stage Alzheimer's disease and associate with neuronal injury markers. *EMBO Mol Med*. 2016 May 2;8(5):466-76. [\[Pubmed\]](#)