

Noelia Fandos Marín

Método de cuantificación de Ab40
y Ab42 en el plasma y aplicación
de los índices Ab42/40 como
posibles biomarcadores de la
enfermedad de Alzheimer

Departamento
Anatomía, Embriología y Genética Animal

Director/es
Sarasa Barrio, Jose Manuel
Pesini Ruíz, Pedro

EXTRACTO

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

El presente documento es un extracto de la tesis original depositada en el Archivo Universitario.

En cumplimiento del artículo 14.6 del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, los autores que puedan verse afectados por alguna de las excepciones contempladas en la normativa citada deberán solicitar explícitamente la no publicación del contenido íntegro de su tesis doctoral en el repositorio de la Universidad de Zaragoza. Las situaciones excepcionales contempladas son:

- Que la tesis se haya desarrollado en los términos de un convenio de confidencialidad con una o más empresas o instituciones.
- Que la tesis recoja resultados susceptibles de ser patentados.
- Alguna otra circunstancia legal que impida su difusión completa en abierto.



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral [Extracto]

MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE AB40 Y AB42
EN EL PLASMA Y APLICACIÓN DE LOS ÍNDICES
AB42/40 COMO POSIBLES BIOMARCADORES DE
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Autor

Noelia Fandos Marín

Director/es

Sarasa Barrio, Jose Manuel
Pesini Ruíz, Pedro

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Anatomía, Embriología y Genética Animal

2018

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Anatomía, Embriología y Genética
Animal**



**Universidad
Zaragoza**

**MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE A β 40 Y A β 42
EN EL PLASMA Y APLICACIÓN DE LOS ÍNDICES
A β 42/40 COMO POSIBLES BIOMARCADORES DE
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**POR LA LICENCIADA:
NOELIA FANDOS MARÍN**

(Versión reducida)

Zaragoza, 2018

MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE A β 40 Y A β 42 EN EL PLASMA Y APLICACIÓN DE LOS ÍNDICES A β 42/40 COMO POSIBLES BIOMARCADORES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Noelia Fandos Marín

Este trabajo ha sido realizado en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza y en los laboratorios de la empresa de investigación Araclon Biotech.



El trabajo descrito en esta tesis ha sido publicado parcialmente en los siguientes trabajos:

Artículos:

Perez-Grijalba V, Fandos N, Canudas J, Insua D, Casabona D, Lacosta AM, Montanes M, Pesini P, Sarasa M. Validation of immunoassay-based tools for the comprehensive quantification of Abeta40 and Abeta42 peptides in plasma. *J.Alzheimers.Dis.* 2016; 54(2): 751-762. (Perez-Grijalba *et al.*, 2016)

Fandos N, Perez-Grijalba V, Pesini P, Olmos S, Bossa M, Villemagne VL, Doecke J, Fowler C, Masters CL, Sarasa M and the AIBL research group. Plasma amyloid beta 42/40 ratios as biomarkers for amyloid beta cerebral deposition in cognitively normal individuals. *Alzheimers Dement.(Amst.)*. 2017; 8: 179-187. (Fandos *et al.*, 2017)

Comunicación oral en Clinical Trials on Alzheimer's Disease (CTAD) 2015:

Pedro Pesini, Virginia Pérez-Grijalba, Noelia Fandos, Salvador Olmos, Matias Bossa, Colin Masters, Victor Villemagne, James Doecke, Chris Fowler, Alan Rembach, Manuel Sarasa and the AIBL Research Group. Assessment of plasma A β markers to estimate dichotomic amyloid PET among cognitively healthy people. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease –JPAD*. Volume 2, Number 4, 2015. OC13 280-281.

Pósteres:

Noelia Fandos, Virginia Pérez-Grijalba, Iván Marcos-Campos, Pedro Pesini, Manuel Sarasa. The effect of pre-analytical factors in the quantification of A β in plasma. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, Vol. 10, Issue 4, P657. Published in issue: July 2014.

Noelia Fandos, Iván Marcos-Campos, Virginia Pérez-Grijalba, Pedro Pesini, Manuel Sarasa. The influence of the centrifugation settings on A β quantification in plasma. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, Vol. 10, Issue 4, P658. Published in issue: July 2014

Pedro Pesini, Virginia Pérez-Grijalba, Noelia Fandos, Salvador Olmos, Matias Bossa, Colin L Masters, Víctor L Villemagne, James D Doecke, Christopher Fowler, Alan Rembach, Manuel Sarasa and The AIBL Research Group. Total Plasma A β 42/40 Ratio Is an Early

Biomarker of Alzheimer's Disease Progression. Alzheimer's and Dementia. The Journal of the Alzheimer's Association, Vol. 11, Issue 7, P4-238. Published in issue: July 2015

En el **Anexo 2** se incluyen los trabajos completos.

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Ya ha llegado el momento. Me costaba mucho visualizarme a mí misma escribiendo estas líneas de agradecimiento, pero ya estamos aquí. Ahora voy a intentar no olvidarme de nadie.

Me gustaría comenzar agradeciendo a Pedro y Manolo la oportunidad que me habéis dado de poder aprender tanto con este manuscrito. Y no quiero acordarme sólo de estos últimos meses, sino también y principalmente, de la confianza que habéis depositado en mí desde aquel primer día en que llegué a esta familia que es Araclon, por aquel entonces bastante menos numerosa. Es un privilegio poder dedicarme día a día a aquello que elegí y formar parte de este proyecto tan bonito que vemos crecer poco a poco con una gran ilusión. Gracias por vuestra perseverancia, vuestra curiosidad y vuestro optimismo.

Por supuesto, también sois grandes protagonistas de esta página el resto de "Araclonianos" que formáis parte de este equipazo. ¡Qué calidad científica y humana se juntan cuando tengo que hablar de vosotros! Es un privilegio ir a trabajar todos los días sabiendo que nos reiremos seguro y aprenderemos también algo seguro. Gracias a "la colmena" por ese primer año tan arropada por vosotros en Logroño y "al avispero" por tantos buenos ratos en Montecanal. Ahora me doy cuenta de que hace mucho que no usamos estos términos. Debe de ser el poder unificador de este edificio. Gracias por vuestro compañerismo, vuestro trabajo y vuestro apoyo. Esta tesis también es de cada uno de vosotros.

Eliseras! Cuántas y cuántas cosas que agradecer, por ese día a día cargado de aprendizaje, risas y motivación. Con vosotras trabajar en equipo es un privilegio. Gracias por vuestro trabajo compartido, por vuestras palabras en el momento adecuado, por vuestras carcajadas y por vuestra actitud. Juntas somos más fuertes! *Are you there?* De ti tampoco me olvido. Gracias por tus ideas, tus consejos, tu predisposición y tu sentido del humor.

Virginia, gracias. Gracias por cada una de tus explicaciones, por todo el tiempo invertido, por todas las charlas científicas y no científicas. Gracias por tu comprensión, tu compañerismo, tus ganas de mejorar y tu buen hacer. Gracias en definitiva por ser la mejor profe y, por supuesto, gracias por tu amistad.

A mis amigos, de unos grupos y de otros, de cerca y de lejos. Gracias por preocuparos, preguntarme y animarme. Por interesaros por mi trabajo e ilusionaros con cada avance.

Hermanitas, Ana y Raquel. A vosotras os dedico una parte muy grande de esta tesis. Gracias por hacer que me espabilara desde muy pequeña si quería estar a la altura. Gracias por vuestro ejemplo y vuestros consejos. Gracias por animarme a estudiar lo que me gustaba y seguir de cerca mis progresos. Gracias también por ayudarme a levantar cuando me he caído y por ser mis dos mejores amigas. Con vosotras cerca, aunque estéis lejos, es todo más fácil.

A mis padres, a ellos está dedicada esta tesis, como no podía ser de otra manera. Dos grandes trabajadores que me han enseñado a ser una persona responsable y que me han dado libertad y confianza para tomar mis propias decisiones. Gracias por darme la oportunidad de irme a estudiar a Barcelona y por vuestro esfuerzo. Difícilmente habría podido escribir esta tesis si no fuera por todo ello. Gracias por la familia que habéis formado. Gracias por vuestro apoyo, vuestra comprensión y vuestro amor.

Gracias también al resto de la familia por estar pendientes de todo esto y darme vuestro cariño. A partir de ahora tendremos más tiempo para compartir.

Y a ti, Juan, te dejo para el final. Esta tesis la has vivido más de cerca que nadie y la has sufrido más que nadie. Gracias por convertir nuestra casa en una "biblioteca". Este gran esfuerzo, a tu lado, ha sido más fácil. Gracias por tus ganas de aprender y de superarte. ¡No sabes cuánto te admiro y lo orgullosa que estoy de ti! Gracias también por tu interés hacia mi trabajo y por tu apoyo y amor incondicional. ¡Sin duda eres mi mayor fan! Gracias por escucharme y calmarme. En definitiva, gracias por ser "mi chufa".

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo progresivo que afecta mayoritariamente a individuos de edad avanzada y que representa la causa más común de demencia, un trastorno que afecta a unos 50 millones de personas en todo el mundo. Los dos rasgos histopatológicos característicos de la EA son las placas seniles y los ovillos neurofibrilares. Las placas seniles son depósitos extracelulares compuestos principalmente por fibrillas insolubles de péptido beta-amiloide ($A\beta$), mientras que los ovillos neurofibrilares son intracelulares y se considera que están compuestos mayoritariamente por agregados de proteína tau hiperfosforilada.

En la actualidad se considera que existe una larga fase preclínica de la enfermedad en la que se van produciendo alteraciones fisiopatológicas sin que todavía hayan aparecido los primeros síntomas clínicos. Esta fase preclínica representa un periodo de tiempo muy importante para la aplicación de terapias modificadoras del curso de la enfermedad, las cuales presumiblemente tendrán una mayor eficacia que la observada hasta el momento, ya que, hasta ahora, se han aplicado en las fases más avanzadas de la enfermedad. No obstante, es obvio que el diagnóstico de la EA en esta fase pre-sintomática no puede llevarse a cabo en base a los síntomas, que todavía no se han manifestado, sino que es necesario el uso de biomarcadores de la enfermedad.

Durante los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo a nivel internacional para identificar biomarcadores de la EA que ayuden tanto en el diagnóstico diferencial, como en la identificación de individuos de alto riesgo. En la actualidad ya se están utilizando algunos biomarcadores de líquido cefalorraquídeo y otros de neuroimagen, tanto en el ámbito de la investigación como, de forma incipiente, en el diagnóstico clínico. Sin embargo, a pesar de que algunos de estos biomarcadores presentan un buen rendimiento diagnóstico y pronóstico, su uso en la práctica clínica diaria o como herramienta de cribado poblacional se ve limitado por tratarse de procedimientos invasivos o de elevado coste. Por todo ello, la identificación de biomarcadores de la EA en tejidos periféricos de fácil acceso, como puede ser la sangre, que además sean capaces de reflejar los procesos patológicos que están sucediendo en el sistema nervioso central (SNC), supondría un avance enorme.

De acuerdo con la hipótesis de la cascada amiloide, la acumulación y agregación de $A\beta$ es el primer evento fisiopatológico que desencadena una serie de acontecimientos posteriores que conducen a la enfermedad. Además, se conoce que existe un transporte activo de $A\beta$ entre el SNC y la sangre. En conjunto, estos datos sugieren la posibilidad de

que los niveles plasmáticos de A β puedan utilizarse como biomarcadores de la EA. Persiguiendo la confirmación de esta hipótesis, en Araclon Biotech hemos desarrollado dos inmunoensayos de tipo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) sándwich, denominados ABtest40 y ABtest42, con los que llevamos a cabo la cuantificación de los péptidos A β 40 y A β 42. La sustitución del anticuerpo comercial de captura utilizado con anterioridad por un anticuerpo monoclonal de producción interna en nuestro laboratorio, ha motivado el desarrollo de un nuevo proyecto de validación. Con ello hemos demostrado que nuestros kits ABtest40 y ABtest42 son dos herramientas sensibles, específicas, precisas y exactas para la cuantificación de los péptidos amiloides A β 40 y A β 42 en plasma. Mientras que la determinación de los niveles de A β en plasma sin diluir nos aporta información acerca de la concentración del péptido que se encuentra libre en la sangre, la determinación de los niveles de A β en plasma diluido en un tampón expresamente formulado por nosotros nos informa acerca de los niveles plasmáticos totales de A β .

Sin embargo, la cuantificación de los péptidos A β en el plasma no es un procedimiento sencillo. Sus propiedades fisicoquímicas, sus capacidades para interactuar con otras proteínas del plasma y la baja concentración a la que se encuentran, dificultan su reconocimiento y cuantificación fiable. Además, existe una amplia lista de variables analíticas y pre-analíticas que pueden tener un impacto importante sobre los niveles de A β publicados por laboratorios que utilizan diferentes metodologías y procedimientos. En concreto, en este trabajo hemos observado que tanto el protocolo de procesado de las muestras de sangre como el tipo de anticoagulante utilizado tienen un efecto sobre los niveles de A β cuantificados en el plasma. Además, hemos constatado que el tratamiento de las muestras de sangre con un *cocktail* de inhibidores de proteasas exógenos no se traduce en la detección de niveles plasmáticos más elevados de A β . Asimismo, también hemos comprobado que los niveles de A β cuantificados en el plasma no varían sustancialmente cuando el procesado de las muestras se pospone hasta 30 horas, siempre y cuando se conserven en refrigeración (2-8 °C). Estos resultados han permitido establecer un protocolo más eficiente para la obtención y análisis de las muestras, facilitando la aplicación de ABtest en el marco de la investigación clínica de la EA.

Finalmente, en este trabajo hemos evaluado el potencial del índice plasmático A β 42/A β 40 (A β 42/40) como posible marcador de la deposición cortical de A β en una cohorte de individuos sanos pertenecientes al estudio AIBL (*Australian Imaging, Biomarker & Lifestyle Study of Ageing*), a los que se les ha realizado un seguimiento de 72 meses. Para ello se ha tomado como estándar de referencia un test de neuroimagen ampliamente utilizado, el PET-amiloide (PET-A β), con el que se evalúa el grado de deposición fibrilar de los péptidos amiloides en el SNC. Los resultados de los estudios

transversal y longitudinal que hemos realizado muestran que las ratios o proporciones plasmáticas A β 42/40 más bajas se asocian con una mayor deposición de amiloide a nivel cortical. Además, en la población estudiada el índice plasmático A β 42/40 ha mostrado un valor predictivo positivo (VPP) del 81 % para detectar la patología amiloide cortical. Este dato representa un incremento del 110 % sobre la prevalencia de individuos con carga amiloide cortical positiva en la población de controles sanos. En conjunto, los resultados de este estudio sugieren que el biomarcador plasmático A β 42/40 podría utilizarse como una primera herramienta, económica y poco invasiva, en un proceso de diagnóstico secuencial para la identificación de individuos sanos con carga amiloide cortical elevada, de cara tanto a su participación en ensayos clínicos, como para, cuando estén disponibles, poder aplicar potenciales terapias modificadoras del curso de la enfermedad.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

4PL: *4-parameter logistic function curve fitting* (ajuste de la curva dado por la función logística de 4 parámetros)

AA: *Alzheimer's Association*

A β : Péptido beta-amiloide

ACE: *Angiotensin-converting enzyme* (enzima convertidora de la angiotensina)

ADNI: *Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative*

AIBL: *Australian Imaging, Biomarker & Lifestyle Study of Ageing*

AICD: *APP intracellular domain* (dominio intracelular de APP)

ApoE: Apolipoproteína E

APP: *Amyloid- β precursor protein* (proteína precursora del amiloide β)

ARN: Ácido ribonucleico (mARN: ácido ribonucleico mensajero)

AUC: *Area under the ROC curve (área bajo la curva ROC)*

BeCKeT: *Before the Centiloid Kernel Transformation*

BHE: Barrera hematoencefálica

BSA: Bovine serum albumin (albúmina de suero bovino)

CAA: *Cerebral amyloid angiopathy* (angiopatía cerebral amiloide)

CCI: Coeficiente de correlación intraclase

CLSI: *Clinical Standards Laboratory Institute*

CSF: *Cerebrospinal fluid* (ver LCR)

CTF: *C-terminal fraction* (fracción C-terminal)

CV: Coeficiente de variación

DA: Fracción de péptido directamente accesible en plasma

DCL: Deterioro cognitivo leve (en inglés MCI: *mild cognitive impairment*)

DLB: *Dementia with Lewy bodies* (demencia con cuerpos de Lewy)

EA: Enfermedad de Alzheimer

ECE: *Endothelin-converting enzyme* (enzima convertidora de la endotelina)

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etilendiaminotetraacético)

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

EMA: *European Medicines Agency* (Agencia Europea de Medicamentos)

ER: Error relativo

ET: Error total

FDA: *Food and Drug Administration*

FDG: *Fluorodeoxyglucosa* (fluorodesoxiglucosa)

FTD: *Frontotemporal dementia* (demencia frontotemporal)

GuHCl: Hidrocloruro de guanidina

h: Horas

HPLC: *High-performance liquid chromatography* (cromatografía líquida de alta eficacia)

HRP: *Horseradish peroxidase* (peroxidasa de las raíces del rábano)
IC: Intervalo de confianza
IDE: *Insulin-degrading enzyme* (enzima degradadora de la insulina)
IgG: Inmunoglobulina G
IP: Inhibidores de proteasas
KPI: Kunitz protease inhibitor (inhibidor de la proteasa *Kunitz*)
LB: Límite del blanco
LD: Límite de detección
LC: Límite de cuantificación
LCR: Líquido cefalorraquídeo
LIC: Límite inferior de cuantificación
LRP-1: *Lipoprotein receptor-related protein 1*
LSC: Límite superior de cuantificación
LTP: *Long-term potentiation* (potenciación a largo plazo)
MCI: *Mild cognitive impairment* (ver DCL)
MDD: Mínima dosis detectable
MRI: *Magnetic resonance imaging* (imagen por resonancia magnética)
min: Minutos
NEP: Neprilisina
NFL: *Neurofilament light polypeptide* (polipéptido de neurofilamento ligero).
NIA: *National Institute of Aging*
OD: *Optical density* (densidad óptica)
PBS: *Phosphate buffered saline* (tampón fosfato salino)
PET: *Positron emission tomography* (tomografía por emisión de positrones)
PiB: *Pittsburgh Compound-B* (componente de Pittsburgh B)
PS: Presenilina
RAGE: *Receptor for advanced glycation end products*
ROC: *Receiver operating characteristic* (característica operativa del receptor)
RP: Fracción de péptido recuperado del plasma
rpm: revoluciones por minuto
RT: *Room temperature* (temperatura ambiente)
SD: *Standard deviation* (desviación estándar)
SNAP: *Suspected non-AD pathophysiology*
SNC: Sistema nervioso central
SSD: Sample/standard diluent (tampón de dilución de muestras y estándares)
SUVR: *Standardized uptake value ratio*
TMB: *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine* (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina)
TP: Fracción de péptido total en plasma
TRP: Tiempo de retardo del procesamiento
VC: Validación cruzada
VPN: Valor predictivo negativo
VPP: Valor predictivo positivo

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
La enfermedad de Alzheimer	3
Impacto de la enfermedad de Alzheimer	5
Factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer.....	6
Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.....	8
Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.....	11
El péptido beta-amiloide y la proteína tau	12
APP: la proteína precursora del beta-amiloide	14
Procesamiento de APP	15
Agregación y degradación de A β	18
La hipótesis de la cascada amiloide.....	20
Biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer	23
Neuroimagen.....	24
Imagen por resonancia magnética estructural (MRI)	25
Tomografía por emisión de positrones (PET)	26
PET-A β	26
Fluorodesoxiglucosa (FDG)-PET	28
PET-tau.....	28
PET de marcadores de inflamación.....	29
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	29
A β 42 en LCR.....	29
T-tau y p-tau en LCR.....	30
Neurogranina.....	31
YKL-40	31
Dinámica de los biomarcadores	32
Limitaciones de los biomarcadores de neuroimagen y LCR	34
Comunicación entre el sistema nervioso central y la sangre	35
Biomarcadores en sangre.....	37
A β en plasma	37
Otros péptidos A β	40
Tau en plasma	41
Discrepancias entre estudios: la importancia de los factores pre-analíticos.....	43
Tratamiento de la sangre con inhibidores de proteasas exógenos.....	45

Tiempo transcurrido desde la extracción de la sangre hasta su procesamiento	46
Protocolo de centrifugación	46
Tipo de anticoagulante	47
Justificación del trabajo	48
OBJETIVOS.....	51
MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
ABtest40 y ABtest42	57
Anticuerpo monoclonal de captura anti N-terminal	57
Unión del anticuerpo de captura a la fase sólida	59
Péptido A β estándar	60
Anticuerpos de detección anti C-terminal.....	61
Conjugación de moléculas de biotina a los anticuerpos de detección	62
Reacción de amplificación, reacción colorimétrica y parada de la reacción	63
Puesta a punto del ensayo	64
Protocolo ELISA para la cuantificación de A β en muestras de plasma y plasma diluido.....	65
Validación de ABtest40 y ABtest42	69
Curva de calibrado.....	71
Especificidad.....	74
Caracterización del epítipo	74
Interferencia de péptidos relacionados.....	75
Sensibilidad.....	77
Aproximación estadística.....	78
Aproximación experimental	79
Límite del blanco (LB).....	79
Límite de detección (LD)	81
Límite de cuantificación (LC).....	83
Reproducibilidad	83
Reproducibilidad intra-ensayo.....	84
Reproducibilidad inter-ensayo	85
Reproducibilidad inter-lote.....	85
Reproducibilidad test-retest.....	85
Reproducibilidad test-retest intra-estudio	86
Reproducibilidad test-retest inter-estudio	86
Exactitud.....	87
Recuperación	88
Efecto matriz	89
Linealidad de la dilución	89
Efecto de los factores pre-analíticos en la cuantificación de Aβ en plasma	90
Tratamiento de la sangre con inhibidores de proteasas (IP) exógenos	90
Temperatura y tiempo de retardo del procesamiento (TRP) de la muestra	92
Parámetros de centrifugación de la sangre y presencia de plaquetas en el plasma.....	93
Determinación de la concentración de plaquetas en el plasma tras diferentes protocolos de centrifugación de la sangre	93
Cuantificación de A β 40 y A β 42 en muestras de plasma tras diferentes protocolos de centrifugación de la sangre	94

Cuantificación de A β 40 en el plasma tras la eliminación de las plaquetas por filtración.....	94
Tipo de anticoagulante.....	95
Los índices plasmáticos Aβ42/40 como posibles biomarcadores de la EA	96
Población de estudio	96
Neuroimagen PET amiloide	97
Cuantificación de A β 40 y A β 42 en plasma	98
Análisis estadístico	100
Análisis exploratorio	100
Análisis transversal	101
Análisis longitudinal.....	101
Análisis ROC	101

RESULTADOS 105

Validación de ABtest40 y ABtest42	107
Curva de calibrado.....	107
Aproximación gráfica.....	107
Valoración de homocedasticidad	108
Valoración del método de calibrado.....	109
Especificidad.....	110
Caracterización del epítipo	110
Efecto de moléculas interferentes.....	112
Sensibilidad.....	114
Aproximación estadística: cálculo de la mínima dosis detectable (MDD)	114
Aproximación experimental: cálculo del límite del blanco (LB), límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).	114
Reproducibilidad	117
Reproducibilidad intra-ensayo, inter-ensayo e inter-lote	117
Reproducibilidad test-retest.....	119
Reproducibilidad test-retest intra-estudio	119
Reproducibilidad test-retest inter-estudio	121
Exactitud.....	123
Recuperación.....	126
Efecto matriz	127
Linealidad de la dilución con muestras de plasma	127
Resumen de resultados de validación de ABtest40 y ABtest42	129
Efecto de los factores pre-analíticos en la cuantificación de Aβ en plasma	130
Tratamiento de la sangre con inhibidores de proteasas (IP) exógenos	130
Conservación de la sangre durante 8 horas a 4 °C	130
Conservación de la sangre durante 8 horas a temperatura ambiente (RT).....	132
Conservación de la sangre durante 30 horas a 4 °C	133
Temperatura y tiempo de retardo del procesamiento (TRP) de la muestra	134
Conservación de la sangre en refrigeración (4 °C):.....	134
Conservación de la sangre a temperatura ambiente:	136
Parámetros de centrifugación de la sangre y presencia de plaquetas en el plasma.....	138
Determinación de la concentración de plaquetas en el plasma tras diferentes protocolos de centrifugación de la sangre	138
Cuantificación de A β 40 y A β 42 en muestras de plasma y plasma diluido tras diferentes protocolos de centrifugación de la sangre	140
Cuantificación de A β 40 en plasma tras la eliminación de las plaquetas por filtración	141

Tipo de anticoagulante.....	143
Los índices plasmáticos Aβ42/40 como posibles biomarcadores de la EA	146
Estadísticos descriptivos.....	147
Análisis exploratorio.....	148
Estudio transversal	150
Estudio longitudinal.....	151
Rendimiento diagnóstico del índice plasmático TP42/40: curvas ROC	155
Escenario 1: Sensibilidad y VPN elevados.....	158
Escenario 2: Máximo índice de Youden	159
Escenario 3: Especificidad y VPP elevados.....	160
DISCUSIÓN	163
Validación de ABtest40 y ABtest42	165
Curva de calibrado.....	167
Especificidad.....	168
Sensibilidad.....	169
Reproducibilidad	172
Exactitud.....	175
Recuperación y efecto matriz.....	177
Efecto de los factores pre-analíticos en la cuantificación de Aβ en plasma	180
Tratamiento de la sangre con inhibidores de proteasas (IP) exógenos	181
Temperatura y tiempo de retardo del procesamiento (TRP) de la muestra	183
Parámetros de centrifugación de la sangre y presencia de plaquetas en el plasma.....	185
Tipo de anticoagulante.....	187
Los índices plasmáticos Aβ42/40 como posibles biomarcadores de la EA	190
CONCLUSIONES	197
BIBLIOGRAFÍA.....	201
INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA	237
VALIDACIÓN ABEST40 Y ABTEST2	239
Sensibilidad.....	239
Cálculo de la mínima dosis detectable para ABtest40.....	239
Cálculo de la mínima dosis detectable para ABtest42.....	240
Límite del blanco de ABtest40	241
Límite del blanco de ABtest42	242
Límite de detección de ABtest40.....	243
Límite de detección de ABtest42.....	244
Límite de cuantificación de ABtest40 y ABtest42	245
Exactitud.....	246
Exactitud de ABtest40 con muestras de plasma.....	246
Exactitud de ABtest42 con muestras de plasma.....	247
Exactitud de ABtest40 con muestras de plasma diluido.....	248

Exactitud de ABtest42 con muestras de plasma diluido.....	249
Linealidad de la dilución	250
ABtest40 con muestras de plasma	250
ABtest42 con muestras de plasma	251
Efecto de los factores pre-analíticos en la cuantificación de Aβ en plasma	252
Efecto de la temperatura y el tiempo de retardo del procesamiento de la muestra.....	252
A β 40 con muestras conservadas en refrigeración (4 °C).....	252
A β 42 con muestras conservadas en refrigeración (4 °C).....	253
A β 40 con muestras conservadas a temperatura ambiente.....	254
A β 42 con muestras conservadas a temperatura ambiente.....	255
La influencia del anticoagulante utilizado en la cuantificación de A β	256
A β 40 en plasma y plasma diluido	256
A β 42 en plasma y plasma diluido	257
 ANEXOS.....	 259
ANEXO 1: DETALLES DEL EXPERIMENTO DE VALIDACIÓN CRUZADA PARA EL ANÁLISIS ROC.	261
ANEXO 2: PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	262

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo de progresión lenta e irreversible que se caracteriza clínicamente por pérdida de memoria, cambios psicológicos y de comportamiento y declive cognitivo generalizado que termina afectando a las actividades de la vida cotidiana de los pacientes (Khachaturian, 1985; Masters *et al.*, 2006; Villemagne and Chetelat, 2016). Los individuos que padecen esta enfermedad presentan una degeneración sináptica y neuronal que afecta a múltiples regiones del cerebro, principalmente al hipocampo y a las áreas cortical y subcortical (Braak and Braak, 1991; Thal *et al.*, 2002).

Existen dos rasgos histopatológicos característicos de la EA (**Figura 1**): las placas seniles y los ovillos neurofibrilares. Las placas seniles son unos depósitos extracelulares compuestos mayoritariamente por fibrillas insolubles de péptidos beta-amiloide ($A\beta$) (Glenner and Wong, 1984; Masters *et al.*, 1985), mientras que los ovillos neurofibrilares intracelulares se cree que están compuestos mayoritariamente por agregados de una forma hiperfosforilada de la proteína asociada a microtúbulos tau (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). Conjuntamente, en las zonas afectadas por la patología aparece estrés oxidativo, astrocitos reactivos y microglía activada que originan el proceso de inflamación asociado a la enfermedad (Blennow *et al.*, 2006; Hampel *et al.*, 2010a). Asimismo, la EA suele presentarse junto con otra patología denominada angiopatía amiloide cerebral o CAA que se caracteriza por la acumulación de agregados fibrilares extracelulares de $A\beta$ en las paredes de todos los tipos de vasos sanguíneos, incluidos los capilares (Johnson *et al.*, 2007).

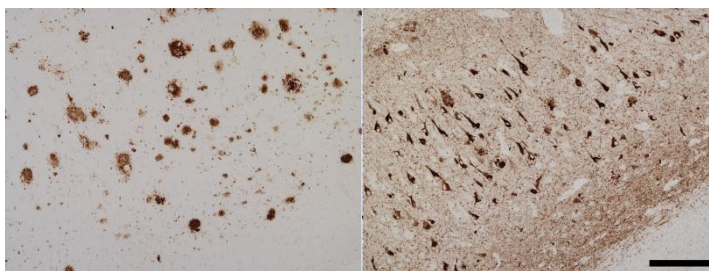


Figura 1. Rasgos histopatológicos de la enfermedad de Alzheimer. Placas amiloides extracelulares (izquierda) y ovillos neurofibrilares intracelulares (derecha). Para estas imágenes de inmunohistoquímica se utilizaron anticuerpos anti- $A\beta$ 42 y anti-tau (AT8), respectivamente. Barra de escala = 200 μ m. (Fuente: Araclon Biotech).

Introducción

Existen dos variantes de la EA:

- La mayoría de los casos de la EA pertenecen a la forma esporádica de la enfermedad y se presenta en personas mayores de 65 años (EA de inicio tardío). Su origen es multifactorial, pero la edad y la presencia del alelo $\epsilon 4$ del gen ApoE, que codifica para la apolipoproteína E, suponen dos factores de riesgo importantes (Corder *et al.*, 1993; Poirier *et al.*, 1993).
- Un pequeño porcentaje de todos los casos de la EA (<1 %) tiene una base genética (EA de origen familiar) debido a mutaciones autosómicas dominantes en el gen que codifica para la proteína precursora del amiloide o APP (cromosoma 21) o en los genes PSEN1 (cromosoma 14) y PSEN2 (cromosoma 1) que codifican para las presenilinas 1 (PS1) y 2 (PS2), proteínas que forman parte del complejo enzimático de la γ -secretasa (ver apartado "Procesamiento de APP" más adelante). Esta variante de la enfermedad se caracteriza por presentar un inicio más temprano (Hardy, 1997; Scheuner *et al.*, 1996).

Actualmente no existe un tratamiento disponible que vaya dirigido específicamente contra los mecanismos patogénicos de la EA y que sea capaz de detener su progresión, por lo que finalmente acaba produciéndose la muerte de los pacientes en un periodo variable de tiempo que normalmente oscila entre los siete y diez años después del diagnóstico (Khachaturian, 1985; Villemagne and Chetelat, 2016). Las únicas terapias farmacológicas disponibles en el mercado se basan en el tratamiento de los síntomas característicos de la enfermedad como, por ejemplo, potenciadores de la función colinérgica, que tienen un efecto más o menos limitado en la cognición, el comportamiento y las funciones relacionadas con la vida cotidiana de los pacientes.

En la actualidad se piensa que algunas de las alteraciones fisiopatológicas características de la EA comienzan más de una década antes de que los síntomas clínicos emerjan (Blennow *et al.*, 2015a; Jack, Jr. and Holtzman, 2013; Sperling *et al.*, 2013a; Sperling *et al.*, 2013b; Toledo *et al.*, 2013; Villemagne *et al.*, 2013a). Sin embargo, a pesar de que han pasado más de cien años desde que se describió el primer caso de la EA, todavía queda mucho trabajo por realizar debido a que aún no se han descubierto los cambios biológicos precisos que la originan, por qué progresa más rápidamente en unos individuos que en otros, ni cómo se podría prevenir, ralentizar o detener esta enfermedad.

Impacto de la enfermedad de Alzheimer

En el año 2015 se estimó que padecían demencia en torno a 46,8 millones de personas en todo el mundo. Además, debido al envejecimiento de la población y a la mejora de los sistemas sanitarios, se cree que este número se va a duplicar cada 20 años, alcanzando los 74,7 millones en el año 2030 y los 131,5 millones en el año 2050 (<https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>). En lo que respecta a la EA, se trata de la causa más común de demencia en personas de edad avanzada representando el 60-80 % de todos los casos (Alzheimer's Association, 2016).

Lejos de mejorar, las estimaciones realizadas en el año 2015 fueron un 17 % más altas que las que se habían calculado en el año 2010 y, además, presentaron un desplazamiento en la distribución de los casos de demencia alrededor del globo ya que se estimó que en el año 2050, el 71 % de las personas con demencia vivirán en países con ingresos medios y bajos (**Figura 2**).

<https://www.alz.co.uk/research/GlobalImpactDementia2013.pdf>.

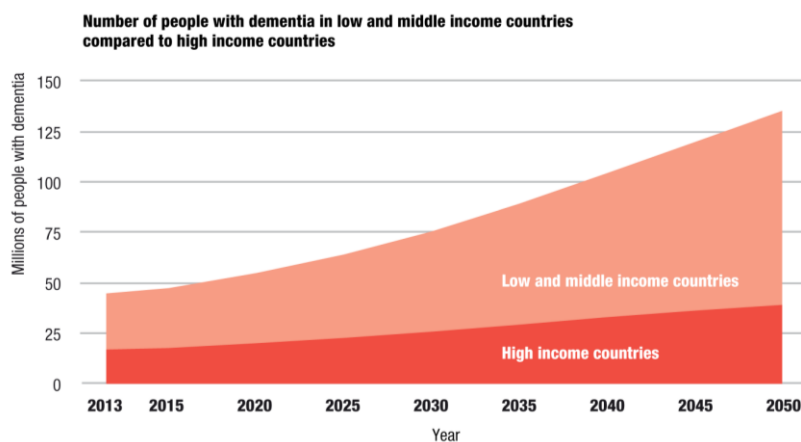


Figura 2. Estimación del número de personas con demencia en países con ingresos bajos y medios en comparación con países con ingresos altos hasta el año 2050. Se estima que el número de personas con demencia vaya progresivamente en aumento a nivel mundial, especialmente en los países con ingresos bajos y medios (Fuente: <https://www.alz.co.uk/research/GlobalImpactDementia2013.pdf>).

Introducción

La EA tiene efectos devastadores para la salud de los pacientes y sus cuidadores. Además, supone también un importante impacto socioeconómico tanto en las familias afectadas como en los sistemas de salud (Johnson *et al.*, 2000). El gasto mundial que supuso la demencia en todo el mundo en el año 2015 fue de 818.000 millones de dólares, lo que representó un 1,09 % del producto interior bruto global.

<https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>.

Todos estos datos indican que la demencia, y en particular la EA, supone uno de los mayores desafíos para los sistemas sanitarios en aquellos países en los que la esperanza de vida aumenta. Por ello, se considera importante realizar avances significativos tanto en el terreno de la prevención como del tratamiento de la EA ya que, de otra manera, nuestros sistemas de salud difícilmente serán capaces de soportar la carga financiera que representará esta enfermedad en el futuro.

Factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer

Con la excepción de los casos de la EA causados por mutaciones genéticas autosómicas dominantes (EA familiar), la forma esporádica de la enfermedad parece desarrollarse como consecuencia de múltiples factores, tanto ambientales como genéticos:

- Edad: es el principal factor de riesgo ya que la mayoría de los individuos que desarrollan la EA son mayores de 65 años. Además, las probabilidades de padecer esta enfermedad aumentan con la edad. Por ejemplo, de todas las personas que padecen la EA, un 15 % tienen edades comprendidas entre los 65 y los 74 años, mientras que un 44 % tienen entre 75 y 84 años. A pesar de que la edad es un factor de riesgo importante, la EA no es un proceso normal del envejecimiento y, por tanto, no es una causa suficiente para el desarrollo de la enfermedad (Hebert *et al.*, 2010).

- Genotipo ApoE: el gen ApoE codifica para la apolipoproteína E, una proteína involucrada en el metabolismo y el transporte del colesterol. Existen tres alelos principales del gen de la ApoE: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, que codifican para proteínas que difieren únicamente en dos aminoácidos. La presencia de la variante $\epsilon 4$ está asociada con un riesgo incrementado de padecer la EA de inicio tardío. Este riesgo se multiplica por tres en los portadores de un alelo $\epsilon 4$ y por entre ocho y doce veces en los portadores de dos alelos $\epsilon 4$ (Holtzman *et al.*, 2012; Saunders *et al.*, 1993). Por el contrario, la variante $\epsilon 2$ confiere un efecto

protector frente al desarrollo de la EA (Corder *et al.*, 1994) y el alelo $\epsilon 3$, el más común en la población general, se considera neutro (Zimmermann *et al.*, 2014).

El mecanismo por el cual el genotipo ApoE supone un factor de riesgo para la EA ha sido objeto de investigación durante mucho tiempo. Por una parte se ha demostrado que la proteína ApoE tiene un papel en la unión de A β y su posterior eliminación del cerebro (Poirier, 2000) a través del receptor LRP-1 (*lipoprotein receptor-related protein 1*) (Kang *et al.*, 2000; Shibata *et al.*, 2000). En concreto, el alelo $\epsilon 4$ se ha asociado con una disminución de la afinidad de la proteína ApoE por el péptido A β . Esto dificultaría su eliminación desde el cerebro hacia la periferia (Bates *et al.*, 2009; Tokuda *et al.*, 2000) y favorecería su agregación y deposición, justificando el riesgo incrementado de padecer la EA en los individuos con este genotipo. Por otra parte, recientemente se ha comprobado que en neuronas humanas derivadas de células madre, la ApoE secretada por células de la glía estimula la transcripción de APP y la producción de A β . La potencia con la que esto sucede depende de la isoforma de ApoE: ApoE $\epsilon 4$ > ApoE $\epsilon 3$ > ApoE $\epsilon 2$. Esta activación diferencial en la producción de A β podría explicar, al menos en parte, el papel de cada una de estas proteínas en la patogénesis de la EA (Huang *et al.*, 2017).

La prevalencia del alelo $\epsilon 4$ es de aproximadamente el 15 % en la población general y del 40 % en enfermos de Alzheimer (Bendlin *et al.*, 2010). Además, los enfermos de Alzheimer portadores de este alelo suelen desarrollar la EA a una edad más temprana que los pacientes portadores de los alelos $\epsilon 2$ y $\epsilon 3$ (Spinney, 2014). Sin embargo, al igual que ocurre con el envejecimiento, a pesar de representar un riesgo incrementado, la presencia de la variante $\epsilon 4$ no es un factor ni necesario ni suficiente para el desarrollo de la EA (Corder *et al.*, 1993; Poirier *et al.*, 1993).

- Historia familiar de EA: aunque tener una historia familiar de la EA tampoco es necesario para su desarrollo, es cierto que los individuos que tienen un pariente de primer grado con la enfermedad tienen una mayor probabilidad de desarrollarla (Green *et al.*, 2002; Lautenschlager *et al.*, 1996; Mayeux *et al.*, 1991). Este riesgo incrementado no sólo tiene que ver con la posibilidad de haber heredado el alelo $\epsilon 4$ de ApoE, sino que el hecho de compartir otros factores ambientales, genéticos y de estilo de vida podrían jugar un rol en el desarrollo de la enfermedad (Alzheimer's Association, 2016).

- Años de educación: se ha comprobado que las personas que han recibido una educación escolar más breve tienen un riesgo mayor de padecer la EA y otras demencias que aquellos individuos que disfrutaron de una educación más prolongada (Evans *et al.*, 1997; Sando *et al.*, 2008; Stern *et al.*, 1994). Algunos investigadores opinan que el hecho de tener un nivel educativo mayor favorecería el establecimiento de una reserva cognitiva elevada, aumentando las conexiones entre neuronas y permitiendo que el cerebro

Introducción

compense los cambios ocurridos durante la primera fase de la enfermedad (Roe *et al.*, 2007; Stern, 2012).

- Sexo: en comparación con los hombres, existe un mayor porcentaje de mujeres con la EA. Este hecho se ha asociado principalmente a que, de promedio, las mujeres viven más que los hombres (Alzheimer's Association, 2016). Sin embargo, numerosos estudios sobre la incidencia de la EA no han encontrado diferencias significativas entre hombres y mujeres en la proporción de individuos que desarrollan la EA, o cualquier otra demencia, sea cual sea la edad estudiada (Barnes *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2001; Kukull *et al.*, 2002).
- Enfermedad cardiovascular: el hecho de tener un sistema cardiovascular sano proporciona al cerebro el oxígeno y los nutrientes que necesita para asegurar su correcto funcionamiento. En base a esto, muchos factores que incrementan el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares como el tabaco (Anstey *et al.*, 2007; Rusanen *et al.*, 2011), la obesidad en la vida adulta (Anstey *et al.*, 2011; Ronnema *et al.*, 2011), la diabetes (Gudala *et al.*, 2013; Vagelatos and Eslick, 2013), la hipertensión (DeBette *et al.*, 2011; Launer *et al.*, 2000) y los niveles altos de colesterol (Meng *et al.*, 2014; Solomon *et al.*, 2009) se han asociado con un mayor riesgo de desarrollar demencia. Por el contrario, la actividad física o una dieta baja en grasas saturadas se han asociado con un riesgo menor de padecer la EA y otras demencias (Morris *et al.*, 2015; Reitz *et al.*, 2011).
- Daño cerebral traumático: hace referencia a una alteración de la función normal del cerebro causada por un fuerte impacto en el cráneo. Se ha comprobado que el daño cerebral traumático incrementa el riesgo de desarrollar la EA u otras demencias (Groswasser *et al.*, 2002; Lehman *et al.*, 2012; Plassman *et al.*, 2000).

Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

Los síntomas de la EA varían entre individuos pero normalmente el síntoma inicial más común es el empeoramiento gradual de la capacidad de recordar nueva información. Esto ocurre porque las primeras neuronas que se ven afectadas se localizan en las regiones del cerebro involucradas en la formación de nuevos recuerdos. Sin embargo, conforme la enfermedad progresa se van viendo afectadas otras regiones del cerebro ocasionándoles a los pacientes otros tipos de dificultades.

En 1984, el NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's disease and Related Disorders Association*)

publicó unas guías con criterios de diagnóstico para la EA (McKhann *et al.*, 1984). Dichos criterios estaban basados principalmente en el juicio clínico del neurólogo que se fijaba en los síntomas del individuo, el resultado de los test cognitivos, una evaluación neurológica general y la información aportada por el entorno más próximo al paciente (Alzheimer's Association, 2016). Por lo tanto, el diagnóstico en vida de la EA dependía del desarrollo de síntomas de demencia.

Sin embargo, posteriormente se descubrió que la demencia representa un estadio final de la EA y que la patología cerebral específica de dicha enfermedad comienza incluso años antes de que se detecte la muerte neuronal y los primeros síntomas clínicos de demencia (Hulette *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 1996; Price and Morris, 1999). Ello ha supuesto que en los últimos años se esté realizando un importante esfuerzo para el desarrollo de herramientas de diagnóstico que reconozcan estadios más tempranos de la enfermedad, como son la etapa preclínica o la de predemencia (Blennow and Zetterberg, 2010). Un elemento principal para conseguir este objetivo es el uso de biomarcadores que puedan ayudar al diagnóstico precoz y que permitan predecir el riesgo de progresión de la enfermedad en las fases asintomáticas.

En el año 2011, el *National Institute of Aging* (NIA) y la *Alzheimer's Association* (AA) actualizaron las guías de 1984 y revisaron los criterios allí descritos con el objetivo de mejorar el diagnóstico de la EA (Albert *et al.*, 2011; Jack, Jr. *et al.*, 2011; McKhann *et al.*, 2011; Sperling *et al.*, 2011). Para ello incorporaron el uso potencial de biomarcadores fiables, ya que sin ellos, y debido a la deficiente exactitud del diagnóstico clínico, el examen directo del tejido cerebral, ya sea mediante biopsia o autopsia, continuaría siendo el único método fiable para establecer un diagnóstico definitivo de la EA (Fagan and Perrin, 2012; Humpel, 2011; Rosen *et al.*, 2013; Toledo *et al.*, 2013).

Las guías revisadas de 2011 identificaron tres fases de la EA (**Figura 3**) e incluyeron un amplio periodo asintomático o fase preclínica, muy importante en el ámbito de la investigación (Dubois *et al.*, 2010; Dubois *et al.*, 2007; Jack, Jr. *et al.*, 2013):

- *Fase presintomática o preclínica*: las personas son cognitivamente normales pero existe evidencia de deposición amiloide cerebral. Gracias al desarrollo de marcadores patológicos de la EA, esta fase se subdividió en tres estadios diferentes (Sperling *et al.*, 2011):
 - *Estadio 1 de amiloidosis cerebral asintomática*: existe evidencia de acumulación cerebral de A β pero no hay ninguna evidencia detectable de otras alteraciones cerebrales que sugieran neurodegeneración o sintomatología cognitiva o de comportamiento.

Introducción

- *Estadio 2 de amiloidosis cerebral asintomática + evidencia de disfunción sináptica y/o neurodegeneración temprana:* además de deposición de amiloide cerebral existe la presencia de uno o más marcadores relacionados con el daño neuronal.
- *Estadio 3 de amiloidosis cerebral + evidencia de neurodegeneración + declive cognitivo leve:* los individuos con estas tres características se encontrarían en la última fase de la EA preclínica y muy cerca de la zona en la cual cumplirían los criterios clínicos de la siguiente fase.
- *Fase prodrómica o sintomática:* en 2005 se comenzó a denominar fase de deterioro cognitivo leve (DCL o *mild cognitive impairment*, MCI) debido a la EA. Se define como una etapa de transición entre el declive cognitivo normal que ocurre durante el envejecimiento y la disfunción cognitiva asociada con la EA (Petersen and Morris, 2005). Los individuos con DCL debido a la EA experimentan un deterioro cognitivo mayor que el esperado para personas de su misma edad y nivel educativo, y en ellos ya existe evidencia de deposición de péptido A β y neurodegeneración. A pesar de que aparecen los primeros síntomas cognitivos, todavía no son tan severos como para catalogarlos como demencia.
- *Fase sintomática de demencia:* el deterioro cognitivo empeora e interfiere con las actividades de la vida cotidiana. En esta fase existe un amplio repertorio de cambios moleculares y neurodegenerativos.

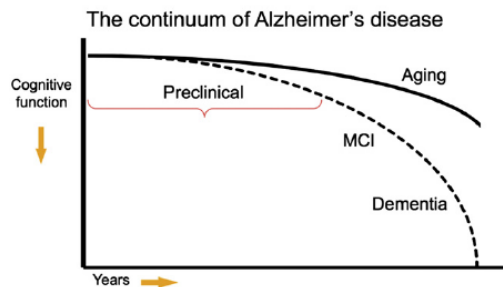


Figura 3. Modelo de la trayectoria clínica de la enfermedad de Alzheimer. Existe una larga fase preclínica que precede a los estadios de deterioro cognitivo leve (DCL o MCI) y demencia. En las personas que sufren la enfermedad, las funciones cognitivas empeoran a lo largo de los años de manera mucho más acusada de lo que se observa durante el envejecimiento normal (*Aging*). MCI: *mild cognitive impairment*. Figura tomada del artículo durante el envejecimiento normal (*Aging*). MCI: *mild cognitive impairment*. Figura tomada del artículo "Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease" (Sperling et al., 2011).

El estudio de la fase preclínica ha resultado imprescindible para el entendimiento de la progresión de la EA. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que se trata de una fase "asintomática con riesgo de padecer la EA". Es decir, ello no significa que todos los individuos que tengan evidencias patológicas que pudieran asociarse con el Alzheimer preclínico vayan a desarrollar la enfermedad (Sperling *et al.*, 2011). De hecho, además de los 3 estadios de la EA preclínica recogidos en las guías del NIA-AA, se ha sugerido la necesidad de añadir otras dos categorías denominadas "Estadio 0" que incluiría a individuos sin evidencia de deterioro cognitivo y con los biomarcadores de la EA no alterados, y otro grupo denominado SNAP (*suspected non-AD pathophysiology*) que englobaría a aquellos sujetos sin depósitos de amiloide pero con evidencias de neurodegeneración (Jack, Jr. *et al.*, 2012). Por último, existen otros tipos de patologías con las que se podría confundir la EA como son la demencia frontotemporal (FTD), la esclerosis del hipocampo, la demencia con cuerpos de Lewy (DLB), el derrame cerebral, los tumores cerebrales, la hidrocefalia de presión normal o la depresión (Cummings *et al.*, 1998; Dubois *et al.*, 2014; Larson *et al.*, 1996; Masters *et al.*, 2006).

Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

Ninguno de los fármacos disponibles en la actualidad para el tratamiento de la EA ralentiza o detiene el daño y la destrucción neuronal que ocasionan los síntomas de la enfermedad. Los fármacos para el tratamiento de la EA aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) y la EMA (*European Medicines Agency*) únicamente mejoran temporalmente los síntomas al incrementar los niveles de neurotransmisores en el cerebro. Algunos de estos fármacos son inhibidores de la acetilcolinesterasa como la galantamina, la rivastigmina o el donepezilo, y otros son bloqueantes de los receptores NMDA del glutamato como la memantina (Alzheimer's Association, 2016; Scheltens *et al.*, 2016). La efectividad de estos fármacos varía entre los individuos pero normalmente producen efectos limitados a una estabilización temporal de los síntomas, más que a una mejora notable de la función cognitiva (Masters and Beyreuther, 2006).

La larga fase preclínica de la enfermedad, en la cual ya existen cambios biomoleculares en el cerebro como por ejemplo deposición de péptido A β , pero todavía no han aparecido los primeros síntomas clínicos, proporciona un espacio de tiempo muy valioso

Introducción

para realizar intervenciones con terapias modificadoras de la enfermedad. Siguiendo este razonamiento, en los últimos años se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos con terapias anti-A β que, incluso a pesar de haber llegado a las fases clínicas II y III, finalizaron con sonoros fracasos debido a la ausencia de beneficios clínicos. Se han planteado diferentes argumentos para explicar dichos resultados. Por una parte se cree que, al menos en algunas ocasiones, las terapias se aplicaron a pacientes en estadios demasiado avanzados de la enfermedad (Blennow, 2010; Fagan and Perrin, 2012). Por otra parte, en algunos de estos ensayos el criterio utilizado como método de referencia o "estándar de oro" para realizar la clasificación de sus pacientes fue el diagnóstico clínico. Sin embargo, la exactitud de los métodos de diagnóstico clínicos actuales han presentado sensibilidades que varían entre el 70,9 y el 87,3 % y especificidades de entre el 44,3 y el 70,8 % (Beach *et al.*, 2012). De hecho, al realizar a dichos pacientes una prueba de neuroimagen, mediante PET-amiloide, se encontró que el 10-35 % de los individuos clínicamente diagnosticados como dementes presentaron un resultado negativo. Esto implica que una proporción importante de los individuos incluidos en los ensayos clínicos podían no padecer la patología para la que la terapia estaba dirigida (Salloway *et al.*, 2014).

En la actualidad se considera que es crítico conseguir definir el perfil de biomarcadores que mejor prediga la progresión de la enfermedad desde las fases preclínicas asintomáticas a los estadios de DCL y Alzheimer con demencia (Sperling *et al.*, 2011). Se espera que la elección temprana y adecuada de individuos asintomáticos en riesgo de desarrollar la demencia incremente las posibilidades de éxito de las terapias modificadoras de la enfermedad, ya que, una vez que la degeneración neuronal ha comenzado, el efecto de dichas terapias parece limitado (Blennow and Hampel, 2003; Hardy, 2009; Lansbury, Jr., 2004; Levites *et al.*, 2006; Selkoe, 2011; Sperling *et al.*, 2011).

El péptido beta-amiloide y la proteína tau

El primer caso de la EA fue presentado en 1906 por el psiquiatra alemán Alois Alzheimer. Este médico había tratado a una mujer de 51 años llamada Auguste Deter que presentaba signos de paranoia y pérdida de memoria y que falleció 5 años más tarde. En la autopsia de su cerebro, Alzheimer observó atrofia cerebral y pérdida neuronal. Además, el psiquiatra describió unos "cuerpos miliares" y unos "manojos densos de

fibrillas” que son lo que hoy en día conocemos como las placas amiloides o placas seniles y los ovillos neurofibrilares, respectivamente.

El término amiloide hace referencia a agregados anormales de proteínas o péptidos que de forma regular adoptan una configuración de lámina- β . Dichos agregados peptídicos forman fibrillas de 10 nm de diámetro, que en el caso de la EA pueden alcanzar los 200 μ m (Yates and McLoughlin, 2008).

Las placas seniles se localizan en el espacio cerebral extracelular y su principal componente es el péptido A β , de unos 4 kDa de tamaño, que se origina tras el procesamiento proteolítico de la proteína precursora del A β o APP (Kang *et al.*, 1987; Selkoe, 1999). El péptido A β es una metaloproteína que pertenece a una familia de péptidos altamente relacionados, con tamaños que varían principalmente entre los 38 y los 43 aminoácidos. Las dos principales isoformas de A β son A β 1-40 (A β 40) y A β 1-42 (A β 42), denominadas así por el número de aminoácidos de su secuencia. Aunque A β 40 es la forma más abundante generada tras el procesamiento proteolítico de la APP, A β 42 es una especie más hidrofóbica y con mayor tendencia a agregar y formar fibrillas (Burdick *et al.*, 1992; Jarrett *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1994), representando el componente mayoritario de las placas amiloides y albergando efectos que pueden resultar neurotóxicos (Fukumoto *et al.*, 1996; Gravina *et al.*, 1995; Jarrett *et al.*, 1993). Por el contrario, el péptido A β 40, también presente en las placas seniles, es el componente mayoritario de los depósitos amiloides vasculares (Gravina *et al.*, 1995).

El péptido A β es producido por casi todos los tipos celulares del sistema nervioso central y la periferia (Zhang and Lee, 2011) como producto del metabolismo celular normal (Haass *et al.*, 1992; Mehta *et al.*, 2000; Scheuner *et al.*, 1996). De manera adicional, este péptido se localiza de forma habitual en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y la sangre (Haass *et al.*, 1992; Seubert *et al.*, 1992), pero su función fisiológica permanece siendo objeto de estudio (Bates *et al.*, 2009).

Por otra parte, se piensa que los ovillos neurofibrilares son el resultado de la agregación de la proteína tau anormalmente fosforilada en forma de filamentos helicoidales emparejados insolubles localizados en el espacio intracelular (Jellinger and Bancher, 1998; Michaelis *et al.*, 2002). Bajo condiciones normales, tau es una proteína asociada a microtúbulos que estabiliza su estructura y la arquitectura celular interna. Sin embargo, en la EA tau presenta un proceso de fosforilación aberrante y se encuentra desanclada de los microtúbulos. Tanto la presencia de ovillos neurofibrilares como la desestabilización de los microtúbulos podrían contribuir al daño celular observado antes de que se produzca la muerte celular (Yates and McLoughlin, 2008).

Introducción

Aunque la acumulación extracelular de A β en las placas seniles está universalmente aceptada, algunos estudios también han demostrado que tanto A β 40 como A β 42 pueden producirse intracelularmente en las neuronas y formar agregados en forma de ovillos neurofibrilares (Hartmann *et al.*, 1997; Masters *et al.*, 1985; Wertkin *et al.*, 1993). Además, otros estudios afirman que la acumulación intraneuronal de A β resulta tóxica para las células y ocurre como un evento temprano que precedería a su acumulación extracelular, tanto en los cerebros de enfermos de Alzheimer como en modelos de ratones transgénicos de la enfermedad (Gouras *et al.*, 2010; Lacosta *et al.*, 2017; Oddo *et al.*, 2003; Wirths *et al.*, 2001). No obstante, no parece existir co-localización de A β y tau en los ovillos neurofibrilares, sino que unos y otros se localizan en dos poblaciones neurodegenerativas independientes (Lacosta *et al.*, 2017).

APP: la proteína precursora del beta-amiloide

Como ya se ha mencionado, el péptido A β se origina a partir del procesamiento proteolítico de la APP. Ésta es una glicoproteína transmembrana de tipo I expresada en todas las células del organismo, que consiste en un largo dominio N-terminal extracelular, un único dominio transmembrana y un corto tallo intracelular (Dyrks *et al.*, 1988; Kang *et al.*, 1987).

El gen que codifica para la APP humana se localiza en el cromosoma 21 y contiene 19 exones (Yoshikai *et al.*, 1991). El *splicing* alternativo de los exones 7 y 8 genera ARNs mensajeros de la APP que codifican para varias isoformas de la proteína, siendo las más abundantes la APP770, APP751 y APP695 (refiriéndose al número de aminoácidos de su secuencia).

APP770 y APP751 se expresan en la mayoría de los tejidos y contienen un dominio inhibidor de la proteasa Kunitz (KPI) en su región extracelular. Por su parte, APP695 se expresa mayoritariamente en neuronas y no contiene el dominio KPI (**Figura 4**) (Kang and Muller-Hill, 1990; Rohan de Silva *et al.*, 1997). Se han encontrado niveles elevados de isoformas de APP con el dominio KPI en cerebros de enfermos de Alzheimer con una deposición elevada de A β (Menendez-Gonzalez *et al.*, 2005). Esto podría sugerir que un *splicing* desregulado del ARN de la APP podría contribuir a la patogénesis de la EA (Zhang *et al.*, 2011).

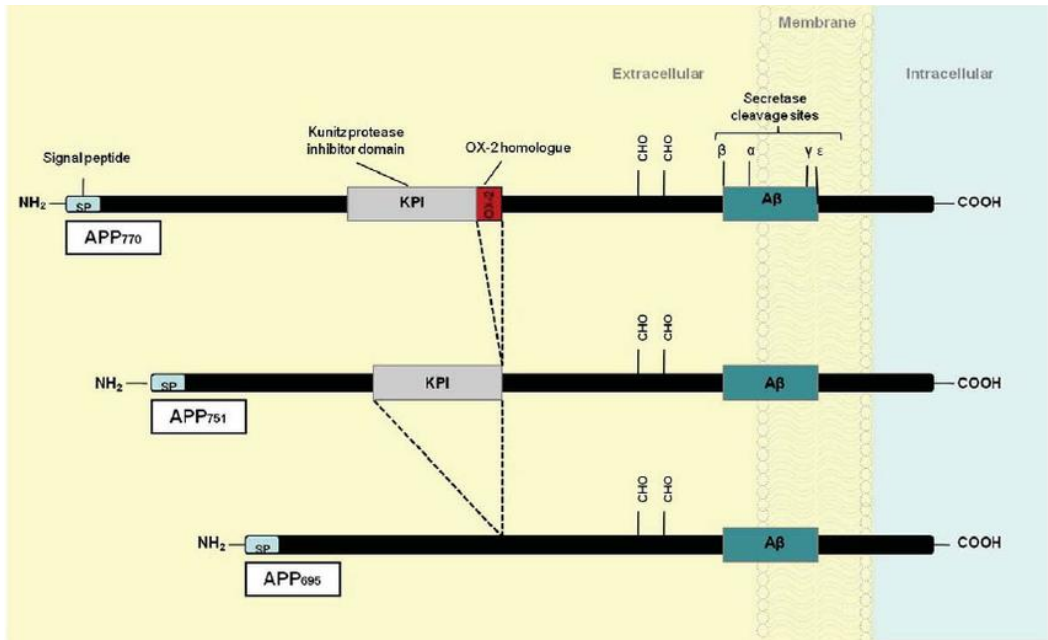


Figura 4. Representación esquemática de las isoformas de APP. APP770 contiene los dominios KPI y OX-2; APP751 contiene el dominio KPI pero no contiene el dominio OX-2; APP695 no contiene ninguno de estos dos dominios. En el extremo N-terminal se localiza un péptido señal (SP) compuesto por 17 aminoácidos. En el esquema también se representa el péptido beta-amiloide (Aβ) que contiene 28 aminoácidos en la parte exterior de la membrana y 12-14 aminoácidos en el dominio transmembrana. KPI: dominio inhibidor de la proteasa Kunitz. *Figura tomada del artículo: "Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: the AICD enigma" (Beckett et al., 2012).*

La función fisiológica de la APP permanece todavía sin identificar. Sin embargo, se ha sugerido que esta proteína podría tener un papel en el crecimiento neurítico y la sinaptogénesis, en el tráfico proteico a lo largo del axón, en la traducción de señales transmembrana, en procesos de adhesión celular y en el metabolismo del calcio (Zheng and Koo, 2006).

Procesamiento de APP

El procesamiento de la APP es dependiente de enzimas con actividad secretasa y genera productos que son secretados al espacio extracelular, otros que permanecen en el

Introducción

interior de la célula y otros asociados a la membrana celular. Existen dos rutas diferentes de procesamiento proteolítico de la APP (**Figura 5**):

- *Vía amiloidogénica de procesamiento de la APP*

Mediante esta ruta se generan los péptidos A β . En primer lugar actúan enzimas con actividad β -secretasa, como BACE1 (*β -site APP cleaving enzyme 1*), una aspartil proteasa localizada en la región transmembrana, que corta APP en su dominio extracelular, liberando un dominio N-terminal soluble (sAPP β) y dejando un fragmento C-terminal anclado a la membrana denominado β -CTF (*C-terminal fraction*) o C99 (Vassar *et al.*, 1999). Posteriormente, este dominio β -CTF es procesado en su región transmembrana por la enzima γ -secretasa, liberando el péptido A β al espacio extracelular. Además de A β se genera un dominio intracelular de APP (AICD) que se cree que participa en la regulación de la expresión de numerosos genes (Haass *et al.*, 1992; Shoji *et al.*, 1992; Vassar *et al.*, 1999; Wilkins and Swerdlow, 2016).

El complejo proteolítico γ -secretasa está formado al menos por cuatro proteínas: las proteínas presenilina 1 (PS1) o presenilina 2 (PS2) que forman el dominio catalítico, nicastrina, APH (*Anterior pharynx defective*) 1a o 1b y *preseniline enhancer 2* (PEN2). El procesamiento que realiza γ -secretasa puede tener lugar en diferentes posiciones de la secuencia de A β , dando lugar a diversos péptidos A β y AICD de diferentes longitudes, entre los que se encuentran las isoformas más conocidas A β 40 y A β 42 (Haass *et al.*, 1992; Roher *et al.*, 1993).

- *Vía no amiloidogénica de procesamiento de la APP*

Esta es la ruta mayoritaria y en ella actúa en primer lugar alguna de las proteasas con actividad α -secretasa, como por ejemplo, las metaloproteasas ADAM-10 o ADAM-17 (*ADisintegrin And Metalloprotease 10 y 17*), que cortan el dominio extracelular de APP, liberando un fragmento N-terminal soluble denominado sAPP α y dejando en la membrana el fragmento α -CTF, también denominado C83. El sitio de corte de la enzima con actividad α -secretasa está localizado en la posición 16 de la secuencia de A β , por lo que mediante esta ruta de procesamiento de APP no se genera dicho péptido (Esch *et al.*, 1990). Tras el procesamiento realizado por la enzima con actividad α -secretasa, la enzima γ -secretasa actúa sobre el fragmento α -CTF liberando el péptido no tóxico p3 al espacio extracelular y el dominio intracelular AICD al citoplasma (Haass *et al.*, 1992).

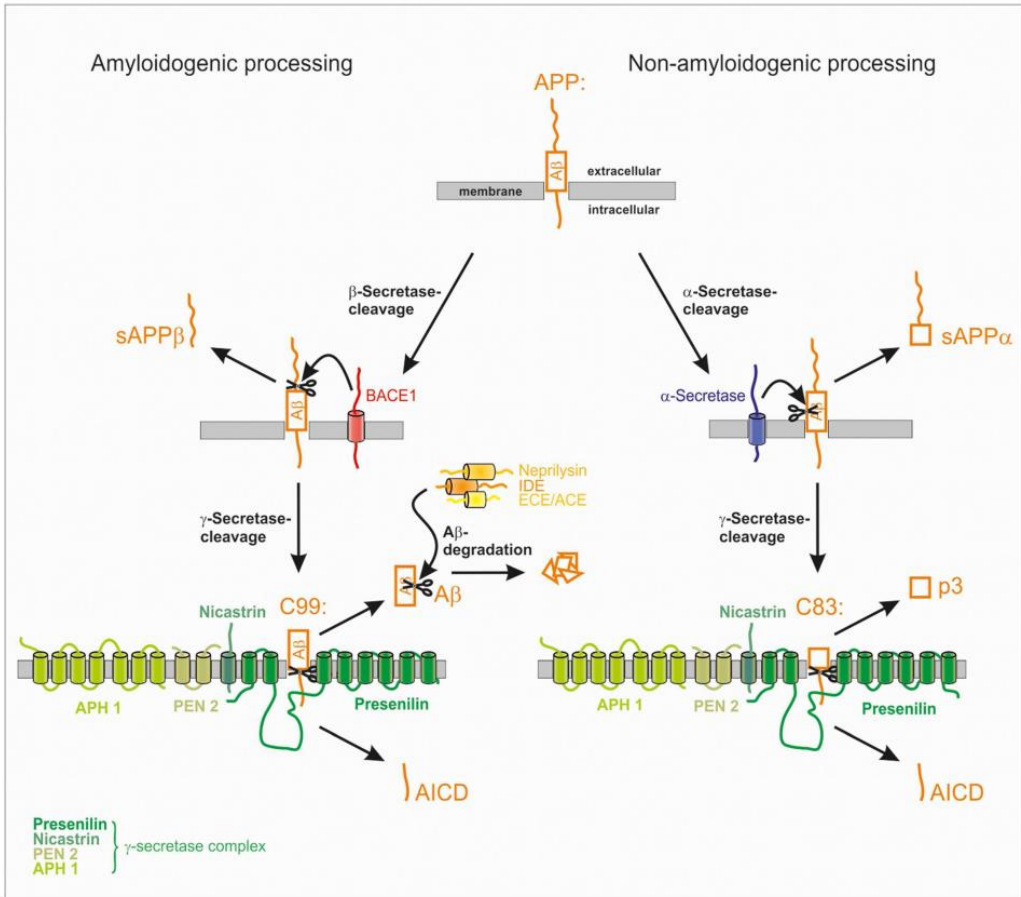


Figura 5. Esquema del procesamiento proteolítico de la proteína precursora del amiloide (APP). Se representa la ruta amiloidogénica (izquierda), por la que se generan los péptidos Aβ, y la ruta no amiloidogénica (derecha) del procesamiento proteolítico de la APP. Una vez generado, el Aβ soluble puede ser degradado por numerosas enzimas como Nepilisina, IDE (*insulin-degrading enzyme*), ECE (*endothelin-converting enzyme*) o ACE (*angiotensin-converting enzyme*) (ver apartado "Agregación y degradación de Aβ"). AICD: dominio intracelular de APP. *Figura adaptada del artículo "Nepilysin and Abeta Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease" (Grimm et al., 2013).*

Agregación y degradación de A β

Una vez liberado tras el procesamiento proteolítico, el péptido A β puede existir como monómeros, dímeros, trímeros y oligómeros solubles, o como fibrillas insolubles que forman parte mayoritaria de las placas amiloides características de la EA (**Figura 6**) (Hampel *et al.*, 2010b; Walsh and Selkoe, 2007). Aunque los mecanismos patogénicos que permiten la agregación de los monómeros no están completamente dilucidados, se cree que dicha agregación se produce como consecuencia de cambios conformacionales: los péptidos solubles adquieren una estructura en forma de lámina β después de su procesamiento proteolítico (Fitzpatrick *et al.*, 2013; Hampel *et al.*, 2010a). La tendencia con la que agrega el péptido A β parece depender de su secuencia primaria, de forma que la variante A β 42, debido a la hidrofobicidad aportada por los dos últimos aminoácidos de su secuencia, presenta una mayor tendencia a agregar que la isoforma A β 40 (Selkoe, 2001).

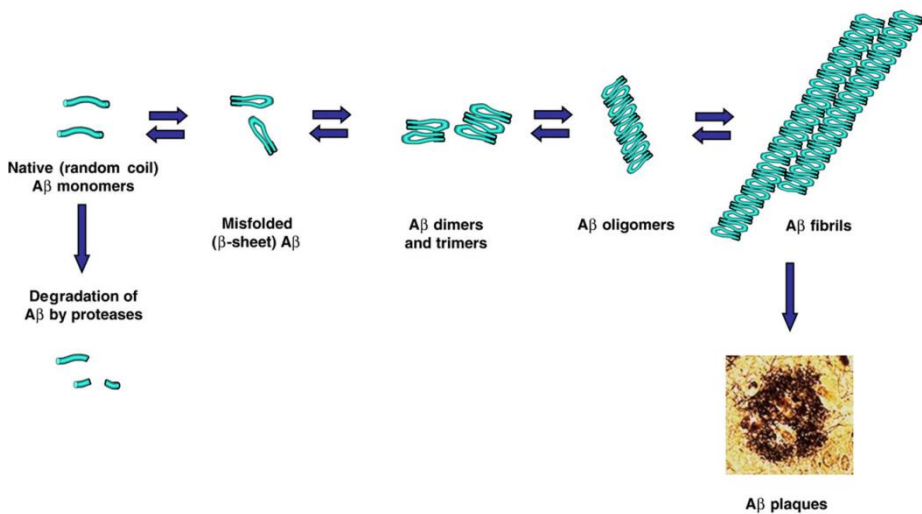


Figura 6. Modelo esquemático de la agregación de A β . Los monómeros solubles nativos se pliegan incorrectamente y se asocian entre sí formando oligómeros y otros productos intermedios que finalmente dan lugar a las fibrillas de A β depositadas en las placas amiloides. *Figura tomada del artículo "Biological markers of amyloid beta-related mechanisms in Alzheimer's disease" (Hampel et al., 2010b).*

La formación de estructuras en forma de lámina β , concretamente entre los residuos 18 y 42 de la secuencia de $A\beta$, convierte a esta región en una zona más inaccesible para la degradación proteolítica (Crouch *et al.*, 2009). De hecho, aunque existen varias enzimas degradadoras de $A\beta$ que son capaces de cortar el péptido en su forma monomérica, su capacidad para degradar especies oligoméricas o fibrilares está restringida en la mayoría de ellas. Algunas de las enzimas más importantes son metaloproteasas como la NEP (neprilisina), IDE (*insulin-degrading enzyme*), ECE (*endothelin-converting enzyme*) y ACE (*angiotensin-converting enzyme*). Otra enzima degradadora de $A\beta$, la plasmina, pertenece a la familia de las serín-proteasas. Tal y como se muestra en la **Figura 7**, la mayoría de estas enzimas presentan más de un sitio de corte en la secuencia de $A\beta$ (Wang *et al.*, 2006a):

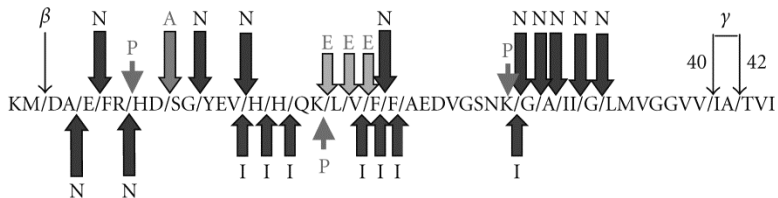


Figura 7. Sitios de corte de $A\beta$ por diferentes enzimas de degradación. N: neprilisina. I: *insulin-degrading enzyme*. E: *endothelin-converting enzyme*. A: *angiotensin-converting enzyme*. P: plasmina. β : representa el sitio de corte de APP por la enzima β -secretasa. Y: representa el sitio de corte de APP por la enzima Y-secretasa para generar los péptidos $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$. *Figura tomada del artículo "Beta-Amyloid degradation and Alzheimer's disease" (Wang et al., 2006a).*

Se ha comprobado que la expresión de NEP e IDE varía durante el proceso de envejecimiento normal de una manera dependiente de la región del cerebro (Caccamo *et al.*, 2005). Además, se ha observado que la expresión, tanto a nivel de mRNA como de proteína, de estas dos metaloproteasas es significativamente más baja en los cerebros de enfermos de Alzheimer que en controles sanos de la misma edad (Caccamo *et al.*, 2005; Cook *et al.*, 2003; Miners *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006a; Yasojima *et al.*, 2001a; Yasojima *et al.*, 2001b). En cualquier caso, aunque se asume que la degradación proteolítica de $A\beta$ es un proceso beneficioso, la relevancia del potencial fisiológico o neurotóxico de la mayoría de sus productos todavía es objeto de investigación (Grimm *et al.*, 2013).

La hipótesis de la cascada amiloide

La hipótesis de la cascada amiloide defiende que la acumulación cerebral de A β está ocasionada por un desequilibrio entre su producción y su eliminación, y que la deposición progresiva de A β representa el agente causativo de la EA. Este desequilibrio promovería el aumento de los niveles de A β y su agregación en especies oligoméricas neurotóxicas. Esto desencadenaría una cascada de eventos patológicos que incluyen la respuesta inflamatoria, la hiperfosforilación de tau y posterior formación de ovillos neurofibrilares, el daño vascular y, finalmente, la muerte celular y la demencia. La hipótesis de la cascada amiloide defiende que todos estos eventos son posteriores y ocurren como consecuencia del aumento inicial en la concentración de A β en el cerebro (Hardy and Higgins, 1992).

Uno de los principales hallazgos que motivaron la generación de esta hipótesis fue el descubrimiento de que una mutación dentro del gen de la APP (localizado en el cromosoma 21) era la responsable de algunos casos de la EA de origen familiar (Goate *et al.*, 1991). Este hecho, así como la demostración de que el A β era el principal componente bioquímico de las placas seniles, fue complementado con la observación de que los individuos con síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21 y, por tanto, triplicación del gen de la APP) desarrollan la EA de forma inevitable (Mann *et al.*, 1989). Se cree que la manera en la que se desarrolla la EA en estos casos obedece a un efecto dependiente de dosis por el cual el poseer una tercera copia del gen de la APP supondría una mayor producción de A β .

Además de estos hallazgos, en los portadores de algunas mutaciones en los genes de la PS1 o PS2 se observa un aumento de la producción de especies hidrofóbicas de A β como A β 42, con una mayor tendencia a agregar, acumularse y depositar (Borchelt *et al.*, 1996; Holtzman *et al.*, 2011; Scheuner *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1994) lo que se traduce en un incremento generalizado de la ratio A β 42/A β 40 (A β 42/40) en estos individuos (Selkoe and Hardy, 2016).

En el caso de la EA de inicio tardío, el responsable de la acumulación de A β no se atribuiría a un incremento en la producción de A β como sucede en la EA de tipo familiar, sino que más bien se debería a una alteración en el proceso de aclarado o eliminación de A β (Tanzi *et al.*, 2004; Zlokovic, 2008; Zlokovic *et al.*, 2000). De hecho, estudios de cinética con A β 40 y A β 42 marcados han demostrado que las tasas de producción de A β no difieren entre individuos controles y enfermos de Alzheimer de la variante esporádica. Sin embargo, en estos últimos, la tasa de eliminación de A β 40 y A β 42 del SNC es significativamente más lenta que en los individuos controles (Mawuenyega *et al.*, 2010).

En la hipótesis de la cascada amiloide (**Figura 8**) se postula que los oligómeros solubles de A β , pero no los monómeros ni las fibrillas insolubles de A β , podrían ser los responsables de la disfunción sináptica en los cerebros de pacientes con la EA. Dichos oligómeros de A β 42 inhibirían la LTP (*long-term potentiation*) en el hipocampo, un proceso imprescindible para la formación de memoria (Walsh *et al.*, 2002), e inducirían la hiperfosforilación de tau que causaría la generación de los ovillos neurofibrilares. Además, serían los responsables de la inflamación y el estrés oxidativo descrito en los cerebros de enfermos de Alzheimer. Aunque la patología con aumento de la proteína tau se postula como un evento tardío, todo ello también contribuiría a la pérdida de la integridad sináptica, la disfunción neuronal y la aparición de los síntomas cognitivos y la demencia.

Algunas de las evidencias que apoyan la hipótesis de la cascada amiloide son:

- Las mutaciones en el gen que codifica para la proteína tau (cromosoma 17) pueden causar demencia frontotemporal con parkinsonismo (Hutton *et al.*, 1998; Poorkaj *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998). Esta enfermedad neurodegenerativa se caracteriza por la deposición de tau en ovillos neurofibrilares en el cerebro pero no por la deposición de A β . Sin embargo, incluso una acumulación muy severa de tau no es suficiente como para inducir la formación de las placas amiloides características de la EA. Por lo tanto, se cree que la formación de ovillos neurofibrilares de proteína tau observados en cerebros de individuos con la EA ocurre después de los cambios en el metabolismo de A β y la formación inicial de las placas seniles (Hardy *et al.*, 1998).
- Los ratones transgénicos que sobreexpresan tanto la APP humana mutante como la tau humana mutante experimentan una mayor formación de ovillos de tau que los ratones transgénicos que sólo sobreexpresan tau. Sin embargo, la estructura, distribución y número de placas amiloides permanece inalterada al comparar ratones transgénicos con ambas mutaciones y ratones transgénicos que únicamente presentan mutaciones en el gen de la APP. Esto sugiere que el procesamiento alterado de APP ocurre antes que las alteraciones de tau en la cascada patogénica de la EA y que APP o A β influyen en la formación de ovillos neurofibrilares (Lewis *et al.*, 2001).

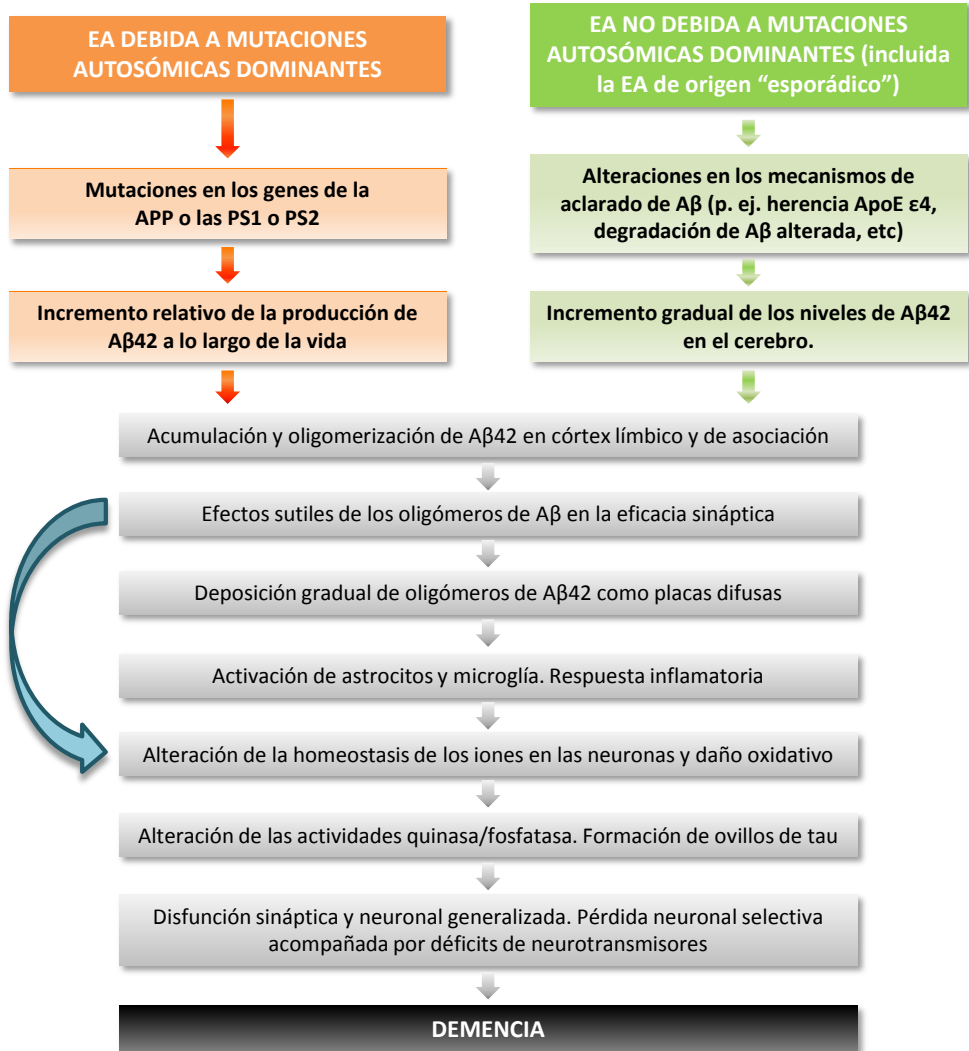


Figura 8. Esquema de la hipótesis de la cascada amiloide propuesta para la enfermedad de Alzheimer. El esquema incluye los eventos patogénicos principales. La flecha azul indica que los oligómeros de Aβ podrían dañar directamente las sinapsis y neuritas de las neuronas, además de activar la microglía y los astrocitos. EA: enfermedad de Alzheimer. APP: proteína precursora del amiloide. PS: presenilina. *Esquema adaptado de "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years" (Selkoe and Hardy, 2016).*

La identificación de una mutación de la APP en el segundo aminoácido de la región A β (A673T) resulta en una disminución del procesamiento de APP por la β -secretasa (Jonsson *et al.*, 2012) y en la generación de un péptido A β mutado que, además, tiene alteradas sus propiedades de agregación. Los portadores de esta mutación presentan una deposición reducida de A β y tienen un riesgo disminuido de desarrollar la EA.

Por el contrario, uno de los principales argumentos en contra de la hipótesis de la cascada amiloide es que el número de depósitos amiloides en el cerebro no se correlaciona perfectamente con el grado de deterioro cognitivo que el paciente experimenta durante su vida (Hardy and Selkoe, 2002; Murphy and LeVine, III, 2010). La explicación que se le da a este hecho es que el grado de demencia se correlaciona mejor con las especies solubles de A β , incluidos los oligómeros (Bates *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 1999), que con el número de placas seniles.

Por último, otro argumento en contra de esta hipótesis resalta el hecho de que numerosos ensayos clínicos de agentes anti-amiloide no han cumplido sus objetivos fijados. Sin embargo, la causa de este fracaso podría deberse, entre otras razones, a una baja penetración de estos agentes en el cerebro, a la inyección de una dosis insuficiente o con bajo potencial terapéutico, al hecho de que algunos de los pacientes incluidos en los ensayos clínicos no presentarían realmente la EA, sino otro tipo de demencia, o a que éstos se encontraran en un estadio muy avanzado de la enfermedad (Selkoe and Hardy, 2016).

Las hipótesis alternativas a la de la cascada amiloide no consideran que la deposición del A β sea el primer acontecimiento de una cascada de eventos patológicos que llevan a la neurodegeneración y la demencia, sino que postulan que la deposición de A β ocurre como una interacción en paralelo con otros eventos patológicos, como una causa necesaria pero no suficiente del proceso patológico que acaba por ocasionar la enfermedad (Chetelat, 2013; Pimplikar *et al.*, 2010; Small and Duff, 2008).

Biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer

Un biomarcador es un parámetro fisiológico, bioquímico o anatómico que puede ser medido objetivamente y que se utiliza como un indicador de un proceso biológico normal, un proceso patológico o una respuesta a una intervención terapéutica (Cedazo-

Introducción

Minguez and Winblad, 2010; Frey *et al.*, 2005; Jack, Jr. and Holtzman, 2013; Sprott, 2010). Por tanto, un biomarcador puede ser utilizado para realizar un diagnóstico clínico, estimar el riesgo de padecer una enfermedad (prognosis), evaluar el estadio de una enfermedad, o monitorizar la progresión y/o respuesta a una terapia (Blennow *et al.*, 2010). Se ha estipulado que un biomarcador ideal para la EA debería cumplir los siguientes requisitos (Blennow *et al.*, 2015b; Consensus report of the Working Group, 1998; Hampel *et al.*, 2010a; Hampel, 2011; Schneider *et al.*, 2009):

- Detectar un rasgo fundamental de la neuropatología.
- Tener una sensibilidad diagnóstica para la EA superior al 85 % junto con una especificidad superior al 75 % para distinguir la EA de otras demencias.
- Ser fiable y reproducible.
- No ser invasivo.
- Implicar un procedimiento fácil de llevar a cabo.
- Ser asequible.

Debido a que los cambios neuropatológicos de la EA preceden a los síntomas clínicos años o incluso décadas, se consideraría óptimo tratar la enfermedad tan pronto como sea posible. Por este motivo, el interés se centra fundamentalmente en la búsqueda de biomarcadores de la EA preclínica que identifiquen correctamente a los pacientes en riesgo, predigan la progresión clínica de la enfermedad y ayuden a la correcta selección e inclusión de individuos en ensayos clínicos de intervención terapéutica preclínica. Asimismo, una vez que se consigan tratamientos adecuados, las herramientas de diagnóstico serán necesarias para seleccionar aquellos individuos con la EA preclínica o prodrómica a los que aplicar el tratamiento en la práctica clínica rutinaria (Blennow *et al.*, 2015a; Hampel *et al.*, 2010b; Sperling *et al.*, 2011). La dificultad a la que nos enfrentamos en relación con la EA es que todavía no se ha establecido una unión firme entre la detección de cualquier biomarcador específico en individuos asintomáticos y la subsiguiente emergencia de la sintomatología clínica (Sperling *et al.*, 2011).

Los biomarcadores más utilizados actualmente en la EA pueden clasificarse en dos categorías: biomarcadores de neuroimagen y biomarcadores en LCR.

Neuroimagen

A lo largo de la progresión de los procesos neuropatológicos ocurren cambios morfológicos y funcionales de manera continua que pueden ser detectados y

cuantificados por varios tipos de técnicas de neuroimagen. El cambio cerebral más evidente relacionado con la edad es una atrofia cerebral resultante de la pérdida neuronal y sináptica. Esta atrofia es mayor en los individuos con demencia y a menudo muestra variaciones regionales en función del tipo de patología que sufre el paciente (Cedazo-Minguez and Winblad, 2010; Small *et al.*, 2008). Habitualmente las técnicas de imagen se clasifican como estructurales o funcionales en función de la información principal que ofrecen.

A continuación, se describen algunas de las técnicas más utilizadas en el ámbito de la EA:

Imagen por resonancia magnética estructural (MRI)

Esta técnica tiene una alta resolución y aporta información de alta calidad acerca de la estructura del cerebro. Generalmente los pacientes con la EA muestran atrofia en las zonas del cerebro afectadas por la patología (**Figura 9**) (Desikan *et al.*, 2011; Dickerson and Wolk, 2012; Hua *et al.*, 2008; Morra *et al.*, 2009; Vemuri *et al.*, 2009), lo que se asocia con la pérdida neuronal y de sinapsis en estas regiones (Bobinski *et al.*, 2000).

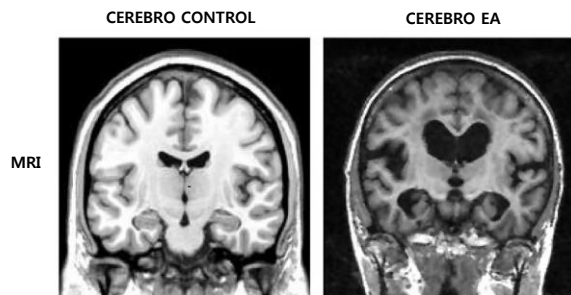


Figura 9. Ejemplo representativo de imágenes de resonancia magnética estructural de cerebros de pacientes con la EA e individuos cognitivamente sanos del mismo grupo de edad. El cerebro del paciente con la EA presenta atrofia simétrica del hipocampo y aumento de los ventrículos laterales. *Imagen tomada del artículo "Biomarkers for Alzheimer's disease and other forms of dementia: clinical needs, limitations and future aspects" (Cedazo-Minguez and Winblad, 2010).*

La MRI ha sido capaz de distinguir sujetos con la EA de controles sanos a partir del estudio volumétrico del lóbulo temporal medial y el hipocampo, con una sensibilidad del

Introducción

78-94 % y una especificidad del 60-100 % (Craig-Schapiro *et al.*, 2009). Además, en estudios transversales la MRI ha distinguido con una exactitud elevada los pacientes con DCL que progresaron a EA de los que no (deToledo-Morrell *et al.*, 2004; Jack, Jr. *et al.*, 2008; Killiany *et al.*, 2000; Tapiola *et al.*, 2008). No obstante, esta técnica presenta peores resultados a la hora de diferenciar la EA de otros tipos de demencia como la demencia vascular o la DLB (Barber *et al.*, 1999; Khan and Alkon, 2015).

Tomografía por emisión de positrones (PET)

La técnica de imagen PET permite la cuantificación *in vivo* de radiofármacos o ligandos radiactivos en el rango picomolar de concentración. Esto posibilita la evaluación de un proceso molecular en su sitio de acción y permite la detección de enfermedades en estadios asintomáticos cuando todavía no hay evidencias de cambios anatómicos detectables por MRI o tomografía computarizada (Phelps, 2000; Villemagne, 2016).

PET-A β

El desarrollo de marcadores PET para detectar los depósitos de A β ha permitido estudiar la patología beta-amiloide *in vivo* (Klunk *et al.*, 2004) y mejorar el entendimiento de la topografía, la propagación y las tasas de acumulación de A β en cerebros humanos (Villemagne and Chetelat, 2016).

El componente de Pittsburgh B (¹¹C-PiB) es un agente radiactivo análogo de la tioflavina y de bajo peso molecular capaz de medir depósitos de A β mediante PET *in vivo*. Concretamente, este compuesto se une con una afinidad elevada a la estructura en forma de láminas- β de los agregados fibrilares de A β . En los pacientes con la EA se ha descrito una captación cortical significativamente superior a la observada en los controles sanos del mismo grupo de edad (**Figura 10**) (Klunk *et al.*, 2004; Rowe *et al.*, 2007). Además, en la mayoría de pacientes a los que se les ha realizado un test PiB-PET *ante mortem* y una autopsia del cerebro *post mortem* se ha encontrado una excelente correspondencia entre la unión de PiB y la deposición cerebral de A β (Bacskai *et al.*, 2007; Ikonomic *et al.*, 2008).

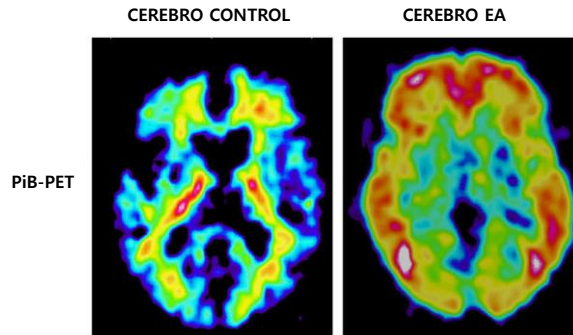


Figura 10. Ejemplo representativo de imágenes de ^{11}C -PiB-PET de cerebros de un paciente con la EA y un individuo cognitivamente sano del mismo grupo de edad. El cerebro del paciente con la EA presenta un aumento de carga cortical de $\text{A}\beta$. Imagen del artículo "Biomarkers for Alzheimer's disease and other forms of dementia: clinical needs, limitations and future aspects" (Cedazo-Minguez and Winblad, 2010).

Los estudios de imagen con PiB son apropiados para realizar un diagnóstico confirmatorio de la EA en los casos sintomáticos. Además, como la acumulación de $\text{A}\beta$ en el cerebro ocurre en los estadios iniciales de la enfermedad, este biomarcador también tiene potencial para poder ser utilizado en la identificación de individuos en las fases pre-sintomáticas de la enfermedad (Craig-Schapiro *et al.*, 2009). Este factor es muy importante, ya que los criterios clínicos y las técnicas de imagen de tipo estructural únicamente permiten realizar un diagnóstico lo suficientemente sensible y específico de la EA en los estadios medio y avanzado de la enfermedad (Villemagne *et al.*, 2005).

La corta vida media del carbono-11 radiactivo (20 minutos) limita su uso a los centros que disponen de un ciclotrón y ha hecho necesario el desarrollo de otros ligandos radiactivos con una vida media más larga como los derivados del flúor-18 (vida media de 110 minutos aproximadamente) (Johnson *et al.*, 2013). Existen tres ligandos de $\text{A}\beta$ de este tipo que han sido aprobados para uso clínico tanto por la EMA como por la FDA: ^{18}F -florbetapir (también llamado AV-45), ^{18}F -florbetaben y ^{18}F -flutemetamol (Herholz and Ebmeier, 2011). Todos estos ligandos han mostrado resultados similares a ^{11}C -PiB en lo que se refiere a la correlación de los análisis *ante mortem* y *post mortem* (Pike *et al.*, 2007; Villemagne *et al.*, 2012). Además han mostrado una elevada sensibilidad y especificidad en la detección de la patología fibrilar amiloide y en la discriminación de pacientes con la EA y controles cognitivamente sanos (Villemagne, 2016).

Introducción

Fluorodesoxiglucosa (FDG)-PET

La glucosa marcada radiactivamente (^{18}F -Fluorodesoxiglucosa o ^{18}F -FDG) se utiliza para medir el metabolismo cerebral de la glucosa, el cual es un indicador indirecto de su actividad funcional. Los estudios con FDG-PET han mostrado que en los enfermos de Alzheimer existe un hipometabolismo cortical simétrico distintivo que se extiende desde las regiones parietales y el giro cingulado posterior al córtex temporal y prefrontal (**Figura 11**) (Cedazo-Minguez and Winblad, 2010; Pakrasi and O'Brien, 2005; Silverman *et al.*, 2001), por lo que representa un biomarcador útil para evaluar los procesos de neurodegeneración.

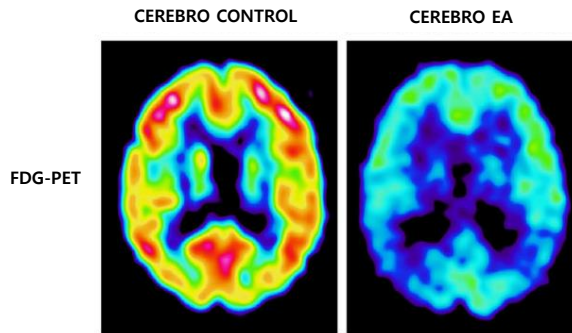


Figura 11. Ejemplo representativo de imágenes de ^{18}F -FDG-PET de cerebros de pacientes con la EA e individuos cognitivamente sanos del mismo grupo de edad. El cerebro del paciente con la EA muestra un metabolismo reducido de la glucosa, principalmente en las áreas parietales. *Imagen del artículo "Biomarkers for Alzheimer's disease and other forms of dementia: clinical needs, limitations and future aspects" (Cedazo-Minguez and Winblad, 2010).*

PET-tau

Se han desarrollado varios radiofármacos como ^{18}F -AV-1451 (T807) para detectar *in vivo* los ovillos neurofibrilares de tau característicos de la EA. Estudios neuropatológicos de esta enfermedad muestran una fuerte asociación entre los depósitos de tau, la disminución de la función cognitiva y los cambios neurodegenerativos asociados (Villemagne *et al.*, 2015). Además, las señales elevadas del ligando PET-tau, particularmente en las regiones neocorticales, se asocian fuertemente con la presencia de señales positivas en los escáneres de PET-A β (Johnson *et al.*, 2016; Scholl *et al.*, 2016). Sin embargo, la capacidad del biomarcador PET-tau para distinguir la EA de otras demencias

con patología tau como la FTD, la degeneración corticobasal y la parálisis supranuclear progresiva es más baja (Khan and Alkon, 2015).

PET de marcadores de inflamación

Se han desarrollado radiofármacos moleculares de activación microglial para utilizarse con PET, pero se trata de un terreno que todavía se encuentra en desarrollo inicial o experimental. La mayoría de estos ligandos se unen a la proteína translocadora de 18 kDa TSPO, también conocida como el receptor de benzodiazepina periférico, que refleja un proceso neuroinflamatorio (Lang, 2002). El ligando de PET más ampliamente empleado en este campo es ^{11}C -(R)-PK11195 y con él se han observado mayores tasas de retención en individuos con EA (Tomasi *et al.*, 2008) y con DCL (Okello *et al.*, 2009), en comparación con controles sanos no dementes de la misma edad (Reitz and Mayeux, 2014).

Líquido cefalorraquídeo (LCR)

El LCR es un fluido interesante para la búsqueda de biomarcadores de la EA ya que circula o rellena el espacio extracelular del cerebro y, por tanto, los cambios patológicos que ocurren en este órgano pueden reflejarse en su composición bioquímica (Hampel *et al.*, 2012).

Los tres biomarcadores principales de LCR para la EA son A β 42, la proteína tau total (t-tau) y la proteína tau fosforilada (p-tau).

A β 42 en LCR

Numerosos estudios apoyan la hipótesis de que los niveles de A β 42 en el LCR disminuyen conforme aumenta la deposición de A β en las placas seniles del cerebro (Blennow *et al.*, 2010; Bouwman *et al.*, 2009; Fagan *et al.*, 2007; Grimmer *et al.*, 2009; Mattsson *et al.*, 2009b; Shaw *et al.*, 2009; Visser *et al.*, 2009). Además, se ha observado que los niveles de A β 42 en el LCR de enfermos de Alzheimer son significativamente más bajos que en los controles sanos de la misma edad (Andreasen *et al.*, 1999; Galasko *et al.*, 1998; Motter *et al.*, 1995; Mulder *et al.*, 2002; Rosler *et al.*, 2001).

Introducción

El biomarcador A β 42 en el LCR no sólo se asocia con el diagnóstico clínico de la EA, sino que también se ha visto que existe una correlación importante con la neuropatología de A β en autopsias (Clark *et al.*, 2003a; Schoonenboom *et al.*, 2008; Seppala *et al.*, 2012; Strozyk *et al.*, 2003). Además, este biomarcador tiene potencial como identificador de las fases preclínicas de la enfermedad ya que los niveles de A β 42 en el LCR de individuos cognitivamente sanos se han correlacionado con el declive cognitivo futuro (Fagan *et al.*, 2007; Gustafson *et al.*, 2007; Stomrud *et al.*, 2010). Por último, se ha mostrado que existe casi un 100 % de concordancia entre niveles anormalmente bajos de A β 42 en LCR y PiB-PET positivos en enfermos de Alzheimer a los que se les han realizado ambos test (Fagan *et al.*, 2006; Grimmer *et al.*, 2009; Jagust *et al.*, 2009; Palmqvist *et al.*, 2015; Tolboom *et al.*, 2009). No obstante, existe una mayor discrepancia entre ambas técnicas cuando se analizan individuos sanos o pacientes con DCL (Landau *et al.*, 2013; Mattsson *et al.*, 2015b; Palmqvist *et al.*, 2014).

T-tau y p-tau en LCR

En comparación con los controles sanos, los niveles de las proteínas t-tau y p-tau en el LCR de los enfermos de Alzheimer son más altos (Buerger *et al.*, 2006; Mattsson *et al.*, 2009b; Shaw *et al.*, 2009; Visser *et al.*, 2009) debido probablemente a la acumulación previa de dichas proteínas en las neuronas, principalmente en los axones.

La localización de t-tau en el LCR se asocia con un proceso intrínseco de neurodegeneración (Hampel *et al.*, 2008) y, por tanto, también aparece durante el proceso de envejecimiento normal (Blennow *et al.*, 2015a) y cuando existe daño cerebral traumático o isquemia (Hesse *et al.*, 2001; Ost *et al.*, 2006). No obstante, este biomarcador se correlaciona bien con la severidad de la EA, y concentraciones altas se han asociado con un mayor declive cognitivo (Blom *et al.*, 2009; Samgard *et al.*, 2010; Shaw *et al.*, 2009).

Por otra parte, el aumento de los niveles de p-tau en el LCR refleja la formación de ovillos neurofibrilares en el cerebro. Las isoformas de tau fosforiladas en la treonina 231 y en la treonina 181 (p-tau_{231P} y p-tau_{181P}) son los subtipos que han presentado los mejores resultados en discriminar los grupos de enfermos de Alzheimer y controles sanos de la misma edad (Hampel *et al.*, 2008). Además, en los individuos con DCL, niveles altos de estas proteínas en el LCR se han asociado con la progresión del declive cognitivo (Buerger *et al.*, 2002).

Aunque A β 42, t-tau y p-tau por sí solos ya tienen cierta capacidad diagnóstica, en conjunto han presentado una elevada sensibilidad y especificidad para discriminar a los enfermos de Alzheimer de los individuos cognitivamente sanos de la misma edad (Hampel *et al.*, 2008; Olsson *et al.*, 2016; Schneider *et al.*, 2009). Asimismo, estos biomarcadores tienen potencial pronóstico ya que pueden distinguir a los individuos con DCL que van a progresar a fases más avanzadas de la enfermedad de los que no (Hampel *et al.*, 2008; Mattsson *et al.*, 2009a).

A pesar de que A β y tau son los biomarcadores de LCR más ampliamente utilizados, a continuación se mencionan otros dos biomarcadores de LCR con resultados prometedores:

Neurogranina

La neurogranina es una proteína dendrítica post-sináptica involucrada en la LTP y la consolidación de la memoria (Diez-Guerra, 2010; Huang *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2002). Se encuentra muy concentrada en las espinas dendríticas y en la EA se han observado niveles muy reducidos de esta molécula en el hipocampo y en el córtex frontal, lo que indica que se produce la pérdida de elementos post-sinápticos durante el proceso patológico (Davidsson and Blennow, 1998; Reddy *et al.*, 2005). Asimismo, se ha observado que concentraciones elevadas de neurogranina en el LCR predicen la progresión de la enfermedad en pacientes con DCL y se correlacionan con un deterioro cognitivo rápido durante el seguimiento clínico (Kvartsberg *et al.*, 2015).

YKL-40

YKL-40 es un biomarcador de inflamación. En la periferia, esta molécula es producida por células derivadas de los monocitos. Sin embargo, en el cerebro YKL-40 no se produce en células de la microglía sino en astrocitos acompañados por microglía activada, que probablemente también están produciendo TNF- α (factor de necrosis tumoral- α), IL-1 β (interleucina-1 β) y otros factores de la inflamación (Bonneh-Barkay *et al.*, 2012; Bonneh-Barkay *et al.*, 2010; Craig-Schapiro *et al.*, 2010). En la EA, los astrocitos aparecen en pequeños subconjuntos asociados con las placas de amiloide y los niveles de YKL-40 en LCR aumentan desde las primeras etapas de la enfermedad, permaneciendo elevados hasta estadios más tardíos (Craig-Schapiro *et al.*, 2010). Por tanto, YKL-40 podría tener

Introducción

utilidad para monitorizar los estadios iniciales de la EA (Fagan and Perrin, 2012). Además, la ratio de este biomarcador con los niveles de A β 42 en LCR podría predecir la tasa de declive cognitivo (Craig-Schapiro *et al.*, 2010).

Dinámica de los biomarcadores

Los cinco biomarcadores de la EA más populares y ampliamente utilizados en los ensayos clínicos (Albert *et al.*, 2011; Dubois *et al.*, 2010; Jack, Jr. *et al.*, 2011; McKhann *et al.*, 2011; Sperling *et al.*, 2011) se han clasificado en dos grandes categorías:

- Biomarcadores de la deposición de placas amiloides en el cerebro: retención elevada de PET-A β y disminución de los niveles de A β 42 en el LCR.
- Biomarcadores de neurodegeneración: aumento de t-tau y p-tau en el LCR, hipometabolismo medido por FDG-PET y presencia de atrofia cerebral medida por MRI.

Todos estos biomarcadores son indicadores de los cambios específicos que caracterizan la EA *in vivo*. Sin embargo, no todos ellos se presentan al mismo tiempo, debido a que los procesos patológicos y el deterioro cognitivo presentes en la EA ocurren de forma gradual antes de la aparición de la demencia.

El modelo dinámico de biomarcadores propuesto por Jack *et al.* recapitula los principios más destacados de la hipótesis de la cascada amiloide, y se basa en que la alteración de los biomarcadores de la EA ocurre de forma ordenada y sucesiva en el tiempo (Jack, Jr. *et al.*, 2010). Los resultados de estudios longitudinales llevados a cabo en grandes cohortes tales como ADNI (*Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative*) o AIBL (*Australian Imaging, Biomarker & Lifestyle Study of Ageing*) sugieren que existe un orden en la aparición de los biomarcadores. Según este modelo hipotético, la agregación y deposición de A β 42 ocurre muchos años antes que la aparición de los síntomas clínicos y puede detectarse antes que la patología de tau y la degeneración neuronal (**Figura 12**).

Este modelo se apoya en estudios de biomarcadores de la EA esporádica, en los que se observó que el cambio de A β 42 en el LCR es un evento muy inicial en la cascada de eventos patológicos que ocurren durante el curso de esta enfermedad (Gustafson *et al.*, 2007; Skoog *et al.*, 2003). En estudios con modelos de ratones transgénicos de la EA también se concluyó que la acumulación de A β es un evento temprano, mientras que la patología relacionada con tau ocurre más tarde (Oddo *et al.*, 2003). Además, estudios tanto de evaluación *post mortem* de A β como de neuroimagen PET-A β han indicado que

el 20-40 % de individuos cognitivamente normales con edades comprendidas entre los 60 y los 90 años tienen alta deposición de A β en el cerebro (Arvanitakis *et al.*, 2002; Price *et al.*, 2009; Rowe *et al.*, 2010). Esto indica que la deposición de A β precede tanto a la atrofia cerebral como al declive cognitivo (Jack, Jr. *et al.*, 2010; Jack, Jr. *et al.*, 2012). Por tanto, el estudio de la patología amiloide cerebral parece la alternativa más adecuada si se tiene el objetivo de identificar pacientes asintomáticos con riesgo de desarrollar la EA para poder aplicar terapias modificadoras de esta enfermedad en estadios iniciales.

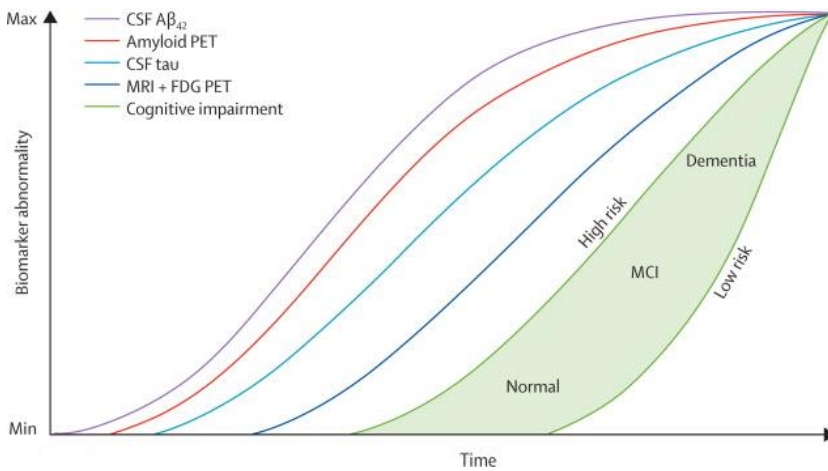


Figura 12. Modelo hipotético de la dinámica de los biomarcadores durante el desarrollo de la EA. La figura muestra la relación entre el tiempo (eje x) y el grado de anomalía de los biomarcadores (eje y). Los primeros biomarcadores que se ven alterados son los relacionados con A β : A β 42 en LCR (línea morada) y PET-A β (línea roja). A continuación, se alteran los biomarcadores de neurodegeneración: niveles de tau en LCR (línea azul clara), y atrofia (MRI) e hipometabolismo de la glucosa (FDG-PET) que se representan conjuntamente con una línea azul oscura. El déficit cognitivo se representa como una zona verde con límites de alto y bajo riesgo (dependiendo, por ejemplo, de la reserva cognitiva del individuo). Por definición, todas las curvas convergen en el punto de máxima aberración. CSF: *cerebrospinal fluid* (líquido cefalorraquídeo); PET: tomografía por emisión de positrones; MRI: imagen por resonancia magnética; FDG: fluorodeoxiglucosa; MCI: *mild cognitive impairment* (deterioro cognitivo leve). *Imagen tomada del artículo "Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers" (Jack, Jr. et al., 2013).*

Finalmente, conviene señalar que en los últimos años, fomentado en parte por el desarrollo del biomarcador PET-tau, se está apostando por una clasificación de los biomarcadores de la EA en tres categorías principales que incluirían los biomarcadores de patología amiloide (A β 42 en LCR y PET-A β), los de patología tau (p-tau en LCR y PET-tau)

y los biomarcadores de neurodegeneración o daño neuronal (t-tau en CSF, FDG-PET y MRI). Esta actualización se basa en que mediante la separación de los biomarcadores de ovillos neurofibrilares de los de daño neuronal, se podría diferenciar entre los procesos neurodegenerativos que son atribuibles a la EA de los que se originan por otras causas (Jack, Jr. *et al.*, 2016).

Limitaciones de los biomarcadores de neuroimagen y LCR

El NIA y la AA han recomendado que la información obtenida por los biomarcadores neuroquímicos y de neuroimagen sea utilizada para el diagnóstico de la EA con propósitos de investigación y para la inclusión de los pacientes en los ensayos clínicos (McKhann *et al.*, 2011; Petersen and Trojanowski, 2009). Sin embargo, estos dos tipos de biomarcadores presentan limitaciones importantes que restringen su uso extendido en la práctica clínica y como herramienta general de cribado o *screening* poblacional.

Por una parte, la extracción del LCR se lleva a cabo mediante una punción lumbar, un procedimiento invasivo y que requiere de especialistas entrenados (Kawarabayashi and Shoji, 2008). Por ello, su uso como herramienta de *screening* y como biomarcador de elección en los estudios longitudinales que precisan de extracciones repetidas de muestra en individuos de edad avanzada se ve limitado (Bazenet and Lovestone, 2012; Galvin *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2009).

Por otra parte, los biomarcadores basados en técnicas de neuroimagen son también procedimientos invasivos que además requieren de equipos sofisticados no siempre disponibles y que suponen un coste muy elevado. Asimismo, su aplicabilidad en la práctica clínica se ve limitada debido a la corta vida media de los radiofármacos, lo que restringe su uso a los centros o ciudades que disponen del aparato (ciclotrón) necesario para su fabricación (Bazenet and Lovestone, 2012; Fiandaca *et al.*, 2014; Toledo *et al.*, 2013).

Por todo ello, una fuente periférica de biomarcadores como puede ser la sangre, representaría grandes ventajas y se consideraría una alternativa atractiva, ya que se trata de una muestra fácil de obtener, asequible incluso para centros de atención primaria y cuya extracción de forma repetida para su uso en estudios longitudinales o como control preventivo de la población es mucho más sencilla (O'Bryant *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2009). No obstante, para que la sangre se pueda utilizar como fuente de biomarcadores de la EA es necesario demostrar que refleja la patología característica de la EA y que los

biomarcadores medidos en ella se correlacionan con los biomarcadores medidos en el cerebro, ya sea mediante PET o análisis de LCR, mientras el sujeto está vivo (Bazenet and Lovestone, 2012).

Comunicación entre el sistema nervioso central y la sangre

Existen varios mecanismos que participan en la eliminación cerebral de A β como la degradación proteolítica, la fagocitosis mediada por la microglía y el transporte de A β al LCR con su posterior reabsorción en la sangre (Roberts *et al.*, 2014). Además, otra vía muy importante de eliminación cerebral de A β consiste en un transporte activo entre el SNC y la sangre a través de la barrera hematoencefálica (BHE) (Deane *et al.*, 2009; Roberts *et al.*, 2014). En dicho transporte participan fundamentalmente el receptor LRP-1 (Deane *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2000; Shibata *et al.*, 2000), que media la eliminación de A β del cerebro hacia la sangre, y el receptor denominado RAGE (*receptor for advanced glycation end products*), que se encarga del transporte activo del A β circulante hacia el SNC (Deane *et al.*, 2003). Estos receptores pueden unir el A β directamente o unirse a una de las proteínas transportadoras de A β , facilitando su intercambio a través de las células endoteliales (Pascale *et al.*, 2011). El transporte activo de A β a través de la BHE y por medio del LCR es responsable del 50 % del A β eliminado del SNC (Roberts *et al.*, 2014). Por tanto, estos mecanismos fisiológicos son muy importantes para prevenir la acumulación y deposición de A β en el cerebro (Shibata *et al.*, 2000), ya que el flujo pasivo de A β desde el líquido intersticial hasta el torrente sanguíneo sólo es responsable de la eliminación del 10-15 % del A β del SNC (Wang *et al.*, 2006b). Una vez que el péptido A β se encuentra en el plasma, éste puede unirse a una forma soluble de la proteína LRP (sLRP) y ser transportado al hígado y los riñones, en los cuales tiene lugar la eliminación tanto del A β libre como de los complejos sLRP-A β (Sagare *et al.*, 2007; Sagare *et al.*, 2012). La vida media del A β en el plasma es de tres horas, lo cual supone un recambio mucho más rápido que el que ocurre en el LCR donde la vida media de este péptido es de nueve horas (Ovod *et al.*, 2017).

Durante el proceso de envejecimiento normal así como en los pacientes con la EA y en modelos de ratones transgénicos de dicha enfermedad, se ha observado un aumento en la expresión de RAGE en las células endoteliales de la microvasculatura cerebral (Deane *et al.*, 2003; Donahue *et al.*, 2006; Silverberg *et al.*, 2010b; Yan *et al.*, 1996), mientras que la expresión de LRP-1 disminuye (Deane *et al.*, 2004; Donahue *et al.*, 2006; Shibata *et al.*,

Introducción

2000; Silverberg *et al.*, 2010a) con respecto a los controles. Ello favorecería el transporte de A β hacia el fluido intersticial del cerebro y reduciría su salida del mismo, lo que en conjunto contribuiría a su acumulación en el SNC (Deane *et al.*, 2009). Asimismo, se cree que la alteración de la funcionalidad de la BHE, ocasionada tanto por la edad como por la progresión de la enfermedad, podría favorecer el desarrollo de esta patología, ya que la eliminación de especies tóxicas de A β desde el cerebro se vería comprometida (Burgmans *et al.*, 2013; Pascale *et al.*, 2011; Shibata *et al.*, 2000). De hecho, un estudio ha demostrado que en los enfermos de Alzheimer de tipo esporádico la eliminación cerebral de A β se ve reducida en un 30 % en comparación con los controles sanos (Mawuenyega *et al.*, 2010).

De manera adicional, algunos estudios llevados a cabo en modelos de ratones transgénicos de la EA apoyan la hipótesis de que las concentraciones de A β en el plasma y en el LCR se encuentran en un estricto equilibrio dinámico (Gherzi-Egea *et al.*, 1996; Kawarabayashi *et al.*, 2001), de modo que el incremento en la producción de A β en el cerebro podría asociarse con concentraciones elevadas de A β en estos fluidos periféricos. No obstante, se ha observado que dicho equilibrio se ve alterado cuando se produce la deposición de A β en el cerebro (DeMattos *et al.*, 2002), de modo que la formación de las placas seniles ocasionaría una reducción acelerada de los niveles de A β 42 en el LCR y la sangre (Kawarabayashi *et al.*, 2001).

En definitiva, la existencia de una comunicación entre el SNC y la sangre a través de un transporte activo de A β y el hecho de que un porcentaje elevado del A β presente en el SNC alcance la sangre por medio de mecanismos de eliminación, plantea la hipótesis de que los procesos de amiloidosis que ocurren en el SNC puedan ser detectados en la sangre. De hecho, un estudio reciente sobre el metabolismo de A β realizado en humanos con marcaje de isótopos estables, ha sugerido que la cinética de A β en el plasma refleja la patología amiloide del SNC de una manera similar a la observada en el LCR. Asimismo, este estudio considera que, ya que el proceso de amiloidosis de A β ocurre exclusivamente en el SNC, el desarrollo de alteraciones de los niveles de este péptido en la sangre sería improbable sin una fuente de A β del propio SNC (Ovod *et al.*, 2017). En conjunto, todos estos resultados motivarían el estudio de los niveles de A β en sangre como un posible biomarcador de la EA.

No obstante, a pesar de todos estos indicios y resultados, algunos estudios han concluido que los niveles de A β 40 y A β 42 en el plasma no reflejan ni la acumulación de A β en los cerebros de individuos con la EA (Fagan *et al.*, 2006; Freeman *et al.*, 2007), ni se correlacionan con los niveles de este analito en el LCR (Hansson *et al.*, 2010; Le Bastard *et al.*, 2009; Lewczuk *et al.*, 2010; Matsumoto *et al.*, 2007; Mehta *et al.*, 2001;

Vanderstichele *et al.*, 2000), algo que compromete el uso de este biomarcador con fines diagnósticos o pronósticos.

Biomarcadores en sangre

El desarrollo de biomarcadores en sangre para la EA se presenta como una alternativa no invasiva, rentable, sencilla y accesible en comparación con el uso de los biomarcadores en LCR o de neuroimagen.

A β en plasma

El péptido A β en plasma es el marcador periférico de la EA más ampliamente examinado (Henriksen *et al.*, 2014) ya que su acumulación en el cerebro constituye un evento inicial en la cascada de procesos patológicos que tienen lugar antes de la aparición de los primeros síntomas clínicos (Koyama *et al.*, 2012).

Numerosos estudios de los últimos años han tratado de averiguar si los niveles de A β en plasma varían entre los diferentes grupos de diagnóstico: controles normales, individuos con DCL e individuos diagnosticados con demencia debida a la EA. Además, otros muchos estudios también han intentado averiguar si los niveles basales de A β podrían predecir la evolución de la EA.

En lo que respecta a la forma familiar de esta enfermedad, se han cuantificado niveles plasmáticos altos de A β total (Scheuner *et al.*, 1996) y A β 42 (Kosaka *et al.*, 1997) antes del inicio de la demencia, tanto en individuos con mutaciones en los genes de la APP y las PS1 y PS2, como en los individuos con trisomía del cromosoma 21 o síndrome de Down (Head *et al.*, 2011; Schupf *et al.*, 2001). Estos resultados sugieren que posiblemente en la variante esporádica de la enfermedad también podrían detectarse niveles alterados de A β en el plasma. Sin embargo, los estudios realizados han dado lugar a resultados contradictorios, ya que en algunos de ellos no se han encontrado diferencias en los niveles plasmáticos de A β entre los diferentes grupos de diagnóstico (Fukumoto *et al.*, 2003; Tamaoka *et al.*, 1996; Toledo *et al.*, 2011; Vanderstichele *et al.*, 2000), mientras que en otros estudios sí que se han encontrado diferencias, aunque de diferente tipo: desde niveles más elevados de A β 40 (Mehta *et al.*, 2000) o de A β 42 en el grupo de los

Introducción

enfermos de Alzheimer (Mayeux *et al.*, 2003), hasta niveles reducidos de A β 42 y/o del índice o la ratio A β 42/40 en pacientes con DCL o con la EA en comparación con los controles sanos (Lui *et al.*, 2010; Pesaresi *et al.*, 2006).

Además de los estudios transversales citados anteriormente, también se han publicado estudios longitudinales que persiguen el objetivo de averiguar si los niveles plasmáticos de A β en el punto de partida del estudio (o *baseline*) podrían predecir el desarrollo de la EA en individuos cognitivamente normales. Los resultados de estos estudios también han sido controvertidos: en algunos de ellos no se ha encontrado asociación significativa (Hansson *et al.*, 2010; Lopez *et al.*, 2008; Toledo *et al.*, 2011) y en otros se han descrito niveles plasmáticos de A β 40 (van Oijen *et al.*, 2006) o A β 42 (Mayeux *et al.*, 2003; Mayeux *et al.*, 1999; Schupf *et al.*, 2008) más elevados en *baseline* en los individuos que posteriormente desarrollaron la EA.

No obstante, algunos estudios recientes realizados con grandes poblaciones de individuos (en general más jóvenes y asintomáticos o en fases más tempranas de la enfermedad) coinciden en la existencia de una correlación entre tener un índice A β 42/40 bajo en el punto de partida y un riesgo incrementado de desarrollar la enfermedad (Abdullah *et al.*, 2009; Chouraki *et al.*, 2015; Graff-Radford *et al.*, 2007; Janelidze *et al.*, 2016a; Lambert *et al.*, 2009; van Oijen *et al.*, 2006). Además, estos últimos resultados también han sido respaldados por un meta-análisis de Koyama que incluyó 13 estudios y un total de 10.303 individuos procedentes de trabajos publicados entre 1995 y 2011, en el cual se indicó que un índice A β 42/40 bajo se asocia significativamente con el desarrollo de la EA (Riesgo Relativo, RR = 1,60, IC 95 % = 1,04, 2,46; p = 0,03). Asimismo, este estudio mostró que los niveles plasmáticos de A β 40 y A β 42 tomados de forma aislada no se asocian significativamente con ningún resultado. En cualquier caso, debido a la gran heterogeneidad de este meta-análisis, sus autores sugieren la necesidad de investigar más profundamente el valor predictivo del índice A β 42/40 (Koyama *et al.*, 2012).

Tal y como se ha mencionado previamente, el diagnóstico clínico de la EA presenta un cierto porcentaje de error (Beach *et al.*, 2012) y, por tanto, su uso como estándar de oro para evaluar el poder diagnóstico o predictivo de los biomarcadores plasmáticos podría sesgar los resultados obtenidos. Por este motivo, se considera más adecuado validar los biomarcadores periféricos frente a biomarcadores centrales, ya sean bioquímicos (LCR) o de neuroimagen. En relación con esto, estudios recientes han encontrado que existe una correlación estadísticamente significativa, aunque débil, entre los niveles plasmáticos de A β (concretamente el índice A β 42/40) y los biomarcadores centrales de la EA, ya sea PET-A β (Devanand *et al.*, 2011; Janelidze *et al.*, 2016a; Lui *et al.*, 2010) o A β 42 y A β 42/40 en

LCR (Janelidze *et al.*, 2016a). Sin embargo, otros estudios no han encontrado correlación entre los niveles plasmáticos y cerebrales de A β , ya sea comparándolos con biomarcadores de neuroimagen o de LCR (Fagan *et al.*, 2006; Hansson *et al.*, 2010; Le Bastard *et al.*, 2009). En nuestro laboratorio pensamos que la búsqueda de esta asociación debería orientarse hacia los estadios más tempranos de la EA preclínica, ya que la alteración de la funcionalidad de la BHE podría dificultar dicha correlación. En concordancia con esto, en un estudio de Giedraitis *et al.* se encontró correlación entre los niveles de A β 40 y A β 42 en plasma y LCR en el grupo de individuos sanos, pero no en los grupos de individuos con DCL y EA (Giedraitis *et al.*, 2007).

A pesar de la existencia de un transporte activo de A β entre el SNC y la sangre (Roberts *et al.*, 2014), la heterogeneidad de resultados obtenidos al estudiar el potencial diagnóstico del biomarcador A β plasmático sugiere que podría existir algún tipo de enmascaramiento o influencia de ciertos factores de confusión que dificultaran la correlación entre los niveles centrales y periféricos de A β . En relación con esto, por una parte está descrito que el *pool* de A β circulante en el plasma está compuesto no sólo por el A β producido en el cerebro y transportado a través de la BHE, sino también por el péptido producido por tejidos y órganos periféricos (Roher *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2009; Toledo *et al.*, 2013), así como por el aportado por las plaquetas que también producen APP y secretan el péptido A β (Chen *et al.*, 1995; Skovronsky *et al.*, 2001). Por otra parte, la cuantificación de este péptido en el plasma supone un procedimiento más complicado que su cuantificación en el LCR, ya que, en primer lugar, la concentración de A β en el plasma es muy baja (100 veces menor a la del LCR) (Mehta *et al.*, 2000) y, en segundo lugar, la concentración total de proteínas es muy superior. Además, la naturaleza altamente hidrofóbica de este péptido favorece su oligomerización e interacción con muchas de las proteínas de esta matriz como por ejemplo la albúmina, la α 2-macroglobulina, las lipoproteínas y los factores del complemento (Biere *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 2012; Deane *et al.*, 2009; Kuo *et al.*, 1999; Kuo *et al.*, 2000). En relación con este aspecto, hay estudios que sugieren que aproximadamente el 90 % del A β presente en el plasma se encuentra unido a albúmina y lipoproteínas y, por tanto, sólo una pequeña parte de este péptido se encontraría libre en el plasma (Biere *et al.*, 1996; Sagare *et al.*, 2007). Todo esto podría dificultar la cuantificación del A β plasmático en un inmunoensayo debido al posible enmascaramiento de los epítomos (Kawarabayashi and Shoji, 2008; Schneider *et al.*, 2009; Zetterberg and Blennow, 2006).

En definitiva, a pesar de la dificultad de la cuantificación fiable del péptido A β en el plasma y de la gran variedad de resultados obtenidos en los diferentes estudios

Introducción

realizados por numerosos grupos de investigación, las ventajas que aportaría un biomarcador de la EA en el plasma son tan amplias que consideramos que merece la pena investigar su potencial en una población de individuos sanos con riesgo de desarrollar la EA. Entre todos los posibles marcadores beta-amiloides que se pueden estudiar, el índice plasmático A β 42/40 se está postulando como un biomarcador premórbido útil para la identificación de individuos cognitivamente sanos con un riesgo incrementado de evolucionar a DCL o EA (Kawarabayashi and Shoji, 2008).

Otros péptidos A β

Desde los años 90 se conoce que existen en el cerebro isoformas truncadas de A β en sus extremos N- y C-terminal (Miller *et al.*, 1993; Naslund *et al.*, 1994). Asimismo, además de los péptidos más ampliamente estudiados, A β 1-40 y A β 1-42, también está descrita la presencia de más de 20 isoformas de A β en el LCR (Portelius *et al.*, 2006; Sarasa *et al.*, 2013).

Con relación a los péptidos truncados en el extremo N-terminal, hay estudios que consideran que, al igual que el péptido A β 1-42, otras isoformas como A β 2-40 y A β 2-42 son más propensas a agregar y presentan una toxicidad elevada (Bibl *et al.*, 2012). Se ha descrito también la isoforma [Pyr3] A β 3-42 que tiene el glutámico de la posición 3 en forma de piroglutamato, lo que le confiere una mayor resistencia a la degradación. Esta parece ser una especie relevante en la EA ya que es abundante en las regiones del cerebro afectadas y se ha considerado que podría comportarse como semilla de agregación de las placas amiloides (Saido *et al.*, 1995; Saito *et al.*, 2011; Schilling *et al.*, 2008; Sullivan *et al.*, 2011).

En lo que respecta a las isoformas de A β truncadas en el extremo C-terminal, en el LCR se ha publicado la existencia de numerosas isoformas entre las que destacan A β 1-16, A β 1-33, A β 1-37, A β 1-38 y A β 1-39, además de A β 1-40 que sería también una isoforma truncada de la prototípica A β 1-42 (Maddalena *et al.*, 2004; Portelius *et al.*, 2006; Vigo-Pelfrey *et al.*, 1993; Wiltfang *et al.*, 2002). Aunque se ha descrito que las isoformas A β 1-38 y A β 1-40 son las más abundantes en este fluido (Portelius *et al.*, 2006; Wiltfang *et al.*, 2002), en nuestro laboratorio hemos encontrado que la variante A β 1-17 no sólo está presente en el LCR, sino que es la segunda isoforma más abundante después de A β 1-40 (Sarasa *et al.*, 2013). A β 1-17 también se encuentra en las placas seniles de los enfermos de Alzheimer (Perez-Grijalba *et al.*, 2015).

En la matriz plasmática también se han identificado numerosas variantes de A β , además de A β 1-40 y A β 1-42, como A β 1-37, A β 1-38, A β 1-39, A β 1-41, A β 2-40, A β 2-42 (Lewczuk *et al.*, 2004; Maler *et al.*, 2007). De hecho, se considera que la cuantificación relativa de los dos péptidos más estudiados, A β 1-40 y A β 1-42, constituye únicamente el 60 % del total de todos los péptidos beta-amiloides presentes en el plasma (Maler *et al.*, 2007). Con la idea de seguir investigando el potencial diagnóstico del péptido A β 1-17, en nuestro laboratorio se ha desarrollado un kit ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) sándwich para la cuantificación específica de dicha isoforma en el plasma. Los resultados preliminares de un estudio piloto que incluyó controles sanos, individuos con DCL y enfermos de Alzheimer, sugirieron que los individuos con una ratio A β 17/42 baja tienen una probabilidad más elevada de padecer DCL o la EA, en comparación con los individuos con una ratio A β 17/42 alta (Perez-Grijalba *et al.*, 2015).

En resumen, es posible que sean varias las isoformas de A β que jueguen un papel importante en el desarrollo de la EA. Además, se cree que algunos de estos péptidos podrían reflejar más adecuadamente los cambios específicos de los distintos procesos que intervienen en la neurodegeneración, como pueden ser los cambios en la actividad de las enzimas secretasas y en el metabolismo de la APP (Bibl *et al.*, 2007; Wiltfang *et al.*, 2002). Por ejemplo, se han descrito niveles estables o más elevados de la variante A β 1-38 en el LCR de los enfermos de Alzheimer (Wiltfang *et al.*, 2002) y, por el contrario, niveles disminuidos de este mismo péptido en pacientes con FTD (Bibl *et al.*, 2007). Por tanto, la cuantificación de varias isoformas de A β podría ayudar al diagnóstico diferencial de la EA frente a otras enfermedades neurodegenerativas (Bibl *et al.*, 2004; Bibl *et al.*, 2007; Portelius *et al.*, 2009; Sarasa *et al.*, 2013; Wiltfang *et al.*, 2002).

Tau en plasma

Utilizando sistemas clásicos de análisis, los niveles de tau en suero o plasma son indetectables tanto en individuos con DCL como en individuos con EA (Henriksen *et al.*, 2014). Por tanto, la cuantificación de esta proteína en sangre requiere de sistemas ultrasensibles (Randall *et al.*, 2013). Al igual que hemos descrito anteriormente para el caso de A β , diferentes estudios que han tratado de averiguar el potencial de tau como biomarcador en plasma han presentado resultados contradictorios: niveles claramente más elevados (Chiu *et al.*, 2014) o algo más elevados en la EA (Zetterberg *et al.*, 2013), sin diferencias entre los pacientes con la patología y los controles (Wang *et al.*, 2014), o

Introducción

bien con niveles disminuidos en los pacientes (Sparks *et al.*, 2012). No obstante, un estudio reciente realizado con 563 participantes de la cohorte ADNI y 721 participantes de la cohorte BioFINDER ha mostrado que los niveles plasmáticos elevados de tau se asocian con la EA, con niveles más altos de tau en el LCR y con niveles más bajos de A β 42 en el LCR. No obstante, las correlaciones fueron débiles y difirieron entre las dos cohortes analizadas. Por otra parte, el análisis longitudinal de la cohorte ADNI mostró una asociación significativa entre los niveles de tau en plasma y una peor cognición, una mayor atrofia y un mayor hipometabolismo cerebral durante el seguimiento. En definitiva, parece que los niveles plasmáticos de tau reflejan, al menos parcialmente, los cambios que ocurren conforme transcurre la EA. No obstante, el gran solapamiento que existe en los niveles cuantificados en los diferentes grupos impide el uso de tau en plasma como biomarcador de ayuda al diagnóstico y requiere el desarrollo de nuevos estudios en el futuro (Mattsson *et al.*, 2016).

La identificación de biomarcadores de la EA es una tarea urgente y probablemente necesaria para el desarrollo y la evaluación de terapias modificadoras de la enfermedad, así como para la reducción de los costes de los ensayos clínicos (van Rossum *et al.*, 2010). En este último terreno, los biomarcadores podrían ser muy útiles en las tareas iniciales de reclutamiento, favoreciendo la identificación de pacientes que se encuentren en las fases preclínicas de la enfermedad (Aisen, 2011; Bazenet and Lovestone, 2012; Blennow *et al.*, 2010; Cedazo-Minguez and Winblad, 2010; Hampel *et al.*, 2010b; Morris *et al.*, 2010). En este sentido, los biomarcadores plasmáticos podrían utilizarse de manera complementaria al uso de biomarcadores de neuroimagen o de LCR. Es decir, los biomarcadores en sangre podrían ser útiles para realizar una preselección de los individuos con alto riesgo de desarrollar la enfermedad y, posteriormente, en el grupo de individuos seleccionados, se podrían aplicar los otros procedimientos más caros o invasivos (Koyama *et al.*, 2012; Mattsson *et al.*, 2015a; Schneider *et al.*, 2009). Por ejemplo, en un procedimiento secuencial en el que se confirmen los individuos preseleccionados con otra técnica menos accesible o más costosa.

Discrepancias entre estudios: la importancia de los factores pre-analíticos

Estudios recientes han mostrado que gran parte de la variabilidad observada entre los trabajos que han analizado el potencial del A β plasmático como biomarcador de la EA podría deberse a la falta de métodos estandarizados en la manipulación pre-analítica de las muestras (Lui *et al.*, 2010; O'Bryant *et al.*, 2015a; Watt *et al.*, 2012).

La sangre es un sistema biológico muy complejo y existen numerosos factores de confusión que pueden influenciar la aplicación e interpretación de los resultados obtenidos en los análisis de biomarcadores (Henriksen *et al.*, 2014). De hecho, los niveles de estos biomarcadores en sangre no sólo reflejan la condición patológica de los individuos, sino que pueden verse influenciados por otros factores intrínsecos y extrínsecos al individuo o paciente. Asimismo, las propiedades fisicoquímicas del péptido A β y su baja concentración en esta matriz añaden dificultades metodológicas que desafían la cuantificación fiable de este péptido en el plasma (Hampel *et al.*, 2008).

En relación con los métodos analíticos, los estudios realizados por diferentes laboratorios han utilizado una amplia variedad de técnicas, plataformas, diseños, metodologías y protocolos, lo que podría ser una causa, o estar influenciando en la variabilidad de resultados obtenidos, dificultando la interpretación general de todos los datos en conjunto (Koyama *et al.*, 2012; O'Bryant *et al.*, 2015b; Schneider *et al.*, 2009) y, por supuesto, imposibilitando el establecimiento de puntos de corte que sirvan como límites de referencia universales para el diagnóstico de la EA (Rosen *et al.*, 2013). Incluso cuando se cuantifica el péptido A β mediante una misma técnica, como puede ser el inmunoensayo de tipo ELISA sándwich, existen algunos aspectos que pueden aportar variabilidad entre los diferentes kits, como pueden ser la especificidad de los anticuerpos, la disponibilidad del epítipo, los tiempos y temperaturas de incubación, el equilibrio y la cinética de la reacción antígeno-anticuerpo, la dilución realizada a la muestra, así como el valor de concentración asignado a los calibradores o estándares utilizados en los diferentes kits (Bjerke *et al.*, 2015; O'Bryant *et al.*, 2017; Okereke *et al.*, 2009).

Además de la variabilidad analítica también está descrita la variabilidad post-analítica, que se relaciona por ejemplo con el análisis y manejo de los datos, el tipo de ajuste utilizado para la curva estándar o el tratamiento de los *outliers* (Mattsson *et al.*, 2011). Por último, la variabilidad pre-analítica, tanto técnica como biológica, tiene un impacto muy importante en los resultados obtenidos en los análisis. De hecho, aunque en muchas ocasiones puedan pasar desapercibidos, se ha descrito que el 46 % de los errores testados en el laboratorio se deben a aspectos relacionados con esta fase del protocolo (Becan-McBride, 1999; O'Bryant *et al.*, 2015a).

Introducción

Las variables pre-analíticas biológicas hacen referencia a rasgos intrínsecos de los propios individuos (Ferguson *et al.*, 2007). En lo que respecta a la cuantificación de A β en el plasma, algunos factores que pueden influenciar los niveles obtenidos son la edad, el género, el estadio de la enfermedad, tener una historia familiar de la EA, el genotipo ApoE o la función renal (Arvanitakis *et al.*, 2002; Ertekin-Taner *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2008; Mayeux *et al.*, 2003; Rembach *et al.*, 2014a; Toledo *et al.*, 2011). Asimismo, algunas peculiaridades de la matriz plasmática de cada individuo, como por ejemplo los niveles totales de proteína, el conteo de plaquetas, o los niveles de colesterol y glucosa en el plasma también podrían tener un efecto en los niveles de A β cuantificados en esta matriz (Toledo *et al.*, 2011). Además, la existencia de múltiples patologías o comorbilidades en los individuos diagnosticados con la EA, como puede ser la presencia de enfermedad cardiovascular o lesiones de la sustancia blanca, incrementa la variabilidad del ensayo (Gurol *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2005; Snyder *et al.*, 2014).

Las variables pre-analíticas técnicas comprenden todos los procesos realizados antes del propio análisis de la muestra, abarcando los procedimientos relacionados con la recogida de la muestra, el transporte, su procesamiento y, por último, las condiciones de almacenaje (Lista *et al.*, 2013). La **Tabla 1** recoge algunas de las variables de este tipo que se podrían controlar y que pueden tener un impacto sobre la estabilidad o cuantificación de los biomarcadores en sangre.

Variables pre-analíticas técnicas controlables

Momento de la extracción
Ayuno previo a la extracción de la muestra
Tamaño de la aguja y punto de extracción
Tipo de tubo y aditivos (inhibidores de proteasas y anticoagulantes)
Parámetros de centrifugación
Tiempo transcurrido desde la extracción de la muestra hasta su procesado
Temperatura de conservación de las muestras desde su extracción hasta su procesado
Tiempo transcurrido desde la extracción hasta la congelación de la muestra
Temperatura y velocidad de congelación
Ciclos de congelación-descongelación
Volumen de las alícuotas

Tabla 1. Variables pre-analíticas técnicas que pueden tener un impacto sobre los biomarcadores de sangre dentro de los estudios de la EA. Estas variables representan parámetros que se podrían estandarizar. *Tabla adaptada del artículo "Guidelines for the standardization of preanalytic variables for blood-based biomarker studies in Alzheimer's disease research" (O'Bryant et al., 2015a).*

Hay algunos factores pre-analíticos para los que existe un consenso más o menos universal entre laboratorios, como la importancia de utilizar tubos de polipropileno para reducir al máximo la interacción del péptido A β con las paredes del tubo (Bjerke *et al.*, 2010; Lewczuk *et al.*, 2006a; Toombs *et al.*, 2014), la temperatura de almacenaje de las muestras a -80 °C o la importancia del ayuno la noche anterior a la extracción de la muestra (Watt *et al.*, 2012). Sin embargo, existen otras variables para las que no existe consenso. A continuación, se desarrollan con más detalle algunas de las variables recogidas en la **Tabla 1**:

Tratamiento de la sangre con inhibidores de proteasas exógenos

La sangre humana contiene numerosas proteasas y factores de coagulación que pueden favorecer la degradación proteolítica de los componentes de la muestra a lo largo del tiempo (Ayache *et al.*, 2006; You *et al.*, 2005). Concretamente, el A β plasmático es un péptido susceptible de ser degradado proteolíticamente por la NEP y la IDE, ambas proteasas detectables en la circulación periférica (Maruyama *et al.*, 2005; Murphy and LeVine, III, 2010; Shii *et al.*, 1986; Simonini *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006a; Watt *et al.*, 2012).

Para reducir o eliminar la actividad de las proteasas del plasma, en este fluido existen numerosos inhibidores de proteasas (IP) endógenos como la α_2 -macroglobulina, el inhibidor de proteasas α_1 , el inhibidor tisular de la metaloproteasa y el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (Ayache *et al.*, 2006; Baker *et al.*, 2002; Boyanton, Jr. and Blick, 2002; Clark *et al.*, 2003b; Desrochers and Weiss, 1988). No obstante, la amplia variedad y cantidad de proteasas del plasma provoca que, normalmente, estos inhibidores endógenos no sean completamente efectivos (Ayache *et al.*, 2006). Por tanto, el tratamiento de las muestras de sangre con IP exógenos para evitar o ralentizar la degradación proteolítica de los péptidos endógenos podría ser adecuado para llevar a cabo una detección más sensible de los biomarcadores en este fluido biológico (Tammen and Hess, 2011). Sin embargo, éste es un asunto que debe estudiarse experimentalmente, ya que los IP exógenos también podrían interferir en los análisis posteriores y, en cualquier caso, su utilización complica la logística de las muestras y encarece el proceso.

Tiempo transcurrido desde la extracción de la sangre hasta su procesamiento

Junto con el tratamiento con IP exógenos, otro método utilizado para preservar la integridad de las proteínas del plasma consiste en separarlo rápidamente de la fracción celular y congelarlo inmediatamente (Boyanton, Jr. and Blick, 2002). De esta manera se evitaría, o al menos se reduciría, tanto la liberación de sustancias procedentes del metabolismo celular como la activación proteolítica, ambas con capacidad de alterar la composición del proteoma plasmático (Ayache *et al.*, 2006; Fauschou and Borregaard, 2003; Rai and Vitzthum, 2006; Tammen and Hess, 2011). El cumplimiento de esta premisa llevaría implícita la exclusión en los ensayos clínicos de centros que no dispongan en sus instalaciones de la infraestructura necesaria para llevar a cabo el procesamiento y almacenamiento inmediato de las muestras. Por tanto, el estudio del efecto del tiempo de retardo del procesamiento (TRP) de la muestra de sangre se considera un parámetro muy importante a la hora de realizar el diseño de los estudios y la selección de los centros participantes. Además, la no adición de IP exógenos a las muestras de sangre cuyo procesamiento no va a ser inmediato, podría suponer una disminución de los niveles de A β cuantificados a lo largo del tiempo.

Protocolo de centrifugación

De todas las variables enumeradas en la **Tabla 1**, los parámetros de centrifugación hacen referencia al protocolo llevado a cabo para separar el plasma y la fracción celular en las muestras de sangre. En la **Tabla 2** se puede apreciar cómo este parámetro es uno de los que recopilan la mayor variabilidad entre laboratorios. Además, ha variado entre diferentes e importantes estudios de búsqueda de biomarcadores para la EA realizados hasta el momento con muestras de plasma.

Un protocolo de centrifugación que no sea lo suficientemente enérgico podría estar dejando niveles elevados de plaquetas en la fracción plasmática, variable que podría tener un impacto sobre la cuantificación de A β en dicha matriz dado que, entre otros motivos, este tipo celular está considerado como uno de los principales aportadores de A β en el plasma (Bush *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1995; Schlossmacher *et al.*, 1992; Skovronsky *et al.*, 2001).

Cohorte	Tipo de muestra	Velocidad y tiempo de centrifugación
TARCC	Suero/plasma	1.300 g, 10 min RT
ADNI	Suero/plasma	3.000 rpm, 15 min
AIBL	Suero	1.800 g, 15 min, 20 °C
	Plasma	Paso 1: 200 g, 10 min, 20 °C Paso 2: 800 g, 15 min, 20 °C
ADCS	Plasma	3.000 rpm, 10 min
HABLE	Suero/plasma	1.300 g, 10 min, RT
DIAN	Suero/plasma	2.000 g, 15 min, RT
ACS	Plasma	2.000 g, 15 min, 4 °C
King's Dementia Studies	Suero/plasma	3.000 rpm, 8 min
Araclon	Plasma	2.500 g, 15 min, 4 °C

Tabla 2. Parámetros de centrifugación y tipo de muestra utilizada en diferentes estudios. rpm: revoluciones por minuto. RT: room temperature (temperatura ambiente). TARCC: *Texas Alzheimer's Research and Care Consortium*; ADNI: *Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative*; AIBL: *Australian Imaging, Biomarker & Lifestyle Study of Ageing*; ADCS: *Alzheimer's Disease Cooperative Study*; HABLE: *Health and Aging Brain among Latino Elders study*; DIAN: *Dominantly Inherited Alzheimer Network*; ACS: *Adult Children Study*; <http://www.slideshare.net/alzforum/obryant-alz-forum-presentation-61313>

Tipo de anticoagulante

El análisis de biomarcadores en las muestras de plasma implica la adición de anticoagulantes a la sangre. Sin embargo, no todos los anticoagulantes disponibles en el mercado tienen el mismo mecanismo de acción y la adición de estos aditivos y sus respectivos cationes tales como el amonio, litio, sodio y potasio pueden ocasionar un impacto en la composición de la muestra en sí misma o interferir en el proceso de análisis subyacente. Por lo tanto, se considera que algunos anticoagulantes son más apropiados que otros para cuantificar algunos analitos (Holland *et al.*, 2003; Landi and Caporaso, 1997; Rai and Vitzthum, 2006) y, por consiguiente, el estudio de esta variable podría ser útil para optimizar la determinación de A β en el plasma.

Justificación del trabajo

Araclon Biotech sostiene desde hace tiempo la hipótesis de que los niveles plasmáticos de los péptidos A β podrían servir como biomarcadores de la EA. Para probar esta hipótesis se requiere en primer lugar del desarrollo y la validación de herramientas analíticas sensibles y robustas que permitan cuantificar de forma fiable estos péptidos en el plasma. En esta línea, es de gran trascendencia el desarrollo de protocolos estandarizados que abarquen desde la obtención de la muestra de sangre hasta la emisión de los resultados finales, de modo que éstos sean comparables entre diferentes laboratorios y a lo largo del tiempo. Con ese fin, debe explorarse el impacto que tienen diferentes procedimientos pre-analíticos sobre los niveles de estos biomarcadores en el plasma.

Determinar con rigor las condiciones para el manejo de la muestra antes de su llegada al laboratorio tiene trascendencia también en la viabilidad de los ensayos y debe tenerse en cuenta de cara a su generalización en la clínica médica, tanto en el marco de la atención primaria o la especializada, como de cara al diseño de los protocolos para la investigación clínica.

El trabajo desarrollado en esta tesis pretende aportar información útil en los campos mencionados anteriormente. Por ello, en primer lugar, se ha avanzado en el desarrollo de unas herramientas inmunológicas de tipo ELISA para la cuantificación de los péptidos A β 40 y A β 42 en plasma, denominadas ABtest40 y ABtest42 y desarrolladas por Araclon Biotech. Esta nueva fase de optimización de los dos kits se basa en la sustitución del anticuerpo monoclonal comercial que se tenía en uso, por un anticuerpo monoclonal de producción interna en nuestro laboratorio. Además, se ha validado el ensayo no sólo para la matriz de plasma sin diluir sino también para la matriz de plasma diluido que, como se verá más adelante, puede aportar información muy valiosa de cara a su uso como biomarcador potencial de la EA.

En segundo lugar, se han estudiado algunos factores pre-analíticos que pueden afectar a la cuantificación de los péptidos A β en el plasma. Este estudio se considera imprescindible a la hora de trabajar con muestras procedentes de diferentes centros y pretende aportar información que pueda ser útil para el proceso de estandarización de los procedimientos relacionados con la determinación de A β en el plasma.

Por último, con este trabajo se persigue avanzar en el conocimiento de la capacidad diagnóstica y/o pronóstica de ABtest en la EA. En concreto, y a la vista de resultados anteriores, hemos explorado el rendimiento de los índices A β 42/40 para diferenciar

personas con y sin patología amiloide cortical, determinada mediante estudios de neuroimagen con PET-A β , dentro de una población de individuos cognitivamente normales y perfectamente caracterizada perteneciente a *The Australian Imaging Biomarkers and Lifestyle Flagship Study of Ageing (AIBL)*. El desarrollo de un biomarcador en plasma, asequible y mínimamente invasivo, permitiría el enriquecimiento de cohortes para ensayos clínicos de prevención secundaria con individuos cognitivamente normales pero que presentan acumulación cerebral de A β y, por lo tanto, se considera que están en riesgo de desarrollar la EA. En un futuro, una vez que se disponga de tratamientos capaces de modificar el curso de la EA, un test en sangre de esta naturaleza sería de gran utilidad para llevar a cabo el seguimiento y la toma de decisión relacionada con la necesidad o no de tratamiento de los diferentes pacientes.

De acuerdo con esto, en esta tesis nos planteamos unos objetivos concretos que se resumen en el siguiente apartado.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

1. Evaluar el rendimiento de los kits ABtest40 y ABtest42 para la cuantificación de A β 40 y A β 42 en las matrices de plasma y plasma diluido con un anticuerpo monoclonal de fabricación interna en nuestro laboratorio, a través de un proceso de validación que implica el estudio de los siguientes parámetros: especificidad, sensibilidad, reproducibilidad, exactitud, recuperación y efecto matriz.
2. Estudiar el impacto de diferentes variables pre-analíticas sobre el resultado de la cuantificación de los péptidos A β 40 y A β 42 en plasma utilizando ABtest40 y ABtest42. En concreto se analizarán los siguientes parámetros: (i) la necesidad o no de añadir inhibidores de proteasas exógenos a las muestras de sangre, (ii) la importancia del tiempo transcurrido entre la extracción de la muestra y su procesamiento, (iii) las condiciones de la centrifugación (fuerza y tiempo) de dicha muestra y (iv) el efecto de diferentes anticoagulantes.
3. Explorar el rendimiento clínico de ABtest en una cohorte de individuos cognitivamente normales, perfectamente caracterizada, y averiguar si los índices plasmáticos de A β podrían utilizarse como herramientas para la selección o el cribado de los pacientes. El objeto de ello sería enriquecer las cohortes de los ensayos clínicos con individuos cognitivamente sanos y niveles elevados de A β cortical en el análisis con PET-A β .

MATERIALES Y MÉTODOS

ABtest40 y ABtest42

La cuantificación de los péptidos A β 40 y A β 42 se ha llevado a cabo utilizando los kits ABtest40 y ABtest42 desarrollados por Araclon Biotech. Estos kits son dos ensayos ELISA sándwich de tipo colorimétrico específicamente desarrollados para la cuantificación de péptidos A β en muestras de plasma.

Los ensayos de tipo ELISA sándwich se basan en el uso de una pareja de anticuerpos que reconocen diferentes regiones, conocidas como epítomos, de una misma molécula. En este tipo de ensayos la reacción tiene lugar en una fase sólida, a menudo una placa de microtitulación. Los ensayos de tipo ELISA son ampliamente utilizados ya que presentan ciertas ventajas como son su simplicidad, versatilidad, sensibilidad y bajo coste.

Los péptidos amiloides A β 40 y A β 42 comparten la secuencia de aminoácidos a lo largo de toda la molécula a excepción del extremo C-terminal, que les diferencia, ya que A β 42 contiene dos aminoácidos más que A β 40. Por este motivo, los kits ABtest40 y ABtest42 comparten el anticuerpo anti N-terminal pero necesitan anticuerpos anti C-terminal diferentes: uno específico de la secuencia finalizada en el aminoácido 40 y el otro específico de la secuencia terminada en el aminoácido 42.

El diseño concreto de ABtest40 y ABtest42 consiste en el uso de un anticuerpo monoclonal de captura que reconoce los péptidos A β por su extremo N-terminal, y un anticuerpo policlonal unido a biotina que se utiliza como anticuerpo de detección y que reconoce un epítipo concreto del extremo C-terminal de A β : anticuerpos anti-A β 40 o anti-A β 42. Por tanto, ambos ensayos comparten el anticuerpo de captura pero utilizan diferentes anticuerpos de detección para poder cuantificar de forma independiente A β 40 y A β 42. El uso de dos péptidos estándar sintéticos previamente cuantificados, A β 1-40 y A β 1-42, para la preparación de las curvas de calibrado, permite cuantificar los niveles de dichos péptidos en muestras de concentración desconocida.

A continuación se describen con más detalle los diferentes componentes involucrados en los kits ABtest40 y ABtest42.

Anticuerpo monoclonal de captura anti N-terminal

El anticuerpo de captura utilizado, 1F3, es un anticuerpo monoclonal de producción interna en nuestro laboratorio que reconoce el extremo N-terminal de A β . Hasta la

Materiales y Métodos

obtención de este anticuerpo monoclonal 1F3, se utilizaba el anticuerpo monoclonal comercial 6E10 (BioLegend, referencia 803003) como componente de los kits ABtest40 y ABtest42. La introducción de este nuevo componente representa el motivo principal por el cual se ha desarrollado todo el proyecto de validación de ABtest explicado más adelante.

La obtención de un anticuerpo monoclonal anti N-terminal era un objetivo primordial de Araclon Biotech ya que permite tener un control absoluto sobre el producto disminuyendo la variabilidad entre los lotes, problema con el que nos habíamos enfrentado al utilizar el anticuerpo comercial 6E10. Por otra parte, todo el procedimiento de selección y desarrollo de 1F3 se basó en su optimización y mejora para ser utilizado como componente de ABtest. Es decir, tanto la elección de 1F3 entre otros candidatos, como el procedimiento utilizado durante todo el proceso de producción y purificación del anticuerpo, se fundamentó en su comportamiento como anticuerpo de captura en ABtest. Esto implica que el nuevo anticuerpo incorporado en el kit está optimizado para la cuantificación de péptidos A β humanos en la matriz de plasma y, como tal, podría suponer una mejora en el rendimiento del kit, así como un aumento de la sensibilidad del ensayo.

La purificación de este anticuerpo monoclonal a partir de los sobrenadantes de cultivo se realizó automáticamente con el sistema *Äkta pure* (GE Healthcare, número de serie 1805857) mediante un procedimiento cromatográfico que utiliza columnas acopladas a proteína G. El proceso de elución del anticuerpo inmovilizado en la columna se llevó a cabo con un tampón de pH 2,7. La presencia de anticuerpo en las distintas fracciones de elución se monitorizó evaluando la absorbancia a 280 nm. Por último, se realizó un cambio de tampón para conservar el anticuerpo en un pH 7,5.

Al tratarse de un anticuerpo monoclonal y mantener constantes todos los pasos del proceso de producción y purificación, esperamos que los diferentes lotes sean prácticamente idénticos entre sí. En cualquier caso, se analiza la especificidad de todos los lotes de producción y la sensibilidad de todos los lotes de anticuerpo purificado. Únicamente los que cumplen los criterios de conformidad se incorporan a ABtest40 y ABtest42.

Unión del anticuerpo de captura a la fase sólida

El ensayo ELISA se desarrolla en una fase sólida que consiste en una microplaca de 96 pocillos de formato 8x12 con superficie Maxisorp® de poliestireno (Nunc, referencia 445101). La superficie de estas placas contiene residuos hidrofílicos e hidrofóbicos que pueden unir una gran variedad de biomoléculas, pero han sido especialmente diseñadas para la unión de inmunoglobulinas G (IgGs).

La unión del anticuerpo de captura 1F3 a la superficie de la placa, proceso conocido como tapizado, se lleva a cabo mediante un proceso de adsorción pasiva. Dicha interacción se produce principalmente a través de los carbohidratos presentes en la región constante (Fc) de los anticuerpos. Esto es importante porque, de esta manera, las fracciones variables de los anticuerpos, en las que se localizan las regiones hipervariables que participan en el reconocimiento del antígeno, quedan accesibles (**Figura 13**).

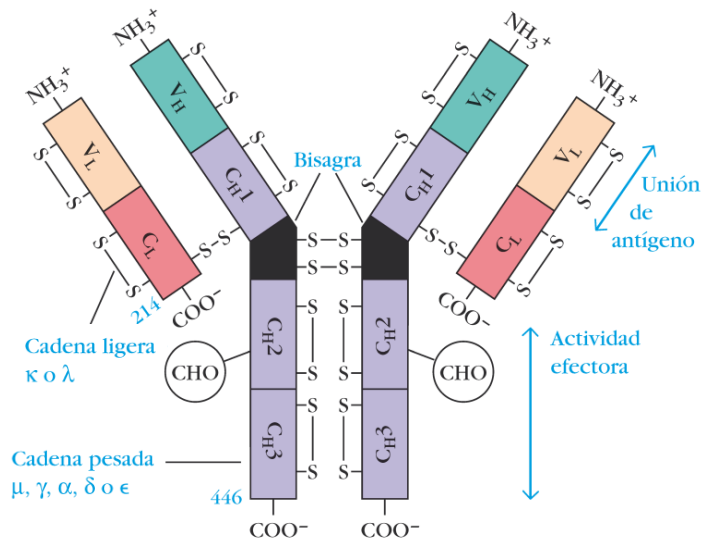


Figura 13. Representación esquemática de la estructura de un anticuerpo. Las regiones variables de las cadenas ligeras (V_L) y pesadas (V_H) tienen tres regiones hipervariables cada una de ellas por las que se produce el reconocimiento de los antígenos. Los sitios de glicosilación (CHO, carbohidratos) se localizan en las regiones constantes de las cadenas pesadas (C_H). *Imagen adaptada del libro "Inmunología de Kuby, 6ed" (Kindt et al., 2017).*

Materiales y Métodos

El proceso de tapizado de 1F3 se realiza en tampón carbonato a pH 9,6 durante un periodo de incubación de 20 horas a 2-8 °C (a partir de aquí este rango de temperatura se abrevia como 4 °C). La concentración de tapizado se elige de forma experimental mediante la realización de una curva de saturación del anticuerpo. La concentración de anticuerpo elegida debe ser lo suficientemente alta como para saturar el pocillo, pero es importante no añadir más moléculas de las necesarias ya que una concentración demasiado elevada podría dificultar el reconocimiento del antígeno. En el caso de 1F3 el tapizado se realiza a una concentración de 5 µg/mL, en un volumen de 100 µL/pocillo.

Después de la incubación de 20 horas se realiza un paso de lavado (5 ciclos x 300 µL) con un tampón de lavado que contiene Tris Base, NaCl y Tween® 20 a pH 8,0 para eliminar el exceso de anticuerpo que no se ha unido a la placa. Inmediatamente después se añaden 300 µL de un tampón de bloqueo que contiene Tris Base 50 mM, BSA (albúmina de suero bovino) 0,5 % y Tween® 20 0,2 %, a pH 8,0.

Tras una incubación del tampón de bloqueo de 3 horas a temperatura ambiente se realiza otro paso de lavado (5 ciclos x 300 µL) para eliminar el exceso de BSA y se añaden 100 µL de un tampón conservante que contiene Tris Base. Las placas se dejan evaporar a temperatura ambiente hasta que se haya eliminado todo el contenido de agua y se almacenan a 4 °C hasta su uso. Para llevar a cabo todos los ciclos de lavado se ha utilizado un lavador automático para placas de 96 pocillos (Biotek, modelo 405 LS).

Péptido Aβ estándar

Para poder cuantificar los niveles de Aβ40 y Aβ42 presentes en las muestras de plasma, es necesario tomar como referencia una curva de calibrado preparada con péptido estándar de concentración conocida, que en el caso de ABtest no consiste en un producto comercial sino que se trata de péptido sintetizado en nuestro laboratorio.

Para llevar a cabo la síntesis de los péptidos Aβ se utiliza un sintetizador automático (Applied Biosystems, modelo 433A). Una vez finalizada la síntesis del péptido, el producto resultante es liberado de la resina. A continuación, se lleva a cabo la purificación del péptido por HPLC (*high-performance liquid chromatography*) y se comprueba su identidad por espectrometría de masas. La pureza final del péptido también se establece por HPLC.

El producto sólido generado se utiliza para preparar lotes de stock para su uso en ABtest40 y ABtest42. Para ello se pesa una cantidad adecuada de péptido, se resuspende

en hexafluoroisopropanol (HFIP) para favorecer la desagregación y se divide en alícuotas que se liofilizan y conservan a -20 °C. Estas alícuotas se resuspenden en NH₄OH 0,1 % para favorecer la disolución del material de partida, se diluyen en cloruro de guanidina (GuHCl) 7,5 M generando un stock de péptido a 200 µg/mL en GuHCl 6 M, se preparan alícuotas y se almacenan a -80 °C. Cada vez que se quiere producir un stock de trabajo se descongela una alícuota de 200 µg/mL, se realizan diluciones seriadas hasta una concentración 100X, se preparan alícuotas y se almacenan a -80 °C hasta su uso.

El tampón en el que se realizan estas diluciones seriadas se denomina *sample/standard diluent* (SSD) y también se utiliza para preparar la curva de calibrado en cada ensayo y para llevar a cabo la dilución de las muestras. La composición de este tampón salino con detergente y polímero bloqueante está optimizada para liberar las interacciones que se producen entre el Aβ endógeno y el resto de componentes de la matriz plasmática con los que interacciona, tal y como se explicará más adelante.

Anticuerpos de detección anti C-terminal

Otro componente imprescindible de nuestro inmunoensayo son los anticuerpos de detección del extremo C-terminal específicos de diferentes epítopos en función de la longitud del péptido Aβ. Los anticuerpos de detección utilizados para ABtest40 y ABtest42 son anticuerpos policlonales producidos en conejas de la raza *New Zealand White Rabbit*. El procedimiento que se llevó a cabo consistió en la inyección subcutánea de un péptido corto finalizado en el aminoácido 40 o el aminoácido 42 de la secuencia del correspondiente péptido Aβ. Tras varios ciclos de inmunización de los animales se recogieron muestras de sangre y se purificaron los anticuerpos mediante un protocolo de cromatografía de afinidad. Para ello se inmovilizó el péptido correspondiente en una resina de tipo epoxy por la que se hizo circular el suero. Los anticuerpos que reconocieron el péptido anclado a la resina quedaron retenidos y fueron eluidos gracias a un tampón de pH 10,0. Al igual que en el caso del anticuerpo monoclonal, se evaluó la presencia del anticuerpo mediante absorbancia a 280 nm y se realizó un cambio de tampón para dejar el anticuerpo a pH 7,5. La magnitud de la respuesta inmune se valoró mediante la titulación de los sueros.

Conjugación de moléculas de biotina a los anticuerpos de detección

Para comprobar el funcionamiento de los diferentes lotes de anticuerpos anti-A β 40 y anti-A β 42 como anticuerpos de detección en ELISA sándwich, es necesario conjugarlos previamente a moléculas de biotina. La biotina es una vitamina de pequeño tamaño (244 Da) que puede conjugarse a gran cantidad de proteínas sin alterar su actividad biológica. Este procedimiento permite su detección posterior gracias a la elevada afinidad que tiene la estreptavidina por la biotina.

La biotina permite el etiquetado de anticuerpos y otras moléculas que contienen aminas primarias (-NH₂) como las presentes en la cadena lateral de las lisinas o en el extremo amino de los polipéptidos. Como consecuencia de la reacción se forman enlaces amida estables entre la biotina y el anticuerpo (**Figura 14**).

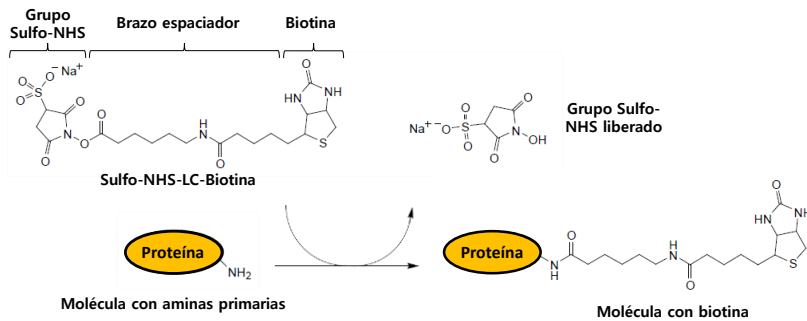


Figura 14. Reacción de conjugación de la biotina. Si se dibujara a escala, el óvalo que representa la proteína sería mucho mayor y probablemente contendría muchos grupos amina, por lo que a la proteína se unirían varias moléculas de biotina. Nótese que el grupo Sulfo-NHS es un grupo saliente durante el proceso de conjugación de la biotina. (Esquema adaptado de: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011560_EZ_Sulfo_NHS_LC_Biotinylation_UG.pdf)

Para que la reacción descrita anteriormente se lleve a cabo de manera exitosa, se incubó el anticuerpo con un exceso molar adecuado de biotina durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se pasa por una columna desaladora (*Zeba Spin Desalting columns, 7K MWCO*; Thermo Scientific, referencia 89883) donde quedan retenidas las moléculas de pequeño tamaño como la biotina que no ha reaccionado y los grupos Sulfo-NHS salientes de la reacción de conjugación. Las moléculas con un peso

molecular superior a 7 kDa, como los anticuerpos unidos a la biotina, atraviesan la columna y se pueden conservar a 4 °C hasta su uso.

Una vez que se ha llevado a cabo la reacción de conjugación de los anticuerpos con la biotina, éstos ya pueden ser testados como anticuerpos de detección de ABtest40 o ABtest42. Se evalúan tanto criterios de sensibilidad como criterios de especificidad para garantizar que no se producen reacciones cruzadas con otros péptidos amiloides de secuencia similar. Sólo los anticuerpos que cumplen criterios se incorporan a ABtest.

Reacción de amplificación, reacción colorimétrica y parada de la reacción

La adición de reactivos conjugados a enzimas es un paso intrínseco a un ensayo de tipo ELISA. Existen diferentes metodologías y tipos de ensayo, pero ABtest se basa en el uso de un sustrato que genera una reacción colorimétrica cuantificable mediante un espectrofotómetro de placas.

En nuestro ensayo trabajamos con una molécula de estreptavidina conjugada a la enzima peroxidasa de las raíces del rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) a través de una cadena hidrofílica de dextrano que incorpora numerosas moléculas de la enzima unidas covalentemente. Este conjugado polimérico estreptavidina-HRP se acopla al sistema antígeno-anticuerpo gracias a la elevada afinidad del par de moléculas biotina-estreptavidina (**Figura 15**). Además, las moléculas de HRP unidas al polímero permiten realizar una amplificación de la señal y mejorar la sensibilidad del ensayo, ya que para un pequeño número de moléculas de antígeno se introducen numerosas moléculas de la enzima.

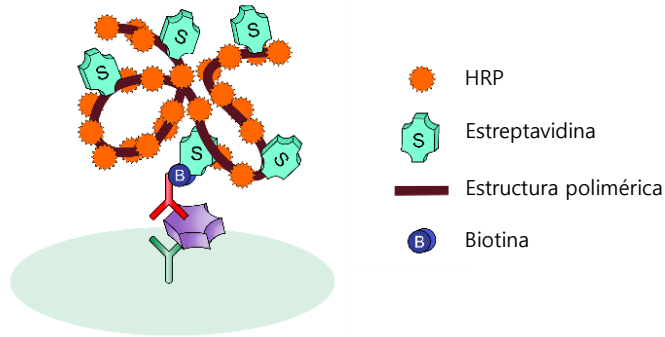


Figura 15. Amplificación de la señal del inmunoensayo mediante un conjugado estreptavidina-HRP modificado. El acoplamiento de varias moléculas de estreptavidina a una cadena polimérica conjugada a su vez con numerosas moléculas de HRP permite la amplificación de la señal. Todo el sistema se basa en la elevada afinidad de la molécula de biotina unida al anticuerpo de detección con la estreptavidina. HRP: *horseradish peroxidase*. Imagen adaptada de: <http://www.kem-entec.com/streptavidin-hrp/enhanced-streptavidin-hrp-in-a-biotin-streptavidin-aplication-system/>

Como sustrato cromógeno de la enzima peroxidasa se utiliza el producto TMB (3',3',5',5'-tetrametilbenzidina) que produce un color azul cuando se oxida como resultado de los radicales de oxígeno producidos por la hidrólisis del peróxido de hidrógeno por HRP. Tras 30 minutos de incubación, la adición de una solución de parada (H_2SO_4 1 N) aporta el grado de acidez necesario para estabilizar el proceso de oxidación del TMB y produce un cambio de color de la reacción de azul a amarillo que tiene un nivel máximo de absorbancia a 450 nm. Ésta es la longitud de onda utilizada para cuantificar la reacción antígeno-anticuerpo mediante un espectrofotómetro de placas (Biotek, modelo Synergy 4). Todo este diseño se fundamenta en que la generación del color es proporcional a la concentración de antígeno presente en la muestra, permitiendo un ensayo de tipo cuantitativo.

Puesta a punto del ensayo

Una vez que se dispone de todos los reactivos participantes en el ensayo, es preciso confirmar el buen funcionamiento de todos ellos en conjunto. Además, es necesario elegir las mejores diluciones de trabajo para el anticuerpo de detección y la solución de amplificación, de manera que se optimice la relación señal específica/fondo del ensayo. Para ello se realizan diluciones seriadas del anticuerpo de detección y de la solución de

amplificación y se analiza la señal obtenida para el punto más alto de la curva y para el blanco (ruido de fondo, ausencia de analito).

Los criterios de aceptación exigen una señal de absorbancia del blanco inferior a 0,15 unidades de absorbancia y una señal corregida del punto más alto de la curva de calibrado superior a 1,00 unidades de absorbancia para una longitud de onda de 450 nm. La señal corregida se calcula restando la señal del blanco a la señal específica. En todos los casos se elige la combinación de diluciones que ofrece una mejor relación señal específica/fondo.

Protocolo ELISA para la cuantificación de A β en muestras de plasma y plasma diluido

El procedimiento seguido para el desarrollo del ensayo ABtest40 y ABtest42 se puede resumir en los siguientes pasos:

1. Tapizado de las placas con el anticuerpo de captura. Este paso se ha descrito en el apartado "Unión del anticuerpo de captura a la fase sólida".
2. Adición de 100 μ L de muestras o estándares al pocillo para permitir que el anticuerpo de captura unido a la placa reconozca al antígeno (o analito) (**Figura 16**).

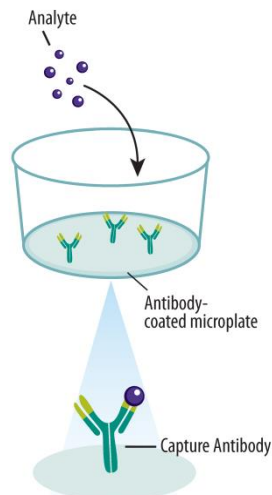


Figura 16. Reconocimiento del analito por parte del anticuerpo de captura. El anticuerpo 1F3 reconoce el extremo N-terminal de los péptidos A β y los retiene en el pocillo. *La fuente de esta imagen y de las tres siguientes es: ELISA Reference Guide & Catalog de R&D Systems.*

Materiales y Métodos

La muestra se deja en incubación durante unas 16 horas a 4 °C para permitir que se produzca la reacción antígeno-anticuerpo.

3. Lavado de la placa (5 ciclos x 300 μ L) con el tampón de lavado para eliminar los componentes del plasma que no han sido capturados por el anticuerpo de captura. Adición posterior de 100 μ L del anticuerpo de detección conjugado a la biotina (**Figura 17**) a la dilución adecuada para optimizar la relación señal/fondo. Incubación de 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

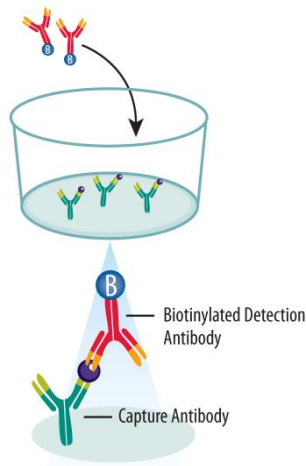


Figura 17. Adición del anticuerpo de detección conjugado a la biotina. Reconocimiento por parte del anticuerpo de detección de un epítipo del péptido diferente al reconocido por el anticuerpo de captura, permitiendo el desarrollo de un ensayo ELISA de tipo "sándwich". En el caso de ABtest, el anticuerpo de detección reconoce el extremo C-terminal de A β .

4. Lavado de la placa (5 ciclos x 300 μ L) para eliminar el exceso de anticuerpo de detección que no ha reaccionado y adición de 100 μ L de la solución de amplificación a la dilución adecuada (**Figura 18**). Incubación durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

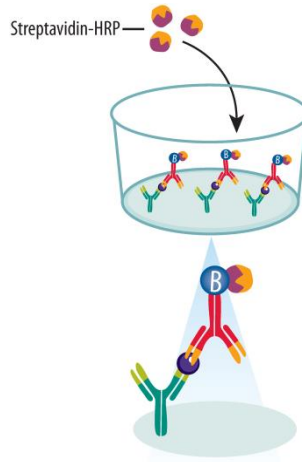


Figura 18. Adición de la solución de amplificación “Estreptavidina-HRP”. La estreptavidina conjugada a la enzima HRP se une a la biotina gracias a la elevada afinidad de estas dos moléculas entre sí. En este esquema se muestra una versión simplificada de lo mostrado anteriormente en el apartado “Reacción de amplificación y colorimétrica”. HRP: *horseradish peroxidase*.

El tampón utilizado para la dilución del anticuerpo de detección y la solución de amplificación denominado “Assay diluent”.

5. Lavado de la placa (5 ciclos x 300 μ L) para eliminar el exceso de estreptavidina conjugada a la peroxidasa que no ha reaccionado. Adición al pocillo de 100 μ L de sustrato cromógeno e incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, ya que se trata de un reactivo fotosensible.

6. Por último, parada de la reacción con 50 μ L de solución de parada H_2SO_4 1 N (**Figura 19**) y lectura de la absorbancia a 450 nm y 620 nm en el espectrofotómetro de placas. La lectura a 620 nm se realiza para poder descartar el propio ruido de fondo de la lectura.

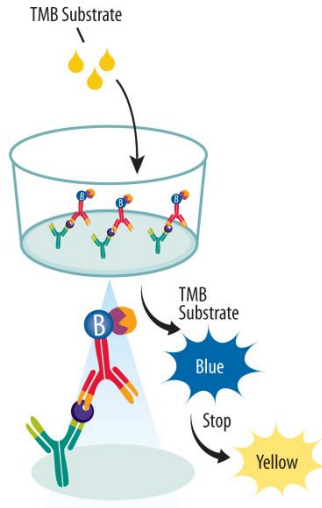


Figura 19. Adición de la solución del sustrato cromógeno TMB y parada de la reacción con la solución de parada (Stop). El sustrato cromógeno, inicialmente transparente, cambia a color azul cuando se oxida debido a la actividad de la enzima HRP en presencia de H_2O_2 . Después de 30 minutos de incubación con el TMB, se añade la solución de parada para detener la reacción. Esto produce un cambio de color instantáneo de azul a amarillo.

Un ensayo ABtest “típico” en el que se persiga la cuantificación de los niveles desconocidos de $A\beta$ en muestras de plasma obedecería al siguiente diseño:

- Curva de calibrado preparada a partir de péptido estándar de concentración conocida en SSD. La representación de la señal obtenida a lo largo de los diferentes puntos de la curva permite la generación de una ecuación de la curva. A partir de ésta se pueden interpolar las absorbancias de las muestras de concentración desconocida, obteniéndose así los niveles de $A\beta$ presentes en las muestras.
- Varias réplicas del blanco consistentes en SSD en ausencia de analito para monitorizar el ruido de fondo de nuestro ensayo.
- Inclusión de muestras control de concentración conocida para poder valorar la precisión y exactitud de la cuantificación en cada ensayo.
- Muestras de plasma de concentración desconocida, sin diluir y diluidas 1/3 en el SSD.

Ninguno de estos componentes se añade a la placa en un único pocillo, sino que se trabaja siempre al menos con duplicados. Tanto el volumen de reacción en los pocillos,

como el resto de manipulaciones que se realizan durante todo el ensayo deben ser constantes y homogéneos a lo largo de toda la placa. Sólo de esta manera será adecuado calcular la concentración de las muestras a partir de los datos de absorbancia obtenidos en la curva de calibrado.

El hecho de analizar las muestras de plasma sin diluir y diluidas 1/3 se basa en la información obtenida en estudios anteriores en nuestro laboratorio en lo referente a la distribución del péptido en las diferentes fracciones del plasma. Con el análisis de los niveles de A β en la muestra de plasma sin diluir medimos el péptido que se encuentra directamente accesible (DA) o libre en el plasma. De manera adicional, se considera que la dilución 1/3 de la muestra de plasma en el SSD provoca la liberación del péptido A β de su interacción con los componentes de la matriz plasmática con los que interacciona, proporcionando una medida de los niveles totales de péptido en el plasma (TP). La diferencia entre los niveles de péptido TP y DA aporta el dato referido a la concentración de péptido que se recupera del plasma (RP), es decir, el que estaba interaccionando con otros componentes de la matriz (ver apartado "Efecto matriz" en las secciones de Materiales y Métodos, Resultados y Discusión para una mayor explicación y justificación de esta nomenclatura).

El formato utilizado en ABtest para la cuantificación de A β en las muestras de plasma y plasma diluido también sería adecuado para trabajar con otro tipo de muestras como LCR. Sin embargo, para cada tipo de muestra sería necesario optimizar el rango de la curva de calibrado y realizar una dilución adecuada de la muestra.

Validación de ABtest40 y ABtest42

El objetivo de una validación de un método es presentar evidencias objetivas de que éste puede utilizarse para la finalidad para la que ha sido diseñado (Andreasson *et al.*, 2015), garantizando que el desarrollo es apropiado y fiable para aplicarse en una matriz biológica determinada (Kadian *et al.*, 2016). Por lo tanto, es preciso demostrar la fiabilidad del método para determinar la concentración de un determinado analito en cada una de las matrices biológicas de interés.

No existen regulaciones específicas en lo que se refiere a las validaciones de métodos bioanalíticos. Sin embargo, se han desarrollado guías por agencias como la FDA

(*Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM), 2013*) y la EMA (*Guideline on bioanalytical method validation; European Medicines Agency, 2011*) que incluyen información acerca de los diferentes parámetros que se deberían evaluar, así como de los criterios de aceptación que se deberían cumplir (EMA Committee for Medicinal Product for Human Use, 2011; FDA US Department of Health and Human Services *et al.*, 2013). En cualquier caso, es necesario entender el contexto biológico del biomarcador de interés y la enfermedad con la que se trabaja para desarrollar un ensayo apropiado (Arnold *et al.*, 2016).

En relación con los biomarcadores de la EA, la validación de los métodos bioanalíticos debe hacer frente a una serie de características relacionadas con estos ensayos como son la ausencia de materiales de referencia apropiados o la presencia del biomarcador endógeno en la matriz biológica de interés (Valentin *et al.*, 2011). El uso de inmunoensayos supone la opción más ampliamente utilizada debido a su sensibilidad analítica, su selectividad inherente en matrices biológicas complejas y la cuantificación relativamente exacta del analito tras una preparación mínima de las muestras (Lachno *et al.*, 2012).

Las guías internacionales distinguen tres tipos de protocolos de validación:

- **Validación completa:** es la que se debe realizar cuando se desarrolla e implementa un método bioanalítico por primera vez.
- **Validación parcial:** es la de elección cuando se realizan modificaciones de métodos bioanalíticos ya validados. Estas modificaciones pueden ser tan diversas como cambios de laboratorio, del anticoagulante o matriz utilizada, un cambio en el rango de concentración o en la metodología utilizada, algún cambio de reactivo, etc. Las validaciones parciales pueden abarcar desde unos pocos ensayos para confirmar la reproducibilidad y la exactitud del método, hasta una validación prácticamente completa.
- **Validación cruzada:** se trata de una comparación de los parámetros de validación cuando se utilizan dos o más métodos bioanalíticos para generar datos dentro de un mismo estudio o entre diferentes estudios.

En nuestro caso, la opción elegida fue una validación parcial del método ABtest40 y ABtest42 para la cuantificación de A β 40 y A β 42 en plasma humano. El motivo por el cual se eligió este tipo de validación fue debido a que ya se habían realizado validaciones previas de este método en las cuales se demostró que ABtest40 y ABtest42 son herramientas útiles y fiables para cuantificar ambos péptidos A β en plasma. Sin embargo,

ahora se dispone de una nueva versión de estos kits, ya que se ha sustituido el anticuerpo monoclonal de captura que se estaba utilizando (6E10) por un anticuerpo monoclonal de fabricación interna (1F3). No obstante, a pesar de clasificar el trabajo realizado como una "validación parcial", se ha realizado un estudio exhaustivo de todos los parámetros del ensayo para garantizar la fiabilidad de las medidas.

La sustitución del anticuerpo comercial 6E10 por un anticuerpo específicamente desarrollado para su uso como anticuerpo de captura en ABtest, supuso un trabajo completo de optimización del ensayo y permitió llevar a cabo una aproximación para intentar mejorar la sensibilidad del kit. Este aspecto se considera especialmente beneficioso para ABtest42 ya que los niveles endógenos de A β 42 en plasma son muy bajos.

Por último, al llevar a cabo la evaluación del método se considera imprescindible utilizar muestras con una concentración y composición del analito similar a la de los individuos que después van a utilizarse para los estudios (Lachno *et al.*, 2012). Por ese motivo, se evaluaron los distintos parámetros del protocolo de validación tanto en la matriz de plasma como en la matriz de plasma diluido. Hasta el momento, los resultados de validación previos se habían ceñido únicamente a la matriz de plasma. Sin embargo, dado que la matriz de plasma diluido nos permite obtener el dato de péptido A β total en el plasma, se consideró necesario validar el método con ambos tipos de matriz.

Los parámetros utilizados para validar ABtest40 y ABtest42, el diseño llevado a cabo y los criterios de aceptación recomendados por las guías de validación se detallan a continuación:

Curva de calibrado

Los calibradores estándar se preparan añadiendo concentraciones conocidas del material estándar de referencia (analito) al tampón apropiado para generar una relación concentración-respuesta en las condiciones de ensayo previamente establecidas. De esta manera, se genera una curva de calibrado a partir de la cual se puedan interpolar las concentraciones de analito presentes en las muestras de concentración desconocida.

El rango de las curvas de calibrado debería cubrir el rango de concentraciones endógenas esperadas en las muestras de los estudios. Información previa obtenida en nuestro laboratorio de los niveles endógenos de A β 40 en muestras de plasma y plasma diluido confirman la idoneidad de seguir utilizando un rango de concentraciones de

entre 3,13 y 200 pg/mL para ABtest40. Sin embargo, debido a los bajos niveles endógenos de A β 42 obtenidos en muestras de plasma en nuestros estudios previos, con la nueva versión de ABtest que incorpora nuestro nuevo anticuerpo de captura 1F3 se consideró oportuno intentar ajustar el rango dinámico de ABtest42 entre 1,56 y 100 pg/mL.

Para preparar el punto de concentración más alto en las curvas de calibrado se realiza una dilución 1:100 de los stocks de trabajo 100X (que son de 20 ng/mL en el caso de A β 40 y de 10 ng/mL en el caso de A β 42) en el SSD. A continuación, se realizan seis diluciones seriadas a 1/2 en este mismo tampón hasta los 3,13 o los 1,56 pg/mL que representan los puntos más bajos de concentración de las curvas de ABtest40 y ABtest42 respectivamente.

El modelo de ajuste debería ser el algoritmo más sencillo que describa la relación concentración-respuesta de manera apropiada. Habitualmente, cuando se trabaja con ensayos de tipo unión a ligando o inmunoensayos, la trayectoria descrita por las curvas refleja ausencia de linealidad. En esos casos resulta apropiado utilizar un método de ajuste basado en un modelo de regresión logística de 4 parámetros, 4PL (**Fórmula 1**).

Fórmula 1. Función de regresión logística de 4 parámetros.

$$\text{Señal} = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{\text{Concentración}}{C} \right)^B} + D \leftrightarrow \text{Concentración} = C \left(\frac{A - D}{\text{Señal} - D} - 1 \right)^{\frac{1}{B}}$$

A: respuesta a una concentración de analito igual a cero; B: factor de la pendiente de la curva; C: punto de inflexión en la curva de calibración (IC50); D: respuesta a una concentración máxima (infinita) de analito.

Para estudiar el comportamiento de las curvas de calibrado, las guías de validación recomiendan ensayar por duplicado al menos seis puntos de concentración diferentes del blanco en seis ensayos independientes. En nuestro caso se realizaron los seis ensayos independientes recomendados analizando siete puntos de concentración por duplicado. Para evaluar las curvas de calibrado se recurrió a los criterios de precisión y exactitud. El primero de ellos se estudió mediante el cálculo del coeficiente de variación (CV) en tanto por ciento del duplicado de absorbancia para cada nivel de concentración (**Fórmula 2**):

Fórmula 2. Cálculo del coeficiente de variación (CV) en tanto por ciento.

$$CV = \frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Promedio}} \times 100$$

El CV nos informa acerca de la dispersión o error aleatorio cometido.

En lo que respecta a la exactitud, los valores de concentración calculados a partir de la ecuación de la curva se compararon con el valor de concentración teóricamente añadido en cada punto. Para ello se utilizó la fórmula del error relativo (ER) en tanto por ciento (**Fórmula 3**):

Fórmula 3. Cálculo del error relativo (ER) en tanto por ciento.

$$ER (\%) = \frac{\text{Concentración obtenida} - \text{Concentración teórica}}{\text{Concentración teórica}} \times 100$$

El error relativo informa del grado de exactitud de la concentración experimental obtenida respecto a la concentración teórica. Da una idea del error sistemático cometido.

✓ Los criterios de aceptación de la FDA y la EMA recomiendan que al menos el 75 % de los puntos analizados en las curvas de calibrado tengan un $CV \leq 20 \%$ (permitiendo 25 % en el último punto de la curva) y un $ER \leq \pm 20 \%$ (25 % en el último punto de la curva).

Además del estudio de los parámetros de precisión y exactitud, muchas guías incorporan el concepto de error total (ET), que hace referencia a la suma del CV (%) y del ER (% en términos de valor absoluto). De esta manera se obtiene un dato general del error cometido: tanto el asociado con el error aleatorio (CV) como el asociado con el error sistemático (ER, sesgo).

✓ Se recomienda que el ET no supere el 30 % a lo largo de todos los puntos de la curva.

Especificidad

La especificidad de un anticuerpo se refiere a la capacidad de unirse únicamente al antígeno de interés. Este término está íntimamente relacionado con el concepto de reactividad cruzada, que se refiere al reconocimiento, por parte del anticuerpo, de diferentes variantes del analito o de otros compuestos estructuralmente relacionados con él.

Caracterización del epítipo

El cambio del anticuerpo de captura anti N-terminal, sustituyendo el anticuerpo comercial 6E10 por el anticuerpo de producción interna 1F3, planteó la necesidad de estudiar cuál o cuáles son los epítopos reconocidos por el nuevo anticuerpo. Además, se consideró adecuado realizar una comparativa de ambos anticuerpos para averiguar si ambos reconocen las mismas isoformas de péptidos A β .

Para estudiar este aspecto se trabajó con péptidos beta-amiloides truncados en su extremo N-terminal en diferentes posiciones de la secuencia. De esta manera, además del péptido completo A β 1-40 (Araclon Biotech), se evaluó el reconocimiento de los péptidos A β 2-40 (AnaSpec, referencia AS-29905), A β 3-40 (AnaSpec, referencia AS-61029), A β 4-40 (AnaSpec, referencia AS-79938) y A β 11-40 (AnaSpec, referencia AS-18478). De manera adicional, se estudió si el nuevo anticuerpo 1F3 reconoce el péptido [Pyr3] A β 3-40 (AnaSpec, referencia AS-29906) que tiene el glutámico de la posición 3 en forma de piroglutamato.

Por último, se consideró oportuno averiguar si el anticuerpo 1F3 reconoce el péptido A β murino, cuya secuencia de aminoácidos varía ligeramente a la humana (**Figura 20**). Esta información resulta valiosa si se quieren realizar estudios con muestras de ratones transgénicos. La ausencia de reconocimiento de la secuencia murina por parte de 1F3 implicaría que todo el péptido A β cuantificado en estas muestras de ratones corresponde específicamente al péptido de secuencia humana, producido como consecuencia de la manipulación genética del ratón para generar un modelo de la EA, descartando que la concentración obtenida sea también debida a los niveles de péptido endógeno del ratón.

1	10	20	30	40	42	
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA						Humano
DAEFGHDSGFEVRRHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA						Ratón

Figura 20. Comparación de la secuencia de aminoácidos del A β humano y el A β murino. Las dos secuencias se diferencian en los aminoácidos de las posiciones 5, 10 y 13 (Yamada *et al.*, 1987). El extremo C-terminal permanece invariable entre especies por lo que los anticuerpos anti-A β 40 y anti-A β 42 utilizados para detectar A β 40 o A β 42 humano también reconocerán el péptido murino. *Esta figura es una adaptación de la que aparece en el trabajo "Experimental models for Alzheimer Disease" (Sarasa, 2006).*

Para el estudio de la caracterización del epítipo N-terminal se trabajó con el kit ABtest40, ya que todos los péptidos utilizados terminan en el aminoácido 40. Para ello se añadieron 200 pg/mL (punto de concentración máxima de la curva de calibrado de ABtest40) de cada péptido en el SSD y se determinó el grado de reconocimiento de cada uno de ellos, tomando como referencia la señal del péptido entero.

En lo que respecta a la especificidad de los anticuerpos policlonales anti-A β 40 (pAB002) y anti-A β 42 (pAB031) únicamente se pretendía confirmar resultados previos: el anticuerpo anti-A β 40 sólo reconoce el péptido A β terminado en el aminoácido 40 y el anticuerpo anti-A β 42 sólo reconoce el péptido A β cuyo extremo C-terminal acaba en el aminoácido 42. De la misma manera que para el extremo N-terminal, se añadió una concentración teórica conocida de los péptidos A β 1-37 (AnaSpec, referencia AS-60251), A β 1-38 (Araclon Biotech) y A β 1-43 (AnaSpec, referencia AS-25356) en el SSD, y se comparó la señal obtenida con la del péptido de referencia A β 1-40 o A β 1-42 (Araclon Biotech). Se eligieron estos péptidos para poder evaluar la especificidad de los anticuerpos con la mayor exigencia posible, ya que se trata de péptidos con secuencias ligeramente más cortas o más largas (incluso un solo aminoácido) al péptido diana. En todos los casos la concentración de trabajo utilizada se correspondió con la concentración del punto más elevado de la curva de calibrado: 200 pg/mL para ABtest40 y 100 pg/mL para ABtest42.

Interferencia de péptidos relacionados

Una vez definida la especificidad de los anticuerpos utilizados en nuestros kits por distintos péptidos A β , se estudió la capacidad de los mismos para medir el analito de interés en presencia de péptidos secuencialmente relacionados. Para ello se trabajó con tres muestras de plasma y tres muestras de plasma diluido y se comparó la cuantificación

Materiales y Métodos

de A β 40 y A β 42 en presencia y ausencia de las moléculas interferentes. De nuevo se eligieron péptidos muy similares a la diana para maximizar la exigencia de la cuantificación.

Los péptidos A β relacionados utilizados en cada kit fueron los siguientes:

- En el caso del extremo N-terminal del kit ABtest40 se trabajó con los péptidos humanos A β 4-40, A β 11-40 y el A β 1-40 murino.
- En el caso del extremo C-terminal del kit ABtest40 se añadieron los péptidos A β 1-38, A β 1-42 o A β 1-43.
- En el caso del extremo C-terminal del kit ABtest42 se añadió A β 1-38, A β 1-40 o A β 1-43.

La concentración añadida de cada uno de ellos debería ser coherente con los niveles endógenos presentes en plasma y, por lo tanto, varió en función del péptido analizado. De los péptidos truncados en el extremo N-terminal no se tienen referencias acerca de sus niveles endógenos, por lo que se añadieron 200 pg/mL de cada uno de ellos que se corresponde con la concentración máxima de la curva y que, por lo tanto, estará muy en exceso, ya que no son especies mayoritarias. También se trabajó con esta concentración tan exigente del péptido murino.

En lo que respecta a A β 1-38, estudios previos realizados con muestras de plasma y plasma diluido de controles sanos, pacientes con DCL y enfermos de Alzheimer, realizados en nuestro laboratorio con un anticuerpo específico del extremo C-terminal de dicho péptido, dieron como resultado niveles máximos de este péptido A β 38 de 40 pg/mL en plasma y 50 pg/mL en plasma diluido. Por tanto, estos fueron los niveles de A β 1-38 elegidos para este estudio de interferencia.

A β 40 y A β 42 son los péptidos diana en nuestros kits ABtest y por ese motivo se decidió trabajar en unas condiciones muy exigentes y añadir las máximas concentraciones de la curva de calibrado de cada uno de los dos péptidos (200 y 100 pg/mL respectivamente), a pesar de que los niveles endógenos presentes en las muestras son más bajos, especialmente de A β 42.

Por último, en el caso de A β 43 se tomaron como referencia los niveles de péptido cuantificados por un grupo de investigación que utiliza un kit ELISA específico de este péptido (Zou *et al.*, 2013). En dicho trabajo cuantificaron los niveles de A β 43 en muestras de suero de controles sanos y de enfermos de Alzheimer, obteniendo como promedio niveles de en torno a 12 y 16 pg/mL respectivamente. El resto de trabajos localizados en

la bibliografía utilizan kits en los que miden conjuntamente los péptidos Aβ42 y Aβ43. Por este motivo, se decidió utilizar como referencia los datos de Zou *et al.* y se trabajó con una concentración ligeramente superior (20 pg/mL de Aβ43) para garantizar la ausencia de interferencia de este péptido a concentraciones endógenas.

El estudio del efecto de las moléculas interferentes se cuantificó como un porcentaje de recuperación comparando la concentración del péptido Aβ diana en presencia y ausencia de las moléculas interferentes (**Fórmula 4**):

Fórmula 4. Cálculo del porcentaje de recuperación del péptido de interés en presencia y ausencia de moléculas interferentes.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración con moléculas interferentes}}{\text{Concentración sin moléculas interferentes}} \times 100$$

Una recuperación del 100 % indicaría ausencia de interferencia. Recuperaciones <100 % indicarían un efecto interferente de la molécula añadida ya que su presencia dificultaría el reconocimiento del antígeno de interés. Recuperaciones >100 % podrían indicar reconocimiento inespecífico de la molécula añadida.

✓ El criterio de conformidad se cumpliría si el porcentaje de recuperación del péptido diana, Aβ40 o Aβ42, se encontrara entre el 80-120 %, ya que se permite un margen que incluya la propia variabilidad del ensayo.

Sensibilidad

La capacidad de detección de un procedimiento analítico es un término muy amplio que se relaciona con la exactitud de las medidas para niveles de concentración de analito muy bajos. Actualmente, todavía no existe un término único para referirse a la "concentración más baja de analito que puede ser medida de forma fiable por un procedimiento analítico". Algunos laboratorios se refieren a ello como "sensibilidad", "límite de detección" o "límite de cuantificación". Además, tampoco existe un consenso sobre la metodología más adecuada para estimar dicho parámetro. Por todo ello, en este trabajo se abordó el cálculo de la sensibilidad de ABtest desde una aproximación estadística más flexible y desde una aproximación experimental más exigente.

Materiales y Métodos

Aproximación estadística

Los modelos más simples utilizan únicamente medidas del blanco para estimar la sensibilidad de sus ensayos. Estos modelos asumen que el valor más alto dado por un blanco constituye el umbral para determinar la presencia de analito y, por lo tanto, éste es el límite inferior de detección del ensayo.

De manera habitual, el procedimiento seguido consiste en analizar medidas repetidas del blanco, calcular la media y la desviación estándar (SD, *standard deviation*) de estas medidas, multiplicar la SD por un factor no consensuado (en nuestro caso igual a dos) y sumar estos dos términos.

Siguiendo esta aproximación, en este trabajo se ha estimado la "mínima dosis detectable, MDD" como el valor medido más bajo que es estadísticamente diferente de cero. Este parámetro se ha calculado añadiendo dos veces la SD al valor de densidad óptica promedio de varias réplicas del blanco y determinando la concentración correspondiente de analito a partir de la curva de calibrado (**Fórmula 5**):

Fórmula 5. Estimación de la mínima dosis detectable (MDD).

$$MDD = OD \text{ blanco} + 2SD$$

Una vez sumado el término 2SD al promedio de los valores del blanco en términos de absorbancia, se calcula la concentración de este dato de absorbancia a partir de la ecuación de la curva de calibrado. OD: densidad óptica. SD: desviación estándar.

Para establecer la MDD de ABtest40 y ABtest42 se realizaron tres ensayos independientes utilizando en cada uno de ellos tres lotes diferentes de ABtest. En cada ensayo y lote se analizaron diez réplicas del blanco y se calculó la absorbancia promedio y la SD de todas las determinaciones. Después de aplicar la **Fórmula 5**, se calculó el dato de concentración equivalente a la MDD para cada lote utilizando la ecuación de la curva de calibrado correspondiente en cada caso. Finalmente, se consideró el promedio de los tres lotes como la MDD de ABtest40 y ABtest42.

Aproximación experimental

El "Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI" publicó las guías EP17-A, "*Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation*" (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2004) y EP17-A2 "*Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline- second edition*" (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) con la intención de proporcionar un método estándar para el establecimiento de la sensibilidad de los métodos analíticos. El método descrito por el CLSI se basa en un procedimiento experimental secuencial exigente por el cual se estima en primer lugar el límite del blanco, a continuación, el límite de detección del ensayo y, por último, el límite de cuantificación.

Límite del blanco (LB)

Se define como el valor de concentración más alto que podemos encontrar al analizar con nuestro método muestras que no contienen analito. Para conseguir este tipo de muestras de plasma sin A β 40 ni A β 42 se llevó a cabo un proceso de depleción del péptido incubando las muestras en una fase sólida conjugada con 1F3, anticuerpo específico del extremo N-terminal.

La estimación del LB se realizó midiendo réplicas de las muestras sin analito y calculando el valor promedio y la SD de todas ellas en términos de concentración. Esta metodología es similar a la seguida para determinar la MDD. Sin embargo, en el caso del cálculo del LB se tiene en cuenta la forma en la que se distribuyen los datos. De hecho, existen dos procedimientos para calcular este dato: opción paramétrica u opción no paramétrica en función de si los datos siguen o no una distribución gaussiana.

Para establecer el LB de ABtest40 y ABtest42 utilizando 1F3 como anticuerpo de captura, se utilizaron cuatro muestras sin analito y se realizaron tres ensayos independientes utilizando tres lotes diferentes de ABtest. En cada ensayo se analizaron seis réplicas de cada muestra, por lo que en total se dispone de 72 valores de muestras sin analito en cada lote de ABtest.

En este trabajo se realizó el cálculo del LB de acuerdo con la opción paramétrica porque el conjunto de todas las réplicas de las muestras sin analito siguió una distribución normal, tal y como indicó el test de normalidad Shapiro-Wilk. De esta manera, el LB refleja el resultado experimental más elevado que, con un nivel de confianza del 95 %, se observa para una muestra que no contiene analito. Por lo tanto, la estimación del LB

refleja el 95 % de todos los valores observados en muestras carentes de analito y el 5 % restante representa respuestas elevadas producidas por muestras que no contienen analito. Estadísticamente esto es lo que se conoce como error de tipo I o error α . De la misma manera, puede ocurrir que una muestra con niveles muy bajos de analito presente un valor indistinguible del blanco y se concluya que no hay analito medible en la muestra, cometiendo un error de tipo II o error β (**Figura 21**).

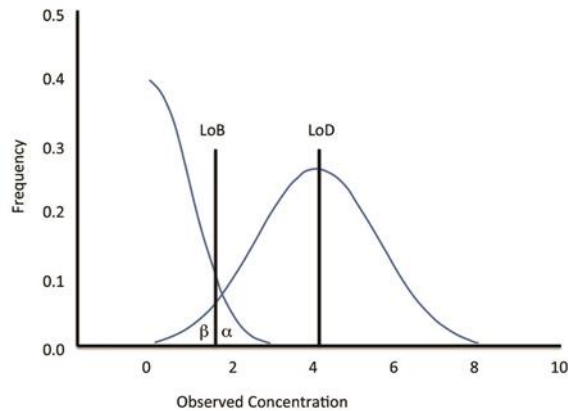


Figura 21. Distribución de los resultados para una muestra sin analito (curva de la izquierda) y una muestra con niveles bajos de analito (curva de la derecha). Para las muestras sin analito, el 95 % de los resultados analizados (considerando $\alpha = 0,05$) se encuentran por debajo del LB. Con una muestra cuya concentración de analito equivalga al LD, el 95 % de sus medidas (considerando $\beta = 0,05$) exceden el LB. *LoB: Limit of Blank. LoD: Limit of Detection. Figura adaptada de la guía EP17-A2 del CLSI: Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline - second edition.*

Cuando se asume un error de tipo $\alpha = 5\%$ y los valores del blanco siguen una distribución gaussiana, el cálculo del LB viene determinado por la **Fórmula 6**:

Fórmula 6. Estimación del límite el blanco (LB) con muestras carentes del analito de interés para datos que siguen una distribución gaussiana.

$$LB = \mu_B + c_p \cdot SD_B$$

Siendo μ_B la concentración promedio de todas las medidas evaluadas y SD_B la desviación estándar de las muestras del blanco, calculada siguiendo la ecuación de la Fórmula 7. c_p es un factor multiplicador que corrige la estimación de la SD. Para un error $\alpha = 5\%$:

$$C_p (\alpha = 5\%) = \frac{1,645}{\left(1 - \frac{1}{4(B - K)}\right)}$$

Siendo B el número total de resultados obtenidos y K el número de muestras diferentes utilizadas para el estudio.

El cálculo de la SD de las muestras del blanco, que es uno de los parámetros de la **Fórmula 6**, se realiza de acuerdo con la ecuación de la **Fórmula 7**:

Fórmula 7. Cálculo de la desviación estándar (SD) de las muestras del blanco.

$$SD_B = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^K (n_i - 1) SD_i^2}{\sum_{i=1}^K (n_i - 1)}}$$

Siendo n_i el número de determinaciones de cada una de las muestras analizadas y K el número de muestras analizadas.

Límite de detección (LD)

Se define como la concentración más baja de analito que el método puede detectar de forma fiable para garantizar su presencia o ausencia. Relacionándolo con lo descrito en la **Figura 21**, el LD se establece como la concentración a la cual la probabilidad de que un resultado de una muestra con analito sea un falso negativo (error β) es del 5 %. La aproximación empírica para estimar este límite se basa en el análisis de muestras que contienen concentraciones bajas del analito de interés, en nuestro caso A β . Los niveles de concentración de estas muestras deben ser cercanos, pero superiores, al LB previamente establecido. Por este motivo, se prepararon cuatro muestras añadiendo diferentes concentraciones de A β 40 (5,10, 5,50, 6,00 y 6,50 pg/mL) y de A β 42 (2,00, 2,30, 2,60 y 2,90 pg/mL) al SSD. La guía EP17 del CLSI utiliza tanto el dato del LB como la SD de los resultados de las muestras con baja concentración de analito para la estimación del LD (**Fórmula 8**):

Fórmula 8. Estimación empírica del límite de detección (LD).

$$LD = LB + c_p \cdot SD_L$$

LB: límite del blanco; se trata del dato de concentración previamente calculado a partir del análisis de réplicas de muestras sin analito. SD_L : desviación estándar de muestras con niveles bajos de analito (L se refiere a "low"), siguiendo la ecuación de la Fórmula 9. c_p es un factor multiplicador que corrige la estimación de la SD. Para un error $\alpha = 5\%$:

$$C_p(\alpha = 5\%) = \frac{1,645}{\left(1 - \frac{1}{4(L-J)}\right)}$$

Siendo L el número total de resultados obtenidos y J el número de muestras con niveles bajos de analito utilizadas para el estudio.

Al igual que en el apartado anterior, la SD incorporada en la fórmula del límite de detección se calcula con la siguiente **Fórmula 9**:

Fórmula 9. Cálculo de la desviación estándar (SD) de muestras con niveles bajos de analito (low).

$$SD_L = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^J (n_i - 1) SD_i^2}{\sum_{i=1}^J (n_i - 1)}}$$

Siendo n_i el número de determinaciones de cada una de las muestras analizadas y J el número de muestras analizadas.

El establecimiento del LD de ABtest40 y ABtest42 se realizó siguiendo la misma metodología que la utilizada para establecer el LB, pero en esta ocasión, tal y como se ha descrito previamente, se utilizaron cuatro muestras con niveles bajos de analito en lugar de cuatro muestras sin analito. Se incluyeron seis réplicas de cada muestra en cada uno de los tres ensayos idénticos e independientes realizados, utilizando tres lotes diferentes de ABtest. Esto supone un total de 72 valores de muestras con niveles bajos de concentración en cada uno de los tres lotes utilizados.

De manera análoga a lo realizado para el LB, se calculó el dato de concentración promedio de las muestras con concentraciones bajas de analito, así como la desviación estándar de todos los resultados obtenidos para cada lote de ABtest y se estableció como LD del kit el promedio de los datos obtenidos para los tres lotes.

La ventaja de calcular el LD siguiendo este método empírico es que se utilizan datos objetivos para comparar la respuesta analítica de muestras sin analito y de muestras con niveles bajos de analito. De esta manera se puede determinar qué concentración de analito es necesaria para distinguir su presencia de su ausencia.

Límite de cuantificación (LC)

El LC se define no sólo como la concentración más baja de analito que el método puede cuantificar de forma fiable, sino que además debe cumplir unos determinados requisitos de precisión y exactitud. El límite de cuantificación puede ser equivalente al límite de detección o superior, pero nunca inferior.

Para el establecimiento del LC se prepararon muestras con concentraciones crecientes de analito empezando por la concentración obtenida para el límite de detección. Se analizaron 44 réplicas de una misma muestra en un único ensayo y se utilizaron dos lotes de ABtest. Se realizó el cálculo del CV (%) y del ER (%) para cada muestra en cada uno de los dos lotes utilizados (ver **Fórmulas 2 y 3**).

✓ El límite de cuantificación del ensayo será la mínima concentración de A β con la que se cumpla que el CV \leq 25 % y el ER \leq \pm 25 %.

Reproducibilidad

La precisión de un método analítico describe la proximidad de las medidas individuales de un analito cuando se aplica el procedimiento de manera repetitiva. Las guías de validación recomiendan utilizar al menos cinco muestras con concentraciones repartidas a lo largo de todo el rango de calibración de la curva, realizando el análisis en seis ensayos independientes y utilizando al menos un triplicado de cada concentración. Además, resaltan la importancia de estudiar este parámetro en cada una de las matrices utilizadas.

Materiales y Métodos

Siguiendo estas recomendaciones se prepararon muestras de plasma y plasma diluido con concentraciones repartidas a lo largo de todo el rango de la curva: muestra con niveles cercanos al límite inferior de cuantificación (LIC), concentración baja, media, alta y muestra con niveles próximos al límite superior de cuantificación (LSC). Para aquellos niveles de concentración en los que no fue posible obtener un volumen de muestra suficiente como para llevar a cabo todo el estudio, las muestras tuvieron que enriquecerse añadiendo péptido exógeno hasta alcanzar los niveles de concentración deseados. El número de alícuotas producidas fue suficiente como para realizar todos los ensayos pertinentes evitando el uso de alícuotas con ciclos adicionales de congelación y descongelación. En el caso del estudio de la reproducibilidad con la matriz de plasma diluido, se prepararon muestras de plasma con niveles suficientes de péptido como para ocupar todo el rango de cuantificación de la curva una vez aplicada la dilución 1/3 en el SSD. Es decir, se prepararon y congelaron muestras de plasma y en cada ensayo se descongelaron las alícuotas necesarias y se realizó la dilución 1/3.

Hasta la realización de este trabajo no se había estudiado el comportamiento de ABtest en lo referente a la reproducibilidad con muestras de plasma diluido. Sin embargo, este análisis nos parece importante ya que con este tipo de muestras se obtiene el dato de péptido total en el plasma y, junto con el dato de los niveles de péptido libre en plasma, permite el cálculo de numerosas ratios, así como el establecimiento de los niveles de péptido recuperado del plasma.

La evaluación de la reproducibilidad se llevó a cabo mediante el cálculo del coeficiente de variación porcentual (**Fórmula 2**). En este proyecto de validación se han estudiado varios tipos de reproducibilidad:

Reproducibilidad intra-ensayo

Para evaluar la reproducibilidad intra-ensayo, se analizaron seis réplicas de cada una de las cinco muestras preparadas en seis ensayos independientes, utilizando un lote de ABtest40 y ABtest42. Se calculó el CV (%) de los seis datos obtenidos para cada ensayo y muestra y se estimó el promedio de los CV intra-ensayo de los seis ensayos.

Reproducibilidad inter-ensayo

La reproducibilidad inter-ensayo se calculó como el CV promedio de los 36 valores de cada muestra analizados a lo largo de seis ensayos independientes en un lote de ABtest.

Reproducibilidad inter-lote

Se consideró oportuno realizar una evaluación de la reproducibilidad inter-lote de ABtest para tener una idea de cómo de próximas son nuestras medidas entre sí cuando se utilizan diferentes lotes de kits. Para ello se prepararon tres lotes de ABtest de forma completamente independiente, de modo que todos los reactivos participantes en el kit (lotes de los anticuerpos, de los estándares de calibrado y de los tampones) variaban entre lotes.

Para el estudio de la reproducibilidad inter-lote se analizaron seis réplicas de cada muestra en tres ensayos independientes y utilizando tres lotes de ABtest. En cada ensayo se calculó el CV inter-lote para cada muestra y se calculó el promedio de los CV inter-lote obtenidos en los tres ensayos.

✓ El criterio de conformidad del parámetro de reproducibilidad sugerido por las guías de validación apunta a un $CV \leq 20 \%$, permitiéndose el 25 % para la muestra con niveles cercanos al LIC.

Reproducibilidad test-retest

De manera adicional al estudio intrínseco de la reproducibilidad de ABtest con cinco muestras de plasmas control descrito previamente, se llevó a cabo un estudio más amplio de la reproducibilidad del kit. Dicho análisis consistió en comparar los niveles de concentración obtenidos con muestras procedentes de estudios que se analizaron de forma repetida: reproducibilidad test-retest.

Materiales y Métodos

Reproducibilidad test-retest intra-estudio

Para este análisis se midieron en dos ocasiones, es decir, de forma repetida, las mismas 25 muestras de plasma y plasma diluido a lo largo de un mismo estudio. Para cada uno de los dos análisis se utilizó una alícuota diferente de manera que no se introdujeron ciclos adicionales de congelación-descongelación. La misma alícuota se utilizó para cuantificar los niveles de A β en plasma y plasma diluido. Además, se utilizó un mismo lote de ABtest40 y ABtest42 para llevar a cabo los dos análisis de la misma muestra, de modo que no se introdujo variabilidad adicional por el uso de dos lotes diferentes de ABtest. La variabilidad se cuantificó mediante el cálculo del CV y también del coeficiente de correlación intraclase (CCI).

Reproducibilidad test-retest inter-estudio

Por último, se realizó un análisis de la variabilidad test-retest inter-estudio de nuestro kit. Es decir, se evaluó cuánto se asemeja la cuantificación de las muestras cuando éstas se analizan en dos estudios independientes entre los que difiere el lote de ABtest utilizado. Para ello se analizaron las mismas 98 muestras en dos estudios separados entre sí 18 meses. Al igual que en el caso anterior, para cada uno de los dos análisis se utilizaron alícuotas diferentes de una misma muestra (sin ciclos extra de congelación-descongelación). No obstante, las alícuotas del primer y segundo análisis se enviaron desde el centro original hasta nuestro laboratorio en dos envíos diferentes, separados entre sí también 18 meses.

Al igual que en el apartado anterior, para la evaluación de la reproducibilidad test-retest inter-estudio también se calculó el CV y el CCI.

✓ Los CCI más elevados indican una mejor correlación entre los valores. $CCI \geq 0,75$ se consideran excelentes; $0,4 \leq CCI \leq 0,75$ se consideran entre mediocres y buenos y $CCI \leq 0,4$ se consideran malos (Rosner, 1995).

Exactitud

La exactitud de un método analítico describe la proximidad del resultado experimental obtenido con dicho método, con el valor de referencia del analito. El problema al que nos enfrentamos es que no existe un método de referencia para la cuantificación de A β 40 y A β 42 en muestras de plasma. Por ese motivo, la determinación de la exactitud de ABtest40 y ABtest42 se realizó de una manera aproximada, tomando como referencia un valor de concentración teórico previamente establecido mediante el mismo método.

Al igual que el estudio de la reproducibilidad, la exactitud también se analizó utilizando cinco muestras de plasma y plasma diluido con concentraciones repartidas a lo largo de todo el rango de la curva: muestra cercana al LIC, concentraciones baja, media, alta y muestra cercana al LSC.

Para la determinación de la concentración teórica se realizaron numerosas medidas de la misma muestra, en varios ensayos y utilizando diferentes lotes de ABtest. De esta manera, se pretendió establecer un valor de referencia robusto y poco influenciado por factores externos puntuales. En concreto, se utilizaron dos lotes de ABtest y se realizaron tres (para muestras de plasma diluido) o cuatro (para muestras de plasma) ensayos independientes. En cada ensayo se analizaron seis réplicas de cada muestra. De esta manera, la concentración teórica de referencia se estableció con 36 o 48 (plasma diluido y plasma respectivamente) valores de una misma muestra.

Una vez disponible el valor teórico de referencia, se llevó a cabo el estudio de la exactitud de nuestro método utilizando un lote diferente de ABtest y a lo largo de varios ensayos independientes. Para ello se cuantificaron los niveles de A β 40 y A β 42 en las mismas cinco muestras de plasma y plasma diluido. Se realizaron seis ensayos independientes midiendo seis réplicas de cada muestra en cada ensayo y se estableció la exactitud del método a partir del cálculo del error relativo porcentual para cada determinación (**Fórmula 3**).

La exactitud global viene determinada por el promedio, en términos de valor absoluto, de los 36 datos de ER (%) obtenidos para cada muestra.

✓ Las guías de validación recomiendan que el ER promedio no supere el 20 % en todos los niveles de concentración, permitiendo un $ER \leq 25 \%$ para las muestras con niveles de concentración cercanos al LIC.

Materiales y Métodos

Además del estudio de los parámetros de precisión y exactitud, se consideró adecuado realizar un cálculo del error total que, como ya se ha descrito anteriormente, consiste en la suma del error aleatorio (CV) y el error sistemático (ER).

✓ El criterio de conformidad establecido por las guías de validación recomienda que el error total no supere el 30 %, permitiendo un 40 % para las muestras con niveles cercanos al LIC.

Recuperación

La evaluación de la recuperación del péptido exógeno añadido a muestras de plasma y plasma diluido permite averiguar si existe un efecto matriz que esté dificultando el reconocimiento de todo el péptido endógeno presente en las muestras.

Para el estudio de la recuperación de A β en la matriz de plasma y plasma diluido se trabajó añadiendo concentraciones conocidas de péptido estándar exógeno a este tipo de muestras. En paralelo, se cuantificaron los niveles de péptido endógeno en esas mismas muestras en ausencia de péptido exógeno. La diferencia entre ambos resultados nos permitió averiguar la concentración de péptido exógeno recuperado de la muestra.

Las guías de validación recomiendan añadir tres concentraciones diferentes de péptido exógeno: alta, media y baja. El volumen de péptido añadido debería ser el mismo en todas las muestras y no debería suponer más de un 5 % del volumen total de la muestra. Siguiendo estas recomendaciones, para este estudio se utilizaron tres muestras de plasma y plasma diluido y se añadieron tres niveles de concentración de péptido exógeno. En ABtest40 se trabajó con 150, 75 y 20 pg/mL y en ABtest42 con 75, 50 y 20 pg/mL. Para que el volumen de péptido estándar añadido fuera el mismo en los tres casos, se prepararon soluciones intermedias de estándar en SSD a diferentes concentraciones. En el caso de ABtest40, estas soluciones de A β 40 fueron de 7,50, 3,75 y 1,00 ng/mL, respectivamente. Para ABtest42, las soluciones de A β 42 en SSD fueron de 3,75, 1,25 y 0,50 ng/mL, respectivamente. Posteriormente, se añadieron 5 μ L de cada una de estas soluciones a 245 μ L de cada una de las tres muestras de plasma o plasma diluido.

Para confirmar los resultados y obtener un dato robusto de recuperación, se realizaron tres ensayos idénticos e independientes. En cada uno de ellos se añadió el péptido exógeno a las muestras recién descongeladas y se cuantificaron los niveles de A β 40 y A β 42 tanto en las muestras con péptido añadido como en las muestras sin péptido

añadido. Para evaluar la recuperación en las muestras de plasma diluido se realizó en primer lugar la dilución 1/3 en el SSD y, a continuación, se añadió el péptido exógeno.

Para la evaluación de este parámetro se utilizó la medida de recuperación porcentual (**Fórmula 10**):

Fórmula 10: Recuperación de péptido exógeno en tanto por ciento:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Conc. con péptido añadido} - \text{Conc. sin péptido añadido}}{\text{Conc. teórica añadida}} \times 100$$

Siendo "Conc" = concentración.

✓ El rango de recuperación aceptado por las guías internacionales es del 80-120 % en ausencia de efecto matriz.

Efecto matriz

Siguiendo la misma línea de los estudios de recuperación, se consideró importante averiguar si existe algún efecto o sustancia interferente en la matriz con la que trabajamos que esté dificultando el reconocimiento del péptido A β por parte de la pareja de anticuerpos utilizados en nuestro inmunoensayo. Es decir, es necesario garantizar que la señal obtenida en los ensayos se debe a la presencia del péptido y es proporcional a su concentración en la muestra. Para estudiar este aspecto se realizaron experimentos de dilución de las muestras y se analizó tanto la linealidad de la señal, como la linealidad de la concentración obtenida tras realizar las diferentes diluciones.

Linealidad de la dilución

En ausencia de efecto matriz, se espera que al realizar una dilución de la muestra y aplicar posteriormente el factor de dilución correspondiente, los niveles de concentración en la muestra diluida sean similares a los obtenidos en la muestra sin diluir. Sin embargo, estudios previos de recuperación y linealidad realizados con la versión anterior de nuestro kit (que utilizaba un anticuerpo de captura comercial), indicaron la existencia de

un efecto matriz en el plasma. Dicho efecto desaparecía al diluir las muestras de plasma 1/3 en el SSD, ya que, gracias a la composición de este tampón, se conseguía liberar el A β de su unión a otros componentes de la matriz, quedando el péptido accesible para su reconocimiento (Perez-Grijalba *et al.*, 2013).

En esta tesis, se ha estudiado si el efecto matriz se seguía observando al haber sustituido el anticuerpo comercial de captura por un anticuerpo de producción interna. El estudio de este efecto es muy importante ya que en él se basa la clasificación del péptido en las distintas fracciones plasmáticas: libre, total y unido a componentes de la matriz (recuperado del plasma). Para ello, además de los experimentos de recuperación descritos anteriormente, se estudió la linealidad de la dilución comparando los resultados de señal y concentración obtenidos al diluir las muestras con un tampón salino (PBS) y con el SSD. Se trabajó con un total de cinco muestras de plasma y, basándonos en información previa de nuestros propios ensayos, se eligieron las diluciones 1/3, 1/6 y 1/9 de la muestra de plasma (sin diluir).

Efecto de los factores pre-analíticos en la cuantificación de A β en plasma

El estudio de diferentes factores técnicos pre-analíticos que pueden afectar los niveles de A β cuantificados en el plasma se llevó a cabo en muestras de voluntarios sanos. Lo ideal sería estudiar todos estos factores utilizando un mayor número de individuos y en diferentes etapas de la enfermedad, como por ejemplo muestras procedentes de pacientes con deterioro cognitivo leve y moderado, así como en enfermos de Alzheimer. Sin embargo, el elevado volumen de muestra requerido para este tipo de experimentos limitó su aplicación a individuos sanos.

A continuación, se describe la metodología utilizada para llevar a cabo el estudio de cada uno de estos factores:

Tratamiento de la sangre con inhibidores de proteasas (IP) exógenos

Debido a la presencia de proteasas en la matriz sanguínea, muchos grupos de investigación trabajan añadiendo IP exógenos al tubo en el que se realiza la recogida de la sangre con el objetivo de evitar la degradación del A β presente en dicha matriz.

Además de introducir una manipulación más en el protocolo, dicho procedimiento supone un aumento considerable del coste. Por ello se consideró importante estudiar si realmente el tratamiento de la sangre con IP exógenos tiene algún efecto sobre los niveles de A β cuantificados en las muestras de plasma y plasma diluido.

Para estudiar este asunto se extrajo sangre periférica de siete individuos sanos en tubos de polipropileno que contenían EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) como anticoagulante (*BD Vacutainer K2-EDTA spray dried form; PET 6 mL; Ref: 367864*). La sangre de cada individuo se recogió en diferentes tubos en presencia o ausencia de un *cocktail* comercial de IP (*cOplete™, mini tablets* de Roche; referencia 04 693 124 001) a una concentración de una pastilla por cada 10 mL de sangre. Este producto comercial contiene EDTA e inhibidores reversibles e irreversibles de proteasas, con efecto sobre un amplio espectro de serín-proteasas, cisteín-proteasas y metaloproteasas, así como calpaínas. Además, también contiene un reactivo denominado fluoruro de aminoetilbencenosulfonilo (AEBSF) capaz de modificar químicamente de forma no específica residuos como las tirosinas, las histidinas, las lisinas y los grupos amino. Se ha descrito que este agente modifica el péptido A β 40 humano produciendo un incremento de su masa muy similar a la existente con el péptido A β 42, pudiendo ocasionar que los picos de ambos analitos se superpongan en los espectros de masas (Conboy *et al.*, 2008).

En este trabajo estudiamos si la acción tanto de las proteasas como de los IP exógenos variaba en función del tiempo y la temperatura de conservación de las muestras de sangre antes de su procesamiento y almacenamiento. Esto cobra especial relevancia cuando se trabaja con muestras procedentes de diferentes centros y el procesamiento de la sangre no se realiza de manera inmediata en cada centro, sino que las muestras de sangre son transportadas desde el lugar en el que se realiza su extracción hasta el laboratorio en el que éstas se procesan.

Por este motivo, se recogieron tubos de sangre como para realizar el procesamiento de la muestra en las siguientes condiciones:

- Condiciones control: procesamiento inmediato de la sangre. Estas muestras se recogieron únicamente en tubos sin IP y por lo tanto no se utilizan para la comparativa entre muestras con o sin IP, sino para el estudio del TRP (ver siguiente apartado).
- Procesamiento tras 8 horas de conservación a 4 °C. Tubos con y sin IP.
- Procesamiento tras 8 horas de conservación a temperatura ambiente. Tubos con y sin IP.
- Procesamiento tras 30 horas de conservación a 4 °C. Tubos con y sin IP.

Materiales y Métodos

Después de los diferentes tiempos de conservación o almacenamiento, las muestras de sangre se procesaron mediante un protocolo de centrifugación de 2.500 g durante 15 minutos a 4 °C. Las muestras de un mismo individuo, con y sin IP, se procesaron siempre en paralelo para intentar no introducir diferencias adicionales entre ellas. Después de la centrifugación se separó la fracción plasmática de cada muestra y se dividió en alícuotas de 500 µL. Por último, se procedió a la ultracongelación (-80 °C) del plasma hasta el momento del análisis.

Los niveles de Aβ40 y Aβ42 en muestras de plasma y plasma diluido 1/3 en SSD se analizaron mediante ABtest40 y ABtest42. Para minimizar el efecto de posibles factores externos, las muestras de un mismo individuo, tratadas o no con IP, se analizaron en la misma placa. En esta ocasión se analizó cada muestra por triplicado para tener una mayor garantía del resultado obtenido. De forma adicional, las muestras de plasma utilizadas para este estudio se pre-incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con IgGs de ratón antes de añadirse a la placa. El objetivo de este paso fue realizar un pre-bloqueo de posibles anticuerpos heterofílicos (anticuerpos humanos con capacidad para reconocer inmunoglobulinas de otras especies, por ejemplo, *human anti-mouse*) presentes en las muestras de plasma: los supuestos anticuerpos heterofílicos reconocerían las IgGs de ratón y, por lo tanto, en el momento de añadirse la muestra al pocillo, dichos anticuerpos heterofílicos tendrían sus regiones hipervariables ya ocupadas. De esta manera, al estar interaccionando con las IgGs de ratón, los anticuerpos heterofílicos no podrían reconocer al anticuerpo de captura adsorbido a la placa, evitándose de esta manera la aparición de señales inespecíficas atribuibles a este tipo de interferencia (Hennig *et al.*, 2000; Klee, 2000; Kricka, 1999).

Temperatura y tiempo de retardo del procesamiento (TRP) de la muestra

La inclusión en los ensayos clínicos de muestras procedentes de hospitales o centros de salud que carecen de la infraestructura necesaria para el procesamiento de las muestras en sus instalaciones, pone de manifiesto la necesidad de investigar el efecto que puede tener el TRP de la muestra sobre los niveles de Aβ cuantificados en el plasma. De la misma manera, también tiene importancia evaluar si la temperatura a la que se conservan dichas muestras de sangre desde su extracción hasta el momento del procesamiento puede tener un impacto sobre el resultado de la cuantificación de los péptidos Aβ en la matriz plasmática.

Por este motivo, tomando siempre como referencia los niveles de la muestra control procesada inmediatamente, se cuantificaron y compararon los niveles de A β 40 y A β 42 en plasma y plasma diluido de muestras conservadas durante 8 o 30 horas en refrigeración (4 °C), así como de muestras que permanecieron a temperatura ambiente durante 8 horas.

Este análisis se realizó en paralelo al estudio del efecto de la adición de IP, por lo que el protocolo de procesamiento es exactamente el mismo que el descrito en el apartado anterior, ya que se trata de las mismas muestras.

Parámetros de centrifugación de la sangre y presencia de plaquetas en el plasma

Determinación de la concentración de plaquetas en el plasma tras diferentes protocolos de centrifugación de la sangre

Ya se ha comentado en la Introducción que está descrito que las plaquetas producen APP y secretan el péptido A β (Chen *et al.*, 1995; Skovronsky *et al.*, 2001). Esto puede hacer variar los niveles de A β cuantificados en el plasma en función del número de plaquetas presentes en el mismo tras la recogida y preparación (centrifugación) de la sangre de los pacientes que entran en los diferentes estudios.

Para llevar a cabo la determinación del contenido de plaquetas presentes en la matriz plasmática tras diferentes protocolos de centrifugación de la sangre se utilizaron muestras de cinco individuos sanos. La sangre periférica extraída mediante punción venosa se recogió en tubos de polipropileno sin IP y se utilizó citrato de sodio como anticoagulante. El volumen total extraído se dividió en varias alícuotas para poder llevar a cabo diferentes protocolos de centrifugación de la misma muestra, siempre en condiciones de refrigeración (4 °C):

- 15 minutos a 400 g: protocolo de centrifugación suave (enriquecimiento de plaquetas en plasma).
- 15 minutos a 2.500 g: protocolo usado habitualmente (previamente) en Araclon Biotech.
- 30 minutos a 2.500 g: aumento del tiempo de centrifugación con respecto al protocolo en uso en nuestro laboratorio.
- 30 minutos a 4.000 g: aumento del tiempo y la fuerza de centrifugación con respecto a nuestro protocolo en uso.

Materiales y Métodos

- 30 minutos a 11.400 g: máximas revoluciones permitidas por la centrífuga en uso.

Después de la centrifugación de la sangre se separó la fracción plasmática de la fracción celular y se analizaron los niveles de plaquetas remanentes en esta fracción plasmática con un contador hematológico (Beckman Coulter, modelo AcT diff). Posteriormente, el volumen total de plasma se dividió en alícuotas de 1 mL y las muestras se conservaron a -80 °C hasta el momento de su análisis. Como dato de referencia, se analizó la concentración de plaquetas en plasma con respecto a la concentración inicial de este componente celular en la sangre.

Cuantificación de A β 40 y A β 42 en muestras de plasma tras diferentes protocolos de centrifugación de la sangre

Además de realizar un recuento del número de plaquetas en las distintas muestras de plasma, los niveles plasmáticos de A β 40 y A β 42 se cuantificaron en estas muestras mediante ABtest40 y ABtest42. El objetivo de este análisis fue evaluar el efecto del protocolo de centrifugación de la sangre sobre los niveles cuantificados de dichos péptidos en las matrices de plasma y plasma diluido. Las muestras de un mismo individuo se analizaron en una misma placa para reducir al máximo la variabilidad entre ellas.

Cuantificación de A β 40 en el plasma tras la eliminación de las plaquetas por filtración

Después del procesado de las muestras de sangre con el protocolo de centrifugación menos enérgico, comprobamos que un porcentaje elevado de plaquetas permanece en la fracción plasmática. Una vez confirmado que existen diferencias en los niveles de A β cuantificados en la matriz de plasma sin diluir en función del protocolo de centrifugación aplicado (ver apartado "Parámetros de centrifugación de la sangre y presencia de plaquetas en el plasma" en la sección de Resultados), se consideró adecuado eliminar las plaquetas presentes en el plasma mediante un procedimiento de filtración. El objetivo de este experimento fue averiguar si la presencia de dicho componente celular en el plasma puede ejercer un impedimento estérico que dificulte la detección de parte del A β presente en las muestras. Para ello se utilizaron filtros de 0,22 μ m (Sartorius, Referencia 11107-47-ACN), en los cuales quedan retenidas las plaquetas (diámetro 2-3 μ m). Como

control del procedimiento se filtraron también muestras de plasma centrifugadas con el protocolo de centrifugación más enérgico y que, por tanto, carecían de plaquetas.

Los niveles de A β 40 cuantificados en las muestras de plasma filtradas se compararon con los niveles de este mismo péptido en las mismas muestras de plasma sin filtrar. Todos los análisis se realizaron en un mismo ensayo utilizando ABtest40.

Tipo de anticoagulante

El último aspecto pre-analítico estudiado que puede afectar a la medida del péptido A β en el plasma fue el tipo de anticoagulante utilizado. Para ello se realizó un estudio comparativo de los niveles de A β 40 y A β 42 en muestras de plasma y plasma diluido de 14 individuos sanos cuya sangre se había recogido en paralelo en tubos con EDTA o con citrato de sodio como anticoagulantes. De esta manera se pudo disponer de una comparativa en la sangre de un mismo individuo (comparativa intra-sujeto). La heparina se descartó de esta comparativa ya que, debido a que se conoce que se une a A β , su uso no está recomendado para la determinación de este analito (van Oijen *et al.*, 2006).

El formato del anticoagulante en los tubos en los que se recoge la sangre varía entre ambos aditivos. Mientras que con los tubos de EDTA (*BD Vacutainer K2-EDTA spray dried form; 1,8 mg EDTA/mL de sangre; PET 6 mL; Ref: 367864*) no se realiza una dilución de la muestra con el anticoagulante ya que tiene un formato de spray seco, el citrato de sodio viene en los tubos (*BD Vacutainer Citrate tube; 3,2 % trisodium citrate (0,109 M); PET 2,7 mL; Ref: 363095*) como un aditivo líquido que supone una dilución de la muestra equivalente a un 10 %.

Todo el procedimiento se realizó en paralelo para evitar introducir diferencias adicionales entre ambos tipos de muestras y en todos los casos se trabajó en ausencia de IP exógenos. Las muestras de sangre se centrifugaron a 4.000 g durante 30 minutos a 4 °C, y se realizaron varias alícuotas de la fracción plasmática (de 700 μ L) que se ultracongelaron (-80 °C) hasta su uso. Se utilizó ABtest40 y ABtest42 para realizar la cuantificación de los péptidos A β tanto en la fracción de plasma como en la fracción de plasma diluido. Las muestras de un mismo individuo se analizaron en una misma placa para minimizar la variabilidad entre ellas.

Además de comparar los resultados a nivel individual y el dato promedio de ambos grupos, se analizó si la distribución del péptido en las distintas fracciones plasmáticas (libre en el plasma o recuperado del plasma) variaba en función del anticoagulante

utilizado. Por último, se realizó un análisis estadístico para evaluar si las diferencias entre ambos grupos alcanzaban significación estadística. Para ello se realizó la prueba de la suma de los rangos de Wilcoxon, que es un test no paramétrico que permite la comparación de las medias de dos grupos de muestras relacionadas. Los dos grupos de muestras "EDTA" y "citrato de sodio" se introdujeron como la variable explicativa binaria y los niveles de A β cuantificados por ELISA como la variable respuesta. El resultado se consideró significativo siempre y cuando $p < 0,05$.

Los índices plasmáticos A β 42/40 como posibles biomarcadores de la EA

Población de estudio

Las nuevas versiones de los kits ABtest40 y ABtest42, que incluyen el anticuerpo 1F3 como anticuerpo de captura, se utilizaron para llevar a cabo la cuantificación de A β 40 y A β 42 en muestras de plasma y plasma diluido de una subpoblación de individuos de la cohorte AIBL, con el objetivo de investigar su potencial como posibles biomarcadores de la EA.

El estudio AIBL, de tipo prospectivo y longitudinal, fue diseñado con el objetivo principal de mejorar el entendimiento de la patogénesis de la EA, tratando de buscar diferencias biológicas entre individuos con y sin dicha enfermedad. Se realizó un largo seguimiento de los mismos para tratar de averiguar qué biomarcadores, características cognitivas y factores relacionados con la salud y el estilo de vida determinan el desarrollo de la EA sintomática. El reclutamiento de los sujetos comenzó en noviembre de 2006 en las ciudades de Melbourne (tres centros) y Perth (dos centros). La cohorte inicial comprendió 1.112 voluntarios mayores de 60 años: 768 controles sanos, 133 DCL y 211 con la EA, que se evaluaron en el punto de partida o *baseline* y a intervalos regulares de 18 meses. Esta cohorte es la más grande de Australia en estudios de este tipo y una de las más grandes del mundo.

La clasificación de los individuos en los diferentes grupos de diagnóstico se llevó a cabo por un grupo de profesionales multi-disciplinarios que siguieron criterios internacionalmente reconocidos y bien establecidos. A los individuos reclutados se les han realizado test cognitivos, cuestionarios sobre historia médica personal y familiar, medicación, salud y estilo de vida, extracciones de sangre, test de neuroimagen (MRI y

PET-A β ; por asuntos de financiación, en la visita *baseline* únicamente se realizaron estos análisis a 287 participantes: 177 controles sanos, 57 DCL y 53 EA), y finalmente, revisiones clínicas y de diagnóstico de DCL o EA. Los responsables de este estudio hipotetizaron que al relacionar, de forma retrospectiva, los supuestos biomarcadores sanguíneos con medidas cognitivas longitudinales y la presencia o ausencia de A β cerebral detectado por PET-A β , se podría llevar a cabo la identificación de biomarcadores sanguíneos capaces de detectar el proceso patológico de la EA antes de la aparición de los primeros síntomas cognitivos. La descripción completa de los procedimientos de clasificación clínicos viene reflejada en el documento "*The Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle (AIBL) study of aging: methodology and baseline characteristics of 1112 individuals recruited for a longitudinal study of Alzheimer's disease*" (Ellis *et al.*, 2009).

La sub-cohorte de AIBL seleccionada para llevar a cabo nuestro estudio consistió en controles cognitivamente normales (ausencia de dificultades cognitivas) sometidos a evaluación de la carga amiloide cerebral mediante un análisis de neuroimagen tipo PET. La planificación temporal del estudio AIBL incluyó un seguimiento longitudinal de los individuos durante un total de 72 meses, con visitas cada 18 meses a partir del punto de partida (visitas en tiempos 0, 18, 36, 54 y 72 meses). El resultado del test de neuroimagen se utilizó como estándar de referencia con el que comparar el rendimiento de los biomarcadores en plasma.

Neuroimagen PET amiloide

Los niveles corticales de A β se analizaron en las distintas visitas mediante un análisis PET utilizando PiB o flutemetamol como radiofármacos. La metodología utilizada para cada uno de estos dos radiofármacos está ampliamente detallada en los documentos "*Amyloid imaging results from the Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle (AIBL) study of aging*" (Rowe *et al.*, 2010) y "*18F-flutemetamol amyloid imaging in Alzheimer disease and mild cognitive impairment*" (Vandenberghe *et al.*, 2010). De manera resumida, las imágenes obtenidas se normalizaron espacialmente y se delimitaron regiones volumétricas o volúmenes de interés (VOIs) sobre la imagen PET. A continuación, se calculó un valor estándar de captación del radiofármaco (*Standardized Uptake Value, SUV*) en cada región de interés. Este parámetro es una medida semicuantitativa que normaliza la captación del radiofármaco respecto a la actividad inyectada y al peso del paciente. Se calcularon SUV para todas las regiones examinadas y posteriormente se normalizaron con el SUV de la región de referencia recomendada para cada ligando, generando una ratio de tejido denominada SUV ratio (SUVR). Las regiones de referencia

Materiales y Métodos

utilizadas fueron la corteza cerebelosa en el caso de PiB y el puente troncocefálico en el caso del flutemetamol (Thurfjell *et al.*, 2013). Finalmente, la carga amiloide neocortical global se calculó utilizando las SUVR medias de las regiones frontal, parietal superior, temporal lateral, occipital lateral y giro cingulado anterior y posterior.

Con la finalidad de poder utilizar los resultados de ambos radiofármacos como una única variable continua, los resultados de flutemetamol se transformaron en una SUVR de tipo PiB llamada BeCKeT (*Before the Centiloid Kernel Transformation*) (Villemagne *et al.*, 2014). El uso de SUVR/BeCKeT permitió dicotomizar la carga amiloide cortical en positiva (A β +) o negativa (A β -) en función de un punto de corte establecido en 1,5 (Villemagne *et al.*, 2013b; Villemagne *et al.*, 2014).

Cuantificación de A β 40 y A β 42 en plasma

Las muestras de plasma utilizadas en este estudio se obtuvieron a partir de muestras de sangre procesadas de acuerdo con los procedimientos de AIBL. La sangre de los participantes se recogió en tubos de polipropileno con EDTA y prostaglandina E1, un inhibidor de la agregación plaquetaria que demostró no tener una influencia significativa en los niveles de A β en el plasma según un estudio piloto no publicado por sus autores, tal y como se indica en la información suplementaria del trabajo "*Changes in plasma amyloid beta in a longitudinal study of aging and Alzheimer's disease*" (Rembach *et al.*, 2014a). Tras un periodo de incubación de 15 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital, las muestras de sangre se procesaron de la siguiente manera: se realizó una centrifugación inicial de la sangre durante 10 minutos a 200 g y 20 °C, obteniéndose un plasma rico en plaquetas que se transfirió a un segundo tubo, donde se procedió al segundo ciclo de centrifugación (15 minutos, 800 g, 20 °C) (Rembach *et al.*, 2014a). A pesar de que se realizó un seguimiento de los participantes durante 72 meses con visitas cada 18 meses, únicamente se dispuso de muestras de plasma de las visitas 18, 36 y 54 meses para este estudio, por lo que no se tienen datos de los niveles de A β en plasma de las visitas 0 y 72 meses.

Las muestras de plasma se conservaron a -80 °C hasta el momento de su análisis y no se introdujeron ciclos adicionales de congelación/descongelación de las alícuotas. Los niveles de A β 40 y A β 42 se cuantificaron de acuerdo con el protocolo de ABtest40 y ABtest42 descrito anteriormente. Los investigadores desconocieron las características individuales de las muestras durante todo el análisis.

De cada muestra se analizaron los niveles de A β 40 y A β 42 en plasma y plasma diluido 1/3 en el SSD. Para evitar la aparición de señales inespecíficas ocasionadas por la posible presencia de anticuerpos heterofílicos en algunos individuos, ambos tipos de muestras se pre-incubaron durante 30 minutos a RT con IgGs de ratón a una concentración final de 5 μ g/mL. Tal y como se ha mencionado anteriormente, la determinación de A β en la matriz de plasma sin diluir nos permite cuantificar la concentración de péptido que se encuentra libre en el plasma (directamente accesible, DA), mientras que la determinación de A β en la matriz de plasma diluido nos informa acerca de los niveles totales del analito (total en plasma, TP). Estos cuatro marcadores de análisis directo nos permiten calcular otros muchos marcadores plasmáticos (**Tabla 3**), de entre los cuales conviene recordar que la diferencia entre los niveles de péptido total en plasma y de péptido directamente accesible en el plasma se corresponde con los niveles de péptido recuperado del plasma (RP).

Marcadores directos: determinación en plasma		
Marcador	Abreviatura	Observaciones
A β 40 directamente accesible en plasma	DA40	Medida del péptido en la fracción de plasma sin diluir
A β 42 directamente accesible en plasma	DA42	
A β 40 total en plasma	TP40	Medida del péptido en la fracción de plasma diluido
A β 42 total en plasma	TP42	
Marcadores calculados: distribución de Aβ en las diferentes fracciones plasmáticas		
Marcador	Abreviatura	Observaciones
A β 40 recuperado del plasma	RP40	Diferencia TP40 - DA40
A β 42 recuperado del plasma	RP42	Diferencia TP42 - DA42
Ratio A β 40 DA/A β 40 TP	DA40/TP40	Relación entre el péptido directamente accesible y el péptido total en plasma
Ratio A β 42 DA/A β 42 TP	DA42/TP42	
Ratio A β 40 RP /A β 40 TP	RP40/TP40	Relación entre el péptido recuperado del plasma y el péptido total en plasma
Ratio A β 42 RP/A β 42 TP	RP42/TP42	
Marcadores calculados: relación entre Aβ42 y Aβ40 en las diferentes fracciones plasmáticas		
Marcador	Abreviatura	Observaciones
Ratio A β 42 DA/A β 40 DA	DA42/40	Relación entre A β 42 y A β 40 en cada fracción plasmática
Ratio A β 42 RP/A β 40 RP	RP42/40	
Ratio A β 42 TP/A β 40 TP	TP42/40	

Tabla 3. Resumen de todos los marcadores directos y calculados de A β obtenidos a partir de la cuantificación de A β 40 y A β 42 en muestras de plasma y plasma diluido.

Materiales y Métodos

En comparación con los biomarcadores basados en un solo péptido amiloide, los índices A β 42/40 se están perfilando como biomarcadores más robustos y con un mayor potencial pronóstico (Abdullah *et al.*, 2009; Graff-Radford *et al.*, 2007; Koyama *et al.*, 2012), algo que también se ve reforzado por los resultados de importantes estudios como el estudio Rotterdam (van Oijen *et al.*, 2006), el estudio Framingham (Chouraki *et al.*, 2015) y el estudio *Three-City* (Lambert *et al.*, 2009). Por este motivo, a pesar de la gran variedad de marcadores plasmáticos de A β con los que podemos trabajar tras realizar un estudio con ABtest, en el caso de la cohorte de AIBL la evaluación de su rendimiento como biomarcadores potenciales de la EA se realizó mediante el uso de las ratios A β 42/40 de cada una de las tres fracciones plasmáticas (DA42/40, TP42/40 y RP42/40).

Análisis estadístico

Las poblaciones de estudio variaron en función del análisis llevado a cabo. Para realizar el análisis transversal y la evaluación del rendimiento discriminatorio de ABtest (análisis ROC, característica operativa del receptor), se eligieron aquellos individuos que disponían tanto de una medida válida de PET-A β como de una correspondiente medida válida del parámetro plasmático en las visitas 18, 36 o 54 meses. Sin embargo, para el análisis longitudinal se incluyeron aquellos individuos con una medida válida de PET-A β y del marcador plasmático en *baseline* (visita 18 meses en el caso del marcador plasmático) y al menos otra medida válida de PET-A β a lo largo del seguimiento. La existencia de diferencias demográficas estadísticamente significativas entre ambos grupos (PET-A β + o PET-A β -) se llevó a cabo mediante el test exacto de Fisher (significativo si $p < 0,05$).

Análisis exploratorio

En primer lugar, se realizó un análisis exploratorio para evaluar la asociación entre las medidas de plasma y las de PET. Para ello se llevó a cabo un test U de Mann-Whitney utilizando las parejas de datos de plasma y PET disponibles de las visitas 18, 36 y 54 meses. Como variable independiente categórica se incluyó el resultado del análisis PET (SUVR/BeCKeT) dicotomizado en A β + (punto de corte $\geq 1,5$) o A β -. Como variable dependiente se utilizaron los índices A β 42/40 de las tres fracciones del plasma. Es decir, se analizó si existen diferencias en las ratios plasmáticas de A β entre los grupos de sujetos definidos como PET-A β + y PET-A β -.

Análisis transversal

Para explorar el efecto de las covariables demográficas en la asociación entre SUVR/BeCKeT y las ratios plasmáticas, se llevó a cabo un modelo de regresión lineal para cada visita (18, 36 y 54 meses) utilizando la medida SUVR/BeCKeT como la variable respuesta cuantitativa. En cada modelo se incluyó como variable independiente el índice A β 42/40 de una fracción plasmática en formato de unidades logarítmicas, ya que esta transformación proporciona un mejor resultado estadístico. Las covariables incluidas en el modelo fueron la edad, la presencia de genotipo ApoE ϵ 4 y el género.

Análisis longitudinal

Con el objetivo de evaluar la asociación entre la primera medida de A β en plasma (visita 18 meses) y las trayectorias de SUVR/BeCKeT durante el seguimiento (desde visita *baseline* a visita 72 meses), se utilizó un modelo lineal de efectos mixtos para cada una de las tres ratios del plasma. Los términos "efectos fijos" de cada uno de los tres modelos fueron la contribución de la variable plasma al intercepto y la pendiente de las trayectorias SUVR/BeCKeT, así como las covariables demográficas. Por otra parte, los términos "efectos aleatorios" incluyeron el intercepto y la pendiente a nivel individual.

Análisis ROC

Por último, se llevó a cabo un análisis ROC para evaluar el rendimiento de una única ratio plasmática en predecir la carga amiloide cerebral clasificada como A β + o A β - según SUVR/BeCKeT. Para ello se eligió el índice plasmático que había presentado los mejores resultados en los análisis anteriores. Basados en el modelo de regresión lineal se analizaron tres tipos de clasificadores:

- El primer modelo incluyó como variable explicativa la ratio plasmática TP42/40 en unidades logarítmicas y como covariables el genotipo ApoE ϵ 4 y la edad.
- El segundo modelo se definió únicamente con la finalidad de que sirviera como referencia y solo incluyó las covariables edad y genotipo ApoE ϵ 4.
- El tercer modelo incluyó únicamente la ratio plasmática TP42/40 en unidades logarítmicas y también se utilizó como referencia para comparar con el efecto de las variables demográficas.

La comparativa del rendimiento de los diferentes clasificadores se llevó a cabo mediante la aplicación del test Delong.

Además de evaluar la sensibilidad (**Fórmula 11**) y la especificidad (**Fórmula 12**) de las medidas, se consideró de especial interés en este estudio el cálculo del valor predictivo positivo (**Fórmula 13**), así como del valor predictivo negativo (**Fórmula 14**).

Fórmula 11. Sensibilidad de una prueba diagnóstica.

$$\text{Sensibilidad (\%)} = \frac{\text{Verdaderos positivos} \times 100}{\text{Total enfermos}}$$

La sensibilidad de una prueba diagnóstica indica su capacidad para detectar a un sujeto enfermo. Es decir, una alta sensibilidad supone un bajo número de falsos negativos. Por ejemplo, una sensibilidad del 90 % indicaría que el 90 % de los pacientes enfermos obtendrían un resultado positivo en la prueba. Por tanto, habría un 10 % de falsos negativos (individuos enfermos que han obtenido un resultado negativo en la prueba).

Fórmula 12. Especificidad de una prueba diagnóstica.

$$\text{Especificidad (\%)} = \frac{\text{Verdaderos negativos} \times 100}{\text{Total no enfermos}}$$

La especificidad de una prueba diagnóstica indica su capacidad para identificar correctamente a un individuo sano. Por tanto, una alta especificidad supone una baja frecuencia de falsos positivos. Una especificidad del 90 % indicaría que el 90 % de los individuos sanos obtendrían un resultado negativo en la prueba, por lo que habría un 10 % de falsos positivos (pacientes sanos que han dado un resultado positivo en la prueba).

Fórmula 13. Valor predictivo positivo (VPP) de una prueba diagnóstica.

$$\text{VPP (\%)} = \frac{\text{Verdaderos positivos} \times 100}{\text{Total positivos}}$$

El VPP hace referencia al porcentaje de pacientes enfermos entre todos los individuos con resultado positivo en una prueba. Es decir, valora la probabilidad de que una prueba diagnostique correctamente a un individuo enfermo. Por ejemplo, un VPP del 90 % indicaría que, si la prueba da un resultado positivo, la probabilidad de que el individuo padezca la enfermedad es del 90 %. Esto implicaría que habría un 10 % de individuos sanos incorrectamente diagnosticados como enfermos.

Fórmula 14. Valor predictivo negativo (VPN) de una prueba diagnóstica

$$VPN (\%) = \frac{\text{Verdaderos negativos} \times 100}{\text{Total negativos}}$$

El VPN hace referencia al porcentaje de pacientes no enfermos entre todos los individuos con resultado negativo en una prueba. Es decir, valora la probabilidad de que una prueba diagnostique correctamente a un individuo sano. Por ejemplo, un VPN del 90 % indicaría que si la prueba da un resultado negativo, la probabilidad de que el individuo esté sano es del 90 %. Esto implicaría que habría un 10 % de individuos enfermos incorrectamente diagnosticados como sanos.

El criterio para elegir el punto operativo a lo largo de la curva ROC fue el índice máximo de Youden (**Fórmula 15**). El rendimiento de la clasificación se evaluó a través de un experimento de validación cruzada (VC) con un sub-muestreo repetido al azar de 10.000 rondas y una división de la distribución de los datos de en torno al 50 % - 50 % para los conjuntos de entrenamiento (*training*) y evaluación (*testing*). En el **Anexo 1** se incluyen más detalles acerca de este experimento de VC.

Fórmula 15. Índice de Youden (Y).

$$Y = Se + Es - 1$$

El índice de Youden se utiliza para evaluar la capacidad del método de diagnóstico utilizando un único valor en lugar de la forma dual de hacerlo mediante la sensibilidad (Se) y la especificidad (Es). La idea es combinar los dos índices anteriores para llevar a cabo el estudio de calidad de una prueba. Este índice varía entre -1 y 1, de modo que valores iguales o inferiores a 0 indican que la prueba no tiene validez diagnóstica. Cuanto más se aproxime este índice a 1, mayor valor informativo tiene la prueba.

Por último, se llevó a cabo una aproximación teórica para valorar el beneficio de utilizar ABtest como herramienta de *pre-screening* o enriquecimiento de una población con individuos sanos que acumulen A β a nivel cortical (PET-A β +). Para ello se ideó un hipotético caso de reclutamiento de este tipo de individuos para un ensayo clínico, eligiendo diferentes umbrales del modelo que incluye la ratio logarítmica TP42/40 y las covariables demográficas (edad y genotipo ApoE). Los umbrales elegidos fueron los que maximizan la sensibilidad (y VPN), la especificidad (y VPP) o el índice máximo de Youden.

Materiales y Métodos

Todos los análisis estadísticos de este apartado se realizaron con MATLAB (*The MathWorks, Inc. Natick, MA, USA*). Para todos los test se estableció el nivel de significación en $p < 0,05$. Debido a la complejidad de los modelos matemáticos necesarios para llevar a cabo un análisis lo más informativo posible de los datos de este estudio, así como de la dificultad de su correcta interpretación, el análisis estadístico descrito en esta sección fue fruto de una colaboración con el Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón de la Universidad de Zaragoza.

RESULTADOS

Validación de ABtest40 y ABtest42

Se realizó un proyecto de validación para tener caracterizados los principales parámetros de los dos ensayos (ABtest40 y ABtest42) después de introducir un nuevo anticuerpo de captura, de producción interna, que es común para ambos kits. En este proyecto de validación se trabajó además para mejorar la sensibilidad del ensayo y se hizo especial hincapié en el estudio de los diferentes parámetros del kit en las dos matrices con las que trabajamos: plasma y plasma diluido.

Curva de calibrado

Los rangos de calibración empleados para la cuantificación de A β 40 y A β 42 se eligieron teniendo en cuenta los niveles endógenos de dichos péptidos en muestras de plasma y plasma diluido. Para ABtest40 el rango de la curva de calibrado fue de 3,13 a 200 pg/mL. Para ABtest42 se evaluó la posibilidad de mejorar la sensibilidad del kit ajustando el rango entre 1,56 y 100 pg/mL.

Aproximación gráfica

La representación gráfica de las curvas de calibrado muestra una asociación entre la señal de la absorbancia corregida (señal específica – señal blanco; eje Y) y los distintos niveles de concentración del analito utilizados (eje X). Para ello se tuvieron en cuenta los datos promedio de seis ensayos independientes. Los resultados indicaron ausencia de linealidad para los rangos utilizados, con curvas sigmoideas asimétricas tanto en el caso de ABtest40 como en el caso de ABtest42 (**Figura 22**).

Debido a la ausencia de linealidad de la curva, se utilizó un modelo de regresión logística de cuatro parámetros, 4PL (**Fórmula 1**), con el que se reduce el error cometido a lo largo de los siete puntos de la curva. De modo interesante, en el caso de ABtest42 también observamos un ajuste adecuado a lo largo de todo el rango de la curva a pesar de haber optimizado dicho rango para la cuantificación de los bajos niveles de A β 42 encontrados en plasma.

Resultados

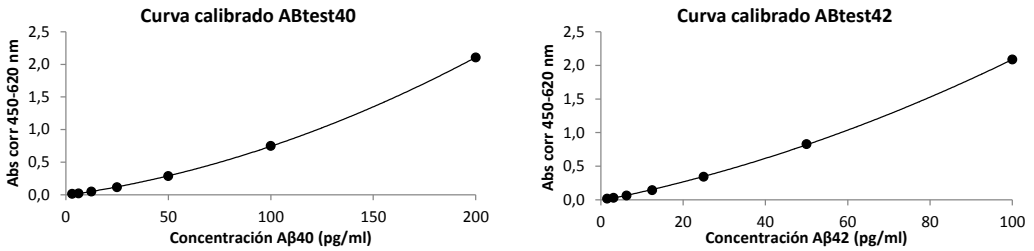


Figura 22. Curvas de calibrado de ABtest40 y ABtest42. Representación gráfica de la relación entre las variables absorbancia y concentración.

Valoración de homocedasticidad

La homocedasticidad hace referencia a la homogeneidad en la varianza de los residuos a lo largo de todo el rango dinámico de la curva. Es decir, este parámetro evalúa si el error cometido entre la concentración obtenida y la concentración teóricamente evaluada varía a lo largo de las distintas concentraciones de la curva.

Para estudiar este parámetro es adecuado representar gráficamente el error relativo que se comete en cada punto de concentración de la curva. A pesar de que un ajuste 4PL permite que la curva se adapte adecuadamente a todos los puntos que la forman, en los puntos de concentración más baja el ER (%) tiende a aumentar. Para minimizar dicho error se realizó una ponderación de tipo 1/y (**Figura 23**).

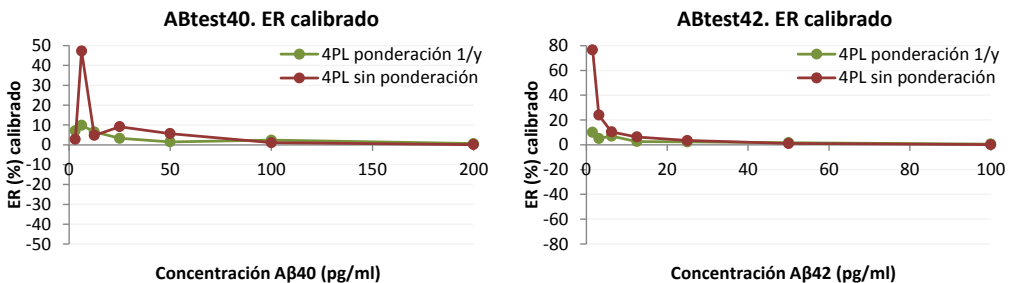


Figura 23. Evaluación del criterio de homocedasticidad. Representación gráfica del porcentaje de error relativo (ER) cometido para cada nivel de concentración tras realizar un ajuste de tipo 4PL con (verde) y sin (granate) ponderación 1/y. Los datos representados reflejan el dato promedio de los ER (%) obtenidos en seis curvas independientes.

Los resultados muestran que en ausencia de ponderación el ER en los puntos de menor concentración aumenta con respecto a lo observado en el resto de la recta (heterocedasticidad), superando el $\pm 30\%$ en algunos puntos en concreto. Sin embargo, al trabajar con un modelo de ajuste 4PL con ponderación $1/y$, el ER (%) se mantiene más o menos constante (homocedasticidad) y próximo al cero a lo largo de todo el rango de la curva. De hecho, aunque la mayor exigencia de los puntos de concentración más baja hace que en esa zona de la curva el ER sea algo superior, en ningún caso se supera el $\pm 20\%$.

La introducción de la ponderación $1/y$ lleva consigo un ligero empeoramiento del coeficiente de bondad de ajuste R^2 . Sin embargo, este procedimiento únicamente supuso una reducción de R^2 del $0,23\%$ en ABtest40 y del $0,24\%$ en ABtest42. Además, en todos los casos el parámetro R^2 se mantuvo dentro de unos niveles de conformidad muy elevados ($R^2 > 0,99$).

Valoración del método de calibrado

Para validar el rango dinámico del ensayo se evaluaron los criterios de precisión y exactitud a lo largo de todos los puntos de concentración de las curvas.

Para ello, se calculó el coeficiente de variación de los duplicados de absorbancia para cada nivel de concentración en cada uno de los seis ensayos realizados. Además, se calculó el error relativo de la concentración obtenida tras aplicar la ecuación de la curva con respecto a la concentración teórica, también para cada rango de concentración (**Tabla 4**). Los criterios de la FDA indican que para el 75% de los puntos analizados el CV y el ER deben ser menores al 20% , excepto en el punto más bajo de la curva donde se acepta un $CV \leq 25\%$ y un $ER \leq \pm 25\%$. Además, el dato del error total (suma de CV y ER) debe ser inferior al 30% .

Todos los valores de CV y ER obtenidos a lo largo de los seis ensayos y para todo el rango dinámico de las curvas cumplieron los criterios recomendados por la FDA. El método de ajuste utilizado en todos los casos fue un modelo de regresión 4PL con ponderación $1/y$. El CV promedio obtenido a lo largo de todo el rango de concentración fue de $5,2\%$ para ABtest40 y de $6,1\%$ para ABtest42, siendo el ER promedio, en términos de valor absoluto, de $4,5\%$ para ABtest40 y de $4,2\%$ para ABtest42. Por su parte, el ET promedio fue del $9,6\%$ para ABtest40 y del $10,3\%$ para ABtest42.

Resultados

Los resultados de precisión y exactitud obtenidos confirman el uso de un rango dinámico de la curva de A β 40 de entre 3,13 y 200 pg/mL. Además, estos resultados también justifican la disminución del rango de calibrado de la curva de ABtest42 a concentraciones de entre 1,56 y 100 pg/mL.

ABtest40																		
A β 40 (pg/mL)	Ensayo I			Ensayo II			Ensayo III			Ensayo IV			Ensayo V			Ensayo VI		
	ER (%)	CV (%)	ET (%)	ER (%)	CV (%)	ET (%)	ER (%)	CV (%)	ET (%)	ER (%)	CV (%)	ET (%)	ER (%)	CV (%)	ET (%)	ER (%)	CV (%)	ET (%)
200	-0,1	0,5	0,5	0,8	2,4	3,2	1,5	1,4	2,9	0,9	3,2	4,0	0,1	2,9	3,0	0,5	1,8	2,3
100	0,6	6,5	7,0	-3,4	3,6	6,9	-3,2	4,0	7,1	-3,6	4,8	8,4	-0,1	5,7	5,8	-3,4	5,4	8,8
50	-1,8	7,7	9,4	2,1	4,7	6,8	2,0	3,2	5,2	1,8	5,5	7,3	-1,1	5,2	6,3	-0,4	4,9	5,2
25	1,0	5,5	6,5	5,1	4,7	9,7	6,5	8,5	15,0	4,7	6,7	11,3	2,0	5,3	7,3	0,6	0,6	1,2
12,5	-0,7	7,1	7,9	9,5	5,5	15,0	12,4	5,7	18,1	7,6	2,9	10,6	3,8	2,5	6,3	5,2	3,6	8,8
6,25	9,9	11,7	21,6	-16,6	5,7	22,3	4,3	7,8	12,1	10,0	4,7	14,7	-8,6	4,2	12,8	-9,9	10,2	20,1
3,125	-17,2	6,7	24,0	-1,7	2,1	3,8	-3,8	9,9	13,7	3,6	8,6	12,1	-6,4	11,5	17,9	-9,6	2,3	11,9

ABtest42																		
A β 42 (pg/mL)	Ensayo I			Ensayo II			Ensayo III			Ensayo IV			Ensayo V			Ensayo VI		
	ER (%)	CV (%)	ET (%)	ER (%)	CV (%)	ET (%)	ER (%)	CV (%)	ET (%)	ER (%)	CV (%)	ET (%)	ER (%)	CV (%)	ET (%)	ER (%)	CV (%)	ET (%)
100	0,7	0,8	1,5	0,0	3,8	3,9	0,7	1,8	2,5	0,0	2,0	2,1	2,0	0,1	2,0	0,2	2,4	2,6
50	-1,7	4,9	6,5	0,3	1,8	2,1	-2,3	3,5	5,8	0,1	1,5	1,6	-3,9	5,0	8,9	-1,7	8,4	10,2
25	-6,2	1,1	7,4	-1,0	7,7	8,7	-0,2	9,3	9,6	0,3	2,3	2,6	2,9	9,8	12,8	3,6	13,4	17,0
12,5	2,2	5,4	7,7	0,8	9,0	9,8	4,8	6,9	11,6	-2,5	3,5	5,9	2,7	14,8	17,5	2,8	14,4	17,2
6,25	12,0	2,6	14,7	-1,4	2,9	4,3	-2,7	7,3	10,0	4,0	1,0	5,0	5,5	6,8	12,4	-16,1	7,9	23,9
3,125	0,2	3,7	3,9	4,5	5,1	9,6	-0,7	14,1	14,8	1,9	4,2	6,0	13,0	5,3	18,3	10,5	6,2	16,7
1,563	-10,3	1,7	12,0	-3,0	22,6	25,7	-8,5	7,2	15,8	-19,7	8,8	28,6	-11,9	4,6	16,5	-6,7	8,9	15,6

Tabla 4. Parámetros de validación del método de calibrado. ER (%): error relativo en tanto por ciento de la concentración calculada a partir de la ecuación de la recta con respecto a la concentración teóricamente añadida. CV (%): coeficiente de variación de los duplicados de absorbancia para cada nivel de concentración y para cada ensayo. ET (%): error total en tanto por ciento. Hace referencia a la suma del ER (en valor absoluto) y del CV.

Especificidad

Caracterización del epítipo

Para evaluar la especificidad de los anticuerpos anti N-terminal y anti C-terminal utilizados en nuestro kit se utilizaron péptidos A β truncados en ambos extremos.

El anticuerpo monoclonal anti N-terminal 1F3 no sólo reconoció el péptido amiloide A β 1-40 sino que también reconoció con elevada afinidad (>96 %) los péptidos amiloides A β 2-

40 y A β 3-40, así como el péptido [Pyr3] A β 3-40. Por el contrario, este anticuerpo no reconoció ni los péptidos A β que empiezan más allá del aminoácido 3 (A β 4-40 y A β 11-40) ni el péptido A β 1-40 murino (**Tabla 5**).

	Especificidad Anti N-terminal	
	1F3	6E10
A β 1-40	✓	✓
A β 2-40	✓	✓
A β 3-40	✓	✓
[Pyr3] A β 3-40	✓	✓
A β 4-40	✗	!
A β 11-40	✗	✗
A β 1-40 murino	✗	✗

Tabla 5. Especificidad del extremo N-terminal de los anticuerpos 1F3 y 6E10. Símbolo verde: reconocimiento total del péptido. Símbolo naranja: reconocimiento parcial. Símbolo rojo: ausencia de reconocimiento.

Estos resultados de especificidad indican que el péptido A β no necesita la presencia de los aminoácidos 1 y 2 para ser reconocido por el anticuerpo 1F3, sino que le basta con la presencia del glutámico de la posición 3, aunque sea en su forma de piroglutamato. El patrón de especificidad de 6E10 es similar, pero en este caso dicho anticuerpo es capaz de reconocer parcialmente (50 % de la señal corregida) al péptido A β en ausencia de los tres primeros aminoácidos del extremo N-terminal (A β 4-40).

Con relación a los anticuerpos anti C-terminal utilizados como anticuerpos de detección, observamos ausencia de reactividad cruzada tanto para el anticuerpo anti-A β 40 (pAB002) como para el anticuerpo anti-A β 42 (pAB031). Es decir, ninguno de los dos anticuerpos reconoció otros péptidos de secuencias similares, independientemente de que la secuencia fuera de mayor o menor longitud a la específica. Por tanto, en el kit ABtest40 sólo detectamos los péptidos A β que terminan en el aminoácido 40 y en el kit ABtest42 sólo detectamos los péptidos A β que terminan en el aminoácido 42 (**Figura 24**). Esto es importante porque toda la secuencia de A β 40 está contenida en el péptido A β 42. Sin

Resultados

embargo, los anticuerpos anti-A β 40 sólo reconocen el péptido A β en su extremo C-terminal cuando la secuencia termina en el aminoácido 40.

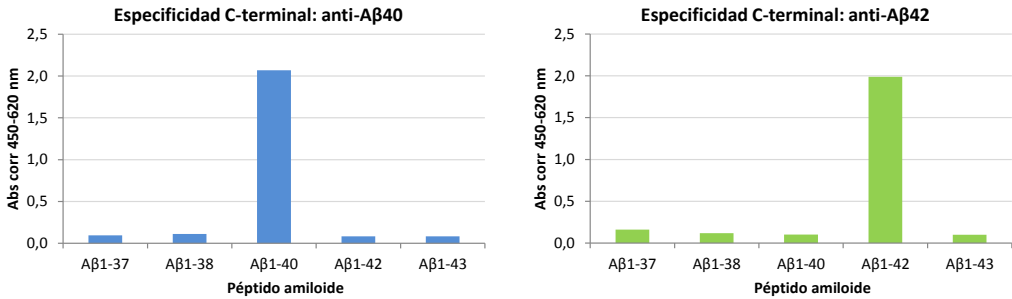


Figura 24. Especificidad de los anticuerpos anti-A β 40 y anti-A β 42. En las figuras se representa la señal de absorbancia corregida (señal específica – señal del blanco) para los diferentes péptidos A β de secuencia similar al A β 40 o al A β 42, pues son entre 1 y 5 aminoácidos más cortos o más largos en el extremo C-terminal. En el caso de ABtest40 se trabajó con 200 μ g/mL de péptido y en el caso de A β 42 con 100 μ g/mL. El anticuerpo anti-A β 40 es específico de A β 40 y el anticuerpo anti-A β 42 es específico de A β 42.

Efecto de moléculas interferentes

Para averiguar si el reconocimiento de los péptidos diana A β 40 y A β 42 en muestras de plasma y plasma diluido se puede ver afectado por la presencia de moléculas de secuencia análoga, se cuantificaron los niveles de dichos péptidos endógenos en presencia y ausencia de otros péptidos A β , de secuencia similar, añadidos a las muestras. Los resultados obtenidos comparando la concentración del péptido A β diana en presencia y ausencia de las moléculas interferentes se recogen en las **Tablas 6A, 6B y 6C**.

Todos los resultados obtenidos son conformes según el criterio de recuperación establecido en 80-120 % (**Fórmula 4**). Esto indica que los kits ABtest40 y ABtest42 son capaces de reconocer específicamente los péptidos A β 40 y A β 42 en las matrices de plasma y plasma diluido incluso en presencia de otras moléculas de secuencia similar.

Tabla 6A

ABtest40. Interferencia en N-terminal					
Molécula Interferente añadida	Concentración añadida	Plasma		Plasma diluido	
		Recuperación (%)	SD	Recuperación (%)	SD
A β 4-40	200 pg/ml	104,2	8,1	108,1	6,7
A β 11-40	200 pg/ml	105,6	5,8	97,9	11,3
A β 1-40 murino	200 pg/ml	103,8	8,3	88,7	8,0
Promedio		104,5	7,4	98,3	8,6

Tabla 6B

ABtest40. Interferencia en C-terminal						
Molécula Interferente añadida	Plasma			Plasma diluido		
	Concentración añadida	Recuperación (%)	SD	Concentración añadida	Recuperación (%)	SD
A β 1-38	40 pg/ml	101,8	0,6	50 pg/ml	94,7	3,0
A β 1-42	100 pg/ml	102,5	4,8	100 pg/ml	92,5	2,3
A β 1-43	20 pg/ml	101,7	10,5	20 pg/ml	91,2	7,1
Promedio		102,0	5,3		92,8	4,1

Tabla 6C

ABtest42. Interferencia en C-terminal						
Molécula Interferente añadida	Plasma			Plasma diluido		
	Concentración añadida	Recuperación (%)	SD	Concentración añadida	Recuperación (%)	SD
A β 1-38	40 pg/ml	100,4	4,4	50 pg/ml	96,6	5,6
A β 1-40	200 pg/ml	106,8	6,4	200 pg/ml	97,1	0,8
A β 1-43	20 pg/ml	107,9	7,4	20 pg/ml	103,2	9,4
Promedio		105,0	6,1		99,0	5,2

Tabla 6. Efecto de moléculas interferentes en el reconocimiento de los péptidos A β 40 y A β 42 en muestras de plasma y plasma diluido. Tabla 6A: resultados de interferencia en el extremo N-terminal para los péptidos A β 4-40, A β 11-40 y A β 1-40 murino. Tabla 6B: resultados de interferencia para ABtest40 al trabajar con los péptidos A β 1-38, A β 1-42 y A β 1-43. Tabla 6C: resultados de interferencia para ABtest42 al trabajar con los péptidos A β 1-38, A β 1-40 y A β 1-43. Una recuperación del 100 % indicaría ausencia de interferencia. Se aceptan niveles de recuperación de péptido endógeno diana de entre 80-120 %. SD: desviación estándar de los resultados de recuperación obtenidos en las tres muestras de plasma o plasma diluido utilizadas.

Sensibilidad

Aproximación estadística: cálculo de la mínima dosis detectable (MDD)

Se realizó un cálculo estadístico de la concentración de A β 0 y A β 42 que representa la MDD a través del cálculo de la absorbancia promedio y la SD de diez réplicas del blanco en cada uno de los tres ensayos realizados y para cada uno de los tres lotes de ABtest utilizados. El conjunto de los datos obtenidos se recoge en las **Tablas S1 y S2 de la Información Suplementaria**. Los resultados promedio obtenidos para cada lote de ABtest se representan en la **Tabla 7**.

	Mínima dosis detectable			
	ABtest40		ABtest42	
	MDD (pg/ml)	SD (OD)	MDD (pg/ml)	SD (OD)
Lote 1	5,29	0,009	1,86	0,006
Lote 2	5,03	0,006	2,56	0,008
Lote 3	2,92	0,007	2,48	0,006
Media	4,41		2,30	

Tabla 7. Cálculo de la mínima dosis detectable (MDD) de ABtest40 y ABtest42. Tanto el dato de concentración como el dato de SD reflejan el promedio de los resultados obtenidos en los tres ensayos realizados para cada lote. SD: desviación estándar. OD: densidad óptica.

Aproximación experimental: cálculo del límite del blanco (LB), límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

El establecimiento de los LC de ABtest40 y ABtest42 mediante un procedimiento experimental se llevó a cabo tras la determinación previa del límite del blanco en primer lugar, y del límite de detección del ensayo en segundo lugar.

Para la determinación del LB se utilizaron cuatro muestras carentes de analito (blancos), preparadas como se ha descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Se analizaron seis réplicas de cada muestra en tres ensayos independientes y utilizando tres lotes de ABtest. Debido a la distribución normal de los datos, evaluada mediante el test de normalidad Shapiro-Wilk ($p < 0,05$), se eligió la opción paramétrica para el cálculo del LB.

El conjunto de todos los resultados obtenidos se representa en las **Tablas S3 y S4 de la Información Suplementaria**. La **Tabla 8**, recoge los datos promedio para cada uno de los tres lotes utilizados, así como el promedio de los tres lotes, quedando establecido el LB de ABtest40 en 5,07 pg/mL y de ABtest42 en 1,94 pg/mL.

Límite del blanco					
		ABtest40		ABtest42	
Lote	LB (pg/ml)	SD _B	LB (pg/ml)	SD _B	
Lote 1	1,96	2,73	2,74	1,62	
Lote 2	7,44	2,17	1,15	1,65	
Lote 3	5,83	2,64	1,93	1,14	
Media	5,07		1,94		

Tabla 8. Límite del blanco de ABtest40 y ABtest42. Se representan los datos promedio de concentración y desviación estándar obtenidos para cada lote, y el dato promedio que representa el LB del ensayo. LB: límite del blanco. SD_B: desviación estándar de las muestras del blanco en términos de concentración.

Una vez calculado el anterior LB se prepararon cuatro muestras para la determinación del LD con diferentes concentraciones de A β 40 o A β 42, próximas pero superiores al LB previamente establecido, tal y como se ha descrito en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. De la misma manera que para la determinación del LB, se analizaron seis réplicas de cada una de las cuatro muestras en cada ensayo, y se realizaron tres ensayos independientes en cada uno de los tres lotes utilizados. Los resultados de todos los valores obtenidos se han representado en la **Tablas S5 y S6 de la Información Suplementaria**, y los niveles de concentración promedio obtenidos en estas muestras se reflejan en la **Tabla 9**.

	Muestras "LD"	
	A β 40 (pg/ml)	A β 42 (pg/ml)
Muestra 1	5,38	2,37
Muestra 2	5,94	2,39
Muestra 3	5,84	2,50
Muestra 4	6,75	2,87

Tabla 9. Niveles de A β 40 y A β 42 de las muestras preparadas para el cálculo del LD. Las concentraciones representadas son un promedio de los datos obtenidos en todas las réplicas analizadas en los tres lotes de ABtest.

Tras seguir todo el procedimiento experimental necesario, y una vez aplicada la **Fórmula 8** para calcular el LD en cada lote de ABtest, se calculó el promedio de los tres lotes utilizados obteniéndose un LD de 7,50 pg/mL para ABtest40 y de 3,54 pg/mL para ABtest42 (**Tabla 10**).

	Límite de detección			
	ABtest40		ABtest42	
Lote	LD (pg/ml)	SD _L	LD (pg/ml)	SD _L
Lote 1	7,56	1,51	3,47	0,93
Lote 2	7,94	1,74	3,84	1,15
Lote 3	7,01	1,17	3,29	0,82
Media	7,50		3,54	

Tabla 10. Límite de detección de ABtest40 y ABtest42. Se representan los datos promedios de concentración y desviación estándar obtenidos para cada lote, y el dato promedio que representa el LD del ensayo. LD: límite de detección. SD_L: desviación estándar de las muestras de concentración baja.

Tras la determinación del LD se estableció el LC del ensayo como la mínima concentración, por encima del LD, que puede ser cuantificada con unos criterios mínimos de precisión (CV \leq 25 %) y exactitud (ER \leq \pm 25 %). Para ello se analizaron 44 réplicas de muestras con concentraciones crecientes desde la establecida por el LD y en dos lotes

diferentes de ABtest. El conjunto de estos resultados se recoge en la **Tabla S7 de la Información Suplementaria**.

En la **Tabla 11** se representan los resultados de precisión y exactitud promedios obtenidos para una concentración de A β 40 de 7,60 pg/mL y de A β 42 de 3,60 pg/mL. El cumplimiento de los criterios establecidos convierte a estas concentraciones en los límites inferiores de cuantificación del ensayo. Los niveles obtenidos a partir de este método experimental secuencial son ligeramente más elevados que los resultados de MDD obtenidos mediante la aproximación estadística (ver **Tabla 7**). Aunque esta última metodología es ampliamente utilizada por las casas comerciales a la hora de reportar la sensibilidad de sus kits, obviamente el cálculo del LC mediante la aproximación experimental es mucho más exigente y realista.

Límite de cuantificación						
ABtest40				ABtest42		
	Concentración evaluada	CV (%)	ER (%)	Concentración evaluada	CV (%)	ER (%)
Lote 1	7,60 pg/ml	22,1	-2,4	3,60 pg/ml	14,4	14,5
Lote 2	7,60 pg/ml	21,2	4,4	3,60 pg/ml	21,8	19,1
Media		21,6	3,4		18,1	16,8

Tabla 11. Límite de cuantificación de ABtest40 y ABtest42. Se representa el dato promedio de precisión (CV) y exactitud (ER) de las 44 réplicas evaluadas por lote para una determinada concentración.

Reproducibilidad

Reproducibilidad intra-ensayo, inter-ensayo e inter-lote

Para evaluar cómo de preciso es ABtest se prepararon cinco muestras de plasma y cinco muestras de plasma diluido con niveles de A β 40 y A β 42 repartidos a lo largo de todo el rango de cuantificación de la curva. Conviene tener en cuenta que la utilización de la matriz de plasma diluido lleva intrínseco un paso de dilución 1/3 de la muestra de plasma en el SSD. Dicha dilución se realiza de forma independiente en cada ensayo y supone una manipulación adicional con respecto a la muestra de plasma sin diluir.

Resultados

Los gráficos de barras de la **Figura 25** reflejan los resultados de variabilidad intra-ensayo, inter-ensayo e inter-lote para los cinco niveles de concentración estudiados, con muestras de plasma y plasma diluido.

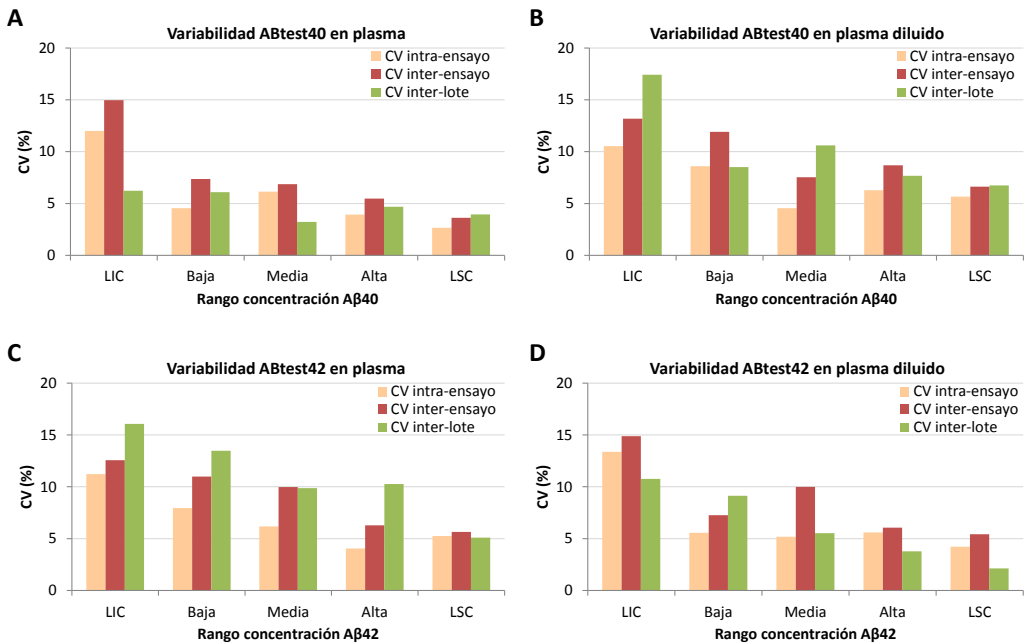


Figura 25. Reproducibilidad de ABtest40 y ABtest42 con muestras de plasma y plasma diluido. Reproducibilidad intra-ensayo (barras salmón), inter-ensayo (barras granates) e inter-lote (barras verdes). Se representa el coeficiente de variación (CV) en tanto por ciento para los cinco rangos de concentración ensayados. Los paneles A y B resumen la reproducibilidad en la matriz de plasma y plasma diluido respectivamente utilizando ABtest40. Los paneles C y D son equivalentes para ABtest42. LIC: límite inferior de cuantificación. LSC: límite superior de cuantificación. *Nota: las concentraciones de estas muestras se recogen en el apartado de exactitud.*

Tanto para ABtest40 como para ABtest42 se cumple el criterio de precisión recomendado por las guías de validación de $CV \leq 20\%$ (25% para LIC) para todas las muestras ensayadas y sea cual sea el tipo de reproducibilidad analizada (intra-ensayo, inter-ensayo o inter-lote). De hecho, solo la variabilidad inter-lote de la muestra LIC sobrepasa ligeramente el 15% de CV para el plasma diluido en ABtest40 y para el plasma sin diluir en ABtest42.

En la **Tabla 12** se recoge la variabilidad global media en las dos matrices utilizadas, siendo ésta siempre inferior o igual al 11 %. Para ABtest40 se observa que la variabilidad es mayor cuando se trabaja con muestras de plasma diluido en comparación con las muestras de plasma. Sin embargo, para ABtest42 la tendencia es la contraria, siendo especialmente notable en el caso de la variabilidad inter-lote.

		Precisión global			
		CV Intra- ensayo (%)	CV Inter- ensayo (%)	CV Inter- lote (%)	CV Promedio (%)
Plasma	ABtest40	5,9	7,7	4,8	6,1
	ABtest42	6,9	9,1	11,0	9,0
Plasma diluido	ABtest40	7,1	9,6	10,2	9,0
	ABtest42	6,8	8,7	6,3	7,3

Tabla 12. Precisión global media de ABtest40 y ABtest42. Coeficientes de variación (CV) intra-ensayo, inter-ensayo e inter-lote promedio para cada una de las dos matrices utilizadas en ABtest: plasma y plasma diluido. Se incluye también un dato de CV promedio para cada kit y matriz.

Reproducibilidad test-retest

Reproducibilidad test-retest intra-estudio

Un total de 25 muestras de plasma (determinación del péptido directamente accesible en plasma) y plasma diluido (péptido total en plasma) se cuantificaron en dos ocasiones dentro de un mismo estudio para valorar la reproducibilidad intra-estudio de ABtest. Para cada uno de los dos análisis se utilizó una alícuota diferente de la misma muestra.

En la **Figura 26** se representa la magnitud de las diferencias obtenidas entre ambos análisis para cada una de las 25 muestras analizadas. En estas gráficas puede apreciarse cómo el promedio de las diferencias obtenidas se sitúa muy cerca del cero, indicando que no existe un error sistemático entre los análisis. También se aprecia que existe homogeneidad de resultados independientemente del nivel de concentración de la muestra. Las gráficas también incluyen unos "límites de conformidad o acuerdo", establecidos con un intervalo de confianza del 95 %, que nos ayudan a valorar cuántas muestras han presentado una variabilidad alta entre ambos análisis. En el caso de la

Resultados

evaluación de la reproducibilidad test-retest intra-estudio, solamente una de las 25 muestras analizadas (4 %) ha presentado diferencias entre ambos análisis que se encuentran fuera de los "límites de acuerdo" establecidos, con la excepción del biomarcador TP40, donde han sido dos muestras (un 8 %) las que han presentado resultados discrepantes.

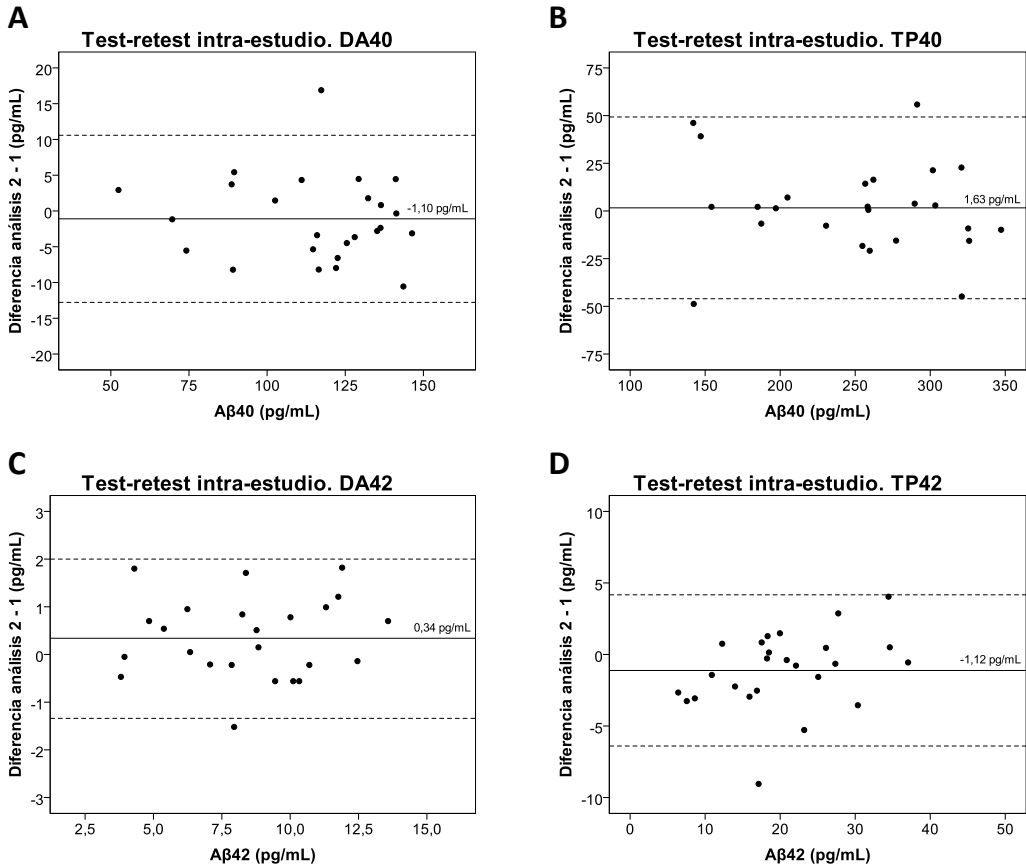


Figura 26: Reproducibilidad test-retest intra-estudio. Estos gráficos "Bland-Altman" muestran las diferencias entre los niveles obtenidos en los dos análisis frente a la concentración promedio de éstos para cada una de las 25 muestras analizadas. La línea continua indica el promedio de las diferencias obtenidas entre ambos análisis. Las líneas discontinuas representan los "límites de acuerdo" superior e inferior establecidos con un intervalo de confianza del 95 % y calculados como $\bar{d} \pm 1,96s_{dif}$ (donde \bar{d} es la media de las diferencias entre ambos análisis y s_{dif} es la desviación estándar de estas diferencias). A y B: Aβ40 en plasma y plasma diluido respectivamente. C y D: Aβ42, también para plasma y plasma diluido respectivamente. DA: directamente accesible en plasma. TP: total en plasma.

Además, en la **Tabla 13** se plasman los datos de la evaluación estadística de la asociación entre ambos análisis mediante el cálculo del CCI. También se incluye el dato promedio del CV test-retest intra-estudio para cada péptido y matriz.

	Reproducibilidad "Test-Retest" intra-estudio			
	CCI	IC 95 %	p	CV (%)
Aβ40 plasma	0,986	0,968 - 0,994	<0,001	3,08
Aβ40 plasma diluido	0,964	0,917 - 0,984	<0,001	5,68
Aβ42 plasma	0,977	0,948 - 0,990	<0,001	6,67
Aβ42 plasma diluido	0,974	0,942 - 0,989	<0,001	9,58

Tabla 13: Reproducibilidad test-retest intra-estudio. Asociación entre las dos medidas de las 25 muestras analizadas en un mismo estudio. CCI: coeficiente de correlación intraclase. IC: intervalo de confianza al 95 %. p: nivel de significación (significativo: $p < 0,05$). CV: coeficiente de variación.

Los resultados muestran una correlación muy alta entre las dos medidas realizadas de una misma muestra. El CCI es muy cercano a 1, lo que indica una correlación positiva casi perfecta, y el valor de p es significativo en todos los casos. Por último, el CV promedio es bajo (<10 %) indicando una elevada reproducibilidad de las medidas.

Reproducibilidad test-retest inter-estudio

Se cuantificaron un total de 98 muestras de forma repetida en dos estudios independientes separados por un periodo de tiempo de 18 meses y utilizando diferentes lotes de ABtest.

En la **Figura 27** se representa la magnitud de las diferencias obtenidas entre ambos análisis para cada una de las 98 muestras analizadas. De nuevo se incluyen los "límites de acuerdo", establecidos con un intervalo de confianza del 95 %. En este caso, en el que se ha evaluado la reproducibilidad test-retest inter-estudio, el porcentaje de muestras que se encuentran fuera de dichos límites ha sido del 6,4 % para el biomarcador DA40, 5,2 % para TP40, 4,9 % para DA42 y finalmente 3,6 % para TP42.

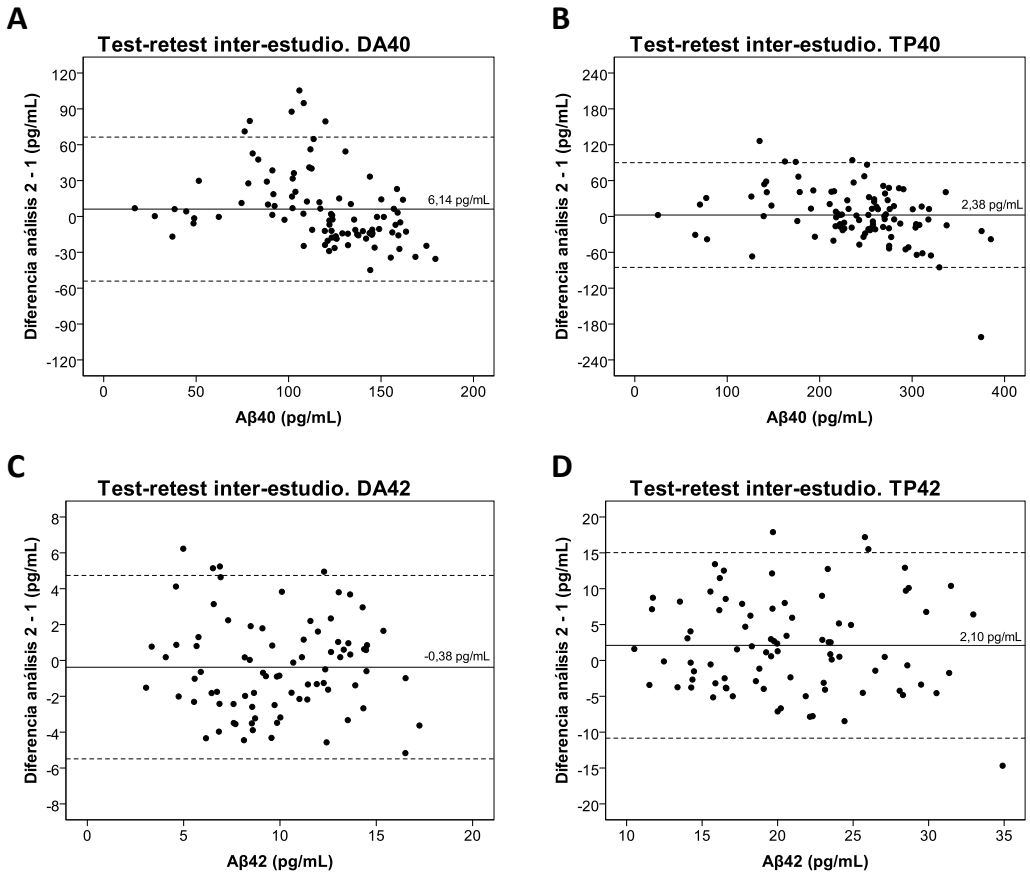


Figura 27: Reproducibilidad test-retest inter-estudio. Estos gráficos "Bland-Altman" muestran las diferencias entre los niveles obtenidos en los dos análisis frente a la concentración promedio de éstos para cada una de las 98 muestras analizadas. La línea continua indica el promedio de las diferencias obtenidas entre ambos análisis. Las líneas discontinuas representan los "límites de acuerdo" superior e inferior establecidos con un intervalo de confianza del 95 % y calculados como $\bar{d} \pm 1,96s_{dif}$ (donde \bar{d} es la media de las diferencias entre ambos análisis y s_{dif} es la desviación estándar de estas diferencias). A y B: A β 40 en plasma y plasma diluido respectivamente. C y D: A β 42, también para plasma y plasma diluido respectivamente. DA: directamente accesible en plasma. TP: total en plasma.

Además, se llevó a cabo un análisis estadístico para valorar el grado de asociación entre las dos medidas. La **Tabla 14** resume los resultados del CCI y el dato promedio de los CV test-retest inter-estudio obtenidos para todas las muestras.

	Reproducibilidad "Test-Retest" inter-estudio			
	CCI	IC 95 %	p	CV (%)
Aβ40 plasma	0,804	0,705 - 0,870	<0,001	14,92
Aβ40 plasma diluido	0,893	0,839 - 0,928	<0,001	11,05
Aβ42 plasma	0,850	0,768 - 0,904	<0,001	18,21
Aβ42 plasma diluido	0,653	0,463 - 0,775	<0,001	19,39

Tabla 14: Reproducibilidad test-retest inter-estudio. Asociación entre las dos medidas de las 98 muestras analizadas en estudios independientes. CCI: coeficiente de correlación intraclase. IC: intervalo de confianza al 95 %. p: nivel de significación (significativo: $p < 0,05$). CV: coeficiente de variación.

Los resultados muestran altos niveles de concordancia (CCI $> 0,8$) entre ambos estudios para ambas determinaciones de ABtest40 y para la determinación de A β 42 DA en plasma. Sin embargo, el dato del CCI al cuantificar A β 42 en la matriz de plasma diluido (TP42) es de 0,653, lo que indica una asociación más pobre entre ambas medidas a pesar de que el valor de p es estadísticamente significativo para los cuatro marcadores plasmáticos analizados. No obstante, si nos fijamos en el CV inter-estudio, en todos los casos dicho coeficiente es < 20 %, lo que refleja la elevada reproducibilidad de ABtest.

Exactitud

La evaluación de la exactitud de los kits ABtest40 y ABtest42 se realizó calculando el porcentaje de error relativo de la concentración obtenida experimentalmente en una serie de muestras con concentraciones repartidas a lo largo del rango dinámico del ensayo, con respecto a la concentración teórica de esas mismas muestras previamente calculada en dos lotes independientes de ABtest.

Para valorar la exactitud se calculó el ER (%) para cada uno de los 36 valores obtenidos de cada muestra (**Tablas S8 a S11 de la Información Suplementaria**) y, posteriormente, se realizó un promedio de todos ellos en términos de valor absoluto, independientemente de su signo positivo o negativo.

La **Tabla 15** recoge el resumen de todos estos resultados. En ella se representan tanto las concentraciones teóricas de las muestras de plasma y plasma diluido, como el ER promedio para cada nivel de concentración.

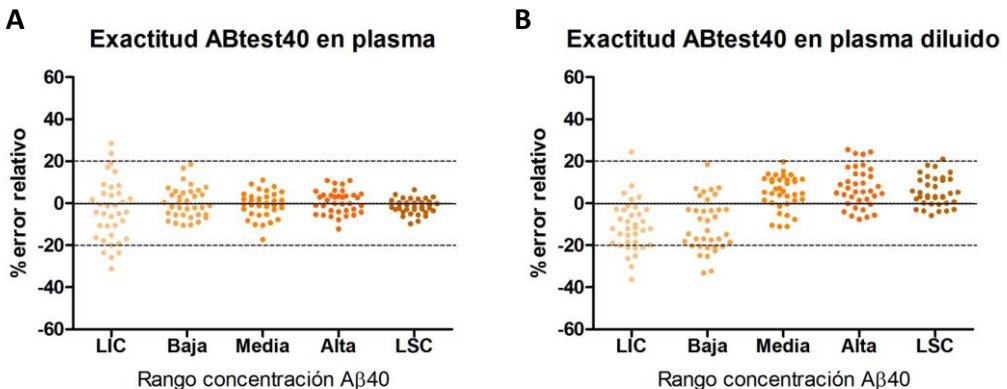
Resultados

Nivel de concentración	Plasma				Plasma diluido			
	ABtest40		ABtest42		ABtest40		ABtest42	
	Concentración teórica (pg/ml)	ER (%)	Concentración teórica (pg/ml)	ER (%)	Concentración teórica (pg/ml)	ER (%)	Concentración teórica (pg/ml)	ER (%)
LIC	16,09	12,17	6,56	13,79	11,97	13,38	9,84	13,10
Baja	30,01	6,50	18,84	10,42	21,25	11,20	15,84	11,20
Media	53,44	8,80	26,89	7,49	46,38	8,07	33,56	7,30
Alta	113,55	4,76	55,96	4,49	95,84	9,37	49,02	6,78
LSC	191,91	3,71	89,16	7,97	137,33	6,73	87,22	5,90
% ER global	7,19		8,83		9,75		8,86	

Tabla 15. Exactitud ABtest40 y ABtest42. Se representan los niveles teóricos promedio de todas las muestras, así como el porcentaje de error relativo promedio, en términos de valor absoluto, para cada nivel de concentración y tipo de matriz plasmática. LIC: límite inferior de cuantificación. LSC: límite superior de cuantificación.

Las guías de validación de los métodos bioanalíticos consideran como aceptables errores relativos inferiores a $\pm 20\%$ en todos los rangos de concentración ensayados, excepto en el LIC donde permiten un $\pm 25\%$. Los resultados obtenidos reflejan el cumplimiento de estos criterios para todas las muestras analizadas, independientemente del tipo de matriz o kit utilizado.

Al analizar los ER de los datos individualmente (**Figura 28**), se observan algunos casos en los que no se cumplen los criterios de exactitud recomendados, principalmente para los rangos de concentración más bajos donde la exigencia del ensayo es mayor. Sin embargo, la mayoría de las determinaciones se sitúan dentro de los límites de aceptación y los resultados promedio nos indican que la cuantificación de las muestras a lo largo de todo el rango de concentración de la curva no está sesgada.



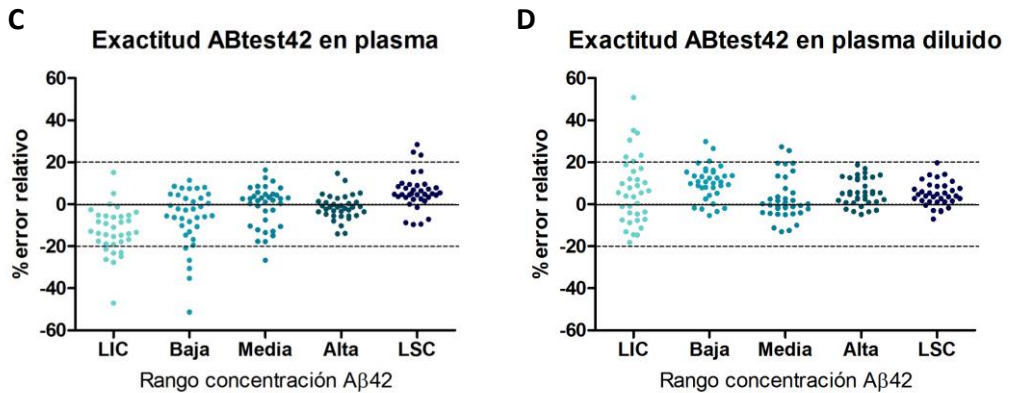
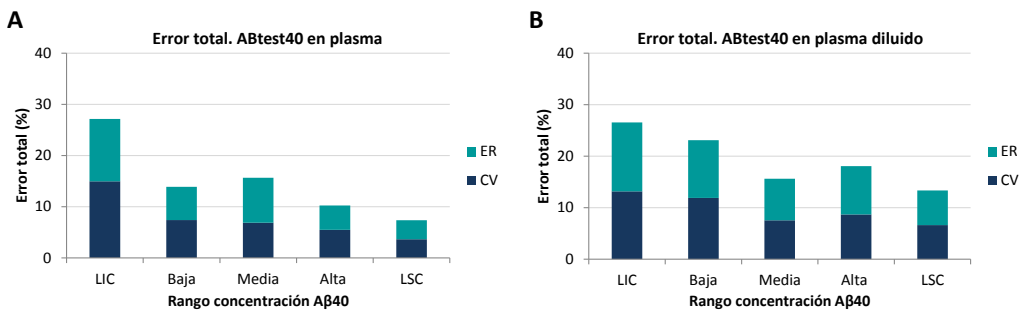


Figura 28. Exactitud ABtest40 y ABtest42 para muestras de plasma y plasma diluido. Cada punto representa el ER (%) concreto de cada una de las medidas realizadas. Las líneas discontinuas señalan el límite de conformidad establecido por las guías de validación ($\pm 20\%$), aunque en el caso de la muestra "LIC" se acepta el $\pm 25\%$. LIC: límite inferior de cuantificación. LSC: límite superior de cuantificación.

Por último, la **Figura 29** recoge los resultados del análisis del error total que incluye la suma del error aleatorio o coeficiente de variación (CV) y del error sistemático o error relativo (ER). Para los datos del error aleatorio se ha representado el dato de la variabilidad inter-ensayo, calculada con los mismos 36 datos que los utilizados para estimar la exactitud.

Los resultados de ABtest40 y ABtest42 se encuentran dentro de los límites de conformidad establecidos por las guías de validación, no alcanzando el 30 % de ET para ninguna de las muestras analizadas, tanto en plasma como en plasma diluido.



Resultados

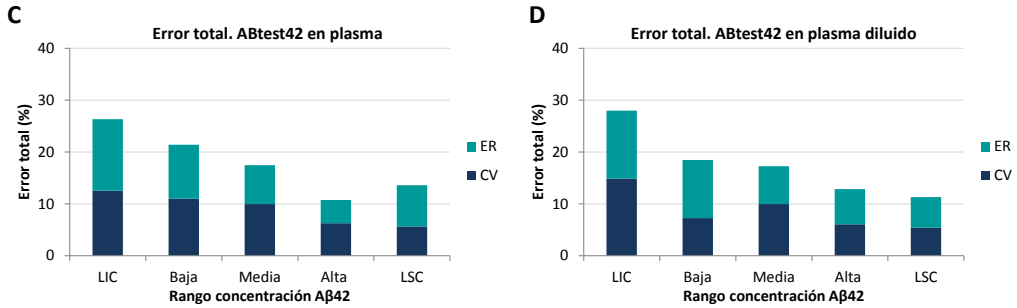


Figura 29. Error total de ABtest40 y ABtest42. Los gráficos de barras apiladas representan la variabilidad total para cada nivel de concentración. En azul oscuro se representa el error aleatorio en términos del coeficiente de variación (%) inter-ensayo. En turquesa se representa el error sistemático en términos del error relativo (%), calculado en base a la concentración teórica previamente calculada. LIC: límite inferior de cuantificación. LSC: límite superior de cuantificación.

Recuperación

La recuperación de A β exógeno añadido a muestras de plasma y plasma diluido se calculó en función de la concentración teórica añadida a la muestra. Para ello se restaron los niveles de péptido endógeno a los niveles totales obtenidos en las muestras con péptido exógeno añadido. Se trabajó con tres muestras de plasma y tres de plasma diluido, a las que se añadieron diferentes concentraciones de péptido exógeno para evaluar si la recuperación es homogénea independientemente de la concentración añadida.

Los resultados del análisis, recogidos en la **Tabla 16**, muestran porcentajes de recuperación promedio de en torno al 60 % en plasma y al 95 % en plasma diluido. Estos resultados indican la presencia de un efecto matriz en la muestra de plasma que prácticamente desaparece en la muestra de plasma diluido 1/3 en el SSD, ya que en esta última matriz el porcentaje de recuperación del péptido añadido es cercano al 100 %. Los niveles de recuperación fueron constantes tanto entre las diferentes muestras analizadas (CV global del 12,4 %) como para los distintos niveles de concentración añadidos (CV global del 5,8 %).

ABtest40			ABtest42		
Concentración de A β añadida	Plasma (% recuperación)	Plasma diluido (% recuperación)	Concentración de A β añadida	Plasma (% recuperación)	Plasma diluido (% recuperación)
150 pg/ml	59,56	87,07	75 pg/ml	66,92	97,38
75 pg/ml	63,52	93,26	50 pg/ml	57,08	93,91
20 pg/ml	58,16	101,74	20 pg/ml	59,04	93,59
Promedio	60,42	94,02	Promedio	61,01	94,96

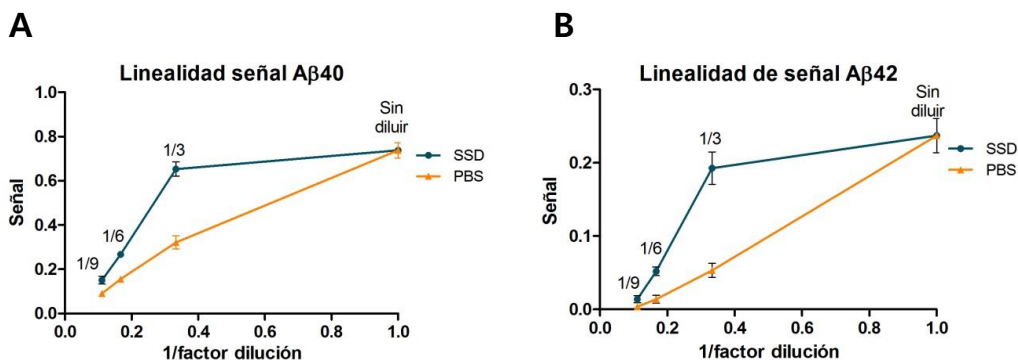
Tabla 16. Recuperación de A β exógeno añadido a muestras de plasma y plasma diluido. Porcentajes de recuperación promedio de las tres muestras de plasma y plasma diluido en cada nivel de concentración añadido y para los tres ensayos realizados.

Efecto matriz

Linealidad de la dilución con muestras de plasma

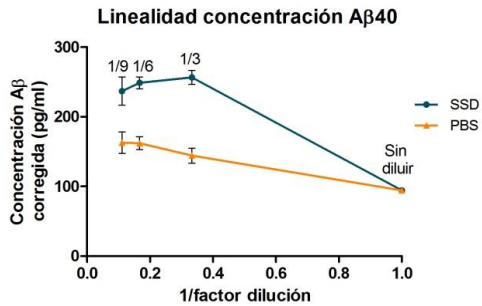
Como información adicional a la obtenida con los experimentos de recuperación de péptido exógeno, se estudió la posible presencia de un efecto matriz en las muestras de plasma. Para ello se realizaron diluciones seriadas de cinco muestras de plasma tanto en el SSD, componente de los kits ABtest, como en tampón PBS.

Los resultados de cada muestra se resumen en las **Tablas S12 y S13 de la Información Suplementaria**. La representación gráfica del promedio de la evolución de la señal y de la concentración una vez aplicado el correspondiente factor de dilución, permite comparar visualmente el efecto de los dos tampones utilizados (**Figura 30**).



Resultados

C



D

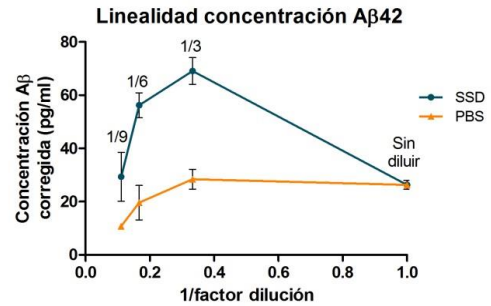


Figura 30. Linealidad de la dilución de muestras de plasma en ABtest40 y ABtest42. En los gráficos A y B se representa la asociación de la señal con respecto a la dilución realizada (1/3, 1/6 y 1/9) para A β 40 y A β 42, respectivamente. En los gráficos C y D se representa la asociación entre la concentración corregida tras aplicar el correspondiente factor de dilución y la propia dilución realizada para A β 40 y A β 42, respectivamente. Cada punto representa la respuesta media de señal o concentración de las cinco muestras analizadas. Las líneas azules y naranjas reflejan la evolución de resultados al diluir con SSD (*sample/standard diluent*) y PBS, respectivamente. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Los resultados muestran un comportamiento muy diferente entre la dilución con el SSD y el PBS. Si nos fijamos en la evolución de la señal (**Figura 30, paneles A y B**), al diluir las muestras de plasma con PBS observamos una tendencia lineal ya que la señal disminuye de forma más o menos proporcional a la dilución realizada. Sin embargo, al diluir con el SSD observamos ausencia de linealidad debido a que la señal no disminuye a proporción de la dilución realizada, sino que es mayor. El comportamiento más llamativo se observa para la dilución 1/3 donde la diferencia de señal entre ambos tampones es mucho más evidente.

En lo que respecta a la concentración corregida (**Figura 30, paneles C y D**), es decir, una vez aplicado el factor de dilución correspondiente, también se observan diferencias entre ambos tampones. Aunque es más notable para ABtest42, con ambos kits observamos un máximo de concentración para una dilución 1/3 con el SSD. Además, la concentración obtenida en la muestra diluida 1/3 en el SSD es muy superior a la obtenida para la muestra sin diluir. Estos resultados indican que en las muestras de plasma sin diluir no se está cuantificando todo el péptido amiloide endógeno, sino que existe un efecto matriz interferente que sólo permite la detección de parte del péptido. Al realizar una dilución del plasma en el SSD se está actuando sobre dicho efecto matriz, permitiendo la liberación del péptido y, por tanto, la cuantificación de niveles más elevados. De manera

adicional, conviene destacar que en las muestras de plasma diluidas 1/3 en SSD, el porcentaje de recuperación del péptido exógeno añadido fue del 95 % (**Tabla 16**). Por tanto, se asume que estas condiciones son las óptimas para cuantificar los niveles máximos de A β en ABtest y por eso se considera que, al realizar una dilución 1/3 del plasma en el SSD, se obtienen los niveles totales de A β presentes en la muestra.

La eliminación del efecto matriz, que se observa mediante la dilución del plasma en el SSD, no tiene lugar si la dilución se realiza con PBS. Aunque la simple dilución de una matriz tan compleja como el plasma puede favorecer la detección de los analitos, y de hecho para A β 40 se observa un aumento de la concentración de péptido para diluciones crecientes en PBS, la cuantificación de A β es claramente superior cuando la dilución de la muestra se realiza en el SSD. Estos resultados sugieren que la composición del SSD permite romper las interacciones presentes entre el A β y otros componentes de la matriz plasmática. De esta manera, todo el péptido A β endógeno presente en la muestra quedaría libre y accesible para ser reconocido en el inmunoensayo.

Resumen de resultados de validación de ABtest40 y ABtest42

La siguiente **Tabla 17** recoge un resumen de los principales resultados obtenidos en el proyecto de validación de ABtest40 y ABtest42 para todos los parámetros estudiados.

		ABtest40		ABtest42	
		Media	Rango	Media	Rango
Calibración	Rango de cuantificación		3,13 a 200 pg/ml		1,56 a 100 pg/ml
	Exactitud, ER (%)	4,5	-17,2 a 12,4	4,2	-19,7 a 13,0
	Precisión, CV (%)	5,2	0,5 a 11,7	6,1	0,1 a 22,6
Especificidad	Reactividad cruzada (%)		0,0 a 1,4		0,9 a 4,1
Sensibilidad	Mínima dosis detectable (pg/ml)	4,41		2,30	
	Límite de cuantificación (pg/ml)	7,60		3,60	
Precisión Plasma	Intra-ensayo, CV (%)	5,9	3,9 a 12,0	6,9	4,1 a 11,22
	Inter-ensayo, CV (%)	7,7	3,6 a 15,0	9,1	5,6 a 12,6
	Inter-lote, CV (%)	4,8	3,2 a 6,2	11,0	5,1 a 16,1
Precisión Plasma diluido	Intra-ensayo, CV (%)	7,4	4,5 a 10,5	6,8	4,2 a 13,4
	Inter-ensayo, CV (%)	10	6,6 a 13,8	8,7	5,4 a 14,9
	Inter-lote, CV (%)	10,2	6,6 a 17,4	6,3	2,1 a 10,8
Exactitud Plasma	ER (%)	7,2	-17,8 a 32,1	8,8	-51,4 a 28,5
Exactitud Plasma diluido	ER (%)	10,2	-36,1 a 25,5	8,9	-18,2 a 50,9
Recuperación plasma	% recuperación	60,4	39,9 a 82,7	61,0	31,8 a 85,4
Recuperación plasma diluido	% recuperación	94,0	82,1 a 122,0	95,0	65,0 a 125,2

Tabla 17. Resumen de los resultados de validación para la cuantificación de A β 40 y A β 42 en plasma y plasma diluido utilizando los kits ABtest40 y ABtest42. CV: coeficiente de variación. ER: error relativo.

Efecto de los factores pre-analíticos en la cuantificación de A β en plasma

Existen factores pre-analíticos que pueden estar introduciendo diferencias en las determinaciones de A β entre diferentes laboratorios, o incluso entre diferentes estudios dentro de un mismo laboratorio. Además, algunos de estos aspectos afectan a la logística de recogida y manejo de las muestras por lo que condicionan seriamente el diseño de los ensayos clínicos y pueden tener una importante trascendencia en el coste económico de los mismos. Para intentar aportar información en este campo, se estudió cómo pueden afectar a la cuantificación final de A β 40 y A β 42 en plasma diferentes puntos críticos del procesamiento pre-analítico de la muestra como son i) el tratamiento de la muestra de sangre con inhibidores de proteasas exógenos; ii) el tiempo y la temperatura de conservación de las muestras de sangre hasta su procesamiento; iii) las condiciones de centrifugación utilizadas para separar la matriz plasmática de la celular y en particular el impacto de la presencia de plaquetas en el plasma; y iv) el tipo de anticoagulante utilizado.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos con referencia a cada uno de estos posibles puntos de intervención.

Tratamiento de la sangre con inhibidores de proteasas (IP) exógenos

Para estudiar el efecto del tratamiento de la sangre con IP exógenos sobre la cuantificación de A β 40 y A β 42 en muestras de plasma se trabajó con muestras de 7 individuos sanos. La sangre de un mismo individuo se recogió en tubos con y sin IP. Se cuantificaron los niveles de A β 40 y A β 42 libre y totales en plasma, es decir, se trabajó tanto con muestras de plasma sin diluir como de plasma diluido.

El efecto de la presencia o ausencia de los IP exógenos se estudió tras diferentes tiempos y temperaturas de conservación de la muestra de sangre antes de su procesado (para la separación de plasma y células).

Conservación de la sangre durante 8 horas a 4 °C

Los resultados de la **Figura 31** muestran que los niveles de A β 40, tanto en muestras de plasma como en muestras de plasma diluido, fueron en general ligeramente más bajos cuando las muestras de sangre se recogieron en tubos con IP, en comparación con las

muestras de sangre recogidas en tubos sin IP, cuando el procesamiento de la sangre se realizó tras 8 horas de conservación en refrigeración (4 °C).

En relación con los resultados de A β 42, en primer lugar llaman la atención los niveles excesivamente elevados de las muestras 2 y 6 en plasma y, sobre todo, en plasma diluido, cuando se comparan con el resto de muestras analizadas en este ensayo y en relación con los niveles habituales de A β 42 en plasma humano. El efecto de los IP es también pequeño en general para este péptido. Además, no observamos un patrón uniforme ya que en algunas muestras los niveles son más elevados en presencia de los IP y en otras en su ausencia. Únicamente en el caso de la muestra 6, los niveles fueron claramente superiores en presencia de los IP.

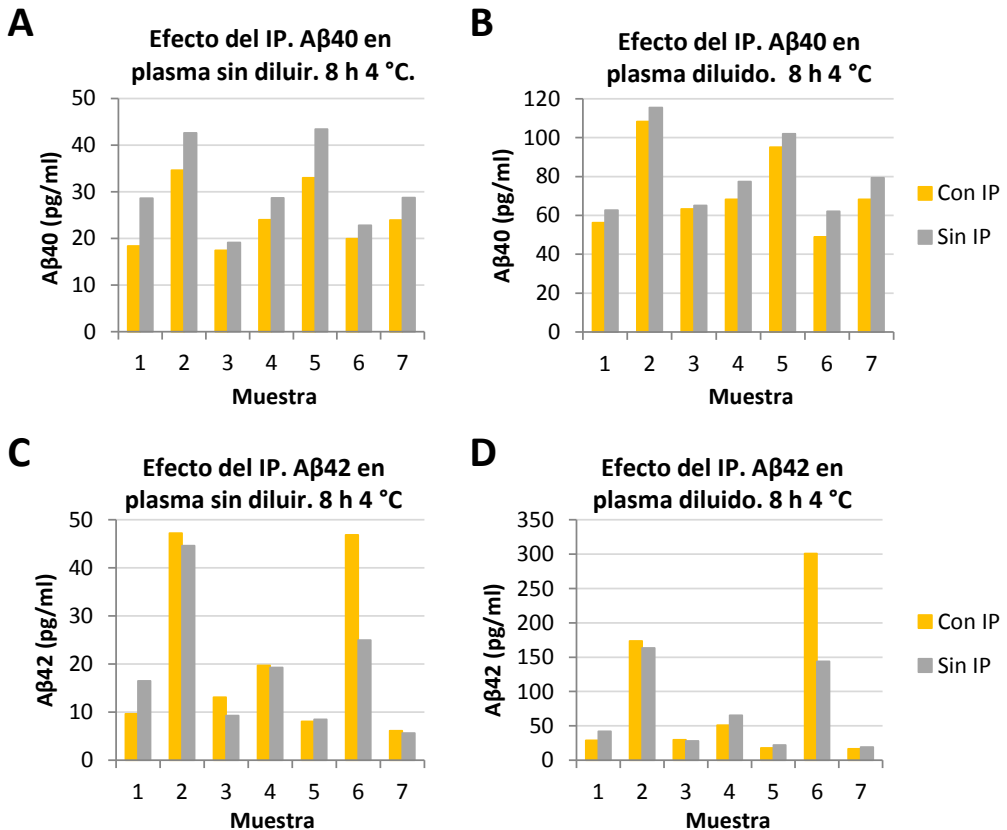


Figura 31. Niveles de A β 40 (A y B) y A β 42 (C y D) en plasma y plasma diluido procedentes de muestras de sangre tratadas o no con inhibidores de proteasas procesadas tras 8 horas a 4 °C. IP: (*cocktail* de) inhibidores de proteasas.

Resultados

Conservación de la sangre durante 8 horas a temperatura ambiente (RT)

Los resultados obtenidos con muestras procesadas tras 8 horas de conservación a temperatura ambiente (**Figura 32**) reproducen los resultados observados a 4 °C: los niveles de A β 40 fueron en general inferiores en las muestras de plasma procedentes de los tubos con IP pero no se observó una tendencia clara con respecto a los niveles de A β 42 entre ambos tipos de muestras. Merece la pena señalar que se vuelve a reproducir el patrón observado en el apartado anterior para la muestra 6, pero en esta ocasión únicamente en la fracción de plasma diluido.

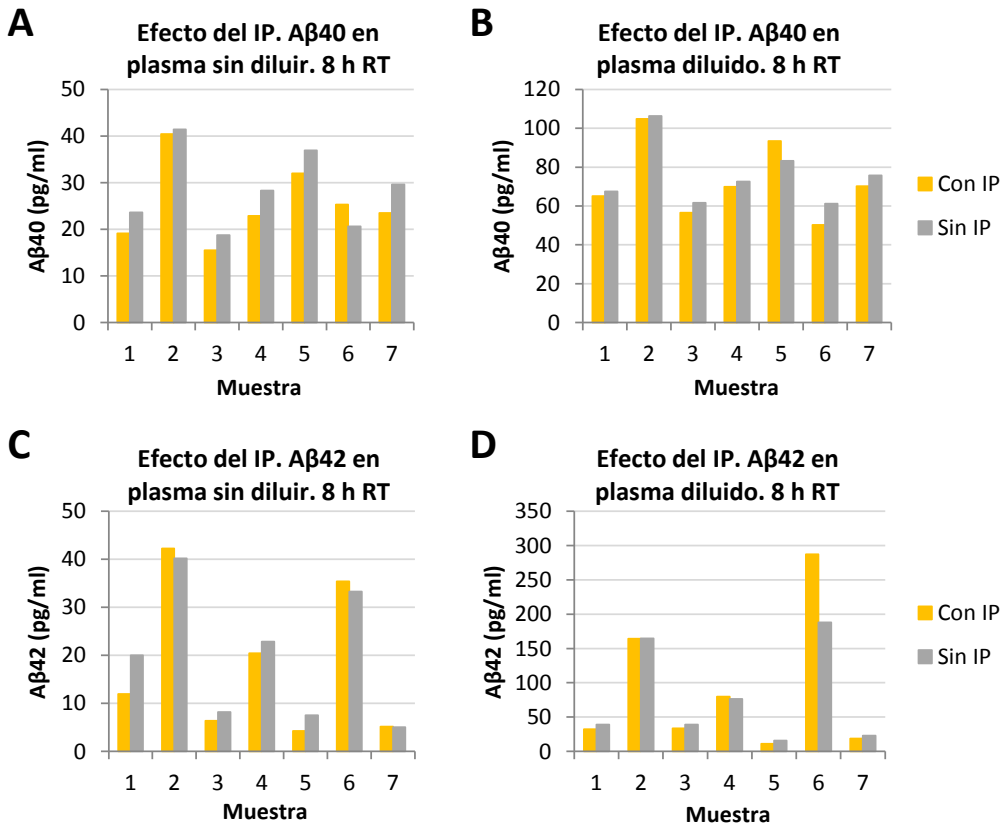


Figura 32. Niveles de A β 40 (Ay B) y A β 42 (C y D) en plasma y plasma diluido de muestras de sangre tratadas o no con inhibidores de proteasas procesadas tras 8 horas a RT (*room temperature*). IP: (*cocktail* de) inhibidores de proteasas.

Conservación de la sangre durante 30 horas a 4 °C

Coincidiendo con lo observado para las dos condiciones anteriores, los resultados de cuantificación de A β 40 en presencia y ausencia de los inhibidores de proteasas tras 30 horas de conservación de la sangre a 4 °C (**Figura 33**) muestran, sorprendentemente, niveles ligeramente más elevados en ausencia del *cocktail* de IP.

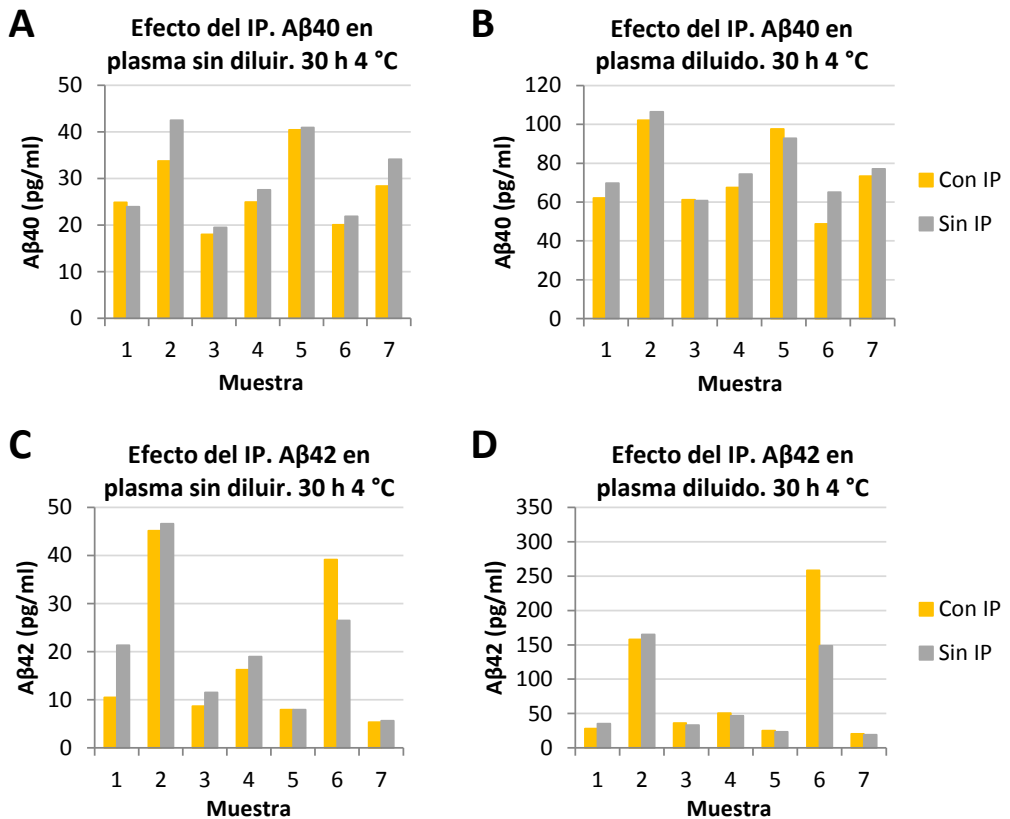


Figura 33. Niveles de A β 40 (A y B) y A β 42 (C y D) en plasma y plasma diluido de muestras de sangre tratadas o no con inhibidores de proteasas procesadas tras 30 horas a 4 °C. IP: (*cocktail* de) inhibidores de proteasas.

En lo que respecta a A β 42, los resultados tras las 30 horas en refrigeración también son similares a lo visto en las condiciones anteriores: no se observa una tendencia homogénea, sino que el comportamiento varía entre muestras y normalmente las

Resultados

diferencias son pequeñas. La excepción la sigue marcando la muestra 6, con niveles considerablemente más elevados en presencia del *cocktail* de IP. Sin embargo, la muestra 1 en la matriz de plasma sin diluir presentó un comportamiento inverso al observado en la muestra 6, ya que los niveles de A β 42 fueron considerablemente más altos en la muestra sin IP en las tres condiciones de tiempo y temperatura analizadas.

En resumen, estos resultados indican que no es necesario añadir un *cocktail* de IP exógenos a las muestras de sangre, ya que su ausencia no conduce a una reducción relevante de los niveles de A β cuantificados en el plasma y plasma diluido. De hecho, en general los niveles de A β 40 fueron incluso más bajos en presencia de los IP. Estos resultados indican, por tanto, que para estos análisis se puede prescindir del tratamiento de las muestras de sangre con IP exógenos, simplificando la logística y abaratando el coste de la cuantificación de las muestras.

Temperatura y tiempo de retardo del procesamiento (TRP) de la muestra

Una vez demostrado que no es necesario el tratamiento de las muestras de sangre con IP exógenos, en lo que respecta a la cuantificación de los niveles de A β 40 y A β 42 en plasma y plasma diluido, se estudió si existen diferencias en los niveles de estos péptidos en función de la temperatura de conservación (ya sea a temperatura ambiente o en refrigeración a 4 °C) y el tiempo de retardo del procesado (TRP) (ya sea de 8 o 30 horas) de las muestras de sangre. Todos los resultados mostrados a continuación pertenecen a muestras no tratadas con IP exógenos.

Conservación de la sangre en refrigeración (4 °C):

En la **Figura 34** se representa la cuantificación de A β 40 y A β 42 en el plasma y plasma diluido de las siete muestras utilizadas para este análisis en función del TRP de la sangre. Se comparan los niveles de estos péptidos en muestras procesadas tras un almacenamiento de las mismas durante 0, 8 o 30 horas en refrigeración (4 °C). Además, los datos obtenidos en este estudio se reflejan en las **Tablas S14 y S15 de la Información Suplementaria**.

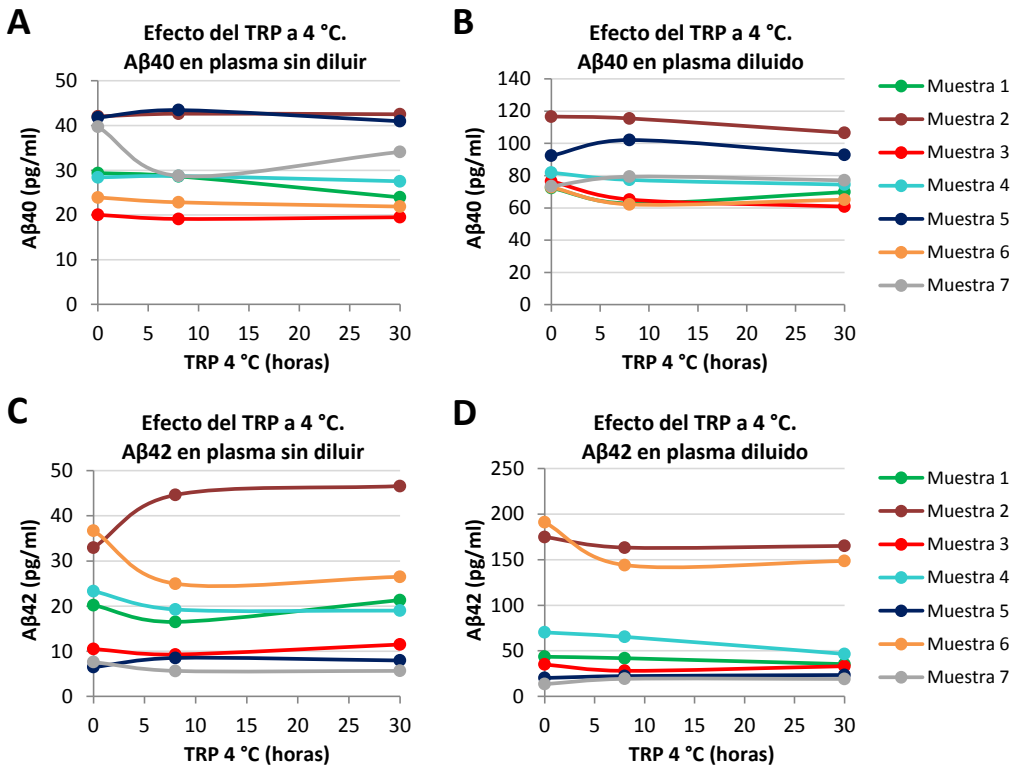


Figura 34. Efecto del tiempo de retardo del procesamiento (TRP) de la muestra en condiciones de refrigeración (4 °C). Cada línea representa un individuo. A y B: niveles de Aβ40 en plasma y plasma diluido. C y D: niveles de Aβ42 en plasma y plasma diluido.

En general, las figuras anteriores reflejan medidas más o menos uniformes a lo largo de los tres puntos de tiempo analizados, con mínimas variaciones que, al menos en el caso de Aβ40, podrían explicarse por la propia variabilidad del ensayo: los CV entre las medidas de los diferentes tiempos (ver **Tablas S14 y S15 de la Información Suplementaria**) son próximos al dato de variabilidad intra-ensayo de ABtest (**Tabla 12**) y, por tanto, podrían desestimarse o despreciarse. No obstante, existen algunos casos particulares en los que los niveles de Aβ cuantificados presentan una mayor variabilidad entre los diferentes TRP, como por ejemplo lo observado para las muestras 2 y 6 al cuantificar Aβ42 en la matriz de plasma sin diluir. Curiosamente, la trayectoria descrita por estas dos muestras es opuesta y, probablemente, los resultados obtenidos se deban a algún aspecto intrínseco a estas matrices que de por sí ya parecen peculiares debido a los niveles tan elevados que presentan del péptido Aβ42.

Resultados

En la **Tabla 18** se resumen los resultados que representan los niveles promedio de cada grupo, así como un cálculo de las diferencias relativas entre grupos.

		Efecto del TRP en refrigeración				
		0 h (pg/ml)	8 h a 4 °C (pg/ml)	% diferencia ± SD 8 h - 0 h	30 h a 4 °C (pg/ml)	% diferencia ± SD 30 h - 0 h
Plasma	Aβ40	32,18	30,59	-4,67 ± 10,61	30,06	-6,81 ± 7,20
	Aβ42	19,69	18,41	-5,49 ± 27,33	19,79	0,97 ± 26,17
Plasma diluido	Aβ40	83,72	80,63	-4,38 ± 10,68	74,43	-6,70 ± 8,30
	Aβ42	78,32	69,18	-1,16 ± 22,59	67,35	-3,87 ± 25,68

Tabla 18. Efecto del tiempo de retardo del procesamiento (TRP) de la muestra en condiciones de refrigeración (4 °C). El dato de concentración indicado para cada protocolo de procesamiento se corresponde con el promedio de cada grupo. % diferencia X h - 0 h: refleja el promedio de las diferencias relativas en tanto por ciento entre las muestras procesadas tras X h a 4 °C y la muestra control procesada inmediatamente tras la extracción; % diferencia X h - 0 h = $100 \times \frac{((\text{pg/mL X h}) - (\text{pg/mL 0 h}))}{(\text{pg/mL 0 h})}$. Se incluye también el dato de la desviación estándar (SD) de las diferencias obtenidas entre los dos puntos de TRP para los distintos individuos.

En términos generales los resultados mostraron niveles similares de Aβ0 y Aβ42 en plasma entre la muestra control procesada inmediatamente y las muestras procesadas tras 8 o 30 horas en refrigeración (4 °C). Además, el dato promedio de las diferencias relativas porcentuales de todas las muestras es cercano a 0, tanto para Aβ40 como para Aβ42, y tanto para plasma como para plasma diluido. Esto indica que las diferencias positivas y negativas se anulan, evidenciando un comportamiento heterogéneo entre muestras y, por tanto, una ausencia importante de efecto del TRP. Estos resultados sugieren que el procesado de la muestra puede posponerse hasta 30 horas a 4 °C sin que ello suponga introducir sesgos relevantes en la cuantificación de Aβ40 y Aβ42. Esto relativiza la urgencia con la que deben procesarse y transportarse las muestras lo que permite adaptar los diseños experimentales a diferentes condiciones y costes.

Conservación de la sangre a temperatura ambiente:

En lo que respecta a la conservación de las muestras de sangre durante 8 horas a temperatura ambiente antes de su procesado, la **Figura 35** muestra los resultados para las matrices de plasma y plasma diluido, tanto para Aβ40 como para Aβ42. Además, los

datos de cada muestra se recogen en las **Tablas S16 y S17 de la Información Suplementaria**.

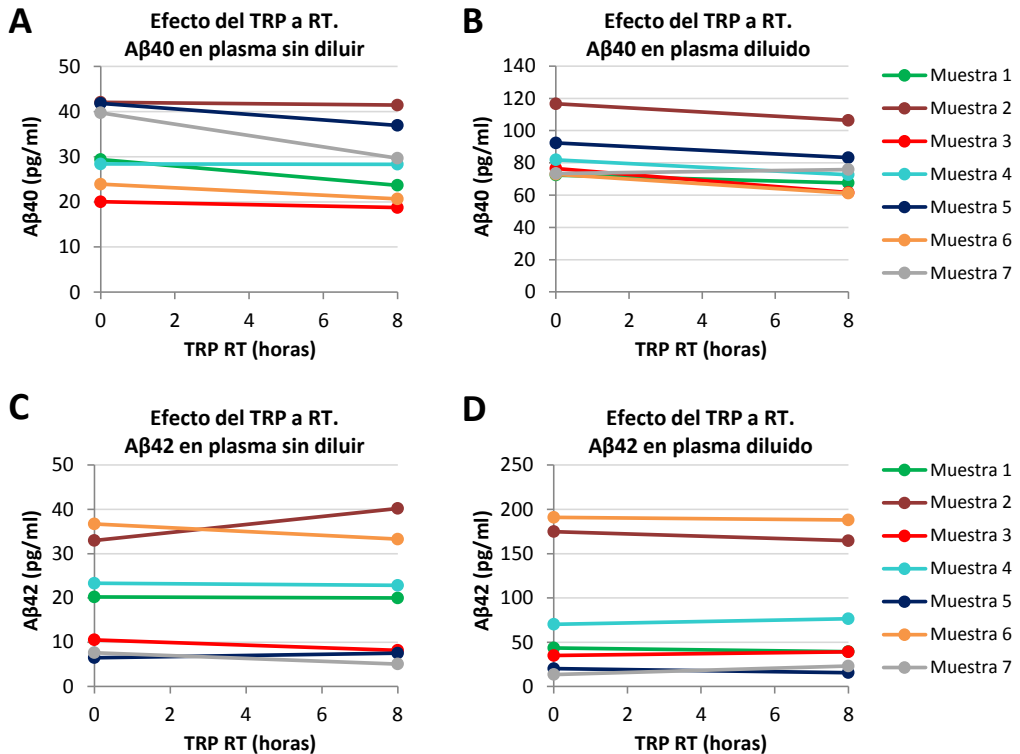


Figura 35. Efecto del tiempo de retardo del procesamiento (TRP) de la muestra de sangre en condiciones de conservación a temperatura ambiente. Cada línea representa los niveles de Aβ en plasma de un individuo tras 0 y 8 horas a temperatura ambiente antes de su procesamiento. Los paneles A y B muestran los niveles de Aβ40 en plasma y plasma diluido, respectivamente, y los paneles C y D muestran los niveles de Aβ42 también para plasma y plasma diluido, respectivamente. RT: room temperature.

Los datos obtenidos reflejan que los niveles de Aβ40 fueron más bajos en prácticamente todas las muestras que se procesaron tras 8 horas de incubación a temperatura ambiente en comparación con las muestras control. La magnitud de estas diferencias se resume en la **Tabla 19** y refleja una disminución promedio de la concentración de Aβ40 equivalente al 11 y 10 % en plasma y plasma diluido respectivamente. En términos de variabilidad

Resultados

(ver **Tablas S16 y S17 de la Información Suplementaria**), las diferencias observadas entre ambos tipos de muestra (CV = 8-9 %) se encuentran próximas a la propia variabilidad del ensayo (**Tabla 12**). No obstante, en este caso todas las muestras presentan la misma tendencia, lo que sugiere que posiblemente existe un efecto de la conservación de las muestras a RT, aunque éste sea pequeño. Para A β 42 no se observó una misma tendencia en todas las muestras y las diferencias entre los niveles de la muestra control y las muestras procesadas tras 8 horas a temperatura ambiente no fueron importantes. El conjunto de todos estos resultados indica que es más aconsejable mantener las muestras de sangre en refrigeración (4 °C) hasta el momento de su procesado.

		Efecto del TRP a RT		
		0 h (pg/ml)	8 h RT (pg/ml)	% diferencia \pm SD 8 h - 0 h
Plasma	A β 40	32,18	28,48	-11,19 \pm 9,22
	A β 42	19,69	19,58	-4,35 \pm 19,68
Plasma diluido	A β 40	83,72	75,48	-9,85 \pm 7,28
	A β 42	78,32	78,05	7,47 \pm 30,61

Tabla 19. Efecto del tiempo de retardo del procesamiento (TRP) de la muestra con conservación a temperatura ambiente (RT). El dato de concentración pertenece al promedio del grupo. % diferencia 8 h – 0 h a RT: promedio de las diferencias relativas entre las muestras procesadas tras 8 h a RT y la muestra control; % diferencia 8 h – 0 h RT = $100 \times [((\text{pg/mL } 8 \text{ h}) - (\text{pg/mL } 0 \text{ h})) / (\text{pg/mL } 0 \text{ h})]$. Se incluye también el dato de la desviación estándar (SD) de las diferencias obtenidas entre los dos puntos de TRP para los distintos individuos.

Parámetros de centrifugación de la sangre y presencia de plaquetas en el plasma

Determinación de la concentración de plaquetas en el plasma tras diferentes protocolos de centrifugación de la sangre

Se procesaron cinco muestras de sangre de individuos sanos con diferentes protocolos de centrifugación y se realizó un recuento de las plaquetas presentes en la fracción plasmática. Los resultados se reflejan en la **Figura 36** e indican la permanencia de un elevado porcentaje de plaquetas en el plasma tras 15 minutos de centrifugación a 400 g

(plasma enriquecido en plaquetas). Al aumentar la fuerza y el tiempo de centrifugación, la cantidad de plaquetas presentes en el plasma disminuyó considerablemente.

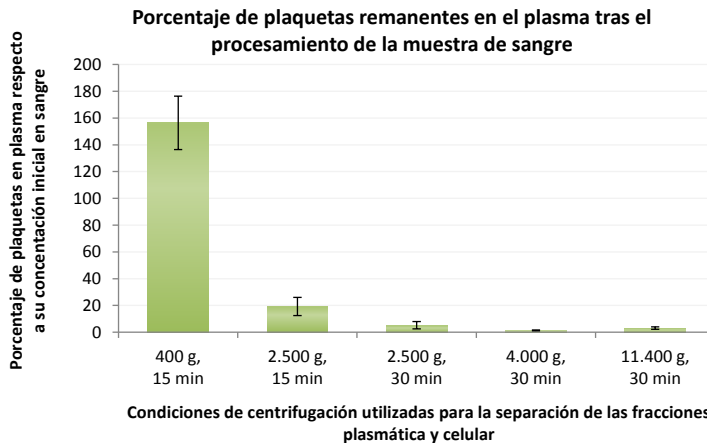


Figura 36. Porcentaje de plaquetas presentes en el plasma después del procesamiento de la sangre con diferentes protocolos de centrifugación. Se refleja el porcentaje promedio de plaquetas en plasma con respecto al recuento obtenido en la muestra de sangre antes del procesamiento. Barras de error: 2*SD. SD: desviación estándar.

Los resultados de este estudio indicaron que, para una eliminación completa de las plaquetas del plasma, se requieren protocolos de centrifugación de al menos 4.000 g durante 30 minutos. El protocolo de procesamiento de la sangre de 2.500 g durante 15 minutos utilizado previamente en nuestro laboratorio y en otros centros de investigación, reflejó la presencia en el plasma de un $19,2 \pm 6,8$ % (promedio \pm SD) del recuento total de plaquetas en sangre. El aumento del tiempo de centrifugación a 30 minutos redujo considerablemente el porcentaje de plaquetas presentes en el plasma, pero no las eliminó por completo ($5,2 \pm 2,8$ %). Por último, aunque los resultados no se reflejan en esta gráfica, también se confirmó que un protocolo de centrifugación de 4.000 g durante 15 minutos no eliminaba la totalidad de las plaquetas del plasma. Es decir, únicamente aumentando tanto la fuerza como el tiempo de centrifugación se consiguió un plasma libre de plaquetas.

Además de estudiar la presencia de plaquetas en el plasma, se realizó una cuantificación de A β 40 y A β 42 en esta matriz para evaluar si el hecho de procesar las sangres con

Resultados

diferentes protocolos de centrifugación podría tener un impacto en los niveles cuantificados de A β .

Cuantificación de A β 40 y A β 42 en muestras de plasma y plasma diluido tras diferentes protocolos de centrifugación de la sangre

Los datos obtenidos muestran una tendencia más o menos homogénea entre individuos pero los resultados difieren entre las dos matrices analizadas (**Figura 37**).

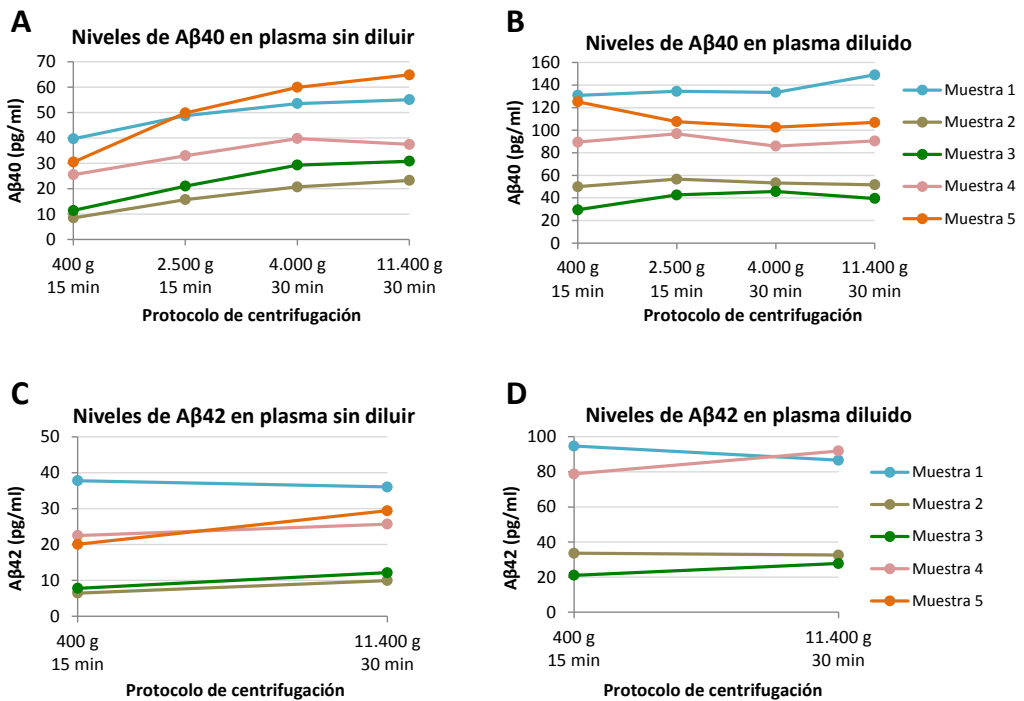


Figura 37. Niveles de A β 40 y A β 42 en muestras de plasma y plasma diluido tras el procesamiento de la sangre con diferentes protocolos de centrifugación. Cada línea representa los niveles endógenos de A β 40 y A β 42 en la matriz de plasma de cinco muestras. Paneles A y B: niveles de A β 40 en plasma y plasma diluido, respectivamente. Paneles C y D: niveles de A β 42 en plasma y plasma diluido, respectivamente.

En las muestras de plasma sin diluir, los niveles de A β 40 y A β 42 fueron en general progresivamente más elevados en las muestras procesadas con los protocolos de centrifugación más enérgicos. Si comparamos el protocolo de procesamiento usado anteriormente (2.500 g, 15 minutos) con el protocolo de 4.000 g durante 30 minutos, los niveles de A β 40 en las muestras procesadas con el primero de ellos fueron de promedio un 20 % más bajos. Estas diferencias se atenúan al comparar las muestras procesadas durante 30 minutos a 4.000 y 11.400 g. Con respecto a A β 42, sólo se compararon los dos protocolos más "extremos". Los niveles de A β 42 con el protocolo de 400 g durante 15 minutos fueron de promedio un 22 % más bajos que los niveles obtenidos al procesar las muestras a 11.400 g durante 30 minutos. Para A β 40, este dato ascendería al 48 %, lo que indica un efecto mayor del protocolo de centrifugación para este péptido.

Por tanto, los resultados observados en la matriz de plasma sin diluir sugieren que posiblemente la presencia de plaquetas en el plasma podría estar interfiriendo en el reconocimiento de parte del péptido A β presente en la muestra. Sin embargo, estos resultados no se reprodujeron en las muestras de plasma diluido. En esta matriz, los niveles de A β 40 se mantuvieron más o menos constantes independientemente del protocolo de centrifugación aplicado y los niveles de A β 42 presentaron una mayor diversidad de comportamientos: de las cuatro muestras analizadas en este caso, en dos de ellas los niveles fueron más elevados con un protocolo y en las otras dos el comportamiento fue inverso.

Cuantificación de A β 40 en plasma tras la eliminación de las plaquetas por filtración

En vista de los resultados anteriores, se quiso averiguar si las diferencias en la cuantificación de A β en la matriz de plasma sin diluir en función del protocolo de centrifugación utilizado, podrían deberse a la presencia o ausencia de plaquetas en la muestra. Dado que las diferencias entre protocolos de centrifugación fueron más notables en el caso de A β 40, se decidió trabajar con este péptido exclusivamente. Se eligieron los dos protocolos de centrifugación más extremos (15 minutos a 400 g y 30 minutos a 11.400 g) y se realizó un filtrado de las muestras de plasma (filtro 0,22 μ m) con el objetivo de eliminar las plaquetas. El filtrado del plasma obtenido tras una centrifugación de 11.400 g durante 30 minutos se realizó como un control del proceso, ya que se había confirmado la ausencia de plaquetas en dicha muestra mediante un contador hematológico.

Resultados

Los resultados de la cuantificación de A β 40 en las muestras de plasma antes y después de la filtración se reflejan en la **Figura 38**.

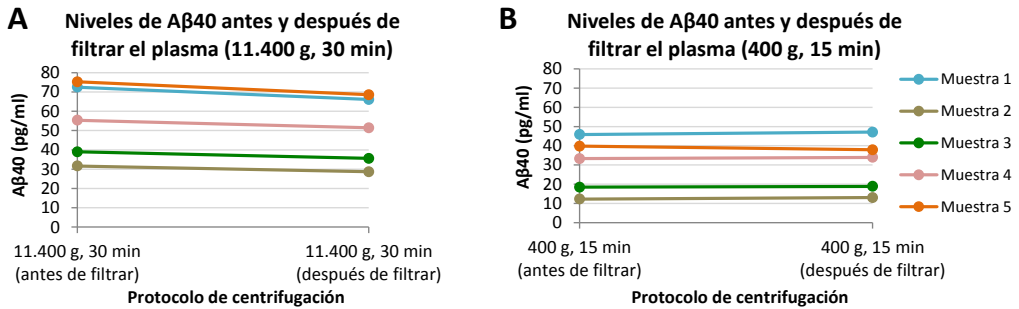


Figura 38. Cuantificación de A β 40 en plasma antes y después de la eliminación de las plaquetas mediante filtración del plasma. Panel A: Control del proceso de filtración del plasma en muestras que inicialmente no contenían plaquetas para estudiar un posible efecto de la filtración sobre la cuantificación de A β . Panel B: Cuantificación de A β 40 en plasmas de muestras procesadas a 400 g durante 15 minutos antes y después de filtrar el plasma para eliminar las plaquetas.

Los niveles de A β 40 en las muestras procesadas a 11.400 g durante 30 minutos fueron similares al comparar la muestra de plasma antes y después de filtrar (no filtrada y filtrada). Es cierto que la cuantificación de este péptido en la muestra filtrada fue ligeramente inferior, pero las diferencias no son muy grandes y consideramos que este proceso no tiene un impacto importante en la cuantificación de A β en el plasma (**Figura 38, panel A**). Asimismo, la eliminación de las plaquetas mediante filtración tampoco tuvo ningún efecto en lo que respecta a los niveles de A β 40 cuantificados en plasmas que inicialmente tenían un elevado contenido de plaquetas (**Figura 38, panel B**). De hecho, los niveles de A β se mantuvieron constantes en todas las muestras sugiriendo que la presencia de plaquetas en el plasma no produce interferencias estéricas que puedan afectar a la cuantificación del péptido A β en un ensayo ELISA.

Por último, en la **Figura 39** se refleja cómo, a pesar de haber eliminado las plaquetas mediante un proceso de filtración del plasma, los niveles de A β 40 continuaron siendo más elevados en aquellos plasmas originariamente libres de plaquetas (11.400 g, 30

minutos), en comparación con los plasmas enriquecidos en plaquetas en los que éstas se eliminaron posteriormente mediante filtración (400 g, 15 minutos).

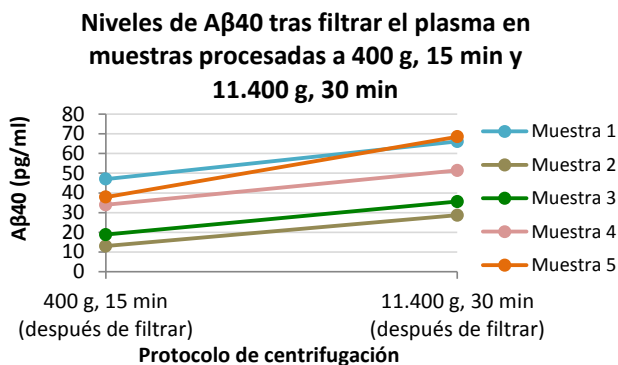


Figura 39. Niveles de A β 40 en muestras de plasma tras su filtración para la eliminación de las plaquetas. Los niveles de A β 40 continúan siendo más elevados en el plasma de las muestras centrifugadas durante 30 minutos a 11.400 g en comparación con los niveles de las muestras centrifugadas durante 15 minutos a 400 g a pesar de haber eliminado las plaquetas por un proceso de filtrado (0,22 μ m).

Tipo de anticoagulante

Los resultados de la comparativa de los niveles de A β 40 y A β 42 en plasma y plasma diluido de 14 individuos cuya sangre se recogió en tubos con EDTA o con citrato de sodio como anticoagulantes se reflejan en la **Figura 40**. Asimismo, los datos de todos estos análisis aparecen en las **Tablas S18 y S19 de la Información Suplementaria**. En el caso de las muestras tratadas con citrato de sodio, los niveles representados están corregidos teniendo en cuenta el factor de dilución (1/10), inherente al uso de tubos con este tipo de anticoagulante.

Los gráficos de barras de la **Figura 40** reflejan que hay niveles superiores de A β 40 y A β 42 en 13 de las 14 muestras analizadas (93 %) en plasma sin diluir cuando el anticoagulante utilizado fue el citrato de sodio (**paneles A y C**). Sin embargo, en el caso de la matriz de plasma diluido no se observa esta misma tendencia, sino que todas las muestras analizadas en el caso de A β 40, o 10 de las 14 muestras analizadas (71,4 %) en el caso de A β 42, presentan niveles superiores al utilizar EDTA como anticoagulante (**Figura 40, paneles B y D**).

Resultados

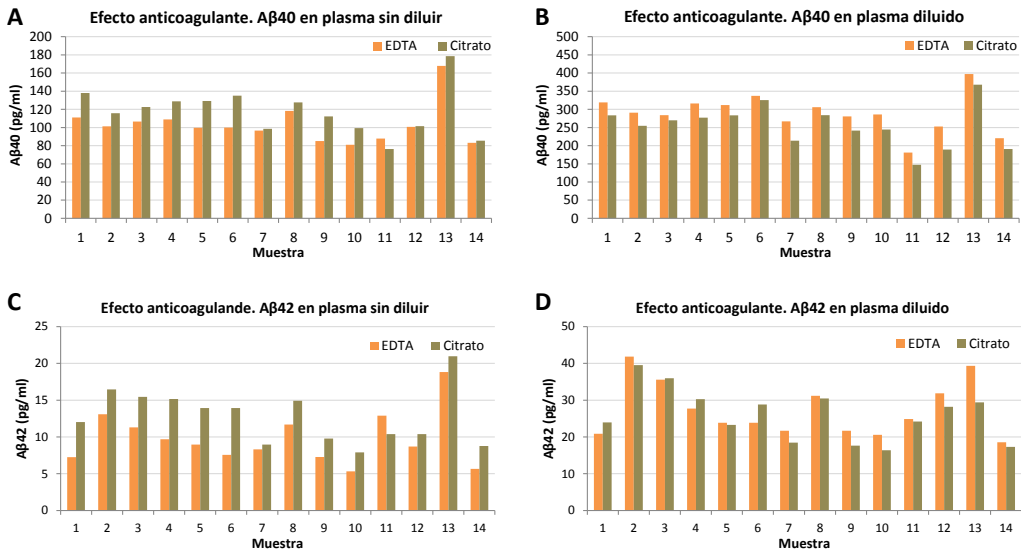


Figura 40. Efecto del anticoagulante utilizado en la cuantificación de Aβ40 y Aβ42 en muestras de plasma y plasma diluido de 14 individuos. Comparativa de los niveles de Aβ40 y Aβ42 en función del anticoagulante utilizado: EDTA en naranja y citrato de sodio en marrón. Paneles A y B: datos de Aβ40 en muestras de plasma sin diluir y diluidas 1/3, respectivamente. Paneles C y D: datos de Aβ42 en muestras de plasma sin diluir y diluidas 1/3, respectivamente.

La **Tabla 20** recoge los resultados promedio de los niveles de Aβ para cada una de las fracciones plasmáticas en función del anticoagulante utilizado. Además, se representa el porcentaje de péptido que se encuentra directamente accesible en el plasma, considerando que los niveles obtenidos en la muestra de plasma diluido constituyen el 100 % del péptido presente en el plasma. El objetivo de ello es evaluar si el tipo de aditivo utilizado podría tener algún efecto en la distribución del Aβ en las diferentes fracciones del plasma con las que trabajamos.

Los resultados promedio mostraron diferencias absolutas importantes en los niveles de Aβ40 total (matriz de plasma diluido) en función del anticoagulante utilizado. Además, también se observaron diferencias en la distribución del péptido en las diferentes fracciones plasmáticas, ya que en el caso del EDTA los porcentajes de péptido directamente accesible y recuperado del plasma son 35 % y 65 %, respectivamente, mientras que en el caso del citrato de sodio la distribución del péptido directamente accesible y recuperado del plasma fue más próxima al 50 %. Esta misma tendencia

también se observó para A β 42, con porcentajes de distribución del péptido en plasma prácticamente idénticos a los observados para A β 40.

	A β 40			A β 42		
	Plasma (pg/ml \pm SD)	Plasma diluido (pg/ml \pm SD)	% DA en plasma (% promedio \pm SD)	Plasma (pg/ml \pm SD)	Plasma diluido (pg/ml \pm SD)	% DA en plasma (% promedio \pm SD)
EDTA	103,38 \pm 21,57	289,22 \pm 51,68	36,07 \pm 5,38 %	9,75 \pm 3,58	27,40 \pm 7,43	35,34 \pm 7,18 %
Citrato	117,76 \pm 25,64	255,16 \pm 57,46	46,43 \pm 3,45 %	12,79 \pm 3,68	25,99 \pm 7,10	49,70 \pm 8,47 %

Tabla 20. Niveles promedio de A β 40 y A β 42 en plasma y plasma diluido en función del anticoagulante utilizado (EDTA o citrato de sodio). Se representa el promedio de la concentración \pm SD de las 14 muestras analizadas, así como el porcentaje promedio de péptido directamente accesible en plasma; % DA = (DA/TP)*100. DA: directamente accesible. TP: total en plasma. SD: desviación estándar.

El mayor número de muestras utilizado para este estudio permitió trabajar con un test estadístico que nos ayudó a valorar la magnitud de las diferencias encontradas entre grupos. La **Tabla 21** resume los resultados del test de Wilcoxon realizado.

	p	Promedio de las diferencias citrato - EDTA (pg/ml)	% promedio diferencias respecto al dato de EDTA
A β 40 DA, EDTA vs Citrato	0,004	14,38	14,17 %
A β 40 TP, EDTA vs Citrato	0,001	-34,06	-12,40 %
A β 42 DA, EDTA vs Citrato	0,003	3,03	36,27 %
A β 42 TP, EDTA vs Citrato	0,140	-1,41	-4,62 %

Tabla 21. Resultados del test de Wilcoxon para la comparación de los niveles de A β 40 y A β 42 directamente accesibles y totales en plasma entre muestras tratadas con EDTA o con citrato de sodio como anticoagulantes. Se considera estadísticamente significativo un resultado con p <0,05 (en negrita). La segunda columna de la tabla refleja el promedio de las diferencias en términos de concentración "Citrato - EDTA". Se observan datos negativos para las dos fracciones "TP" ya que los niveles de A β son más elevados en las muestras "EDTA" que en las muestras "citrato de sodio". En la última columna de la tabla se representa el promedio de las diferencias relativas porcentuales entre ambos anticoagulantes: % diferencias = 100 x [(pg/mL citrato) - (pg/mL EDTA)] / (pg/mL EDTA)]. DA: directamente accesible (matriz de plasma sin diluir); TP: total en plasma (matriz de plasma diluido).

Resultados

El test estadístico utilizado reflejó diferencias significativas para 3 de las 4 variables analizadas. Únicamente al evaluar los niveles de A β 42 totales en el plasma no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras tratadas con EDTA o con citrato de sodio.

En el caso del plasma sin diluir, la cuantificación tanto de A β 40 como de A β 42 fue significativamente más elevada en las muestras tratadas con citrato de sodio, representando incrementos promedio de la concentración del 14,17 y del 36,27 %, respectivamente. No obstante, al trabajar con la muestra de plasma diluido 1/3 en el SSD, la tendencia fue la inversa, presentando la mayoría de las muestras niveles más elevados al utilizar EDTA como anticoagulante. El uso del citrato de sodio supuso una reducción promedio de la concentración de A β 40 total en plasma del 12,4 % y de A β 42 del 4,62 %. Como ya se ha mencionado, estas diferencias sólo alcanzan significación estadística en el caso de A β 40.

Los índices plasmáticos A β 42/40 como posibles biomarcadores de la EA

Se ha llevado a cabo un estudio de la asociación entre las medidas de los índices A β 42/40 en las diferentes fracciones plasmáticas (DA, TP y RP) y los resultados del análisis de la prueba de neuroimagen PET-A β para evaluar si las ratios plasmáticas podrían tener valor como biomarcadores potenciales de la EA. Para este estudio se han utilizado muestras de individuos cognitivamente normales de una sub-cohorte de AIBL, un estudio multi-céntrico longitudinal australiano que reclutó a 1.112 participantes (controles sanos, individuos con DCL e individuos con la EA) en su visita inicial. Los pacientes que continúan en el estudio siguen siendo re-evaluados cada 18 meses con el objetivo de determinar la utilidad predictiva de varios biomarcadores, así como parámetros cognitivos y factores de la vida diaria que puedan ser indicadores de la EA y predictores de declive cognitivo futuro. Se trata de una cohorte bien caracterizada de individuos muy motivados con una amplia repercusión internacional.

Estadísticos descriptivos

En la **Tabla 22** se recoge un resumen de las principales características demográficas de la subcohorte de individuos de AIBL seleccionados para el estudio que hemos realizado nosotros. El número de participantes incluidos a lo largo de las diferentes visitas varía en función de los requisitos necesarios para cada análisis estadístico (ver el apartado de “Análisis estadístico” en Materiales y Métodos) y viene determinado por el número de participantes que cumplen con dichos requisitos. En el caso de las visitas 18, 36 y 54 meses, los requisitos son tener tanto una medida válida de PET-A β como una medida válida de A β en plasma en la misma visita. En el caso de las visitas *baseline* y 72 meses, al no disponer de muestras de plasma, se incluyen aquellos individuos con una medida válida de PET-A β en estas visitas y una medida válida de los índices plasmáticos en la visita de 18 meses.

	<i>baseline</i>		18 meses		36 meses		54 meses		72 meses	
	PET-A β -	PET-A β +	PET-A β -	PET-A β +	PET-A β -	PET-A β +	PET-A β -	PET-A β +	PET-A β -	PET-A β +
Participantes, n	49	27	49	30	42	30	52	36	44	20
Edad (media \pm SD)	72,0 \pm 7,3	74,4 \pm 7,4	73,7 \pm 7,3	74,9 \pm 7,4	74,9 \pm 7,5	76,4 \pm 7,2	76,7 \pm 6,8	77,2 \pm 7,7	77,3 \pm 6,7	78,9 \pm 7,1
Género femenino, n (%)	28 (57,1)	11 (40,7)	30 (61,2)	11 (36,7)*	28 (66,7)	12 (40,0)*	33 (63,5)	17 (47,2)	26 (59,1)	9 (45,0)
Portadores ApoE ϵ 4, n (%)	15 (30,6)	17 (63,0)*	17 (34,7)	22 (73,3)*	11 (26,2)	20 (66,7)**	15 (28,8)	24 (66,7)**	9 (20,5)	9 (45,0)
Años de educación (media \pm SD)	12,5 \pm 2,3	12,2 \pm 2,7	12,4 \pm 2,3	12,1 \pm 2,9	12,4 \pm 2,4	12,1 \pm 2,7	12,6 \pm 2,7	12,0 \pm 2,5	12,5 \pm 2,8	12,0 \pm 2,5

Tabla 22. Datos demográficos descriptivos. PET-A β + o PET-A β - se refiere a los individuos categorizados en estos dos grupos según el punto de corte de la medida SUVR/BeCKeT. SD: desviación estándar. *(**) señala las diferencias significativas entre los grupos PET-A β + y PET-A β - a un nivel de significación de 0,05 (0,001) según el test exacto de Fisher.

Estos datos reflejan que tanto el número de participantes como el porcentaje de portadores del alelo ϵ 4 de ApoE es más bajo en la última visita, tanto en el grupo PET-A β + como PET-A β -. Esto puede ser debido no sólo a los posibles abandonos del estudio, sino también a que en esta cohorte solo se incluyeron controles cognitivamente sanos y algunos de los participantes pudieron evolucionar a pacientes con deterioro cognitivo

Resultados

leve a lo largo del seguimiento. Por otro lado, también se observa que en todas las visitas excepto la última, el porcentaje de individuos con genotipo ApoE $\epsilon 4$ es significativamente más elevado en el grupo de individuos PET-A β +

El resto de datos demográficos están bastante equilibrados si se comparan de forma aislada los datos de cada uno de los dos grupos diferenciados (PET-A β - y PET-A β +) a lo largo de todas las visitas. No obstante, debido a que se trata de una cohorte de individuos seguidos durante 72 meses, es normal que la edad de los individuos sea progresivamente más alta en cada visita.

Análisis exploratorio

La comparativa de los valores de las ratios plasmáticas A β 42/40 en los grupos de individuos categorizados como A β + o A β - en función del test de neuroimagen PET amiloide, dio como resultado unas ratios A β 42/40 más bajas en los individuos categorizados como PET-A β + (**Tabla 23**).

	18 meses		36 meses		54 meses	
	PET-A β -	PET-A β +	PET-A β -	PET-A β +	PET-A β -	PET-A β +
TP42/40; mediana (IQR)	0,083 (0,028)	0,068 (0,020)**	0,088 (0,024)	0,071 (0,027)*	0,085 (0,034)	0,067 (0,015)**
RP42/40; mediana (IQR)	0,089 (0,046)	0,067 (0,038)*	0,094 (0,042)	0,070 (0,032)**	0,095 (0,041)	0,069 (0,030)**
DA42/40; mediana (IQR)	0,074 (0,040)	0,066 (0,016)*	0,081 (0,029)	0,074 (0,016)	0,077 (0,037)	0,069 (0,015)*

Tabla 23. Medidas de los índices plasmáticos A β 42/40 para los grupos de individuos PET-A β + y PET-A β - en cada una de las visitas analizadas y resultados de significación del test U de Mann-Whitney. A β + y A β - hace referencia a los grupos de individuos con resultado SUVR/BeCKeT $\geq 1,5$ o $<1,5$ respectivamente para la evaluación de la carga cortical de A β mediante PET. Mediana: dato que representa la mediana de todas las ratios plasmáticas en cada grupo de individuos dicotomizados como A β + o A β -. IQR: rango intercuartil. Se incluye el resultado de significación de la prueba U de Mann-Whitney para comparar los marcadores plasmáticos entre los grupos de individuos PET-A β + y PET-A β - de modo que * indica $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$. TP: total en plasma; RP: recuperado del plasma; DA: directamente accesible.

La asociación entre los biomarcadores plasmáticos y el biomarcador PET-A β alcanzó significación estadística según el test U de Mann-Whitney para todas las visitas analizadas y para las tres ratios de plasma estudiadas, con la única excepción de DA42/40 en la visita 36 meses, donde se mantuvo la misma tendencia pero no se alcanzó significación estadística. Conviene señalar que para TP42/40 y RP42/40 la asociación fue muy significativa, inferior a 0,001, en dos de las tres visitas analizadas.

Los resultados anteriores también se ilustran en la **Figura 41**.

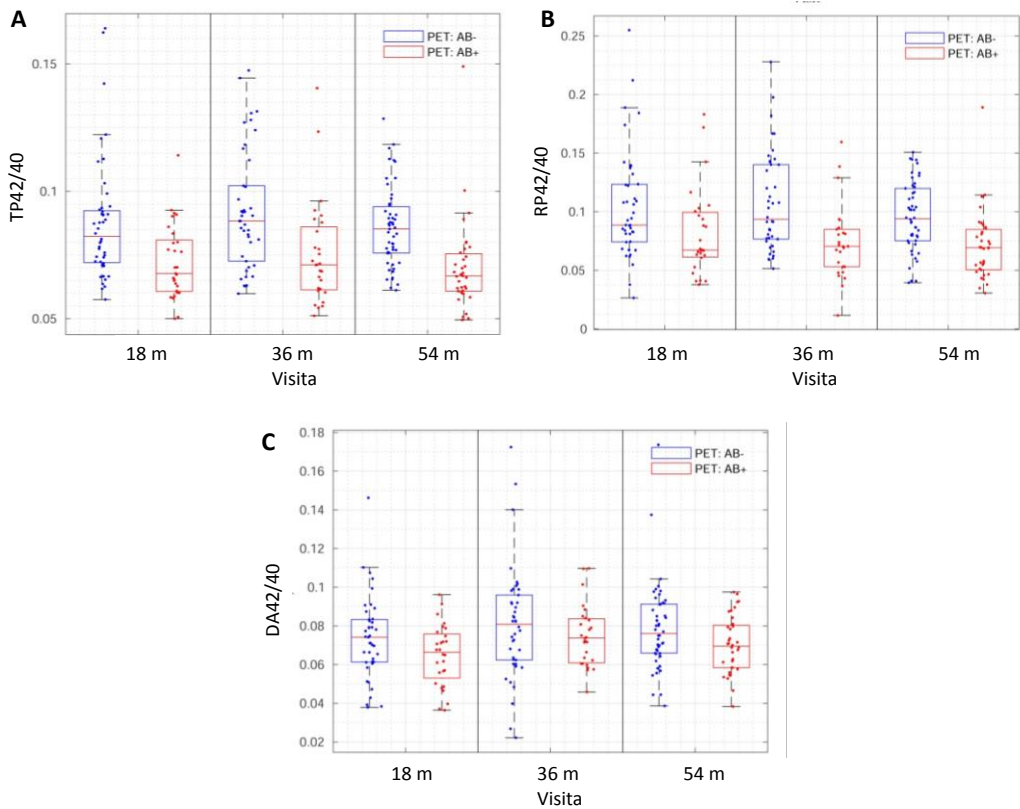


Figura 41. Representación gráfica de las medidas de plasma con respecto al *status cerebral de A β* categorizado como A β + o A β - para cada visita. Se representan las medidas de los índices A β 42/40 (Panel A, total en plasma; Panel B, recuperado del plasma y Panel C: directamente accesible en plasma) para los grupos de individuos cognitivamente normales categorizados como A β + (rojo) o A β - (azul) en función de la medida SUVR/BeCKeT. De las 236 medidas con valores de la ratio TP42/40, se excluyeron tres *outliers* con medidas entre 0,19 y 0,54 por motivos de visualización. Por el mismo motivo, tres *outliers* de las 217 medidas obtenidas para la ratio DA42/40 con valores entre 0,19 y 0,29 no aparecen en la figura.

Resultados

En las gráficas anteriores se observa cómo, a pesar de existir solapamiento entre los grupos, la asociación inversa entre la carga amiloide cerebral y las ratios plasmáticas se mantiene en todas las visitas y para los tres marcadores evaluados: en el grupo PET-A β + los índices plasmáticos A β 42/40 son siempre más bajos.

Estudio transversal

De manera adicional se realizó un modelo de regresión lineal generalizado para valorar la asociación entre los niveles cerebrales y plasmáticos de A β utilizando como covariables demográficas la edad, el género y el genotipo ApoE. Los resultados obtenidos son consistentes con el análisis exploratorio ya que, aunque no se alcanzó significación estadística en todas las visitas, la dirección de la asociación se mantuvo constante: el signo negativo del coeficiente nos indica que los índices plasmáticos A β 42/40 más bajos se asociaron con los valores más elevados de SUVR/BeCKeT en PET-A β (**Tabla 24**).

		18 m	36 m	54 m
log(TP42/40)	Coficiente (IC 95 %)	-0,40 (-0,76, -0,027)	-0,10 (-0,43, 0,22)	-0,59 (-0,94, -0,24)
	valor de p	0,036	0,52	0,0013
log(RP42/40)	Coficiente (IC 95 %)	-0,086 (-0,32, 0,14)	-0,29 (-0,51, -0,066)	-0,30 (-0,54, -0,065)
	valor de p	0,46	0,012	0,013
log(DA42/40)	Coficiente (IC 95 %)	-0,35 (-0,63, -0,067)	-0,055 (-0,36, 0,25)	-0,32 (-0,64, 0,0027)
	valor de p	0,016	0,72	0,052

Tabla 24. Coeficientes de regresión de la asociación entre los índices plasmáticos A β 42/40 transformados logarítmicamente y la variable continua SUVR/BeCKeT en el análisis transversal.

En la tabla se muestran los coeficientes del modelo, los intervalos de confianza al 95 % (IC 95 %) y el valor de significación para cada visita y marcador plasmático. Las covariables demográficas utilizadas fueron la edad, el género y el genotipo ApoE. Las ratios plasmáticas se incluyen en unidades logarítmicas. Se han destacado en negrita las asociaciones significativas ($p < 0,05$). TP: total en plasma. RP: recuperado del plasma. DA: directamente accesible en plasma.

Un coeficiente igual a -0,40 (ejemplo de TP42/40 en la visita de los 18 meses) indicaría que por cada unidad logarítmica que disminuye este índice plasmático se produce un aumento de SUVR/BeCKeT de 0,40 unidades.

La información completa del modelo se recoge en la **Tabla 25**. En lo que respecta a las covariables, los efectos del genotipo ApoE en PET-A β (SUVR/BeCKeT) fueron significativos en todas las visitas y para todos los marcadores de plasma. Sin embargo, los efectos del género no fueron significativos y los de la edad oscilaron entre la significación y la no significación.

	Visita 18 meses			Visita 36 meses			Visita 54 meses		
	Coefficiente	IC 95 %	valor p	Coefficiente	IC 95 %	valor p	Coefficiente	IC 95 %	valor p
Intercepto	-0,7	(-2,02, 0,62)	0,29	-0,18	(-1,39, 1,03)	0,77	-0,7	(-1,90, 0,53)	0,26
Log(TP42/40)	-0,4	(-0,76, -0,027)	0,036	-0,1	(-0,43, 0,22)	0,52	-0,59	(-0,94, -0,24)	0,0013
Edad	0,013	(4,6e-05, 0,027)	0,049	0,016	(0,0014, 0,031)	0,033	0,0076	(-0,0055, 0,021)	0,25
Portador ApoE ϵ 4	0,31	(0,11, 0,52)	0,0033	0,36	(0,14, 0,59)	0,0022	0,28	(0,086, 0,47)	0,005
Género_masculino	0,15	(-0,039, 0,35)	0,12	0,18	(-0,027, 0,39)	0,086	0,03	(-0,15, 0,21)	0,75

	Visita 18 meses			Visita 36 meses			Visita 54 meses		
	Coefficiente	IC 95 %	valor p	Coefficiente	IC 95 %	valor p	Coefficiente	IC 95 %	valor p
Intercepto	0,038	(-1,22, 1,30)	0,95	-0,45	(-1,6, 0,66)	0,42	0,11	(-0,97, 1,2)	0,84
Log(RP42/40)	-0,086	(-0,32, 0,14)	0,46	-0,29	(-0,51, -0,066)	0,012	-0,3	(-0,54, -0,065)	0,013
Edad	0,014	(-0,001, 0,029)	0,067	0,014	(-1,4e-4, 0,028)	0,052	0,0067	(-0,0072, 0,021)	0,34
Portador ApoE ϵ 4	0,34	(0,11, 0,56)	0,0042	0,37	(0,16, 0,58)	0,00095	0,27	(0,074, 0,47)	0,0078
Género_masculino	0,15	(-0,055, 0,36)	0,15	0,12	(-0,088, 0,32)	0,26	0,043	(-0,15, 0,23)	0,65

	Visita 18 meses			Visita 36 meses			Visita 54 meses		
	Coefficiente	IC 95 %	valor p	Coefficiente	IC 95 %	valor p	Coefficiente	IC 95 %	valor p
Intercepto	-0,65	(-1,9, 0,65)	0,32	-0,26	(-1,7, 1,1)	0,71	-0,51	(-1,9, 0,91)	0,48
Log(DA42/40)	-0,35	(-0,63, -0,067)	0,016	-0,055	(-0,36, 0,25)	0,72	-0,32	(-0,64, 0,0027)	0,052
Edad	0,014	(-4,1e-5, 0,028)	0,057	0,018	(0,0039, 0,033)	0,014	0,013	(-5,8e-05, 0,027)	0,047
Portador ApoE ϵ 4	0,33	(0,11, 0,54)	0,0033	0,42	(0,2, 0,63)	0,00029	0,31	(0,12, 0,51)	0,0021
Género_masculino	0,13	(-0,071, 0,33)	0,2	0,19	(-0,014, 0,39)	0,067	0,077	(-0,11, 0,27)	0,42

Tabla 25. Modelo de regresión lineal completo del estudio transversal. Se analiza la asociación entre las ratios plasmáticas de A β 42/40 (incorporadas como variables continuas transformadas logarítmicamente) y la puntuación SUVR/BeCKeT. Las covariables del modelo fueron la edad, el genotipo ApoE y el género. El coeficiente hace referencia a la variable plasmática particular y las covariables seleccionadas en el modelo. IC 95 %: intervalo de confianza al 95 %. p: valor p de cada coeficiente del modelo, significativo si p < 0,05. TP: total en plasma. RP: recuperado del plasma. DA: directamente accesible en plasma.

Estudio longitudinal

Para estudiar si los niveles de los índices plasmáticos de A β en la visita de 18 meses (basal) se asocian con las trayectorias de PET-A β (SUVR/BeCKeT) a lo largo del seguimiento se llevaron a cabo modelos lineales de efectos mixtos. Los resultados de estos modelos mostraron una asociación inversa significativa entre la pendiente de las

Resultados

trayectorias SUVR/BeCKeT y la primera medida disponible de los marcadores plasmáticos (Tabla 26).

		Coefficiente (IC 95 %)	Valor p
log(TP42/40)	Intercepto	-0,34 (-0,62, -0,064)	0,016
	Interacción con el tiempo	-0,034 (-0,054, -0,015)	0,0006
log(RP42/40)	Intercepto	-0,13 (-0,31, 0,047)	0,15
	Interacción con el tiempo	-0,014 (-0,028, -0,00094)	0,036
log(DA42/40)	Intercepto	-0,22 (-0,43, 0,0045)	0,055
	Interacción con el tiempo	-0,026 (-0,42, -0,0098)	0,0017

Tabla 26. Modelo lineal de efectos mixtos para valorar la asociación de los índices plasmáticos en la visita 18 meses y las trayectorias de PET-A β (SUVR/BeCKeT) a lo largo del seguimiento. En la tabla se representan los coeficientes del modelo para el intercepto (sin interacción con el tiempo) y para la pendiente (interacción con el tiempo), así como los intervalos de confianza al 95 % (IC 95 %) y el valor de significación para cada ratio plasmática estudiada. Se han remarcado en negrita las asociaciones significativas ($p < 0,05$). TP: total en plasma. RP: recuperado del plasma. DA: directamente accesible en plasma.

El signo negativo de los coeficientes del modelo indica que cuanto menores son las ratios plasmáticas en la visita de 18 meses más inclinadas son las trayectorias SUVR/BeCKeT a lo largo del seguimiento. Además, la asociación inversa entre las ratios plasmáticas y SUVR/BeCKeT también se observó en el *baseline* (intercepto), aunque su significación fue menor. Estos resultados van en consonancia con lo obtenido en el estudio transversal.

La información completa de los modelos de efectos mixtos se recoge en la **Tabla 27**. En ella se observa que el genotipo ApoE también tuvo efectos significativos tanto en el intercepto como en la pendiente de las trayectorias SUVR/BeCKeT, pero la edad sólo tuvo efectos significativos en el intercepto. En lo que respecta al género, no se observó ningún efecto significativo ni para el intercepto ni para la pendiente. La dirección de la asociación fue la esperada ya que los portadores del alelo $\epsilon 4$ de ApoE presentaron trayectorias con una pendiente más inclinada y una mayor amplitud. Asimismo, los individuos de edad más avanzada mostraron trayectorias con una mayor amplitud.

	Coefficiente	IC 95 %	Valor p
Intercepto	-0,79	(-1,8, 0,17)	0,1
Tiempo	-0,098	(-0,17, -0,028)	0,0063
log(TP42/40)	-0,34	(-0,62, -0,064)	0,016
Edad	0,016	(0,0062, 0,027)	0,0017
Portador ApoE ε4	0,32	(0,17, 0,48)	4,40E-05
Género_masculino	0,076	(-0,068, 0,22)	0,3
log(TP42/40):Tiempo	-0,034	(-0,054, -0,015)	0,0006
Edad:tiempo	0,00016	(-0,00051, 0,00083)	0,64
Portador ApoE ε4:Tiempo	0,018	(0,0069, 0,029)	0,0016
Género_masculino:Tiempo	0,0012	(-0,0095, 0,012)	0,82

	Coefficiente	IC 95 %	Valor p
Intercepto	-0,39	(-1,3, 0,53)	0,4
Tiempo	-0,045	(-0,11, 0,022)	0,19
log(RP42/40)	-0,13	(-0,31, 0,047)	0,15
Edad	0,018	(0,0073, 0,029)	0,0012
Portador ApoE ε4	0,34	(0,18, 0,51)	4,60E-05
Género_masculino	0,07	(-0,083, 0,22)	0,37
log(RP42/40):Tiempo	-0,014	(-0,028, -0,00094)	0,036
Edad:tiempo	8,90E-05	(-0,00066, 0,00083)	0,81
Portador ApoE ε4:Tiempo	0,019	(0,007, 0,031)	0,0021
Género_masculino:Tiempo	0,002	(-0,0092, 0,013)	0,73

	Coefficiente	IC 95 %	Valor p
Intercepto	-0,47	(-1,4, 0,47)	0,32
Tiempo	-0,084	(-0,16, -0,0091)	0,028
log(DA42/40)	-0,22	(-0,43, 0,0045)	0,055
Edad	0,016	(0,0051, 0,027)	0,0042
Portador ApoE ε4	0,33	(0,17, 0,50)	5,90E-05
Género_masculino	0,054	(-0,097, 0,21)	0,48
log(DA42/40):Tiempo	-0,026	(-0,042, -0,0098)	0,0017
Edad:tiempo	0,00023	(-0,00052, 0,00097)	0,55
Portador ApoE ε4:Tiempo	0,018	(0,0061, 0,030)	0,0033
Género_masculino:Tiempo	0,0012	(-0,010, 0,012)	0,84

Tabla 27. Modelo lineal de efectos mixtos completo. Estudio de la asociación entre las ratios plasmáticas de Aβ (incorporadas como variables continuas transformadas logarítmicamente) en la visita de los 18 meses y la evolución de PET-Aβ (SUVR/BeCKeT) a lo largo del seguimiento. Se representan los coeficientes, intervalos de confianza al 95 % (IC 95 %) y el valor de significación p. En negrita se resalta la magnitud del efecto de las diferentes ratios de plasma para el intercepto (sin interacción con el tiempo) y para la pendiente (ratio:tiempo) de la trayectoria SUVR/BeCKeT.

Resultados

Entre los tres índices plasmáticos, el de la fracción de péptido total en plasma es el que presentó una mayor asociación con la pendiente de la trayectoria de PET-A β (SUVR/BeCKeT). La asociación inversa de estas dos variables se observa gráficamente en la **Figura 42** en la que se representan los cambios de SUVR/BeCKeT en cada visita del seguimiento con respecto al dato de la visita inicial (0 meses o *baseline*) para los diferentes genotipos ApoE (portadores o no portadores del alelo $\epsilon 4$). Para esta representación gráfica los individuos se separaron en función de si tenían un índice plasmático TP42/40 alto o bajo en la visita de los 18 meses. Esta clasificación se realizó en base al dato que representa la mediana de todo el conjunto de resultados.

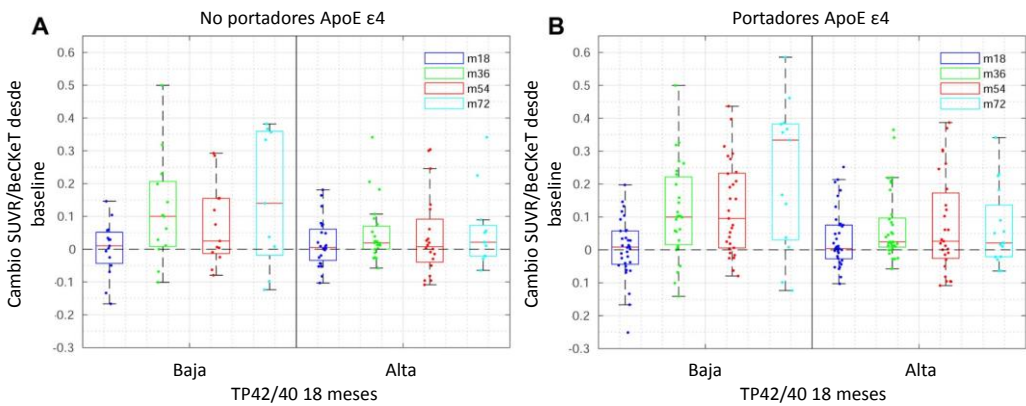


Figura 42. Representación de los cambios de SUVR/BeCKeT desde *baseline* a cada visita del seguimiento en función del dato del índice TP42/40 a los 18 meses. Dentro de cada panel, los valores bajos y altos de la ratio TP42/40 (18 meses) se representan a izquierda y derecha respectivamente. Cada punto representa el cambio de SUVR/BeCKeT en la visita 18 meses (azul oscuro), 36 meses (verde), 54 meses (rojo) y 72 meses (cian) con respecto al dato de SUVR/BeCKeT en *baseline*, para individuos con niveles bajos o altos de TP42/40 en la visita de los 18 meses. El panel de la izquierda contiene los datos de los no portadores de alelos $\epsilon 4$ de ApoE, mientras que el panel de la derecha recoge los datos de los portadores.

Aunque la **Figura 42** no representa directamente ninguno de los modelos estadísticos utilizados, en ella se observa cómo el valor de SUVR/BeCKeT incrementó a lo largo del seguimiento en aquellos sujetos que tenían el índice TP42/40 bajo en la visita de los 18 meses. Además, esta tendencia fue más evidente en los portadores del alelo $\epsilon 4$. Por el contrario, de promedio, en los individuos con los índices plasmáticos más elevados en la visita de 18 meses no se produjo un cambio de SUVR/BeCKeT a lo largo del seguimiento independientemente del genotipo ApoE.

Rendimiento diagnóstico del índice plasmático TP42/40: curvas ROC

Por último, se eligió el índice TP42/40 para llevar a cabo un análisis ROC (*receiver operating characteristic*), ya que éste fue el marcador plasmático que había mostrado una asociación significativa más fuerte tanto en el estudio transversal como en el estudio longitudinal. En la **Figura 43** se representan las curvas ROC obtenidas en el experimento de validación cruzada para cada uno de los tres modelos analizados.

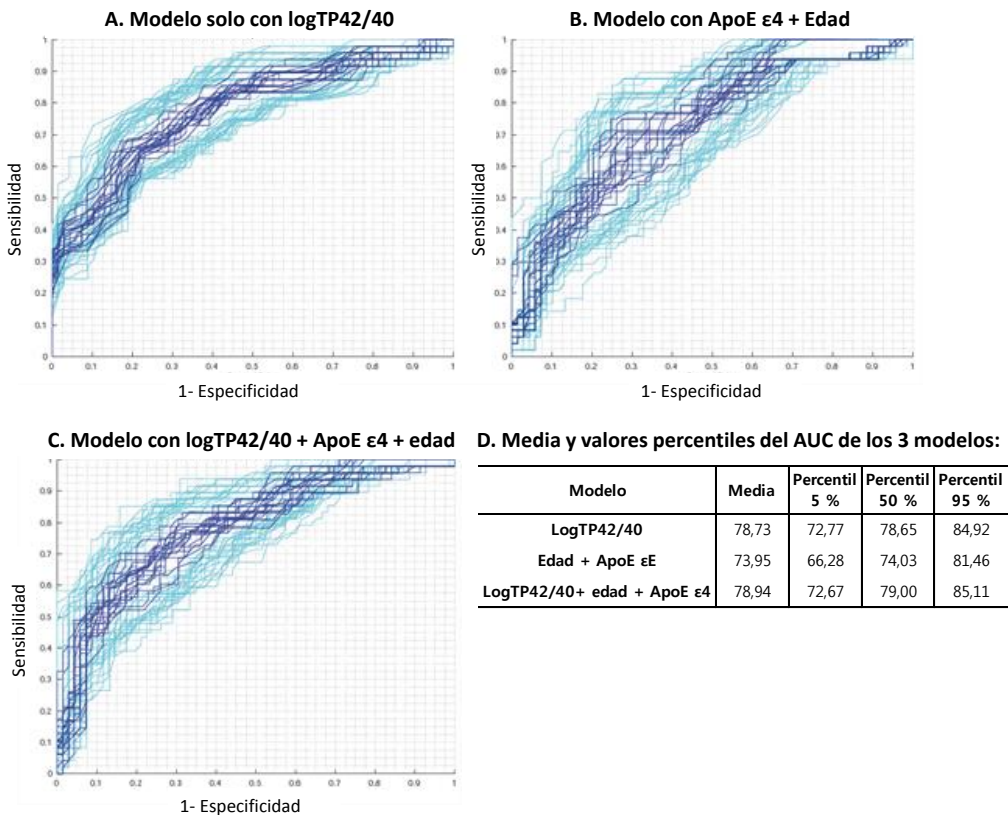


Figura 43. Distribución de las curvas ROC obtenidas en el experimento de validación cruzada. A: el modelo solo incluye el marcador logTP42/40; B: el modelo solo incluye las variables demográficas (edad y genotipo ApoE); C: el modelo incluye el marcador logTP42/40 y las variables demográficas (edad + ApoE). D: Tabla con los valores medios del AUC y sus percentiles en cada uno de estos tres modelos. Cada curva ROC representada se ha obtenido en una ronda diferente del proceso de validación cruzada. Las curvas cuyo AUC se encuentra entre los percentiles 49,9 % y 50,1 % se representan en color azul oscuro, mientras que las curvas en los intervalos de percentiles (2,4 % - 2,6 %) y (97,4 % - 97,6 %) se representan en color cian. AUC: *area under the (ROC) curve*.

Resultados

En cada ronda del proceso de VC se obtiene una curva ROC diferente. Por tanto, las diferentes curvas representadas en la **Figura 43** muestran la variabilidad del método a lo largo de las distintas rondas. El responsable de la variabilidad originada es el limitado tamaño de los conjuntos de entrenamiento y evaluación. No obstante, gracias al hecho de que se utilizaron las mismas divisiones aleatorias de la población, es posible realizar una comparativa del rendimiento de los diferentes clasificadores.

En comparación con la inclusión únicamente de las covariables demográficas (edad y genotipo ApoE) en el clasificador, la inclusión del índice plasmático TP42/40 en el modelo aportó una mejora estadísticamente significativa ($p = 0,0017$ en el test Delong) en el AUC (*area under the ROC curve*) que supuso un incremento desde el 74 % (sólo variables demográficas) hasta el 79 %. La diferencia media (IC 95 %) fue del 5,4 % (2,2 - 8,8 %). En los análisis previos no se habían encontrado asociaciones significativas en lo que respecta al género y, por ese motivo, no se incluyó esta covariable en este modelo.

Una vez obtenido el modelo que incluye tanto la ratio logTP42/40 como las covariables demográficas (edad y genotipo ApoE) como resultado del experimento de validación cruzada, se llevó a cabo un estudio de la evolución de los diferentes parámetros diagnósticos en función del umbral del clasificador (**Tabla 28**).

Umbral	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	Exactitud	Índice de Youden
1,37	0,90	0,40	0,51	0,86	0,60	0,30
1,41	0,86	0,48	0,54	0,84	0,64	0,34
1,46	0,81	0,56	0,57	0,82	0,67	0,37
1,50	0,77	0,64	0,60	0,80	0,69	0,41
1,57	0,71	0,78	0,70	0,80	0,75	0,49
1,64	0,56	0,84	0,73	0,74	0,73	0,40
1,68	0,48	0,90	0,78	0,71	0,73	0,38
1,73	0,39	0,93	0,81	0,69	0,71	0,32

Tabla 28. Medidas promedio del rendimiento del clasificador logTP42/40 + ApoE $\epsilon 4$ + edad. Se representan los valores de los diferentes parámetros diagnósticos de este modelo para diferentes umbrales de SUVR/BeCKeT. El parámetro "exactitud" es un indicador de los individuos correctamente diagnosticados dentro de toda la población evaluada. *Nota: los parámetros diagnósticos no vienen expresados en términos de porcentajes, sino en términos de valor absoluto.*

En la **Tabla 28** puede observarse como a medida que aumenta el umbral del modelo va reduciéndose progresivamente la sensibilidad (**Fórmula 11**) y el VPN (**Fórmula 14**) de la prueba, a la par que aumenta la especificidad (**Fórmula 12**) y el VPP (**Fórmula 13**).

En el punto en el que el índice de Youden (**Fórmula 15**) alcanza su valor máximo, este modelo (logTP42/40 + ApoE ϵ 4 + edad) presentó una sensibilidad del 71 % y una especificidad del 78 %. La distribución de los valores umbral que maximizaron este índice tuvieron un valor medio de 1,57 con un IC 95 % de 1,40 - 1,73. Tal y como se esperaba, este valor umbral se localiza cerca del punto de corte de SUVR/BeCKeT utilizado para discriminar a PET-A β + y PET-A β - (1,5).

No obstante, cuando la principal finalidad de un biomarcador es ser utilizado como herramienta de pre-selección y/o para favorecer el enriquecimiento de cohortes para los ensayos clínicos, es importante que el VPP de ese biomarcador sea elevado para minimizar el número de individuos sanos incorrectamente clasificados (falsos positivos). La estrategia para conseguir esto se basa en elegir un valor umbral elevado en el clasificador. El ejemplo dado a continuación pretende ilustrar estas diferencias.

Imaginemos que queremos reclutar a 200 individuos sanos con carga amiloide cortical elevada (PET-A β +) para participar en un ensayo clínico y vamos a partir de la población del estudio AIBL descrita en este trabajo. La prevalencia de PET-A β + en esta población es del 37,5 %. Si únicamente dispusiéramos del biomarcador de neuroimagen y asumiéramos que éste tiene una sensibilidad del 100 %, tendríamos que reclutar un total de 533 individuos ($200/0,375$) para conseguir los 200 individuos sanos con carga amiloide cortical elevada (PET-A β +) . Dado el elevado precio de la prueba PET-A β (hasta 5.000 \$) (Insel *et al.*, 2016), el coste de esta aproximación sería muy elevado (~2.667.000 \$). Sin embargo, podríamos llevar a cabo un proceso secuencial de selección de individuos en el que en primer lugar se utilizara una herramienta accesible, no invasiva y económica como ABtest (140 \$ en total para TP40 y TP42), para hacer una primera selección de individuos con riesgo de tener una carga amiloide cortical positiva (por ejemplo, PET-A β +) . Una vez realizado este primer cribado, el estado PET-A β de cada caso debería confirmarse mediante neuroimagen. Esta metodología tendría beneficios importantes aunque las cifras variarían en función del parámetro que queramos priorizar de acuerdo con los siguientes escenarios:

Resultados

Escenario 1: Sensibilidad y VPN elevados

En este primer escenario se elige el umbral del clasificador que maximiza la sensibilidad (0,90) de la prueba (**Tabla 28**, Umbral = 1,37). Si el propósito consiste en reclutar 200 individuos PET-Aβ+, considerando dicha sensibilidad de 0,9, se tendría que aplicar ABtest en 222 individuos (200/0,9), entre los que se encontrarían 22 individuos que ABtest descartaría de forma errónea (falsos negativos). No obstante, teniendo en cuenta que la prevalencia de PET-Aβ+ en esta población es del 37,5 %, esos 222 individuos se encontrarían en un grupo de 593 individuos (222/0,375). Finalmente, dado que el VPP de ABtest en este umbral del clasificador es de 0,51, en el grupo completo de 593 individuos, ABtest encontrará no sólo a los 200 individuos PET-Aβ+ (verdaderos positivos) sino también a otros 192 individuos falsos positivos [(200/0,51)-200] (**Figura 44**).

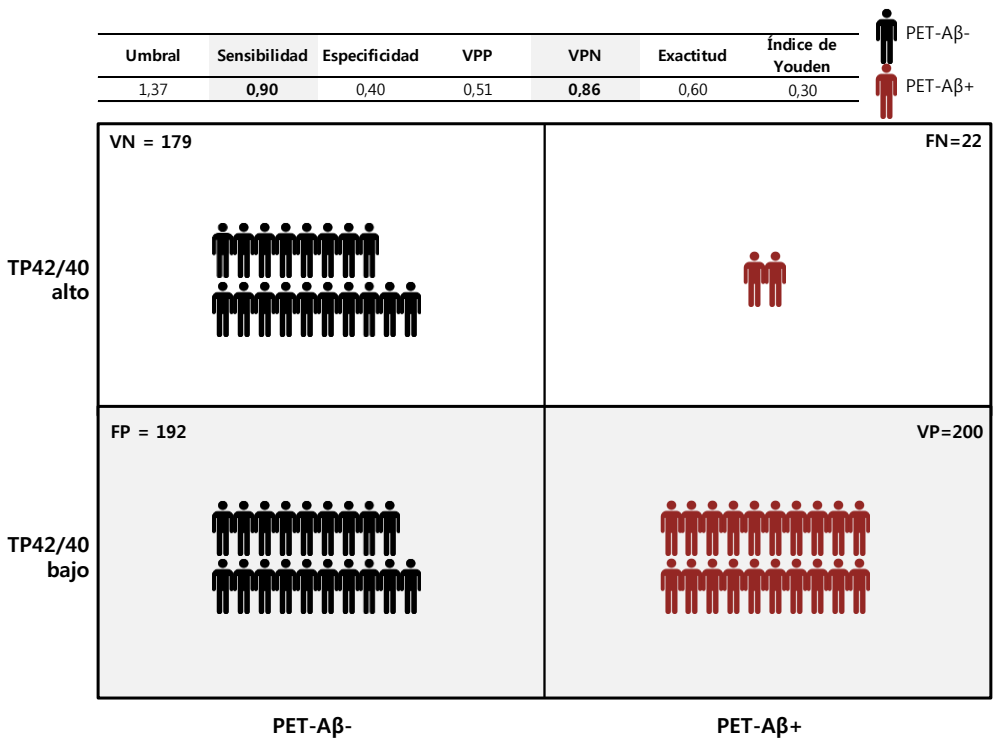


Figura 44. Modelo hipotético de reclutamiento de 200 individuos sanos con amiloide cortical (PET-Aβ+) eligiendo el umbral que maximiza la sensibilidad y el VPN de la prueba. Con esta aproximación debe realizarse la prueba inicial de *pre-screening* ABtest a 593 individuos y la prueba confirmatoria PET-Aβ a 392 individuos (sombreado en gris). VN: verdaderos negativos. FN: falsos negativos. FP: falsos positivos. VP: verdaderos positivos. VPP: valor predictivo positivo. VPN: valor predictivo negativo. La representación de cada individuo equivale a ± 10 individuos de este modelo hipotético.

Escenario 2: Máximo índice de Youden

Otra aproximación sería trabajar con el umbral que maximiza el índice de Youden (**Tabla 28**, Umbral = 1,57). En este caso, dado que en este punto la sensibilidad es de 0,71 se debería aplicar ABtest a 282 individuos ($200/0,71$) que incluirían 82 falsos positivos. No obstante, considerando la prevalencia de PET-A β + en esta población, el grupo inicial preseleccionado ascendería a 751 individuos ($282/0,375$). Dado que el VPP en este umbral es de 0,70, ABtest daría un resultado positivo no sólo para los 200 individuos que realmente tendrían carga amiloide cortical positiva, sino también para otros 86 individuos más [falsos positivos: $(200/0,70)-200$] (**Figura 45**).

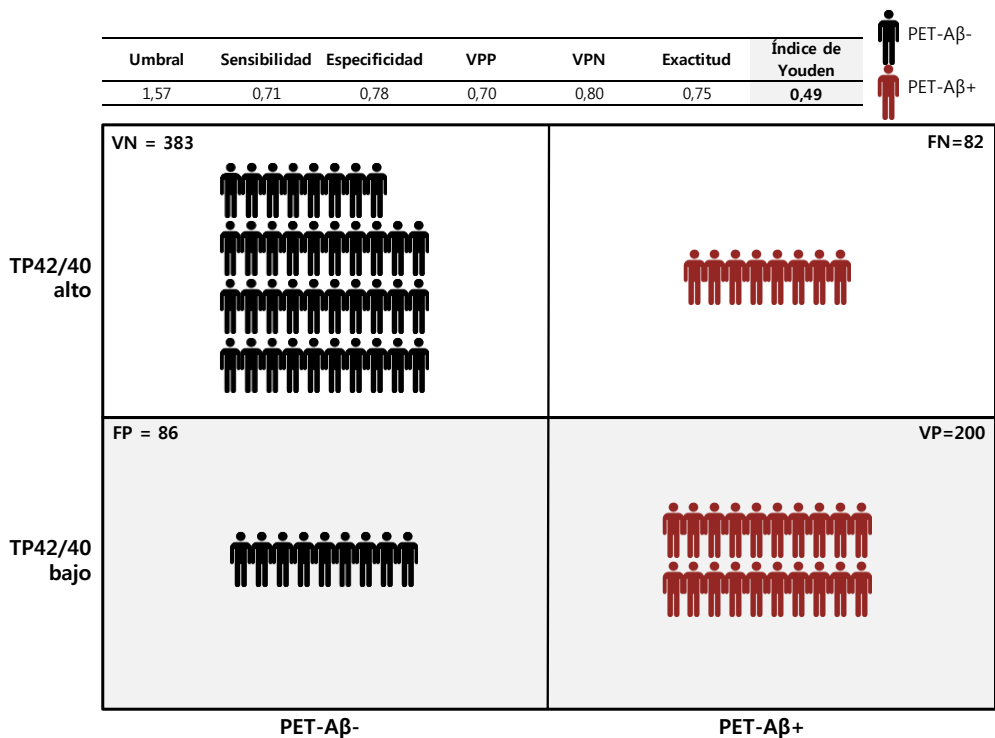


Figura 45. Modelo hipotético de reclutamiento de 200 individuos sanos con amiloide cortical (PET-A β +) eligiendo el umbral que maximiza el índice de Youden de la prueba. Con esta aproximación debe realizarse la prueba inicial de *pre-screening* ABtest a 751 individuos y la prueba confirmatoria PET-A β a 286 individuos (sombreado en gris). VN: verdaderos negativos. FN: falsos negativos. FP: falsos positivos. VP: verdaderos positivos. VPP: valor predictivo positivo. VPN: valor predictivo negativo. La representación de cada individuo equivale a ± 10 individuos de este modelo hipotético.

Resultados

Escenario 3: Especificidad y VPP elevados

Otra posible alternativa sería utilizar el umbral que maximiza la especificidad y el VPP (Tabla 28, Umbral = 1,73). Siguiendo esta aproximación, dado que la sensibilidad de la prueba disminuye considerablemente (0,39), el número de individuos que deberían someterse a una primera prueba de *pre-screening* (ABtest) ascendería a 513 individuos (200/0,39) que incluiría los 200 verdaderos positivos y 313 falsos negativos. De nuevo, aplicando la prevalencia de individuos PET-Aβ+ de esta población, realmente el grupo inicial en el que aplicar ABtest sería de 1.368 individuos (513/0,375). Este grupo incluiría únicamente a 47 falsos positivos mal clasificados, ya que en este caso el VPP de la prueba aumenta a 0,81 [(200/0,81)-200] (Figura 46).

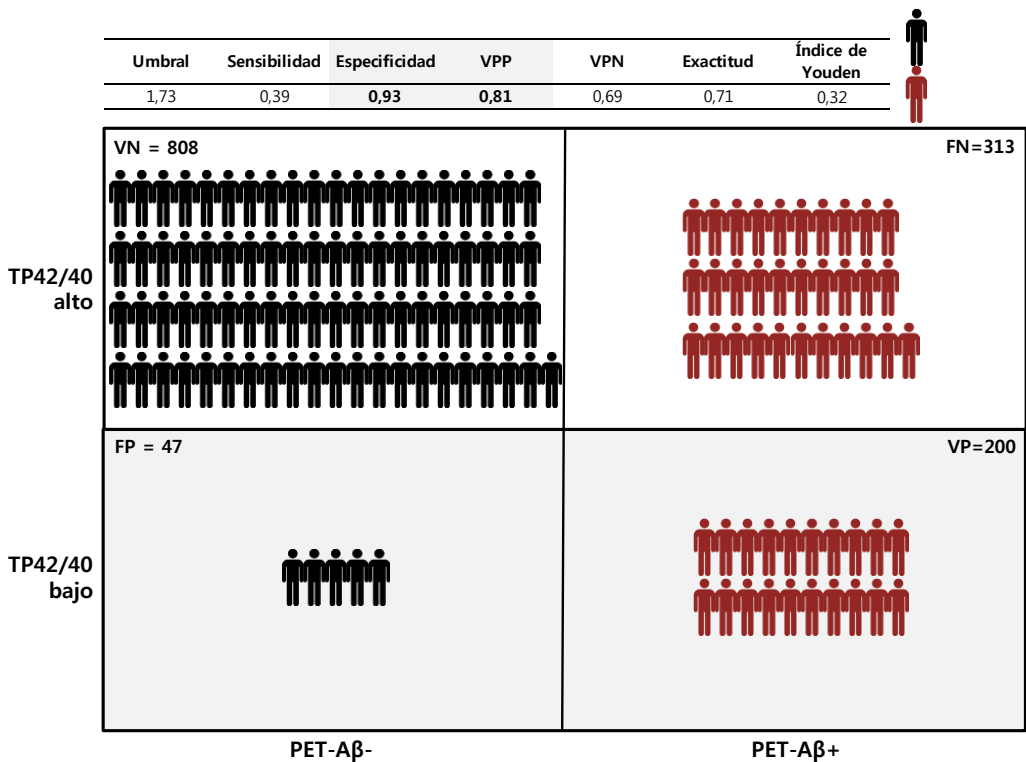


Figura 46. Modelo hipotético de reclutamiento de 200 individuos sanos con amiloide cortical (PET-Aβ+) eligiendo el umbral que maximiza el VPP y la especificidad de la prueba. Con esta aproximación debe realizarse la prueba inicial de *pre-screening* ABtest a 1.368 individuos y la prueba confirmatoria PET-Aβ a 247 individuos (sombreado en gris). VN: verdaderos negativos. FN: falsos negativos. FP: falsos positivos. VP: verdaderos positivos. VPP: valor predictivo positivo. VPN: valor predictivo negativo. La representación de cada individuo equivale a ±10 individuos de este modelo hipotético.

La **Tabla 29** recoge un resumen de los parámetros más importantes de los tres posibles escenarios descritos. En ella se observa claramente cómo conforme aumenta el umbral elegido se incrementa el número de individuos que deben someterse a una primera prueba de *pre-screening* (ABtest), así como el número de falsos negativos incorrectamente excluidos. En contraposición, disminuye progresivamente el número de individuos que deben someterse a una segunda prueba confirmatoria más cara e invasiva. Es decir, se reduce el número de falsos positivos, ya que aumenta el VPP. En términos económicos, esta última aproximación sería la más ventajosa, aunque requeriría gestionar inicialmente a un mayor número de individuos. Además, dado que la prevalencia de individuos con un resultado PET-A β positivo en la población de estudio es del 37,5 %, un VPP del 81 % representaría un incremento de esta prevalencia superior al 110 %. Esto se traduciría en un importante enriquecimiento de nuestra muestra con el tipo de individuos que nos interesaría reclutar para un hipotético ensayo clínico.

Escenario	Parámetro elegido	Umbral	n ABtest	Falsos Negativos	Falsos Positivos	n PET	Ahorro vs solo PET (\$)
Escenario 1	Se/VPN máx.	1,37	593	22	192	392	622.919
Escenario 2	I. Youden máx.	1,57	751	82	86	286	1.132.931
Escenario 3	Es/VPP máx	1,73	1368	313	47	247	1.240.646

Tabla 29. Resumen de los principales parámetros obtenidos en los tres escenarios descritos en un hipotético caso de reclutamiento de 200 individuos sanos con carga amiloide cortical elevada. El ahorro indicado se ha calculado en comparación con el coste necesario en ausencia de una herramienta de *pre-screening* como ABtest. Prevalencia de esta población: 37,5 %. Se: Sensibilidad; Es: especificidad. VPN: valor predictivo negativo. VPP: valor predictivo positivo.

DISCUSIÓN

Validación de ABtest40 y ABtest42

Actualmente se están desarrollando y evaluando en numerosos ensayos clínicos diferentes estrategias terapéuticas que persiguen el objetivo de modificar, ralentizar o incluso detener el desarrollo de la EA. A la vista de numerosos fracasos previos achacados al uso de pacientes en estadios avanzados de la enfermedad, ahora se tiende a realizar estos ensayos en pacientes en estadios más tempranos o incluso en personas sanas con riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad. Esto hace imprescindible el descubrimiento de biomarcadores que permitan evaluar las posibilidades de las nuevas propuestas terapéuticas, al menos en las fases iniciales de su desarrollo clínico. Dentro de la evaluación de la asociación entre una enfermedad y los niveles de un analito o biomarcador determinado, o para llevar a cabo la monitorización de los efectos bioquímicos ocasionados por un fármaco, se considera indispensable llevar a cabo una validación rigurosa del método que se va a utilizar para realizar dichos análisis. Sólo de esta manera se podrá garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos (Lachno *et al.*, 2012). Siguiendo esta recomendación, en este trabajo se ha desarrollado un nuevo proyecto de validación de los inmunoensayos ABtest40 y ABtest42 optimizados para la cuantificación de A β 40 y A β 42 en muestras de plasma y plasma diluido, que incorporan como componente novedoso respecto a los anteriores kits un anticuerpo monoclonal de producción interna.

El desarrollo de un anticuerpo monoclonal con afinidad por el extremo N-terminal de A β se ha considerado un objetivo primordial de Araclon Biotech. Con su obtención, se ha logrado dar un paso muy importante en el desarrollo de ABtest, ya que se ha dejado de depender externamente de un componente tan importante del ensayo como es uno de los dos anticuerpos que forman parte del ELISA sándwich. Aunque el anticuerpo monoclonal 6E10 que se tenía en uso presentaba un buen comportamiento en el ensayo, con él se había tenido que hacer frente a comportamientos inesperadamente anómalos en algunos lotes, con aumentos considerables del fondo y disminución de la sensibilidad del ensayo, lo que limitaba nuestros estudios y comprometía nuestros resultados. Gracias a la producción interna del anticuerpo monoclonal 1F3, se puede realizar un control exhaustivo de todos los pasos del proceso de producción, controlando a su vez la variabilidad inter-lote. Asimismo, el objetivo principal de su desarrollo era su uso como anticuerpo de captura en ABtest, por lo que la producción de dicho anticuerpo se ha optimizado para cumplir este objetivo, algo impensable cuando se utiliza un anticuerpo comercial destinado a diferentes usos, laboratorios y tipos de ensayo.

Discusión

Los bajos niveles de los péptidos A β en plasma y su capacidad para oligomerizar e interaccionar con otras proteínas de la matriz plasmática (Biere *et al.*, 1996; Kuo *et al.*, 1999) dificultan enormemente su manipulación y cuantificación. En nuestro laboratorio, consideramos que la cuantificación de A β en las dos fracciones en las que se encuentra este péptido en el plasma, libre o interaccionando con los componentes de la matriz, puede suponer un valor añadido en nuestros análisis. Por ese motivo, se ha considerado conveniente evaluar los diferentes parámetros del ensayo (reproducibilidad, exactitud, recuperación), no sólo en la matriz de plasma, sino también en la matriz de plasma diluido. Este aspecto también es novedoso en este trabajo ya que hasta el momento únicamente se habían valorado estos parámetros en la matriz de plasma sin diluir. Sin embargo, dado que los niveles de péptido total en plasma se presentan como posibles biomarcadores de la EA y, de hecho, en el estudio con la cohorte de AIBL descrito en este trabajo el índice TP42/40 se ha perfilado como el biomarcador más prometedor, la validación de ABtest con muestras de plasma diluido se considera de especial relevancia.

Los resultados obtenidos en este proceso de validación postulan a ABtest40 y ABtest42 como dos herramientas robustas y fiables para la cuantificación de los péptidos A β 40 y A β 42 en las matrices de plasma y plasma diluido. Además, los datos obtenidos en nuestros análisis están a la altura de otros kits comerciales destinados a la cuantificación de A β en el plasma (ver **Tablas 30 y 31** más adelante).

No obstante, los procesos de validación de los métodos analíticos deben considerarse como procesos en curso mientras se esté utilizando dicho método y, por tanto, se encuentran continuamente en renovación. Las propias necesidades del análisis, la modificación de los componentes del ensayo y los nuevos resultados que se van obteniendo justifican las revisiones y ampliaciones de los procesos de validación previos. De la misma manera, el desarrollo de ABtest es un proceso que sigue activo y por ello en nuestro laboratorio seguimos trabajando para mejorar la cuantificación de A β en los fluidos biológicos, especialmente en el plasma. Actualmente estamos desarrollando un estudio para valorar la estabilidad de las muestras de plasma a corto y largo plazo, el efecto de ciclos adicionales de congelación y descongelación y el efecto del paso de tubo que esperamos aporte información valiosa para los análisis. De manera adicional, estos estudios de validación deberían realizarse en diferentes laboratorios, datos que, sin duda, incrementarían el valor del ensayo.

Curva de calibrado

El ajuste de las curvas de calibrado se realizó a través de un modelo de regresión logística de cuatro parámetros tanto para ABtest40 como para ABtest42. Con dicho método se cumplieron de forma holgada los requisitos de precisión y exactitud recomendados por las guías internacionales y necesarios para garantizar la fiabilidad del método a lo largo de todo el rango de cuantificación (ver **Tabla 4**). Además, los resultados obtenidos en este estudio han permitido reducir en un punto el rango dinámico de la curva de ABtest42, estableciéndolo entre 1,56 y 100 pg/mL. Este rango de concentración se considera más adecuado que el utilizado hasta el momento (3,13 a 200 pg/mL), dados los bajos niveles endógenos de A β 42 en la matriz plasmática. Por ejemplo, en el estudio de las muestras de la cohorte AIBL reflejado en este trabajo, los niveles promedio \pm SD de A β 42 fueron $9,1 \pm 4,1$ pg/mL en la matriz de plasma y $7,0 \pm 5,6$ pg/mL en la matriz de plasma diluido ($21,0 \pm 16,7$ pg/mL tras aplicar el correspondiente factor de dilución). Con el nuevo rango dinámico de ABtest42, la cuantificación de este péptido en las muestras de los estudios se desplaza hacia una zona más central de la curva y se aleja de la zona con las concentraciones más bajas en la que tanto el error aleatorio como el error sistemático tienden a ser más elevados.

En lo que respecta a A β 40, los niveles promedio de las muestras de la cohorte AIBL fueron de $115,2 \pm 41,8$ pg/mL en plasma sin diluir y $81,7 \pm 23,9$ pg/mL en plasma diluido ($245,2 \pm 71,7$ pg/mL tras aplicar el factor de dilución). Por tanto, en este tipo de ensayo, las muestras suelen localizarse en la zona superior del rango, donde la incertidumbre es menor.

También como ejemplo para evaluar la idoneidad de los rangos dinámicos elegidos, del total de las muestras analizadas de la cohorte AIBL, para la matriz de plasma sin diluir, el 98 y 95 % de ellas se encontraron dentro de los rangos de las curvas de calibrado de ABtest40 y ABtest42, respectivamente. En la matriz de plasma diluido, estos datos se corresponden con un 99 y un 97 %, respectivamente. A pesar de que dicha cohorte está formada únicamente por individuos cognitivamente sanos, tanto la bibliografía (Fukumoto *et al.*, 2003; Tamaoka *et al.*, 1997; Vanderstichele *et al.*, 2000) como resultados anteriores de nuestro laboratorio (Perez-Grijalba *et al.*, 2013; Pesini *et al.*, 2012) indican que los niveles de A β 40 y A β 42, sean de controles sanos, de pacientes con DCL o de pacientes con la EA, se encuentran dentro del mismo orden de magnitud, existiendo incluso solapamiento entre los diferentes grupos de diagnóstico. Por ello, se prevé que la cuantificación de A β en muestras de pacientes también se localizará dentro del rango de cuantificación de las curvas de calibrado utilizadas. En conjunto, todos estos datos sugieren que los rangos de concentración de las curvas de calibrado de ABtest40 y

Discusión

ABtest42 son adecuados para los niveles de péptido endógeno presentes en las muestras de los estudios.

Especificidad

El estudio de la caracterización del epítipo del nuevo anticuerpo monoclonal de producción interna 1F3 resultó en el reconocimiento de un epítipo de A β muy similar al del anticuerpo monoclonal comercial 6E10 que se tenía en uso. Ambos anticuerpos reconocen no sólo el péptido A β completo por su extremo N-terminal (A β 1-40), sino también los péptidos A β 2-40, A β 3-40 y [Pyr3] A β 3-40, truncados en el extremo N-terminal de A β 1-40. La principal diferencia entre ellos radica en que el anticuerpo 6E10 reconoce parcialmente el péptido A β 4-40, mientras que 1F3 necesita la presencia del glutámico de la posición 3 de la secuencia de A β 1-40, aunque esté en su forma de piroglutámico, para poder reconocer el correspondiente péptido A β (**Tabla 5**). Aunque estos experimentos se llevaron a cabo analizando péptidos acabados en el aminoácido 40 del extremo C-terminal y, por tanto, se utilizó el kit ABtest40, los resultados obtenidos son extrapolables a ABtest42 ya que ambos kits comparten el anticuerpo 1F3.

El anticuerpo 1F3 no reconoce ni el péptido A β 4-40 ni tampoco el péptido A β 11-40. De estos resultados se puede deducir que 1F3 tampoco reconocerá los péptidos A β que comienzan en los aminoácidos 5 a 10. Asimismo, 1F3 no reconoce el péptido A β murino, que difiere en los aminoácidos 5, 10 y 13 con respecto a la secuencia humana (ver **Figura 20**). Esto indica que el aminoácido 5 de la secuencia de A β 1-40 se encuentra dentro del epítipo de 1F3 y que el cambio de una arginina por una glicina en esa posición 5 modifica la afinidad de 1F3 por el extremo N-terminal de A β . Esto último tiene consecuencias importantes a la hora de trabajar con muestras de ratones transgénicos, ya que ABtest sólo podrá detectar el péptido A β humano, originado como consecuencia de la expresión del gen humano (transgén) introducido en el ratón transgénico, pero no será capaz de reconocer el péptido A β murino en las muestras de los ratones que no contienen el transgén (los ratones *wild type*).

En resumen, el epítipo del anticuerpo 1F3 requiere la presencia del aminoácido Glu-3 de la secuencia de A β 1-40 para el reconocimiento de los distintos péptidos A β .

En lo que respecta a la especificidad de los anticuerpos con afinidad por el extremo C-terminal, los resultados obtenidos confirman que el anticuerpo anti-A β 40 (pAB002) es específico del péptido A β que termina en el aminoácido 40 y el anticuerpo anti-A β 42

(pAB031) es específico del péptido A β que termina en el aminoácido 42, no existiendo reactividad cruzada entre estos péptidos ni tampoco con otros péptidos de longitud similar. Esta especificidad de los anticuerpos anti-A β 40 y anti-A β 42 por sus péptidos diana es muy importante ya que permite determinar las ratios A β 42/A β 40. En base a resultados obtenidos no sólo por nosotros, sino también por otros grupos de investigación (Chouraki *et al.*, 2015; Kaffashian *et al.*, 2015; Koyama *et al.*, 2012; van Oijen *et al.*, 2006), estas ratios podrían presentar un futuro prometedor como biomarcadores de la EA, tanto en el plasma como en el LCR, ya que su evaluación puede llegar a reflejar, de una forma más robusta a la actual, lo que podemos denominar como la fisiopatología intrínseca del beta-amiloide.

De manera adicional, los experimentos de interferencia por adición exógena de péptidos A β demostraron que la presencia en las muestras de plasma y plasma diluido de otros péptidos de secuencia similar al péptido diana no interfieren en el reconocimiento de éste último: el porcentaje de recuperación se mantuvo cercano al 100 % en todos los casos (**Tabla 6**), lo que indica que la presencia de péptidos similares en la muestra no dificulta el reconocimiento del péptido diana en los ensayos con nuestros kits ABtest.

En definitiva, los kits ABtest40 y ABtest42 no sólo reconocen las formas completas de los péptidos amiloides A β 1-40/42 sino que también reconocen las formas de A β más cortas, truncadas en el extremo N-terminal, como son A β 2-40/42, A β 3-40/42 y [Pyr3] A β 3-40/42. El reconocimiento de estos últimos péptidos podría albergar una importancia diagnóstica relevante ya que se ha descrito que la isoforma [Pyr3] A β 3-X tiene una mayor tendencia a agregar y es más estable y tóxica que la isoforma prototipo de A β (ya sea A β 40 o A β 42), representando además una fracción importante de los péptidos A β presentes en las placas seniles (D'Arrigo *et al.*, 2009; Wirths *et al.*, 2010; Wittnam *et al.*, 2012). Además, en el LCR los péptidos A β con el extremo N-terminal truncado son más frecuentes en los enfermos de Alzheimer que en los controles (Tamaoka *et al.*, 1997), por lo que el reconocimiento de todos estos péptidos y no sólo de las isoformas prototipo A β 1-40/42 podría darle a ABtest un valor añadido.

Sensibilidad

El estudio de la sensibilidad de ABtest se llevó a cabo mediante dos tipos de aproximación.

Discusión

En la primera de ellas, se calculó la MDD (mínima dosis detectable) considerando únicamente el dato de la señal promedio y la SD de varias réplicas del blanco. Este modelo de la MDD es similar al cálculo experimental del LB (límite del blanco) descrito en el apartado de Materiales y Métodos y es el de elección por numerosos laboratorios comerciales para el establecimiento de la sensibilidad de sus kits. No obstante, esta metodología asume que los resultados para muestras con niveles bajos de analito y para las muestras sin analito (blancos) siguen el mismo tipo de distribución simétrica y gaussiana. Además, se trata de una aproximación teórica sin evidencia objetiva que demuestre que realmente una muestra con una concentración baja de analito producirá realmente una señal distinguible del blanco. Como consecuencia, los parámetros obtenidos con esta aproximación son menores, aportando un dato de sensibilidad que se encuentra sobreestimado cuando lo comparamos con los niveles de sensibilidad calculados con procedimientos estadísticos más rigurosos. Para ABtest40 y ABtest42 se obtuvo como MDD niveles de concentración de 4,41 y 2,30 pg/mL, respectivamente.

Para disponer de un dato más real o fidedigno de la sensibilidad de ABtest, ésta se calculó también siguiendo un procedimiento experimental exhaustivo dividido en varios pasos secuenciales que incluyeron el establecimiento primero del LB y después del límite de detección (LD) del ensayo. Esta aproximación incrementa la robustez y la confianza de nuestra estimación, ya que asume que el solapamiento existente entre las respuestas analíticas del blanco y de las muestras con concentraciones muy bajas de analito es una realidad estadística. Por ese motivo utiliza el LB como un punto de referencia razonable para estimar el LD. Además, como esta aproximación empírica utiliza datos objetivos para comparar la respuesta analítica del blanco y de muestras con concentraciones bajas de analito, permite determinar de manera concluyente qué concentración de analito es necesaria para distinguir su presencia de su ausencia. Finalmente, tomando como referencia el LD calculado de forma empírica, se establece la mínima concentración de analito que puede ser cuantificada de forma precisa y exacta por nuestro método. Siguiendo esta metodología se han establecido los límites de cuantificación de nuestros ensayos en 7,60 pg/mL para ABtest40 y 3,60 pg/mL para ABtest42.

En la cohorte de individuos de AIBL seleccionados para el estudio de las ratios plasmáticas como biomarcadores de la EA, sólo un 1,1 % de las muestras de plasma sin diluir y un 0,6 % de las muestras de plasma diluido presentaron niveles de A β 40 por debajo del límite de cuantificación del ensayo. Sin embargo, en el caso de ABtest42, al ser los niveles endógenos de A β 42 más bajos, el 12,4 y 9,7 % de las muestras de plasma y plasma diluido, respectivamente, presentaron niveles inferiores a 3,6 pg/mL. Estos dos últimos porcentajes se reducirían al 8,5 y al 4,1 %, respectivamente, si se considerara el dato menos exigente de la MDD (2,30 pg/mL).

En definitiva, los límites de cuantificación obtenidos experimentalmente para ABtest40 y ABtest42 son adecuados para los niveles endógenos de los correspondientes A β presentes en la matriz de plasma. Además, estos límites están en el mismo rango, siendo más bajos en la mayoría de los casos, que los obtenidos en otros ensayos de cuantificación de A β (**Tabla 30**). No obstante, en nuestro laboratorio seguimos trabajando para intentar mejorar la sensibilidad de nuestros kits (principalmente de ABtest42), de modo que todavía un porcentaje menor de muestras se encuentren por debajo del límite de cuantificación del ensayo.

Con respecto a los datos recopilados en la **Tabla 30**, la inmensa mayoría de trabajos no reflejan la metodología seguida para el cálculo de la sensibilidad reportada (Devanand *et al.*, 2011; Lopez *et al.*, 2008; Mayeux *et al.*, 2003; Mehta *et al.*, 2000; Mehta *et al.*, 2001; Schupf *et al.*, 2008; van Oijen *et al.*, 2006; Yaffe *et al.*, 2011), o simplemente no proporcionan ningún dato de sensibilidad de su ensayo aparte del rango dinámico de la curva estándar (Blasko *et al.*, 2008; Blennow *et al.*, 2009; Figurski *et al.*, 2012; Lachno *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2012). Esto representa una limitación importante para llevar a cabo una comparativa entre los resultados de los diferentes estudios o tipos de ensayo, ya que, tal y como se ha descrito en este trabajo, unas metodologías son más exigentes que otras. Además, dado que tampoco existe un consenso terminológico, lo más probable es que la aproximación metodológica llevada a cabo para calcular, por ejemplo, los límites de detección mostrados, no coincidan entre los diferentes estudios reflejados en la tabla ni se ajuste tampoco al procedimiento experimental exhaustivo desarrollado en este trabajo para el cálculo del LD. Por tanto, aunque posiblemente sean más, solamente en uno de estos trabajos (Vanderstichele *et al.*, 2000) queda reflejado que el cálculo de la sensibilidad se ha llevado a cabo a partir de la metodología “menos exigente”, teniendo en cuenta que aplican un factor de multiplicación de la desviación estándar (blanco + 5*SD) superior al aplicado en nuestro ensayo (blanco + 2*SD). Finalmente, son sólo cuatro los trabajos que indican que el cálculo del límite de cuantificación se ha realizado teniendo en cuenta el criterio de precisión (CV) a ese nivel de concentración (Janelidze *et al.*, 2016a; Lachno *et al.*, 2012; Le Bastard *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2016).

	Sensibilidad* (pg/ml)		Rango de cuantificación (pg/ml)	
	Aβ40	Aβ42	Aβ40	Aβ42
Validación Araclon (MDD)	4,41	2,30	3,13-200	1,56-100
Validación Araclon (LC)	7,60	3,60	3,13-200	1,56-100
Vanderstichele et al., 2000 ^{a,1}		5		
Mehta et al., 2000 ^{a, 2}	20	40		
Mehta et al., 2001 ^{a, 2}	10	5		
Mayeux et al., 2003 ^{a, 2}	5	10		
van Oijen et al., 2006 ^{b, 2}	10	5	10-1000	5-100
Lopez et al., 2008 ^{a, 2}	10	10	5-625	5-625
Schupf et al., 2008 ^{a, 2}	9	10		
Devanand et al., 2011 ^{a, 2}	9	9		
Yaffe et al., 2011 ^{c, 2}	12	5		
Le Bastard et al., 2010 ^{c, 3}	10,1	5,7	11-1023	5-459
Lachno et al., 2012 ^{c, 3}	8	6,3	8,4-1545	7,6-1485
Song et al., 2016 ^{d, 3}		2,8		0,206-50
Janelidze et al., 2016 ^{d, 3}	1,94	0,17		
Blasko et al., 2008 ^a				5-1000
Blennow et al., 2009 ^c			30-3000	15-600
Figurski et al., 2012 ^c			3,75-1256	1,25-530
Shah et al., 2012 ^a			3,9-250	0,49-125
Lachno et al., 2013 ^a			15,6-750	43,9-750

Tabla 30. Sensibilidad y rangos dinámicos de concentración de las curvas estándar de diferentes ensayos de cuantificación de Aβ en plasma. a: ensayo ELISA sándwich colorimétrico; b: Ensayo DELFIA de tipo ELISA basado en la inmunodetección por fluorescencia de tiempo resuelto (TRF); c: ensayo INNO-BIA basado en la tecnología Luminex xMAP; d: Ensayo ELISA digital utilizando la tecnología SIMOA. MDD: mínima dosis detectable. LC: límite de cuantificación. *Las líneas discontinuas dividen las diferentes nomenclaturas referentes al dato de sensibilidad aportado por los diferentes estudios (1: "sensibilidad"; 2: "límite de detección"; 3: "límite de cuantificación").

Reproducibilidad

La precisión de los kits ABtest40 y ABtest42 se ha estudiado de forma exhaustiva a través de medidas repetidas de cinco muestras de plasma y plasma diluido con concentraciones repartidas a lo largo de todo el rango dinámico del ensayo. Como dato promedio de precisión (CV) global, en la matriz de plasma se ha obtenido un 6,1 y 9,0 % para

ABtest40 y ABtest42, respectivamente. Con las muestras de plasma diluido, la variabilidad global media ha sido de 9,0 y 7,3 % para ABtest40 y ABtest42, respectivamente. La variabilidad intra-ensayo e inter-ensayo se ha encontrado siempre por debajo de los límites recomendados por las guías de validación para cada péptido y en cada matriz. Estos resultados son similares a los publicados por otros grupos que utilizan otros ensayos de cuantificación de A β en plasma (**Tabla 31**).

Estudio	CV intra-ensayo (%)		CV inter-ensayo (%)	
	A β 40	A β 42	A β 40	A β 42
Validación Araclon (plasma)	5,9%	6,9%	7,7%	9,1%
Validación Araclon (plasma diluido)	7,1%	6,8%	9,6%	8,7%
Vanderstichele et al., 2000 ^a		5,6%		7,1%
Mehta et al., 2000 ^a		8-14%		10-18%
Lopez et al., 2008 ^a	4,6%	9,3%		
Blasko et al., 2008 ^a		8,2%		17,3%
Shah et al., 2012 ^a			3,1-7,9%	12-20%
Lachno et al., 2013 ^a	2-8%	2-7%	8-9%	7-11%
van Oijen et al., 2006 ^b	4,4%	4,9%	10,1%	14,8%
Blennow et al., 2009 ^c			3-7,3%	1,9-7,2%
Hansson et al., 2010 ^c			6,4%	2,7%
Lewzuck et al., 2010 ^c	1,8-4,1%	1,3-3,8%	2,2-10,4%	2,3-11,5%
Le Bastard et al., 2010 ^c			4,0-9,4%	
Yaffe et al., 2011 ^c	3,5%	2,3%	9,9%	9,3%
Figurski et al., 2012 ^c			6,4%	4,8%
Lachno et al., 2012 ^c	2-9%	1-7%	7-10%	5-17%
Rembach et al., 2014 ^c	3,4%	2,3%		
Kaffashian et al., 2015 ^c			10,8%	11,2%
Chouraki et al., 2015 ^c	3,2%	2,6%	10,5%	7,6%
Song et al., 2016 ^d		0,1-8%		2-8%
Janelidze et al., 2016 ^d		<10%		<10%

Tabla 31. Parámetros de reproducibilidad de diferentes ensayos de cuantificación de A β en plasma. CV: Coeficiente de variación. Las líneas discontinuas separan los distintos tipos de ensayo: a: ensayo ELISA sándwich colorimétrico; b: Ensayo DELFIA de tipo ELISA basado en la inmunodetección por fluorescencia de tiempo resuelto (TRF); c: ensayo INNO-BIA basado en la tecnología Luminex xMAP; d: Ensayo ELISA digital utilizando la tecnología SIMOA.

Discusión

Asimismo, el estudio de la reproducibilidad inter-lote de ABtest ha proporcionado datos de precisión dentro de los límites recomendados por los organismos internacionales, siendo los CV promedio siempre inferiores al 11 %. Tal y como se ha mencionado, el hecho de trabajar con un anticuerpo monoclonal de producción interna nos permite controlar tanto todos los pasos de su desarrollo como todos los procesos que pueden introducir diferencias entre lotes, lo que, probablemente, ha favorecido la reducción de la variabilidad inter-lote.

Salvo algunas excepciones, la mayor variabilidad encontrada en nuestros ensayos se observa en las muestras con niveles cercanos al LIC del ensayo. Estos resultados no son inesperados ya que se trata de una zona donde la cuantificación de A β se vuelve más exigente. En lo que respecta al resto de concentraciones, la variabilidad se mantiene más o menos constante entre las muestras. De manera adicional, no se observan grandes diferencias en los resultados obtenidos para la matriz de plasma y la de plasma diluido, ni para A β 40 y A β 42. De hecho, en el caso de A β 40 la variabilidad es en general mayor en las muestras de plasma diluido en comparación con las de plasma, pero en el caso de A β 42 la tendencia es la contraria. Con respecto a esto, es cierto que la matriz de plasma diluido es una muestra menos compleja por tener diluidos los componentes de la matriz y, por tanto, podría esperarse una variabilidad menor. Sin embargo, la preparación de este tipo de muestras implica un paso de manipulación adicional a la hora de realizar la dilución, lo cual podría aportar cierta variabilidad extra.

Por último, la reproducibilidad de ABtest40 y ABtest42 se estudió con muestras procedentes de estudios clínicos en dos tipos de aproximaciones: reproducibilidad test-retest intra-estudio e inter-estudio. Los resultados obtenidos en la primera de estas aproximaciones reflejaron una muy buena concordancia entre ambas cuantificaciones, con CCI >0,9 en todos los casos (ver **Tabla 13**). Además, el CV promedio entre ambas medidas fue siempre inferior al 10 % (5,68 % para A β 40 y 9,58 % para A β 42 para las muestras de plasma diluido). Estos resultados reflejan una excelente reproducibilidad de nuestros kits a lo largo de un estudio, permitiendo comparar las cuantificaciones de muestras analizadas en diferentes placas y ensayos, algo irremediable cuando se trabaja con un número elevado de muestras. Además, los valores obtenidos son similares a los descritos por otros autores que, tras realizar una evaluación test-retest de 195 muestras de plasma diluido, obtuvo CV promedios de 7,2 % para A β 40 y 4,5 % para A β 42 (Figurski *et al.*, 2012).

La comparación de medidas repetidas inter-estudio requirió una mayor exigencia: los análisis no sólo se realizaron utilizando dos lotes diferentes de ABtest, sino que además las determinaciones se realizaron con 18 meses de separación. A pesar de estas premisas,

los resultados para ABtest40 (plasma y plasma diluido) y para plasma sin diluir de ABtest42 mostraron CCI $>0,8$, lo que indica una concordancia muy buena entre ambos análisis. Únicamente la determinación de A β 42 en muestras de plasma diluido reflejó un CCI = 0,653, indicando una concordancia entre ambas determinaciones medianamente buena pero más baja que las otras tres medidas, lo que podría justificarse por tratarse de una determinación más exigente: niveles más bajos de analito y manipulación adicional de la muestra para realizar la dilución. No obstante, en todos los casos el CV promedio se mantuvo inferior al 20 %, es decir, por debajo de lo considerado como conforme. Todos estos resultados reflejan una reproducibilidad aceptable para comparar resultados obtenidos en diferentes estudios, lo que a su vez refleja una baja variabilidad entre lotes diferentes producidos con, al menos, 18 meses de separación.

Todos los resultados anteriormente descritos indican que los kits ABtest40 y ABtest42 son herramientas robustas, que muestran una alta reproducibilidad para la cuantificación de A β 40 y A β 42 en muestras de plasma y plasma diluido. No obstante, somos conscientes de que la valoración de la precisión de ABtest debería completarse con un estudio de la reproducibilidad inter-laboratorio. De esta manera podría valorarse cómo afecta el cambio de material, equipos e investigador a la reproducibilidad de nuestro ensayo. Actualmente en nuestro laboratorio ya estamos trabajando en una automatización del ensayo que aumente el rendimiento y reduzca la variabilidad debida a factores externos, como por el ejemplo, el operador que maneja las muestras o las condiciones ambientales y experimentales del laboratorio.

Exactitud

El principal problema al que nos enfrentamos a la hora de evaluar la exactitud de ABtest es que no existe un método analítico de referencia para la cuantificación de A β en muestras de plasma. Además, debido al efecto matriz propio de los fluidos biológicos, también resulta imposible valorar la exactitud de ABtest utilizando muestras con una concentración determinada (teórica) de péptido añadido.

La manera en la que se llevó a cabo el estudio de la exactitud de los kits ha sido la utilizada por otros grupos de investigación (Lachno *et al.*, 2012) y consistió en llevar a cabo una determinación inicial de la concentración teórica de las muestras de trabajo con el mismo método con el que se evalúa la exactitud. Para solventar las limitaciones de esta aproximación, la determinación de la concentración teórica se realizó en un proceso independiente en el que se emplearon diferentes lotes de ABtest. Además, se analizaron

Discusión

múltiples réplicas de las muestras en varios ensayos con el objetivo de obtener un dato robusto de la concentración real de péptido en la muestra, disminuyendo la posible influencia de factores externos que puedan afectar a la medida. Una vez establecido el dato de la concentración teórica de las muestras, se analizaron un total de 36 réplicas de cada una de ellas en seis ensayos independientes utilizando un lote de ABtest diferente a los utilizados para establecer la concentración teórica. Esta metodología incrementa la fiabilidad de los resultados de exactitud obtenidos en este apartado, ya que dicho parámetro se evaluó con un lote de ABtest distinto y en ensayos de cuantificación independientes a los llevados a cabo para determinar la concentración teórica.

Con las muestras de la matriz de plasma sin diluir, únicamente un 1,7 % y un 6,7 % de los datos obtenidos en ABtest40 y ABtest42, respectivamente, se encontraron fuera de los límites de conformidad previamente establecidos. De todos estos resultados anómalos, la mayoría se observaron para las muestras de concentración más baja y se situaron cerca de los límites de conformidad (ver **Figura 28**). Sólo de forma aislada se obtuvieron resultados con un sesgo muy notable. En el caso de la matriz de plasma diluido, el porcentaje de resultados que no cumplieron los criterios de aceptación ascendió al 6,1 % para ABtest40 pero se redujo al 5 % para ABtest42. De nuevo, los datos con un sesgo mayor se observaron en las muestras con los niveles de concentración más bajos y normalmente se concentraron cerca de los límites de conformidad. No obstante, es importante señalar que no existe un sesgo sistemático que indique que ABtest está constantemente sobrevalorando o infravalorando la concentración de las muestras, independientemente del rango de concentraciones evaluado.

Por tanto, a pesar de la existencia de algunos resultados que presentan un cierto sesgo en la cuantificación, los kits ABtest40 y ABtest42 miden con suficiente exactitud la concentración de péptidos A β en las matrices de plasma y plasma diluido. Tal y como refleja la **Tabla 15**, el error relativo promedio de todas las determinaciones fue igual o inferior al 10 % para los dos kits y para ambas matrices estudiadas. Este dato no sólo es muy inferior al máximo recomendado por las guías de regulación de la industria farmacéutica para los bioanálisis (ER \leq 20 %, permitiéndose el 25 % para la muestra "LIC"), sino que además es similar a lo obtenido por otros grupos que han validado sus métodos para la cuantificación de A β en el plasma como, por ejemplo, lo publicado por *Lachno et al.* en su trabajo de 2012, utilizando el inmunoensayo INNO-BIA basado en la tecnología Luminex xMAP. Estos autores mostraron datos de exactitud intra-ensayo con ER (%) de entre -35 y 22 e inter-ensayo de entre -17 y 8 (*Lachno et al.*, 2012). Estos mismos autores, en su estudio publicado en 2013, en el que utilizaron un ensayo de tipo ELISA sándwich en superficie sólida (Innotest) mostraron datos de exactitud intra-ensayo en plasma con ER (%) en el rango de -6 a 13 % (*Lachno et al.*, 2013)

Cuando se valora en conjunto el error sistemático y aleatorio cometido, es decir, el error total de la cuantificación, los resultados obtenidos se encuentran muy por debajo de los límites establecidos por las guías de validación: las muestras "LIC" no llegan al 30 % de error total (aceptándose hasta un 40 %), mientras que casi la totalidad de las otras muestras reflejan un resultado inferior al 20 % (siendo 30 % el valor máximo permitido). Por tanto, estos resultados indican la buena exactitud global de nuestros kits.

No obstante, conviene señalar que el dato de concentración teórica de las muestras con niveles "cercaos al LIC" (por ejemplo, 16,09 pg/mL de A β 40 y 6,56 pg/mL de A β 42 en las muestras de plasma sin diluir; ver **Tabla 15**), utilizadas para evaluar el criterio de exactitud de ABtest40 y ABtest42, presentan niveles de concentración ligeramente elevados si los se comparan con los límites de cuantificación obtenidos en nuestros mismos ensayos (ver **Tabla 11**). El gran volumen de muestra necesario para realizar estos análisis y la dificultad de encontrar muestras con niveles endógenos de A β tan bajos limita este tipo de estudios. En cualquier caso, se ha demostrado que los kits ABtest40 y ABtest42 son herramientas precisas y exactas para la cuantificación de A β en muestras de plasma y plasma diluido a lo largo de todo el rango de la curva, presentando resultados que se encuentran muy por encima de los criterios de aceptación establecidos, con lo que se esperarían resultados dentro de la conformidad si se trabajara con muestras con niveles de A β ligeramente inferiores a los utilizados.

Por último, el proceso de producción de diferentes lotes de ABtest incluye una serie de controles de calidad con los que se pretende garantizar que el nuevo lote producido cumple con unos requisitos de precisión y exactitud previamente establecidos. Para ello, en nuestro laboratorio se trabaja con estándares internos, controles de calidad y muestras de plasma y plasma diluido de concentración conocida y se utiliza siempre un lote de ABtest en uso como referencia.

Recuperación y efecto matriz

El péptido A β se encuentra en la matriz plasmática acompañando a otros componentes, como por ejemplo proteínas plasmáticas, que podrían dificultar el reconocimiento de este analito en un inmunoensayo como es ABtest. Además, en la bibliografía está descrito que el péptido A β interacciona con algunos componentes de la matriz plasmática (Biere *et al.*, 1996; Kuo *et al.*, 1999) como la albúmina (Costa *et al.*, 2012), proteína mayoritaria en este fluido. Ello, junto con su capacidad de oligomerizar, podría dificultar o impedir el reconocimiento de este péptido en un ensayo de tipo ELISA

Discusión

sándwich, debido al más que probable enmascaramiento, interceptación o bloqueo de sus epítomos. Para averiguar si ABtest es capaz de cuantificar todo el péptido endógeno presente en las muestras de plasma, se llevaron a cabo experimentos de recuperación y linealidad.

El estudio de la recuperación de péptido exógeno evidenció la presencia de un efecto matriz importante en las muestras de plasma sin diluir, ya que únicamente el 60 % del péptido añadido pudo cuantificarse (**Tabla 16**). Estos resultados indicarían que cuando trabajamos con muestras de plasma sin diluir, un porcentaje elevado de péptido endógeno presente en la muestra (~40 %) no estaría siendo detectado en el inmunoensayo. Sin embargo, en estos mismos experimentos también se demostró que cuando las muestras de plasma se diluyen 1/3 en el SSD, la recuperación del péptido exógeno añadido aumentó hasta un 95 %. Por lo tanto, estos datos indican que la dilución del plasma con este tampón elimina prácticamente por completo el efecto matriz interferente que se observa en la muestra de plasma sin diluir y sugieren que estas condiciones son las mejores para cuantificar los niveles más elevados de péptido endógeno en este tipo de inmunoensayos.

De manera adicional a los experimentos de recuperación, se llevó a cabo el estudio de la linealidad mediante diluciones seriadas de muestras de plasma con SSD o con PBS. Los datos obtenidos están en consonancia con los resultados del estudio de recuperación: tras aplicar el correspondiente factor de dilución, la concentración de A β en las muestras de plasma diluidas 1/3 en SSD es superior, a veces muy superior, a la concentración estimada en la muestra de plasma sin diluir, indicando que parte del péptido que circula en la sangre no se cuantifica en la matriz de plasma no diluida. Asimismo, la diferencia de comportamiento observada al diluir las muestras de plasma con un tampón salino (PBS) o con el SSD, que contiene detergente, sugiere que este último tampón podría estar liberando de algún modo las interacciones entre el A β y los otros componentes de la matriz, permitiendo de esta manera el reconocimiento de la fracción de péptido que permanecía inaccesible.

El comportamiento diferencial observado entre el SSD y el PBS también se ha demostrado en experimentos de recuperación no recogidos en este trabajo. En ellos se observó que la recuperación de péptido exógeno en muestras de plasma diluidas 1/3 en PBS sólo aumenta ligeramente con respecto al porcentaje de recuperación obtenido en la matriz de plasma sin diluir, pero nunca alcanza el 95 % obtenido al diluir con SSD. Todos estos resultados indican que la simple dilución de la muestra de plasma no es suficiente para cuantificar todo el péptido endógeno presente en la misma, sino que es necesaria la adición de un detergente al tampón de dilución para liberar el A β de su unión con otros

componentes de la matriz y favorecer el desenmascaramiento de los epítomos inicialmente inaccesibles.

La dilución 1/3 evaluada en estos experimentos se eligió en base a resultados previos que la posicionaban como la más adecuada para cuantificar la totalidad del péptido presente en la muestra, sin necesidad de comprometer la señal al realizar diluciones mayores. De hecho, en la **Figura 30** se observa cómo una dilución mayor de la muestra de plasma con SSD no supone ninguna ventaja con respecto a la dilución 1/3, ya que la concentración máxima de péptido se suele obtener con dicha dilución. Además, en los experimentos de recuperación se ha comprobado que con la dilución 1/3 se recupera prácticamente el 100 % del péptido exógeno añadido, por lo que no es necesario realizar una dilución mayor que, además, podría ser desaconsejable con los niveles tan bajos de péptido endógeno con los que se trabaja al manejar muestras de plasma.

Tanto los aspectos relacionados con la recuperación, como la falta de linealidad observada con la dilución de las muestras han sido también descritos por otros grupos de investigación que trabajan con inmunoensayos para la determinación de A β en la matriz plasmática, sugiriendo la presencia de un efecto matriz interferente en muestras no diluidas (Lachno *et al.*, 2012; Okereke *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2016). Los resultados descritos en este trabajo indican que la evaluación de la concentración de A β únicamente en la muestra de plasma sin diluir no informa de la totalidad del péptido presente en la muestra, ya que únicamente el péptido libre o directamente accesible en el plasma podría ser capturado en el inmunoensayo. Aunque esta metodología es la elegida por algunos grupos de investigación (Cosentino *et al.*, 2010; Lopez *et al.*, 2008; Mehta *et al.*, 2000), otros grupos sí que trabajan con muestras diluidas en tampones que incluyen detergentes (Blennow *et al.*, 2009; Janelidze *et al.*, 2016a) e, incluso, han mostrado un rendimiento máximo al realizar una dilución 1/3, de manera análoga a lo que ocurre con ABtest (Hansson *et al.*, 2010; Lachno *et al.*, 2009). Además, este efecto es ampliable a la matriz de LCR en la que también está descrito un aumento de los niveles cuantificables de A β 42 cuando la muestra se diluye 1/3 en un tampón con detergente en comparación con la muestra no tratada (Bjerke *et al.*, 2010). En dicho trabajo, los autores también consideran que la presencia del detergente en el tampón de dilución es la responsable de la disociación del A β de otras proteínas de la matriz, o incluso de la liberación del A β de los posibles oligómeros.

El hecho de que algunos centros de investigación realicen o no un pre-tratamiento de la muestra (dilución) previo al análisis, así como el tipo de tampón utilizado para llevar a cabo esta dilución puede estar aportando variabilidad a los resultados obtenidos por los diferentes laboratorios. Nuestra perspectiva con respecto a este asunto es que la

Discusión

utilización de ambas medidas de A β en el plasma (plasma diluido y plasma sin diluir) permite obtener un conocimiento más profundo del comportamiento de A β en esta matriz, integrando en el análisis no sólo el A β que está directamente accesible en el plasma, sino también el que se encuentra interaccionando con otros componentes de la matriz plasmática. De hecho, aunque el uso de ABtest como herramienta diagnóstica todavía se encuentra en fase de desarrollo, resultados previos en estudios piloto animan a pensar que el estudio de ambas determinaciones podría tener una mayor significación biológica e incluso diagnóstica (Fagan *et al.*, 2015; Perez-Grijalba *et al.*, 2013; Pesini *et al.*, 2015; Pesini *et al.*, 2012). Asimismo, hay estudios que consideran que en condiciones fisiológicas existe un equilibrio entre las formas libres y las que se encuentran interaccionando con otras proteínas de la matriz, de modo que la disrupción de este equilibrio podría ser un indicador de la patogénesis y progresión de la enfermedad (Kuo *et al.*, 2000). Es decir, podría ocurrir que el hecho de tener una proporción más elevada de A β libre, capaz de agregar o re-entrar en el cerebro tuviera una mayor relevancia patológica que los niveles absolutos totales de A β (Deane *et al.*, 2003). Además, también se cree que la proporción de péptidos unidos a componentes plasmáticos podría reflejar más eficazmente la capacidad de eliminación de A β de un individuo (Sagare *et al.*, 2011), ya que la formación de complejos "péptido A β -proteína" podría dificultar su movimiento hacia el SNC. En relación con esto, un estudio mostró que, en individuos con DCL y con la EA, los niveles de A β 40 y A β 42 libres en plasma son más elevados debido al incremento de la proteína sLRP (forma circulante soluble de la "*lipoprotein receptor-related protein*") en su versión oxidada. Aunque la sLRP tiene un porcentaje muy elevado del A β circulante dificultando o impidiendo que éste acceda al cerebro, cuando esta proteína se oxida pierde su capacidad de interaccionar con A β resultando en un incremento de las formas libres del péptido (Sagare *et al.*, 2011). Por lo tanto, los cambios en la abundancia relativa y la distribución de los péptidos en el plasma podrían reflejar más eficazmente la progresión de la EA que los niveles absolutos de A β . No obstante, es necesario realizar más estudios en el futuro para confirmar estas hipótesis.

Efecto de los factores pre-analíticos en la cuantificación de A β en plasma

Existen diferentes biomarcadores potenciales de la EA que podrían ser útiles para llevar a cabo una detección temprana de la enfermedad, así como para monitorizar los efectos bioquímicos de los fármacos que se están desarrollando. Sin embargo, la variabilidad inter-ensayo e inter-laboratorio causada por factores pre-analíticos, analíticos y post-

analíticos, así como la propia variabilidad inter-lote de los kits con los que se trabaja, dificulta la utilidad de estos biomarcadores en estudios multicéntricos y longitudinales.

En este trabajo se ha estudiado el efecto que tienen diferentes factores pre-analíticos técnicos sobre la cuantificación de los niveles de A β en las muestras de plasma y plasma diluido. La valoración de estos procesos pre-analíticos se considera necesaria para minimizar el número de errores y reducir la variabilidad general de la cuantificación con el objetivo de mejorar la reproducibilidad de las medidas, aportar un mayor grado de exactitud en la cuantificación de los analitos y disminuir el riesgo de obtener resultados no válidos, como también han indicado otros autores (Rai and Vitzthum, 2006). Además, se ha pretendido mejorar la viabilidad del ensayo en la práctica y reducir los costes asociados a su utilización facilitando la implementación de ABtest en ensayos clínicos multicéntricos que incluyen a muchos individuos.

Tratamiento de la sangre con inhibidores de proteasas (IP) exógenos

La presencia de proteasas en el plasma y la afinidad de algunas de ellas por el péptido A β sugerían que el tratamiento de las muestras de sangre con un *cocktail* de IP exógenos podía tener efectos beneficiosos, especialmente cuando el procesamiento de dichas muestras no puede realizarse de manera inmediata. Sin embargo, este efecto teórico de los IP no se había valorado de forma empírica previamente. Por ese motivo, se estudió el efecto del tratamiento con IP (concretamente, *cOmplete™*, mini tablets; Roche) en la cuantificación de A β 40 y A β 42 en muestras de plasma procedentes de sangres que habían permanecido 8 horas a 4 °C o a RT, o bien 30 horas a 4 °C, frente a alícuotas de esas mismas muestras no tratadas con IP. En estas tres condiciones los resultados obtenidos fueron muy similares: el tratamiento de la sangre con IP exógenos no se tradujo en un incremento de la cuantificación de A β en el plasma o plasma diluido. Concretamente, en lo que respecta a A β 42, los resultados fueron muy heterogéneos entre las muestras analizadas, no reflejando una tendencia beneficiosa (o perjudicial) clara. Además, la mayoría de las diferencias observadas en las muestras con y sin IP fueron pequeñas y podrían explicarse por la propia variabilidad del ensayo. Por otra parte, en lo referente a A β 40, la adición del *cocktail* de IP supuso incluso un perjuicio, ya que implicó una cuantificación de niveles ligeramente más bajos de péptido. Este comportamiento se repitió para la inmensa mayoría de las muestras, en las dos matrices analizadas (plasma diluido o sin diluir), e independientemente del tiempo y la temperatura de conservación de la sangre antes de su procesamiento. Aunque el número de muestras utilizado para este análisis no fue muy elevado (n = 7), la reproducibilidad

Discusión

del efecto, más bien perjudicial, de los IP se observó tras los diferentes protocolos de conservación de la sangre, lo que da un valor añadido a los resultados que, en conjunto, reflejan la ausencia de beneficio del uso de los IP para conservar las muestras de sangre. Como consecuencia, el conjunto de los resultados obtenidos motivó la eliminación de los IP del protocolo de procesamiento de muestras de sangre para la cuantificación de A β en plasma. De esta manera también se evitan problemas de interferencia en caso de que las muestras quisieran utilizarse para algún análisis mediante espectrometría de masas, tal y como se ha explicado anteriormente en el apartado de Materiales y Métodos.

Los comportamientos dispares observados en algunas de las muestras con respecto a las demás, por ejemplo las muestras 2 y 6 con ABtest42, pone de manifiesto la influencia que una determinada matriz individual puede tener en los resultados. Es decir, es posible que estas muestras con resultados dispares de cuantificación de A β contengan algún componente biológico, medicamento o característica intrínseca de la matriz (desconocida para el investigador) que sea la responsable de los resultados obtenidos. Por ello, además de controlar y estandarizar los factores pre-analíticos relacionados con el procesamiento de la muestra, conviene realizar otros análisis bioquímicos adicionales de las muestras y registrar toda la información que pudiera resultar interesante.

El motivo por el cual no se han encontrado diferencias en los niveles de A β de las muestras tratadas y no tratadas con el *cocktail* de IP utilizado en estos ensayos (*cOmplete™*, mini tablets; Roche), o incluso la disminución de los niveles de A β 40 en las muestras tratadas con IP, queda fuera del alcance de este trabajo. Sin embargo, algunas de las posibles explicaciones se detallan a continuación.

Por una parte, estas muestras de sangre se recogieron en tubos que contenían EDTA como anticoagulante, el cual ya es un inhibidor de proteasas que favorece la estabilización de los analitos por sus propiedades secuestradoras de iones de las metaloproteasas, enzimas proteolíticas dependientes de ciertos iones metálicos (Banks *et al.*, 2005; Rai and Vitzthum, 2006). Además, el *cocktail* de IP comercial utilizado en este estudio contiene EDTA (3,7 mg/pastilla; 1 mM en 10 mL de muestra), entre otros componentes. Dado que, tanto NEP como IDE, enzimas típicas degradadoras de A β , pertenecen a esta familia de proteasas dependientes de iones metálicos, parece lógico pensar que el anticoagulante utilizado para la obtención de la fracción plasmática a partir de las muestras de sangre ya esté ejerciendo su papel como inhibidor de proteasas. Por lo tanto, en las muestras no tratadas con el *cocktail* de IP exógenos ya se estaría produciendo una cierta inhibición de las proteasas debido a la presencia del anticoagulante EDTA.

Por otra parte, la presencia de IP endógenos en el plasma podría ejercer un cierto papel en la inhibición de las proteasas con capacidad para degradar A β . Por ejemplo, la α 2-macroglobulina es considerada como el principal inhibidor de metaloproteasas en el plasma (Baker *et al.*, 2002) y, por tanto, podría ser uno de los inhibidores endógenos que estuviera impidiendo, o al menos limitando, la acción de las proteasas. Además, a pesar de que a 4 °C ciertos procesos enzimáticos se ven inhibidos o ralentizados (Holland *et al.*, 2003; Rai *et al.*, 2005), la refrigeración de las muestras no parece ser la responsable de los resultados obtenidos, ya que tampoco se encontraron diferencias en los niveles de A β plasmáticos entre muestras tratadas y no tratadas con los IP exógenos cuando éstas se conservaron a RT.

En la bibliografía existen algunos estudios que sugieren que el tratamiento con IP exógenos no afecta a la composición del proteoma de bajo peso molecular en el LCR (Berven *et al.*, 2007), pero sus efectos apenas se han investigado sobre los niveles de A β en la sangre (Watt *et al.*, 2012). Por tanto, consideramos que los datos del estudio presentado en esta tesis aportan información que podría resultar valiosa para llevar a cabo la estandarización de los protocolos de procesamiento de la muestra de sangre.

Temperatura y tiempo de retardo del procesamiento (TRP) de la muestra

La inclusión en los estudios clínicos de pacientes pertenecientes a centros no preparados tecnológicamente para llevar a cabo un procesamiento inmediato de las muestras suele llevar implícito un retardo en el procesamiento de la muestra. El estudio del efecto que puede tener esta variable sobre los niveles cuantificados de A β en la matriz plasmática se considera indispensable para permitir o no la inclusión de dichos centros en los ensayos clínicos.

Este estudio se desarrolló con siete muestras de controles sanos en ausencia de IP exógenos. En comparación con la muestra control, procesada inmediatamente tras su extracción, aquellas muestras conservadas durante 8 horas a 4 °C antes del procesado reflejaron una reducción promedio de la concentración de A β 40 y A β 42 en plasma sin diluir de un 4,7 y 5,5 %, respectivamente (**Tabla 18**). De promedio, los niveles de A β 42 en esta matriz apenas variaron al prolongar el intervalo de tiempo existente entre la extracción de la muestra y su procesado hasta 30 horas en refrigeración (diferencia = 0,97 %). Tampoco se detectaron cambios importantes de este péptido cuando las muestras se conservaron durante 8 horas a temperatura ambiente (diferencia = -4,35 %). En el caso de A β 40, dicho porcentaje alcanzó el -6,8 % cuando las

Discusión

muestras de sangre se conservaron durante 30 horas en refrigeración y hasta el -11,2 % cuando se mantuvieron 8 horas a RT. En la matriz de plasma diluido, los resultados fueron similares.

En resumen, en el caso de las muestras refrigeradas, las variaciones de concentración de A β tras los diferentes intervalos de tiempo estudiados fueron relativamente pequeñas y además las diferentes muestras siguieron trayectorias heterogéneas (ver **Figura 34**). Por el contrario, en el caso de las muestras conservadas a RT durante 8 horas, se observó una homogeneidad en las trayectorias de todas las muestras: los niveles de A β 40 (pero no de A β 42) siempre fueron inferiores en las muestras que habían permanecido 8 horas a RT (ver **Figura 35**) en comparación con las muestras que se procesaron inmediatamente. Aunque el promedio de las reducciones de la concentración de A β 40 entre ambos tipos de muestras no fue muy elevado (-11,2 % en plasma y -9,9 % en plasma diluido) y de hecho los CV (ver **Tabla S16 de la Información Suplementaria**) se encuentran muy próximos a la propia variabilidad del ensayo (ver **Tabla 12**), la homogeneidad de resultados, con una cierta reducción de los niveles a RT, sugiere que podría existir un efecto negativo. Por tanto, se ha considerado oportuno conservar en todo momento la cadena de frío, desde el momento de la extracción de la sangre hasta el procesamiento de la muestra y posterior almacenaje a -80 °C, aceptándose un TRP de la muestra de hasta 30 horas a 4 °C.

El estudio experimental realizado por Lachno *et al.* también demostró la ausencia de reducción de los niveles de A β en muestras de sangres conservadas hasta 24 horas a 4 °C o hasta cuatro horas a 20 °C. Sin embargo, cuando incrementaron el tiempo de almacenamiento de las muestras conservadas a 20 °C, este grupo también observó recuperaciones menores del analito (Lachno *et al.*, 2009). Otro estudio también concluyó que los niveles de A β (especialmente los de A β 42) son estables en sangre tras un retardo en el procesamiento de la muestra de hasta 24 horas a 4 °C (Okereke *et al.*, 2009). No obstante, estos resultados, que van en consonancia con los obtenidos en esta tesis, contradicen lo indicado por otros autores, que recomiendan que el retardo del procesado de la muestra antes de la cuantificación de A β no supere en ningún caso las dos horas (O'Bryant *et al.*, 2015a; Watt *et al.*, 2012). Ahora bien, Watt *et al.* justifican su recomendación por resultados descritos en otros estudios en los que trabajan con el proteoma del LCR (Berven *et al.*, 2007) o bien para el análisis de muestras de suero por espectrometría de masas (West-Nielsen *et al.*, 2005). Asimismo, en la revisión realizada por O'Bryant *et al.* los autores se basan para sus recomendaciones en los datos generales de prácticas comunes de laboratorio del CLSI (O'Bryant *et al.*, 2015a). Por tanto, aunque el procesamiento inmediato de la sangre es una práctica habitual en numerosos laboratorios que trabajan con A β , los resultados obtenidos en este trabajo indican que

retrasar el procesamiento de la muestra hasta 30 horas supone de promedio un impacto despreciable en la concentración de A β de las muestras. Por otro lado, la posibilidad de aumentar el TRP de la muestra de sangre hasta 30 horas a 4 °C facilita la inclusión en los ensayos clínicos de muestras procedentes de centros relativamente lejanos y asegura un procesado más uniforme en los laboratorios de referencia.

Parámetros de centrifugación de la sangre y presencia de plaquetas en el plasma

El protocolo llevado a cabo para separar la fracción plasmática de la fracción celular es uno de los factores pre-analíticos que más varían de un laboratorio a otro. De hecho, en una revisión bibliográfica relacionada con el A β y la EA, Watt *et al.* revisaron diversas publicaciones y encontraron que se habían utilizado fuerzas de centrifugación tan dispares como entre 130 y 10.000 g, así como tiempos de centrifugación de entre 5 y 30 minutos, siendo lo más habitual 1.000-2.000 g durante 10-15 minutos (Watt *et al.*, 2012).

En los estudios descritos en este trabajo, comprobamos que una centrifugación de 2.500 g durante 15 minutos no es suficiente para eliminar la totalidad de las plaquetas del plasma, sino que bajo estas condiciones en torno a un 20 % de ellas permanecen en la fracción plasmática (**Figura 36**). El aumento del tiempo de centrifugación a 30 minutos, redujo este porcentaje al 5 %. No obstante, para eliminar las plaquetas del plasma por completo se necesitó aumentar tanto la fuerza como el tiempo de centrifugado, de modo que se ha comprobado que un protocolo de 4.000 g durante 30 minutos permite trabajar con plasmas libres de plaquetas.

En la bibliografía se encuentran datos que van en consonancia con lo reflejado anteriormente, ya que se ha descrito que un único paso de centrifugación de las muestras de sangre durante 10 minutos a 2.000 g supone que el 25 % de las plaquetas de la muestra permanecen en la fracción plasmática (Tammen and Hess, 2011). Como alternativa para eliminar las plaquetas remanentes en la muestra, estos autores propusieron la transferencia del plasma a otro tubo para realizar una segunda centrifugación (15 minutos a 2.500 g). Un procedimiento similar también fue evaluado en nuestro laboratorio mediante la realización de dos pasos idénticos y consecutivos de centrifugación del plasma durante 15 minutos a 2.500 g (la misma muestra se centrifugó dos veces seguidas con las mismas condiciones -15 minutos a 2.500 g- cambiando el plasma de tubo tras la primera centrifugación, de modo que en el segundo tubo ya se había eliminado la fracción celular). A pesar de haber separado el plasma obtenido en la primera centrifugación antes de llevar a cabo la segunda, los niveles de plaquetas

Discusión

remanentes en el plasma fueron superiores a los observados con el protocolo de 4.000 g durante 30 minutos (datos no incluidos en este trabajo). En definitiva, para simplificar el procesamiento de las muestras, evitar un paso de tubo adicional de las mismas y asegurarse de trabajar con un plasma libre de dicho componente celular, se adoptó un protocolo de centrifugación de las muestras de sangre de 4.000 g durante 30 minutos y a 4 °C.

Curiosamente, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los protocolos de centrifugación más enérgicos permiten la detección de niveles más elevados de A β 40 y A β 42 en la matriz de plasma sin diluir (**Figura 37, paneles A y C**). En relación con los resultados obtenidos, se planteó la hipótesis de que la presencia de un porcentaje variable de plaquetas en el plasma pudiera explicar las diferencias en los niveles de A β cuantificados con ABtest. Algunos de los motivos que llevaron al planteamiento de esta hipótesis fueron, por una parte, que la presencia de un componente celular podría representar un impedimento estérico que dificultara el reconocimiento del analito por el anticuerpo de captura acoplado a la superficie de la microplaca. Por otra parte, se ha descrito que las plaquetas pueden contribuir al *pool* total de A β presente en la sangre mediante procesos de secreción (Bush *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1995; Schlossmacher *et al.*, 1992; Skovronsky *et al.*, 2001; Slemmon *et al.*, 2007). Por lo tanto, en base a esta última información se podrían haber esperado niveles más elevados de A β en plasmas que contienen plaquetas, pero los resultados obtenidos reflejaron la tendencia contraria: los niveles plasmáticos de A β resultaron ser inferiores en plasmas que contienen plaquetas.

En un estudio realizado por Olsson *et al.* se investigó si los niveles plasmáticos de A β podían ser dependientes de la activación de las plaquetas en dicho fluido. Para ello trabajaron con plasmas ricos y pobres en plaquetas en presencia de agonistas fisiológicos de dicha activación y concluyeron que los niveles plasmáticos de A β no se asocian con la activación de las plaquetas del plasma (Olsson *et al.*, 2003). Ante estos datos, se decidió comprobar la hipótesis del impedimento estérico, nombrado anteriormente, utilizando alícuotas filtradas y no filtradas de plasmas procesados con los dos protocolos más extremos: 15 minutos a 400 g (plasma enriquecido en plaquetas) o 30 minutos a 11.400 g (control; sin plaquetas). La ausencia de diferencias en los niveles de A β 40 en el plasma enriquecido en plaquetas al comparar las alícuotas filtradas y no filtradas (**Figura 38, panel B**), indica que tampoco la presencia de este componente celular en la matriz plasmática justifica los niveles más bajos de A β en las muestras procesadas con los protocolos menos enérgicos. Aunque este efecto sólo se evaluó con el péptido A β 40 dado que se observó un mayor efecto de los diferentes protocolos de centrifugación en lo referente a los niveles de analito cuantificados, puede considerarse que los resultados obtenidos son extrapolables a la determinación de A β 42.

En el estudio realizado en nuestro laboratorio, las alícuotas de plasma se ultracongelaron tras el procesamiento de las sangres y se descongelaron para realizar el ensayo ELISA. Este ciclo de congelación y descongelación supone la lisis de al menos algunas de las plaquetas remanentes en el plasma y, por consiguiente, la liberación de sus componentes citoplasmáticos. Entre estos componentes podrían encontrarse proteasas necesarias para la función anti-hemorrágica de las plaquetas, que podrían estar degradando el A β , lo que justificaría los niveles más elevados de este péptido en muestras de plasma carentes de plaquetas. Además, independientemente de todo lo relacionado con las plaquetas, la composición de la propia matriz plasmática puede variar al estar aplicando diferentes protocolos de centrifugación. Por este motivo, y aunque se trata de una nueva hipótesis cuya confirmación no forma parte de los objetivos de este trabajo, es posible que en las muestras de plasma centrifugadas con los protocolos menos enérgicos puedan estar ocurriendo interacciones inespecíficas entre el A β y otros componentes presentes en este tipo de muestras, pero que están ausentes en las muestras centrifugadas con los protocolos más enérgicos. Esto explicaría que los niveles cuantificados de A β sean más bajos en las muestras de plasma que contienen plaquetas (protocolos de centrifugación menos enérgicos), incluso cuando éstas se han eliminado por filtración (**Figura 39**). De manera adicional, el hecho de que en la matriz de plasma diluido los niveles de A β sean más homogéneos entre los diferentes protocolos (**Figura 37, paneles B y D**) no se contraponen a esta hipótesis, ya que la composición del SSD favorecería la liberación del A β de su interacción con los componentes de la matriz.

En definitiva, los resultados de todos estos experimentos permitieron elegir el protocolo más adecuado para trabajar con una matriz de plasma libre de plaquetas, así como comprobar que la presencia de este componente celular en el plasma no se traduce en la cuantificación de niveles más elevados de A β , sino quizá más bajos. No obstante, los resultados obtenidos han abierto nuevas vías de investigación para identificar qué componentes pueden estar involucrados en las diferencias de concentración de A β observadas entre los diferentes protocolos.

Tipo de anticoagulante

El tipo de fracción sanguínea utilizada para cuantificar los analitos no sólo es importante por su abundancia en cada una de ellas, sino también por el papel que juegan otros aditivos como los anticoagulantes, ya que éstos pueden tener un impacto significativo tanto en la estabilidad como en la cuantificación de los biomarcadores (Butterfield *et al.*, 2011; Narayanan, 1993; O'Bryant *et al.*, 2015b; Weber *et al.*, 2007). En este contexto,

Discusión

algunos estudios proteómicos han demostrado que la adición de EDTA a las muestras de sangre genera un perfil proteico del plasma diferente al que se obtiene cuando se utilizan otros anticoagulantes como el citrato de sodio o potasio, o la heparina (Hsieh *et al.*, 2006). Sin embargo, otros trabajos que han realizado análisis multidimensionales han obtenido un perfil peptídico similar al trabajar con EDTA o con citrato, pero diferente cuando se utiliza la heparina (Tammen *et al.*, 2005).

En este trabajo se evaluaron los niveles de A β 40 y A β 42 en muestras de plasma cuyas sangres se recogieron en tubos de EDTA o de citrato de sodio, obteniéndose una amplia heterogeneidad de resultados. Dado que se conoce que la heparina interacciona con el A β , este anticoagulante no se incluyó en estos experimentos. A pesar de haber corregido el factor de dilución adicional (1/10) que supone trabajar con el citrato de sodio, en las muestras de plasma diluido 1/3 en SSD los datos obtenidos evidenciaron una reducción generalizada de los niveles de analito en las muestras tratadas con citrato de sodio en comparación con las muestras tratadas con EDTA (**Figura 40 paneles B y D, Tablas 20 y 21**), aunque sólo se alcanzó significación estadística en el caso de A β 40.

En la bibliografía está publicada la determinación de niveles anormalmente bajos de múltiples analitos en inmunoensayos que utilizan el citrato como anticoagulante (Haab *et al.*, 2005; Rai *et al.*, 2005). Además, otros estudios en los que se han comparado diferentes anticoagulantes, incluidos el EDTA y el citrato de sodio, han mostrado resultados similares a los obtenidos en nuestro laboratorio para la matriz de plasma diluido (Lachno *et al.*, 2009): niveles de A β más elevados al tratar las muestras con EDTA. La diferencia de resultados obtenidos entre anticoagulantes en el estudio de Lachno *et al.* fue atribuida a la manera en la que el EDTA inhibe el proceso de coagulación, ya que se considera que el efecto secuestrador de iones del EDTA es el más adecuado para favorecer la recuperación de A β de la matriz. Sin embargo, también el citrato inhibe la coagulación y otros procesos enzimáticos mediante su unión a iones como el calcio (Barelli *et al.*, 2007; Tammen and Hess, 2011; Tammen *et al.*, 2005). Además, los resultados obtenidos en los experimentos realizados cuando se utilizó la matriz de plasma sin diluir reflejaron niveles de A β 40 y A β 42 significativamente más elevados al trabajar con el citrato de sodio en comparación con el EDTA (**Figura 40 paneles A y C, Tablas 20 y 21**). Estos resultados difieren de los obtenidos por otros grupos que también utilizaron muestras de plasma sin diluir y describieron niveles más elevados de A β 42 en tubos de EDTA, en comparación con otros anticoagulantes incluido el citrato de sodio (Vanderstichele *et al.*, 2000).

Se desconoce el motivo por el cual al utilizar el citrato de sodio se han obtenido niveles más elevados de A β 40 y A β 42 únicamente en la matriz de plasma sin diluir pero no en la

matriz de plasma diluido. Una posible explicación sería que una ligera dilución del plasma con el citrato de sodio se tradujera en una cierta disminución del efecto matriz descrito en apartados anteriores. No obstante, previamente se ha demostrado que la dilución de la muestra con un tampón salino no tiene este efecto sobre la muestra.

En definitiva, en base a los resultados obtenidos en nuestros experimentos, el uso de EDTA parece más adecuado para analizar los niveles de A β en la matriz de plasma diluido, mientras que el uso del citrato de sodio favorece la cuantificación de niveles más elevados de A β en la matriz de plasma sin diluir. Sin embargo, uno de los grandes problemas de utilizar este último anticoagulante es que estrictamente no permite trabajar con la matriz de plasma sin diluir, ya que el formato de este aditivo lleva implícita la dilución irremediable de la muestra. Además, debe tenerse en cuenta que dicha dilución podría variar entre individuos o extracciones si el volumen de sangre recogida difiriese entre tubos, lo que introduciría una variabilidad adicional entre muestras distinta a los niveles endógenos de péptido. Todo ello, sumado a la acción descrita previamente del EDTA como inhibidor de metaloproteasas, a que la mayoría de centros que trabajan con A β en plasma utilizan este anticoagulante (Watt *et al.*, 2012) y a que se ha considerado como el más adecuado para analizar los niveles de este analito en el plasma (Lachno *et al.*, 2009), se ha decidido utilizar el EDTA como anticoagulante de elección en el protocolo de ABtest.

El conjunto de factores pre-analíticos estudiado en nuestro laboratorio pone en evidencia el impacto que algunos factores independientes a la enfermedad pueden tener sobre los resultados obtenidos al analizar los niveles del péptido A β en el plasma. Sin embargo, el efecto de estas variables pre-analíticas no es exclusivo de este tipo de matriz, sino que numerosos estudios han demostrado el impacto que este tipo de variables, principalmente las relacionadas con la recogida y el manejo de la muestra, ejercen sobre los niveles cuantificados de A β en otros fluidos biológicos como el LCR (Bjerke *et al.*, 2010; Schoonenboom *et al.*, 2005). Debido a su proximidad con el SNC, el LCR ha sido más ampliamente utilizado en lo que respecta a la búsqueda de biomarcadores de la EA. Sin embargo, tampoco el análisis de los niveles de A β en esta matriz se escapa de la variabilidad de resultados entre estudios y entre laboratorios (Lewczuk *et al.*, 2006b; Mattsson *et al.*, 2009b; Verwey *et al.*, 2009). Aunque está ampliamente aceptado que los niveles de A β 42 son más bajos en los individuos con la EA en comparación con los controles, el rango de concentraciones obtenido por los diferentes laboratorios es muy variado, no siempre coincide y los umbrales (*cutoffs*) establecidos difieren entre estudios. Tal y como ocurre con el plasma, además de la posible variabilidad explicada por el uso

Discusión

de diferentes anticuerpos, estándares o calibradores y métodos de análisis, así como por la propia variabilidad encontrada entre lotes de un mismo kit, los factores pre-analíticos también juegan un papel muy importante y han sido sometidos a estudio (Bjerke *et al.*, 2010; Kuhlmann *et al.*, 2016; Leitaó *et al.*, 2015; Lewczuk *et al.*, 2006a; Mattsson *et al.*, 2010; Schoonenboom *et al.*, 2005; Vanderstichele *et al.*, 2012).

Con el objetivo de generar resultados fiables y consistentes entre diferentes estudios que ayuden a clarificar el papel de los biomarcadores en sangre, es necesario el desarrollo de guías para estandarizar los métodos pre-analíticos (Galasko and Golde, 2013; Henriksen *et al.*, 2014; Rembach *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2009; Vanderstichele *et al.*, 2000; Watt *et al.*, 2012), de forma análoga a las iniciativas llevadas a cabo para los biomarcadores de LCR (Carrillo *et al.*, 2013; Mattsson *et al.*, 2011; Mattsson *et al.*, 2013). Como resultado de esta necesidad nacieron dos grupos internacionales, el *Standards for Alzheimer's Research in Blood biomarker* (STAR-B) y el *Blood-Based Biomarkers Interest Group* (BBBIG), pertenecientes a la *Alzheimer's Association International Society to Advance Alzheimer's Research and Treatment* (ISTAART) (O'Bryant *et al.*, 2015a), que trabajan para recopilar la información referente a la variabilidad aportada por los factores pre-analíticos y también procuran que la información referente al origen, adquisición, transporte, procesamiento y almacenaje de las muestras se documente en las publicaciones de los estudios. Araclon Biotech forma parte activa de esos grupos a los que se han comunicado nuestros resultados (Fandos *et al.*, 2014a; Fandos *et al.*, 2014b) y consideramos que estos datos aportan información útil para la redacción de los procedimientos estandarizados relacionados con el procesamiento de las muestras de sangre.

Los índices plasmáticos A β 42/40 como posibles biomarcadores de la EA

En el estudio realizado con muestras de individuos cognitivamente normales de la sub-cohorte de AIBL se utilizó un biomarcador de neuroimagen capaz de reconocer la patología amiloide cortical, para evaluar la utilidad de otro biomarcador potencial de la EA en sangre (A β en plasma), en ausencia de un diagnóstico neuropatológico.

Los resultados obtenidos indicaron que niveles bajos de los índices TP42/40, RP42/40 y DA42/40 se asocian con niveles más elevados de deposición cortical de A β (determinado por PET). Esta asociación inversa fue significativa para las tres visitas analizadas (18, 36 y

54 meses) en el caso de TP42/40 y RP42/40 y para dos de las tres visitas (18 y 54 meses) en el caso de DA42/40 (**Tabla 23**). De manera adicional, cuando el modelo se ajustó con las covariables demográficas más relevantes (edad, género y genotipo ApoE), la asociación inversa entre los niveles plasmáticos y corticales de A β se mantuvo significativa en dos de las tres visitas para TP42/40 (18 y 54 meses) y RP42/40 (36 y 54 meses), y en la visita 18 meses para DA42/40 (**Tablas 24 y 25**).

Por otro lado, los resultados del estudio longitudinal realizado evidenciaron una asociación significativa entre los niveles plasmáticos de A β en la visita inicial (18 meses en este caso) y la trayectoria del biomarcador PET-A β (SUVR/BeCKeT) a lo largo del seguimiento (**Tablas 26 y 27**). Los resultados indicaron que los individuos con los índices plasmáticos A β 42/40 (principalmente TP42/40) más bajos presentaron una deposición cortical de A β más rápida (pendiente de PET-A β SUVR/BeCKeT). Estas evidencias posicionan los índices plasmáticos A β 42/40 como potenciales predictores de las trayectorias individuales de acumulación de A β en la corteza cerebral (PET-A β).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio son concordantes con los resultados de otros estudios que también muestran la existencia de una asociación inversa entre la ratio plasmática A β 42/40 y la carga cerebral de A β fibrilar visualizada mediante PET-A β (Devanand *et al.*, 2011; Janelidze *et al.*, 2016a; Lui *et al.*, 2010; Rembach *et al.*, 2014a; Rembach *et al.*, 2014b), incluso cuando los niveles de A β en plasma se cuantifican con una técnica diferente al ELISA como es la espectrometría de masas (Ovod *et al.*, 2017). Además, nuestros datos son consistentes con los resultados publicados previamente en un estudio con la población AIBL que incluyó tanto sujetos cognitivamente normales, como individuos con DCL y enfermos de Alzheimer (Rembach *et al.*, 2014a). En dicho estudio también se observó una asociación inversa entre las ratios plasmáticas y la carga amiloide cortical determinada por PiB-PET. No obstante, en este estudio se ha ampliado el seguimiento de los individuos desde los 18 hasta los 72 meses y se han utilizado datos de PET-A β obtenidos no sólo con PiB sino también con flutemetamol (SUVR/BeCKeT). A partir de toda esta información, se ha confirmado la asociación inversa entre los índices plasmáticos de A β y su deposición cortical, así como la capacidad de estos marcadores plasmáticos para predecir el curso de la patología amiloide cortical a lo largo del tiempo.

Hasta donde tenemos conocimiento, esta es la primera vez que se estudia la asociación entre los índices plasmáticos y la carga amiloide cerebral en una población de individuos cognitivamente normales y estables. Además, los resultados obtenidos son congruentes con los observados por otros grupos que han descrito una asociación entre niveles bajos de A β 42/40 en plasma y un mayor declive cognitivo en individuos de edad avanzada sin demencia (Yaffe *et al.*, 2011), o entre niveles bajos de A β 42/40 en plasma y un riesgo

Discusión

incrementado de desarrollar la EA (Abdullah *et al.*, 2009; Graff-Radford *et al.*, 2007). Por último, la robustez de esta asociación se ha visto reforzada en los últimos diez años con informes de poblaciones grandes y ampliamente conocidas basados en estudios tales como el Framingham (Chouraki *et al.*, 2015), el Rotterdam (van Oijen *et al.*, 2006), el estudio *Three-City* (Lambert *et al.*, 2009) y el estudio BioFINDER (Janelidze *et al.*, 2016a), así como con las conclusiones obtenidas en un meta-análisis que incluyó 10.303 sujetos procedentes de 13 estudios diferentes (Koyama *et al.*, 2012).

Los resultados de este trabajo, junto con los obtenidos por otros autores, apoyan la hipótesis de que los cambios en los niveles periféricos de A β se asocian con su deposición cortical durante la progresión de la enfermedad, debido posiblemente a la aparición de alteraciones en los mecanismos de eliminación o aclarado de A β (Mawuenyega *et al.*, 2010). Además, la asociación existente entre los niveles plasmáticos y cerebrales de A β sugieren que, a pesar de que el A β presente en el plasma puede proceder de diferentes tejidos periféricos, la fuente mayoritaria de A β en la sangre sería el cerebro (Mayeux *et al.*, 2003).

No obstante, los resultados obtenidos en nuestro estudio son discrepantes con los datos publicados por otros investigadores (Hansson *et al.*, 2012; Hansson *et al.*, 2010; Lopez *et al.*, 2008; Lovheim *et al.*, 2017), poniendo de manifiesto la necesidad de continuar investigando el potencial de los niveles plasmáticos de A β como biomarcadores preclínicos de la EA. Posiblemente, la variabilidad observada entre los diferentes estudios se debe tanto a factores clínicos como metodológicos. En primer lugar, los distintos estudios trabajan con cohortes diferentes que incluyen factores de confusión como la edad, la severidad de la enfermedad (Toledo *et al.*, 2011), o el momento en el que se realiza la recogida de la muestra en función del estadio de la enfermedad (Mayeux and Schupf, 2011). En segundo lugar, los estudios presentan diseños heterogéneos con diferencias en el tamaño de la muestra, la duración del seguimiento y el poder estadístico del estudio. En tercer lugar, el método de referencia utilizado para llevar a cabo la clasificación de los pacientes en los diferentes grupos de diagnóstico también varía entre estudios (Lambert *et al.*, 2009; Lopez *et al.*, 2008; Snyder *et al.*, 2014). Además, el hecho de que la exactitud del diagnóstico clínico no sea perfecta podría introducir individuos mal diagnosticados en el análisis estadístico, lo que estaría sesgando los resultados. Por último, tanto el hecho de utilizar métodos analíticos con diferente sensibilidad, como las diferencias relacionadas con el tratamiento pre-analítico de las muestras de plasma podrían estar contribuyendo a la falta de consistencia encontrada entre los resultados de diferentes laboratorios que utilizan inmunoensayos como método de detección de A β . Todo ello apoya la importancia de establecer unos criterios estandarizados para llevar a cabo una correcta manipulación de la muestra, tanto a nivel

analítico como pre-analítico, de modo que los resultados procedentes de diferentes estudios puedan ser comparables.

El uso de los índices plasmáticos A β 42/40, en comparación con los valores absolutos de cada uno de estos dos analitos por separado, presenta varias ventajas. Por una parte, el uso de este marcador disminuye el efecto de posibles factores externos y atenúa los posibles sesgos introducidos por diferencias en la manipulación de la muestra, ya sea a nivel analítico o pre-analítico (Willemse *et al.*, 2017). Además, este procedimiento permite corregir la variabilidad interindividual aportada por diferencias en la producción general de A β (Janelidze *et al.*, 2016b). En línea con esto, los cambios en la abundancia relativa y distribución de los diferentes péptidos A β en el plasma podrían reflejar de forma más efectiva el proceso patológico que tiene lugar en el desarrollo de la EA (Naslund *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1999). De hecho, algunos autores han considerado que la asociación significativa entre el índice plasmático A β 42/40 y la incidencia de la EA y/o demencia apoya la hipótesis de que la EA se origina como consecuencia de un desequilibrio entre las isoformas A β 40 y A β 42 (Chouraki *et al.*, 2015).

Las ventajas aportadas por el uso de las ratios de A β no se ciñen únicamente al plasma sino que también se han descrito en el LCR (Adamczuk *et al.*, 2015; Blennow *et al.*, 2015b; Chiasserini *et al.*, 2016; Dumurgier *et al.*, 2015; Klafki *et al.*, 2016; Lewczuk *et al.*, 2015; Slaets *et al.*, 2013). En un estudio reciente se compararon los resultados de trabajar con los índices A β 42/40 y A β 42/38 frente al uso del biomarcador individual A β 42 y se encontró que las ratios eran mejores biomarcadores de la patología amiloide, tanto en los estadios de demencia, como en los estadios de predemencia. Por un lado, las ratios mostraron una exactitud mayor a la hora de predecir la acumulación cortical de A β (confirmada por PET-A β), mejorando la correlación entre ambas técnicas. Por otro lado, las ratios diferenciaron mejor la EA de otras demencias, ya que en la neurodegeneración presente en la EA únicamente disminuyen los niveles de A β 42 en LCR, pero no los de A β 40 y A β 38. Sin embargo, cuando existe daño subcortical general disminuyen los niveles de todas las isoformas de A β (Janelidze *et al.*, 2016b). Además, en los sujetos que tienen concentraciones extraordinariamente altas o bajas de A β en el LCR, la normalización de la concentración de A β 42 aplicando la ratio A β 42/40 mejoraría la interpretación de los resultados (Klafki *et al.*, 2016; Lewczuk *et al.*, 2015; Wiltfang *et al.*, 2007)

A pesar de las múltiples ventajas descritas, el uso de los índices plasmáticos de A β con fines diagnósticos sigue siendo problemático debido al fuerte solapamiento que existe en las medidas individuales de A β dentro de los grupos de individuos cognitivamente normales, pacientes con DCL y pacientes con la EA (Hampel *et al.*, 2010b; Kawarabayashi

and Shoji, 2008; Lewczuk *et al.*, 2010; Perez-Grijalba *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2012). Esta situación se refleja en los análisis de la curva ROC de este trabajo, en los cuales el clasificador que incluye el índice TP42/40 (junto con la edad y el genotipo ApoE) alcanzó un 71 % de sensibilidad y un 78 % de especificidad para discriminar a los individuos PET-A β + en el umbral con el máximo índice de Youden. Este rendimiento no es suficiente para un diagnóstico individual, pero esos valores de sensibilidad y especificidad posicionan a los marcadores plasmáticos (particularmente TP42/40) como herramientas útiles para enriquecer las cohortes de los ensayos clínicos en los que participen individuos cognitivamente normales con patología amiloide cortical. Esto, junto con sus ventajas por tratarse de biomarcadores asequibles y no invasivos, podría tener un gran interés en los ensayos clínicos de prevención secundaria que se están fomentando en el campo de la investigación clínica de la EA. La metodología se basaría en un procedimiento secuencial según el cual, una vez pre-seleccionados los individuos en riesgo mediante ABtest, la carga amiloide cortical debería confirmarse mediante PET-A β , pero en un número mucho más reducido de individuos. De esta manera se evitaría la exposición innecesaria de un grupo más o menos numeroso de sujetos a procedimientos invasivos con marcadores radiactivos (en el caso del PET) o con punciones lumbares (en el caso de la extracción de LCR para los análisis de biomarcadores), que además son muy caros y de acceso limitado a un número reducido de hospitales incluso en países desarrollados.

Aunque el índice máximo de Youden es una buena elección para compensar los parámetros de sensibilidad y especificidad, si el objetivo es llevar a cabo un enriquecimiento de la población para un ensayo clínico, este umbral podría no ser el más conveniente. En el ejemplo de reclutamiento hipotético descrito en el apartado de resultados (**Figuras 44, 45 y 46**), se observa más claramente cómo la elección de un punto de corte más elevado podría ser una alternativa más adecuada cuando se persigue dicho objetivo. Esto es debido a que, al aumentar el umbral, aunque se reduce la sensibilidad, aumenta el VPP del test de *pre-screening*, lo que se traduce en una reducción considerable del número de falsos positivos y, por consiguiente, del número de sujetos a los que realizar un análisis confirmatorio PET-A β . Aunque en este ejemplo la diferencia económica que supone esta estrategia (Escenario 3, **Figura 46**) en comparación con la elección del umbral con el índice máximo de Youden (Escenario 2, **Figura 45**) es muy pequeña (**Tabla 29**), el hecho de reducir el número de individuos expuestos a una prueba confirmatoria invasiva como el PET es por sí mismo suficientemente ventajoso. Por otra parte, la estrategia descrita en el Escenario 1 (**Figura 44**), en la cual se elige el punto de corte que maximiza la sensibilidad y el VPN quedaría reservada a estudios con otro tipo de objetivo. Este tipo de escenario sería el más adecuado, por ejemplo, para el cribado de poblaciones de gran tamaño en la atención

clínica primaria. De esta manera, el uso inicial de una prueba asequible y no invasiva con una elevada sensibilidad y VPN permitiría descartar la condición en un grupo de individuos en el que el número de falsos negativos es muy pequeño. Posteriormente, como un segundo paso, se aplicaría una prueba confirmatoria más cara e invasiva al grupo seleccionado para elegir a aquellos individuos que realmente son positivos para la condición de interés.

Teniendo en cuenta todas las rondas de validación cruzada, en el subconjunto de sujetos cognitivamente normales de AIBL se ha alcanzado un VPP medio del 81 % para el punto de corte 1,73. Este dato es más de dos veces superior a la prevalencia de PET-A β positivos en esta población (37,5 %). Por lo tanto, en un escenario de reclutamiento dirigido a personas cognitivamente normales, pero positivas para PET-A β , un paso de *pre-screening* con nuestro clasificador plasmático reduciría el número de sujetos a los que hay que realizar la prueba de neuroimagen a menos de la mitad. Además, el percentil 5 % de este parámetro es superior al 68 % (dato no mostrado) con un nivel de confianza del 95 %. Esto representa un incremento de la capacidad para identificar individuos cognitivamente normales PET-A β + del 81 % con respecto al dato de la prevalencia de la muestra.

En resumen, considerando los requerimientos técnicos y el elevado coste de la prueba PET-A β , en un ensayo clínico de fase III que incluya cientos de sujetos el proceso de selección podría abarataarse considerablemente mediante una pre-selección de los sujetos utilizando el biomarcador TP42/40.

La estrategia de favorecer la elección del umbral con el mayor VPP ya ha sido explorada por otros grupos de investigación que han utilizado otras cohortes como la de ADNI (Insel *et al.*, 2016). En dicha cohorte, que incluye sujetos sanos, pacientes con DCL y pacientes con la EA, otro clasificador que combinó variables demográficas, ApoE y declive cognitivo consiguió una mejora con respecto a la prevalencia de sujetos PET-A β positivos en dicha cohorte del 60 %, (Insel *et al.*, 2016). Estos datos ponen de manifiesto el mayor potencial de nuestro clasificador.

Asimismo, conviene mencionar que la inclusión del índice TP42/40 en el clasificador mejoró la identificación de sujetos positivos en amiloide cortical independientemente del genotipo ApoE. Esto permitiría que la estrategia de reclutamiento no se restringiera a la presencia de un factor de riesgo tal como la isoforma ϵ 4 de ApoE, algo que supondría la selección de una cohorte sesgada y acabaría aportando incertidumbres al trasladar los resultados de los ensayos clínicos a la población general.

Discusión

Por último, no hay que olvidar que todavía queda mucho por descubrir en relación con la fisiopatología de la EA, del porqué de su heterogeneidad en distintos individuos y de los desafíos metodológicos que plantea la evaluación de los biomarcadores. Además, dado el origen multifactorial y complejo de la EA, actualmente sigue siendo cuestionable que un único biomarcador plasmático sea suficiente como para poder realizar el diagnóstico definitivo de dicha patología. Por ejemplo, en un estudio reciente se definió al polipéptido ligero de neurofilamentos (NFL), un marcador de daño neuronal o neurodegeneración, como un biomarcador plasmático potencial de la EA. En dicho estudio se comprobó que los niveles de este analito se encuentran incrementados en pacientes con DCL y con la EA en comparación con los controles. No obstante, este biomarcador no es específico de la EA y al tratarse de un biomarcador de daño neuronal (etapa más tardía en el desarrollo de la EA), no distingue entre controles sanos con y sin patología cerebral amiloide subyacente en las etapas iniciales (Mattsson *et al.*, 2017). En línea con esto, es posible que la cuantificación de otras isoformas de A β en el plasma, como puede ser A β 17 (Perez-Grijalba *et al.*, 2015), también aporten información valiosa para elegir a la población en riesgo o facilitar el diagnóstico de la enfermedad.

En definitiva, es posible que un conjunto de proteínas o biomarcadores sanguíneos, junto con el apoyo de otros biomarcadores no sanguíneos (como, por ejemplo, los de neuroimagen), sirvan en un futuro para diagnosticar la EA, idealmente en una etapa presintomática. En este escenario, se considera que los métodos basados en biomarcadores de sangre puedan servir como el primer paso de un proceso diagnóstico secuencial dividido en varias etapas (Bazenet and Lovestone, 2012; Schneider *et al.*, 2009; Thambisetty and Lovestone, 2010). En relación con esto, se consideran imprescindibles los estudios longitudinales de larga duración, con medidas repetidas, en los que se puedan describir las trayectorias de los biomarcadores periféricos y centrales (Pesini and Sarasa, 2015). De esta manera se podrán intentar diferenciar a los individuos cuya patología cerebral amiloide progresa (acumulan A β), es decir, individuos en riesgo, de los individuos en los que los niveles de A β permanecen estables (no progresan). Esto es especialmente importante ya que cada vez está más ampliamente aceptado que la sensibilidad a la carga amiloide cerebral varía enormemente entre individuos y que la tasa de acumulación cortical de A β a lo largo del tiempo podría ser más relevante que las medidas aisladas de este analito (Insel *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

1.- Los kits ABtest40 y ABtest42 son dos herramientas fiables, sensibles y robustas para la cuantificación de los péptidos A β 40 y A β 42 en las matrices de plasma y plasma diluido, tal y como ha quedado reflejado en un riguroso estudio de validación en el que se ha utilizado por primera vez el anticuerpo monoclonal de producción interna 1F3.

- El anticuerpo 1F3 reconoce a los péptido A β que comienzan en los aminoácidos 1, 2 o 3 de su secuencia.
- Existe un importante efecto matriz en la fracción plasmática que impide la determinación del total de A β presente en la muestra. La dilución del plasma con un tampón especialmente formulado para ello permite eliminar casi por completo dicho efecto y favorece la detección de péptidos A β que estaban inaccesibles.

2.- Existen numerosos factores pre-analíticos técnicos que influyen en los resultados de cuantificación de A β 40 y A β 42 en el plasma y que podrían explicar, al menos en parte, las discrepancias entre diferentes estudios o diferentes laboratorios:

- El tratamiento de las muestras de sangre con un *cocktail* de inhibidores de proteasas no resulta ventajoso para cuantificar A β 40 y A β 42 en plasma y plasma diluido.
- El retardo del procesamiento de la muestra de sangre hasta 30 horas no modifica los niveles de A β 40 y A β 42 cuantificados en plasma y plasma diluido, siempre y cuando ésta se conserve a 4 °C.
- La fuerza y el tiempo de centrifugación de la muestra de sangre tienen un impacto tanto en el porcentaje de plaquetas remanentes en la fracción plasmática como en los niveles de A β 40 y A β 42 cuantificados en el plasma. La eliminación completa de las plaquetas del plasma sólo se consigue con procesamientos de al menos 4.000 g durante 30 minutos.
- El tipo de anticoagulante utilizado afecta a la cuantificación de A β en el plasma. En comparación con el citrato de sodio, el uso de EDTA se considera más adecuado para la cuantificación de A β con ABtest.

3.- Los resultados obtenidos al aplicar ABtest en las muestras procedentes de individuos sanos de la subcohorte de AIBL reflejan que:

- La deposición fibrilar de A β en el cerebro es mayor cuanto menor es el índice plasmático A β 42/40.

Conclusiones

- Los individuos con índices plasmáticos A β 42/40 más bajos en la visita inicial presentan trayectorias de deposición cortical de A β más rápidas.
- El uso del biomarcador TP42/40 se postula como una herramienta útil, sencilla, económica y no invasiva para predecir la deposición cortical de A β en individuos sanos. Su aplicación, como un paso inicial, en un proceso de enriquecimiento y cribado de la población sería de gran utilidad para reducir el número de individuos cuyo diagnóstico debe confirmarse mediante test invasivos y de acceso limitado.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah L, Luis C, Paris D, et al. Serum Abeta levels as predictors of conversion to mild cognitive impairment/Alzheimer disease in an ADAPT subcohort. *Mol Med* 2009; 15 (11-12):432-7.
- Adamczuk K, Schaefferbeke J, Vanderstichele HM, et al. Diagnostic value of cerebrospinal fluid Abeta ratios in preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2015; 7 (1):75-0159.
- Aisen PS. Clinical trial methodologies for disease-modifying therapeutic approaches. *Neurobiol Aging* 2011; 32 Suppl 1:S64-S66.
- Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011; 7 (3):270-9.
- Alzheimer's Association. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 2016; 12 (4):459-509.
- Andreasen N, Hesse C, Davidsson P, et al. Cerebrospinal fluid beta-amyloid(1-42) in Alzheimer disease: differences between early- and late-onset Alzheimer disease and stability during the course of disease. *Arch Neurol* 1999; 56 (6):673-80.
- Andreasson U, Perret-Liaudet A, van Waalwijk van Doorn LJ, et al. A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. *Front Neurol* 2015; 6:179.
- Anstey KJ, Cherbuin N, Budge M, Young J. Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. *Obes Rev* 2011; 12 (5):e426-e437.
- Anstey KJ, von SC, Salim A, O'Kearney R. Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Epidemiol* 2007; 166 (4):367-78.
- Arnold ME, Booth B, King L, Ray C. Workshop Report: Crystal City VI-Bioanalytical Method Validation for Biomarkers. *AAPS J* 2016; 18 (6):1366-72.
- Arvanitakis Z, Lucas JA, Younkin LH, Younkin SG, Graff-Radford NR. Serum creatinine levels correlate with plasma amyloid Beta protein. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2002; 16 (3):187-90.
- Ayache S, Panelli M, Marincola FM, Stroncek DF. Effects of storage time and exogenous protease inhibitors on plasma protein levels. *Am J Clin Pathol* 2006; 126 (2):174-84.
- Bacskaï BJ, Frosch MP, Freeman SH, et al. Molecular imaging with Pittsburgh Compound B confirmed at autopsy: a case report. *Arch Neurol* 2007; 64 (3):431-4.

Bibliografia

- Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002; 115:3719-27.
- Banks RE, Stanley AJ, Cairns DA, et al. Influences of blood sample processing on low-molecular-weight proteome identified by surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. *Clin Chem* 2005; 51 (9):1637-49.
- Barber R, Gholkar A, Scheltens P, et al. Medial temporal lobe atrophy on MRI in dementia with Lewy bodies. *Neurology* 1999; 52 (6):1153-8.
- Barelli S, Crettaz D, Thadikaran L, Rubin O, Tissot JD. Plasma/serum proteomics: pre-analytical issues. *Expert Rev Proteomics* 2007; 4 (3):363-70.
- Barnes LL, Wilson RS, Schneider JA, et al. Gender, cognitive decline, and risk of AD in older persons. *Neurology* 2003; 60 (11):1777-81.
- Bates KA, Verdile G, Li QX, et al. Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid-beta peptide: implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Mol Psychiatry* 2009; 14 (5):469-86.
- Bazenet C, Lovestone S. Plasma biomarkers for Alzheimer's disease: much needed but tough to find. *Biomark Med* 2012; 6 (4):441-54.
- Beach TG, Monsell SE, Phillips LE, Kukull W. Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005-2010. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012; 71 (4):266-73.
- Becan-McBride K. Laboratory sampling. Does the process affect the outcome? *J Intraven Nurs* 1999; 22 (3):137-42.
- Beckett C, Nalivaeva NN, Belyaev ND, Turner AJ. Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: the AICD enigma. *Cell Signal* 2012; 24 (2):402-9.
- Bendlin BB, Carlsson CM, Gleason CE, et al. Midlife predictors of Alzheimer's disease. *Maturitas* 2010; 65 (2):131-7.
- Berven FS, Kroksveen AC, Berle M, et al. Pre-analytical influence on the low molecular weight cerebrospinal fluid proteome. *Proteomics Clin Appl* 2007; 1 (7):699-711.
- Bibl M, Esselmann H, Otto M, et al. Cerebrospinal fluid amyloid beta peptide patterns in Alzheimer's disease patients and nondemented controls depend on sample pretreatment: indication of carrier-mediated epitope masking of amyloid beta peptides. *Electrophoresis* 2004; 25 (17):2912-8.

- Bibl M, Gallus M, Welge V, Esselmann H, Wiltfang J. Aminoterminally truncated and oxidized amyloid-beta peptides in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis* 2012; 29 (4):809-16.
- Bibl M, Mollenhauer B, Lewczuk P, et al. Validation of amyloid-beta peptides in CSF diagnosis of neurodegenerative dementias. *Mol Psychiatry* 2007; 12 (7):671-80.
- Biere AL, Ostaszewski B, Stimson ER, et al. Amyloid beta-peptide is transported on lipoproteins and albumin in human plasma. *J Biol Chem* 1996; 271 (51):32916-22.
- Bjerke M, Andreasson U, Kuhlmann J, et al. Assessing the commutability of reference material formats for the harmonization of amyloid beta measurements. *Clin Chem Lab Med* 2015.
- Bjerke M, Portelius E, Minthon L, et al. Confounding factors influencing amyloid Beta concentration in cerebrospinal fluid. *Int J Alzheimers Dis* 2010; 2010:986310.
- Blasko I, Jellinger K, Kemmler G, et al. Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: prediction by plasma amyloid beta 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine. *Neurobiol Aging* 2008; 29 (1):1-11.
- Blennow K. Biomarkers in Alzheimer's disease drug development. *Nat Med* 2010; 16 (11):1218-22.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet* 2006; 368 (9533):387-403.
- Blennow K, De MG, Hansson O, et al. Evolution of Abeta42 and Abeta40 levels and Abeta42/Abeta40 ratio in plasma during progression of Alzheimer's disease: a multicenter assessment. *J Nutr Health Aging* 2009; 13 (3):205-8.
- Blennow K, Dubois B, Fagan AM, et al. Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2015a; 11 (1):58-69.
- Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2003; 2 (10):605-13.
- Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2010; 6 (3):131-44.
- Blennow K, Mattsson N, Scholl M, Hansson O, Zetterberg H. Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 2015b; 36 (5):297-309.
- Blennow K, Zetterberg H. Is it time for biomarker-based diagnostic criteria for prodromal Alzheimer's disease? *Alzheimers Res Ther* 2010; 2 (2):8.
- Blom ES, Giedraitis V, Zetterberg H, et al. Rapid progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease in subjects with elevated levels of tau in cerebrospinal fluid and the APOE epsilon4/epsilon4 genotype. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2009; 27 (5):458-64.

Bibliografia

- Bobinski M, de Leon MJ, Wegiel J, et al. The histological validation of post mortem magnetic resonance imaging-determined hippocampal volume in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2000; 95 (3):721-5.
- Bonneh-Barkay D, Bissel SJ, Kofler J, et al. Astrocyte and macrophage regulation of YKL-40 expression and cellular response in neuroinflammation. *Brain Pathol* 2012; 22 (4):530-46.
- Bonneh-Barkay D, Wang G, Starkey A, Hamilton RL, Wiley CA. In vivo CHI3L1 (YKL-40) expression in astrocytes in acute and chronic neurological diseases. *J Neuroinflammation* 2010; 7:34-7.
- Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, et al. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 1996; 17 (5):1005-13.
- Bouwman FH, Schoonenboom NS, Verwey NA, et al. CSF biomarker levels in early and late onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2009; 30 (12):1895-901.
- Boyanton BL, Jr., Blick KE. Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. *Clin Chem* 2002; 48 (12):2242-7.
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991; 82 (4):239-59.
- Buerger K, Ewers M, Pirttila T, et al. CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain* 2006; 129 (Pt 11):3035-41.
- Buerger K, Teipel SJ, Zinkowski R, et al. CSF tau protein phosphorylated at threonine 231 correlates with cognitive decline in MCI subjects. *Neurology* 2002; 59 (4):627-9.
- Burdick D, Soreghan B, Kwon M, et al. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A β /beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem* 1992; 267 (1):546-54.
- Burgmans S, van de Haar HJ, Verhey FR, Backes WH. Amyloid-beta interacts with blood-brain barrier function in dementia: a systematic review. *J Alzheimers Dis* 2013; 35 (4):859-73.
- Bush AI, Martins RN, Rumble B, et al. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is released by human platelets. *J Biol Chem* 1990; 265 (26):15977-83.
- Butterfield LH, Potter DM, Kirkwood JM. Multiplex serum biomarker assessments: technical and biostatistical issues. *J Transl Med* 2011; 9:173-9.
- Caccamo A, Oddo S, Sugarman MC, Akbari Y, LaFerla FM. Age- and region-dependent alterations in A β -degrading enzymes: implications for A β -induced disorders. *Neurobiol Aging* 2005; 26 (5):645-54.

- Carrillo MC, Blennow K, Soares H, et al. Global standardization measurement of cerebral spinal fluid for Alzheimer's disease: an update from the Alzheimer's Association Global Biomarkers Consortium. *Alzheimers Dement* 2013; 9 (2):137-40.
- Cedazo-Minguez A, Winblad B. Biomarkers for Alzheimer's disease and other forms of dementia: clinical needs, limitations and future aspects. *Exp Gerontol* 2010; 45 (1):5-14.
- Chen M, Inestrosa NC, Ross GS, Fernandez HL. Platelets are the primary source of amyloid beta-peptide in human blood. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213 (1):96-103.
- Chetelat G. Alzheimer disease: Aβ-independent processes-rethinking preclinical AD. *Nat Rev Neurol* 2013; 9 (3):123-4.
- Chiasserini D, Biscetti L, Farotti L, et al. Performance Evaluation of an Automated ELISA System for Alzheimer's Disease Detection in Clinical Routine. *J Alzheimers Dis* 2016; 54 (1):55-67.
- Chiu MJ, Chen YF, Chen TF, et al. Plasma tau as a window to the brain-negative associations with brain volume and memory function in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Hum Brain Mapp* 2014; 35 (7):3132-42.
- Chouraki V, Beiser A, Younkin L, et al. Plasma amyloid-beta and risk of Alzheimer's disease in the Framingham Heart Study. *Alzheimers Dement* 2015; 11 (3):249-57.
- Clark CM, Xie S, Chittams J, et al. Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid: how well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses? *Arch Neurol* 2003a; 60 (12):1696-702.
- Clark S, Youngman LD, Palmer A, et al. Stability of plasma analytes after delayed separation of whole blood: implications for epidemiological studies. *Int J Epidemiol* 2003b; 32 (1):125-30.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation, Approved Guideline. In: CLSI document EP17-A: Wayne, PA USA, 2004.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures, Approved guideline-2nd edition. In: CLSI document EP17-A2: Wayne, PA USA, 2012.
- Conboy JJ, Wood KG, Lame ME, Durham RA, Geoghegan KF. Modification of amyloid-beta(1-40) by a protease inhibitor creates risk of error in mass spectrometric quantitation of amyloid-beta(1-42). *Anal Biochem* 2008; 382 (2):147-9.
- Consensus report of the Working Group. Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". The Ronald and Nancy Reagan Research

Bibliografia

- Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. *Neurobiol Aging* 1998; 19 (2):109-16.
- Cook DG, Leverenz JB, McMillan PJ, et al. Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. *Am J Pathol* 2003; 162 (1):313-9.
- Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 1994; 7 (2):180-4.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; 261 (5123):921-3.
- Cosentino SA, Stern Y, Sokolov E, et al. Plasma ss-amyloid and cognitive decline. *Arch Neurol* 2010; 67 (12):1485-90.
- Costa M, Ortiz AM, Jorquera JI. Therapeutic albumin binding to remove amyloid-beta. *J Alzheimers Dis* 2012; 29 (1):159-70.
- Craig-Schapiro R, Fagan AM, Holtzman DM. Biomarkers of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2009; 35 (2):128-40.
- Craig-Schapiro R, Perrin RJ, Roe CM, et al. YKL-40: a novel prognostic fluid biomarker for preclinical Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 2010; 68 (10):903-12.
- Crouch PJ, Tew DJ, Du T, et al. Restored degradation of the Alzheimer's amyloid-beta peptide by targeting amyloid formation. *J Neurochem* 2009; 108 (5):1198-207.
- Cummings JL, Vinters HV, Cole GM, Khachaturian ZS. Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurology* 1998; 51 (1 Suppl 1):S2-17.
- D'Arrigo C, Tabaton M, Perico A. N-terminal truncated pyroglutamyl beta amyloid peptide Abeta₃₋₄₂ shows a faster aggregation kinetics than the full-length Abeta₁₋₄₂. *Biopolymers* 2009; 91 (10):861-73.
- Davidsson P, Blennow K. Neurochemical dissection of synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr* 1998; 10 (1):11-23.
- Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic BV. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2009; 8 (1):16-30.
- Deane R, Du YS, Subramanian RK, et al. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* 2003; 9 (7):907-13.

- Deane R, Sagare A, Zlokovic BV. The role of the cell surface LRP and soluble LRP in blood-brain barrier Abeta clearance in Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 2008; 14 (16):1601-5.
- Deane R, Wu Z, Sagare A, et al. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron* 2004; 43 (3):333-44.
- DeBette S, Seshadri S, Beiser A, et al. Midlife vascular risk factor exposure accelerates structural brain aging and cognitive decline. *Neurology* 2011; 77 (5):461-8.
- DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Paul SM, Holtzman DM. Brain to plasma amyloid-beta efflux: a measure of brain amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 2002; 295 (5563):2264-7.
- Desikan RS, McEvoy LK, Thompson WK, et al. Amyloid-beta associated volume loss occurs only in the presence of phospho-tau. *Ann Neurol* 2011; 70 (4):657-61.
- Desrochers PE, Weiss SJ. Proteolytic inactivation of alpha-1-proteinase inhibitor by a neutrophil metalloproteinase. *J Clin Invest* 1988; 81 (5):1646-50.
- deToledo-Morrell L, Stoub TR, Bulgakova M, et al. MRI-derived entorhinal volume is a good predictor of conversion from MCI to AD. *Neurobiol Aging* 2004; 25 (9):1197-203.
- Devanand DP, Schupf N, Stern Y, et al. Plasma Abeta and PET PiB binding are inversely related in mild cognitive impairment. *Neurology* 2011; 77 (2):125-31.
- Dickerson BC, Wolk DA. MRI cortical thickness biomarker predicts AD-like CSF and cognitive decline in normal adults. *Neurology* 2012; 78 (2):84-90.
- Diez-Guerra FJ. Neurogranin, a link between calcium/calmodulin and protein kinase C signaling in synaptic plasticity. *IUBMB Life* 2010; 62 (8):597-606.
- Donahue JE, Flaherty SL, Johanson CE, et al. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2006; 112 (4):405-15.
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol* 2010; 9 (11):1118-27.
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 2007; 6 (8):734-46.
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol* 2014; 13 (6):614-29.
- Dumurgier J, Schraen S, Gabelle A, et al. Cerebrospinal fluid amyloid-beta 42/40 ratio in clinical setting of memory centers: a multicentric study. *Alzheimers Res Ther* 2015; 7 (1):30-0114.

Bibliografia

- Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, et al. Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J* 1988; 7 (4):949-57.
- Ellis KA, Bush AI, Darby D, et al. The Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle (AIBL) study of aging: methodology and baseline characteristics of 1112 individuals recruited for a longitudinal study of Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr* 2009; 21 (4):672-87.
- EMA Comitee for Medicinal Product for Human Use. Guideline on bioanalytical method validation. In: 2011.
- Ertekin-Taner N, Graff-Radford N, Younkin LH, et al. Heritability of plasma amyloid beta in typical late-onset Alzheimer's disease pedigrees. *Genet Epidemiol* 2001; 21 (1):19-30.
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, et al. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 1990; 248 (4959):1122-4.
- Evans DA, Hebert LE, Beckett LA, et al. Education and other measures of socioeconomic status and risk of incident Alzheimer disease in a defined population of older persons. *Arch Neurol* 1997; 54 (11):1399-405.
- Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, et al. Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Ann Neurol* 2006; 59 (3):512-9.
- Fagan AM, Perez-Grijalba V, Fandos N, et al. Longitudinal plasma biomarkers changes in middle-aged individuals at risk for Alzheimer Disease. *J Prev Alzheimers Dis* 2015; 2:304-5.
- Fagan AM, Perrin RJ. Upcoming candidate cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Biomark Med* 2012; 6 (4):455-76.
- Fagan AM, Roe CM, Xiong C, et al. Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch Neurol* 2007; 64 (3):343-9.
- Fandos N, Marcos-Campos I, Perez-Grijalba V, Pesini P, Sarasa M. The influence of the centrifugation settings on amyloid beta quantification in plasma. In: *Alzheimer's Association International Conference: Alzheimer's & Dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 2014a.
- Fandos N, Perez-Grijalba V, Marcos-Campos I, Pesini P, Sarasa M. The effect of pre-analytical factors in the quantification of amyloid beta in plasma. In: *Alzheimer's Association International Conference: Alzheimer's & Dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 2014b.
- Fandos N, Perez-Grijalba V, Pesini P, et al. Plasma amyloid beta 42/40 ratios as biomarkers for amyloid beta cerebral deposition in cognitively normal individuals. *Alzheimers Dement (Amst)* 2017; 8:179-87.
- Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 2003; 5 (14):1317-27.

- FDA US Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center of Veterinary Medicine (CVM). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (Draft Guideline). In: 2013.
- Ferguson RE, Hochstrasser DF, Banks RE. Impact of preanalytical variables on the analysis of biological fluids in proteomic studies. *Proteomics Clin Appl* 2007; 1 (8):739-46.
- Fiandaca MS, Mapstone ME, Cheema AK, Federoff HJ. The critical need for defining preclinical biomarkers in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2014; 10 (3 Suppl):S196-S212.
- Figurski MJ, Waligorska T, Toledo J, et al. Improved protocol for measurement of plasma beta-amyloid in longitudinal evaluation of Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative study patients. *Alzheimers Dement* 2012; 8 (4):250-60.
- Fitzpatrick AW, Debelouchina GT, Bayro MJ, et al. Atomic structure and hierarchical assembly of a cross-beta amyloid fibril. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110 (14):5468-73.
- Freeman SH, Raju S, Hyman BT, Frosch MP, Irizarry MC. Plasma Aβ levels do not reflect brain Aβ levels. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66 (4):264-71.
- Frey HJ, Mattila KM, Korolainen MA, Pirttila T. Problems associated with biological markers of Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2005; 30 (12):1501-10.
- Fukumoto H, Asami-Odaka A, Suzuki N, et al. Amyloid beta protein deposition in normal aging has the same characteristics as that in Alzheimer's disease. Predominance of Aβ₄₂ and association of Aβ₄₀ with cored plaques. *Am J Pathol* 1996; 148 (1):259-65.
- Fukumoto H, Tennis M, Locascio JJ, et al. Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid beta-protein levels. *Arch Neurol* 2003; 60 (7):958-64.
- Galasko D, Chang L, Motter R, et al. High cerebrospinal fluid tau and low amyloid beta₄₂ levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol* 1998; 55 (7):937-45.
- Galasko D, Golde TE. Biomarkers for Alzheimer's disease in plasma, serum and blood - conceptual and practical problems. *Alzheimers Res Ther* 2013; 5 (2):10.
- Galvin JE, Fagan AM, Holtzman DM, Mintun MA, Morris JC. Relationship of dementia screening tests with biomarkers of Alzheimer's disease. *Brain* 2010; 133 (11):3290-300.
- Ghersi-Egea JF, Gorevic PD, Ghiso J, et al. Fate of cerebrospinal fluid-borne amyloid beta-peptide: rapid clearance into blood and appreciable accumulation by cerebral arteries. *J Neurochem* 1996; 67 (2):880-3.
- Giedraitis V, Sundelof J, Irizarry MC, et al. The normal equilibrium between CSF and plasma amyloid beta levels is disrupted in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2007; 427 (3):127-31.

Bibliografia

- Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 120 (3):885-90.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991; 349 (6311):704-6.
- Gouras GK, Tampellini D, Takahashi RH, Capetillo-Zarate E. Intraneuronal beta-amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2010; 119 (5):523-41.
- Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J, et al. Association of low plasma Abeta42/Abeta40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2007; 64 (3):354-62.
- Gravina SA, Ho L, Eckman CB, et al. Amyloid beta protein (A beta) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A beta 40 or A beta 42(43). *J Biol Chem* 1995; 270 (13):7013-6.
- Green RC, Cupples LA, Go R, et al. Risk of dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease. *JAMA* 2002; 287 (3):329-36.
- Grimm MO, Mett J, Stahlmann CP, et al. Nephilysin and Abeta Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 2013; 5 (98).
- Grimmer T, Riemenschneider M, Forstl H, et al. Beta amyloid in Alzheimer's disease: increased deposition in brain is reflected in reduced concentration in cerebrospinal fluid. *Biol Psychiatry* 2009; 65 (11):927-34.
- Groswasser Z, Reider-Groswasser II, Schwab K, et al. Quantitative imaging in late TBI. Part II: cognition and work after closed and penetrating head injury: a report of the Vietnam head injury study. *Brain Inj* 2002; 16 (8):681-90.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, et al. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 1986; 261 (13):6084-9.
- Gudala K, Bansal D, Schifano F, Bhansali A. Diabetes mellitus and risk of dementia: A meta-analysis of prospective observational studies. *J Diabetes Investig* 2013; 4 (6):640-50.
- Gurol ME, Irizarry MC, Smith EE, et al. Plasma beta-amyloid and white matter lesions in AD, MCI, and cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 2006; 66 (1):23-9.
- Gustafson DR, Skoog I, Rosengren L, Zetterberg H, Blennow K. Cerebrospinal fluid beta-amyloid 1-42 concentration may predict cognitive decline in older women. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78 (5):461-4.

- Haab BB, Geierstanger BH, Michailidis G, et al. Immunoassay and antibody microarray analysis of the HUPO Plasma Proteome Project reference specimens: systematic variation between sample types and calibration of mass spectrometry data. *Proteomics* 2005; 5 (13):3278-91.
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, et al. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 1992; 359 (6393):322-5.
- Hampel H, Burger K, Teipel SJ, et al. Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2008; 4 (1):38-48.
- Hampel H, Frank R, Broich K, et al. Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 2010a; 9 (7):560-74.
- Hampel H, Lista S, Khachaturian ZS. Development of biomarkers to chart all Alzheimer's disease stages: the royal road to cutting the therapeutic Gordian Knot. *Alzheimers Dement* 2012; 8 (4):312-36.
- Hampel H, Shen Y, Walsh DM, et al. Biological markers of amyloid beta-related mechanisms in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 2010b; 223 (2):334-46.
- Hansson O, Stomrud E, Vanmechelen E, et al. Evaluation of plasma A β as predictor of Alzheimer's disease in older individuals without dementia: a population-based study. *J Alzheimers Dis* 2012; 28 (1):231-8.
- Hansson O, Zetterberg H, Vanmechelen E, et al. Evaluation of plasma A β (40) and A β (42) as predictors of conversion to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2010; 31 (3):357-67.
- Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 1997; 20 (4):154-9.
- Hardy J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *J Neurochem* 2009; 110 (4):1129-34.
- Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J, Hutton M. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci* 1998; 1 (5):355-8.
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297 (5580):353-6.
- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992; 256 (5054):184-5.
- Hartmann T, Bieger SC, Bruhl B, et al. Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A β 40/42 amyloid peptides. *Nat Med* 1997; 3 (9):1016-20.

Bibliografia

- Head E, Doran E, Nistor M, et al. Plasma amyloid-beta as a function of age, level of intellectual disability, and presence of dementia in Down syndrome. *J Alzheimers Dis* 2011; 23 (3):399-409.
- Hebert LE, Bienias JL, Aggarwal NT, et al. Change in risk of Alzheimer disease over time. *Neurology* 2010; 75 (9):786-91.
- Hebert LE, Scherr PA, McCann JJ, Beckett LA, Evans DA. Is the risk of developing Alzheimer's disease greater for women than for men? *Am J Epidemiol* 2001; 153 (2):132-6.
- Hennig C, Rink L, Fagin U, Jabs WJ, Kirchner H. The influence of naturally occurring heterophilic anti-immunoglobulin antibodies on direct measurement of serum proteins using sandwich ELISAs. *J Immunol Methods* 2000; 235 (1-2):71-80.
- Henriksen K, O'Bryant SE, Hampel H, et al. The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2014; 10 (1):115-31.
- Herholz K, Ebmeier K. Clinical amyloid imaging in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2011; 10 (7):667-70.
- Hesse C, Rosengren L, Andreasen N, et al. Transient increase in total tau but not phospho-tau in human cerebrospinal fluid after acute stroke. *Neurosci Lett* 2001; 297 (3):187-90.
- Holland NT, Smith MT, Eskenazi B, Bastaki M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutat Res* 2003; 543 (3):217-34.
- Holtzman DM, Herz J, Bu G. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2 (3):a006312.
- Holtzman DM, Morris JC, Goate AM. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med* 2011; 3 (77):77sr1.
- Hsieh SY, Chen RK, Pan YH, Lee HL. Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low-molecular-weight serum/plasma proteome profiling. *Proteomics* 2006; 6 (10):3189-98.
- Hua X, Leow AD, Lee S, et al. 3D characterization of brain atrophy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment using tensor-based morphometry. *Neuroimage* 2008; 41 (1):19-34.
- Huang KP, Huang FL, Jager T, et al. Neurogranin/RC3 enhances long-term potentiation and learning by promoting calcium-mediated signaling. *J Neurosci* 2004; 24 (47):10660-9.
- Huang YA, Zhou B, Wernig M, Sudhof TC. ApoE2, ApoE3, and ApoE4 Differentially Stimulate APP Transcription and Abeta Secretion. *Cell* 2017; 168 (3):427-41.

- Hulette CM, Welsh-Bohmer KA, Murray MG, et al. Neuropathological and neuropsychological changes in "normal" aging: evidence for preclinical Alzheimer disease in cognitively normal individuals. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57 (12):1168-74.
- Humpel C. Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. *Trends Biotechnol* 2011; 29 (1):26-32.
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 1998; 393 (6686):702-5.
- Ikonomovic MD, Klunk WE, Abrahamson EE, et al. Post-mortem correlates of in vivo PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer's disease. *Brain* 2008; 131 (Pt 6):1630-45.
- Insel PS, Ossenkoppele R, Gessert D, et al. Time to Amyloid Positivity and Preclinical Changes in Brain Metabolism, Atrophy, and Cognition: Evidence for Emerging Amyloid Pathology in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* 2017; 11:281.
- Insel PS, Palmqvist S, Mackin RS, et al. Assessing risk for preclinical beta-amyloid pathology with APOE, cognitive, and demographic information. *Alzheimers Dement (Amst)* 2016; 4:76-84.
- Jack CR, Jr., Albert MS, Knopman DS, et al. Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011; 7 (3):257-62.
- Jack CR, Jr., Bennett DA, Blennow K, et al. A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. *Neurology* 2016; 87 (5):539-47.
- Jack CR, Jr., Holtzman DM. Biomarker modeling of Alzheimer's disease. *Neuron* 2013; 80 (6):1347-58.
- Jack CR, Jr., Knopman DS, Jagust WJ, et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol* 2013; 12 (2):207-16.
- Jack CR, Jr., Knopman DS, Jagust WJ, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* 2010; 9 (1):119-28.
- Jack CR, Jr., Knopman DS, Weigand SD, et al. An operational approach to National Institute on Aging-Alzheimer's Association criteria for preclinical Alzheimer disease. *Ann Neurol* 2012; 71 (6):765-75.
- Jack CR, Jr., Weigand SD, Shiung MM, et al. Atrophy rates accelerate in amnesic mild cognitive impairment. *Neurology* 2008; 70 (19 Pt 2):1740-52.
- Jagust WJ, Landau SM, Shaw LM, et al. Relationships between biomarkers in aging and dementia. *Neurology* 2009; 73 (15):1193-9.

Bibliografia

- Janelidze S, Stomrud E, Palmqvist S, et al. Plasma beta-amyloid in Alzheimer's disease and vascular disease. *Sci Rep* 2016a; 6:26801.
- Janelidze S, Zetterberg H, Mattsson N, et al. CSF Abeta42/Abeta40 and Abeta42/Abeta38 ratios: better diagnostic markers of Alzheimer disease. *Ann Clin Transl Neurol* 2016b; 3 (3):154-65.
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT, Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1993; 32 (18):4693-7.
- Jellinger KA, Bancher C. Neuropathology of Alzheimer's disease: a critical update. *J Neural Transm Suppl* 1998; 54:77-95.
- Johnson KA, Gregas M, Becker JA, et al. Imaging of amyloid burden and distribution in cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 2007; 62 (3):229-34.
- Johnson KA, Minoshima S, Bohnen NI, et al. Appropriate use criteria for amyloid PET: a report of the Amyloid Imaging Task Force, the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, and the Alzheimer's Association. *Alzheimers Dement* 2013; 9 (1):e-16.
- Johnson KA, Schultz A, Betensky RA, et al. Tau positron emission tomographic imaging in aging and early Alzheimer disease. *Ann Neurol* 2016; 79 (1):110-9.
- Johnson N, Davis T, Bosanquet N. The epidemic of Alzheimer's disease. How can we manage the costs? *Pharmacoeconomics* 2000; 18 (3):215-23.
- Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 2012; 488 (7409):96-9.
- Kadian N, Raju KS, Rashid M, et al. Comparative assessment of bioanalytical method validation guidelines for pharmaceutical industry. *J Pharm Biomed Anal* 2016; 126:83-97.
- Kaffashian S, Tzourio C, Soumare A, et al. Association of plasma beta-amyloid with MRI markers of structural brain aging the 3-City Dijon study. *Neurobiol Aging* 2015; 36 (10):2663-70.
- Kang DE, Pietrzik CU, Baum L, et al. Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J Clin Invest* 2000; 106 (9):1159-66.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987; 325 (6106):733-6.
- Kang J, Muller-Hill B. Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 166 (3):1192-200.

- Kawarabayashi T, Shoji M. Plasma biomarkers of Alzheimer's disease. *Curr Opin Psychiatry* 2008; 21 (3):260-7.
- Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, et al. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2001; 21 (2):372-81.
- Khachaturian ZS. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 1985; 42 (11):1097-105.
- Khan TK, Alkon DL. Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid and Neuroimaging Biomarkers: Diagnostic Accuracy and Relationship to Drug Efficacy. *J Alzheimers Dis* 2015; 46 (4):817-36.
- Killiany RJ, Gomez-Isla T, Moss M, et al. Use of structural magnetic resonance imaging to predict who will get Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2000; 47 (4):430-9.
- Kindt TM, Goldsby RA, Osborne BA. *Inmunología de Kuby*. In. Mexico: McGraw-Hill Interamericana, 2017.
- Klafki HW, Hafermann H, Bauer C, et al. Validation of a Commercial Chemiluminescence Immunoassay for the Simultaneous Measurement of Three Different Amyloid-beta Peptides in Human Cerebrospinal Fluid and Application to a Clinical Cohort. *J Alzheimers Dis* 2016.
- Klee GG. Human anti-mouse antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124 (6):921-3.
- Klunk WE, Engler H, Nordberg A, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 2004; 55 (3):306-19.
- Kosaka T, Imagawa M, Seki K, et al. The beta APP717 Alzheimer mutation increases the percentage of plasma amyloid-beta protein ending at A beta42(43). *Neurology* 1997; 48 (3):741-5.
- Koyama A, Okereke OI, Yang T, et al. Plasma amyloid-beta as a predictor of dementia and cognitive decline: a systematic review and meta-analysis. *Arch Neurol* 2012; 69 (7):824-31.
- Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem* 1999; 45 (7):942-56.
- Kuhlmann J, Andreasson U, Pannee J, et al. CSF Abeta - an excellent but complicated Alzheimer's biomarker - a route to standardisation. *Clin Chim Acta* 2016; 467:27-33.
- Kukull WA, Higdon R, Bowen JD, et al. Dementia and Alzheimer disease incidence: a prospective cohort study. *Arch Neurol* 2002; 59 (11):1737-46.
- Kuo YM, Emmerling MR, Lampert HC, et al. High levels of circulating Abeta42 are sequestered by plasma proteins in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257 (3):787-91.

Bibliografia

- Kuo YM, Kokjohn TA, Kalback W, et al. Amyloid-beta peptides interact with plasma proteins and erythrocytes: implications for their quantitation in plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268 (3):750-6.
- Kvartsberg H, Duits FH, Ingelsson M, et al. Cerebrospinal fluid levels of the synaptic protein neurogranin correlates with cognitive decline in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2015; 11 (10):1180-90.
- Lachno DR, Emerson JK, Vanderstichele H, et al. Validation of a multiplex assay for simultaneous quantification of amyloid-beta peptide species in human plasma with utility for measurements in studies of Alzheimer's disease therapeutics. *J Alzheimers Dis* 2012; 32 (4):905-18.
- Lachno DR, Evert BA, Vanderstichele H, et al. Validation of assays for measurement of amyloid-beta peptides in cerebrospinal fluid and plasma specimens from patients with Alzheimer's disease treated with solanezumab. *J Alzheimers Dis* 2013; 34 (4):897-910.
- Lachno DR, Vanderstichele H, De GG, et al. The influence of matrix type, diurnal rhythm and sample collection and processing on the measurement of plasma beta-amyloid isoforms using the INNO-BIA plasma Abeta forms multiplex assay. *J Nutr Health Aging* 2009; 13 (3):220-5.
- Lacosta AM, Insua D, Badi H, Pesini P, Sarasa M. Neurofibrillary Tangles of Abeta40 in Alzheimer's Disease Brains. *J Alzheimers Dis* 2017; 51 (3):661-7.
- Lambert JC, Schraen-Maschke S, Richard F, et al. Association of plasma amyloid beta with risk of dementia: the prospective Three-City Study. *Neurology* 2009; 73 (11):847-53.
- Landau SM, Lu M, Joshi AD, et al. Comparing positron emission tomography imaging and cerebrospinal fluid measurements of beta-amyloid. *Ann Neurol* 2013; 74 (6):826-36.
- Landi MT, Caporaso N. Sample collection, processing and storage. *IARC Sci Publ* 1997 (142):223-36.
- Lang S. The role of peripheral benzodiazepine receptors (PBRs) in CNS pathophysiology. *Curr Med Chem* 2002; 9 (15):1411-5.
- Lansbury PT, Jr. Back to the future: the 'old-fashioned' way to new medications for neurodegeneration. *Nat Med* 2004; 10 Suppl:S51-S57.
- Larson EB, Edwards JK, O'Meara E, Nochlin D, Sumi SM. Neuropathologic diagnostic outcomes from a cohort of outpatients with suspected dementia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1996; 51 (6):M313-M318.
- Launer LJ, Ross GW, Petrovitch H, et al. Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu-Asia aging study. *Neurobiol Aging* 2000; 21 (1):49-55.

- Lautenschlager NT, Cupples LA, Rao VS, et al. Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study: What is in store for the oldest old? *Neurology* 1996; 46 (3):641-50.
- Le Bastard N, Aerts L, Leurs J, et al. No correlation between time-linked plasma and CSF Aβ levels. *Neurochem Int* 2009; 55 (8):820-5.
- Le Bastard N, Leurs J, Blomme W, De Deyn PP, Engelborghs S. Plasma amyloid-beta forms in Alzheimer's disease and non-Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis* 2010; 21 (1):291-301.
- Lee PH, Bang OY, Hwang EM, et al. Circulating beta amyloid protein is elevated in patients with acute ischemic stroke. *J Neural Transm (Vienna)* 2005; 112 (10):1371-9.
- Lehman EJ, Hein MJ, Baron SL, Geric CM. Neurodegenerative causes of death among retired National Football League players. *Neurology* 2012; 79 (19):1970-4.
- Leitao MJ, Baldeiras I, Herukka SK, et al. Chasing the Effects of Pre-Analytical Confounders - A Multicenter Study on CSF-AD Biomarkers. *Front Neurol* 2015; 6:153.
- Levites Y, Das P, Price RW, et al. Anti-Aβ₄₂- and anti-Aβ₄₀-specific mAbs attenuate amyloid deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 2006; 116 (1):193-201.
- Lewczuk P, Beck G, Esselmann H, et al. Effect of sample collection tubes on cerebrospinal fluid concentrations of tau proteins and amyloid beta peptides. *Clin Chem* 2006a; 52 (2):332-4.
- Lewczuk P, Beck G, Ganslandt O, et al. International quality control survey of neurochemical dementia diagnostics. *Neurosci Lett* 2006b; 409 (1):1-4.
- Lewczuk P, Esselmann H, Bibl M, et al. Electrophoretic separation of amyloid beta peptides in plasma. *Electrophoresis* 2004; 25 (20):3336-43.
- Lewczuk P, Kornhuber J, Vanmechelen E, et al. Amyloid beta peptides in plasma in early diagnosis of Alzheimer's disease: A multicenter study with multiplexing. *Exp Neurol* 2010; 223 (2):366-70.
- Lewczuk P, Lelental N, Spitzer P, Maler JM, Kornhuber J. Amyloid-beta 42/40 cerebrospinal fluid concentration ratio in the diagnostics of Alzheimer's disease: validation of two novel assays. *J Alzheimers Dis* 2015; 43 (1):183-91.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, et al. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 2001; 293 (5534):1487-91.
- Lista S, Faltraco F, Hampel H. Biological and methodical challenges of blood-based proteomics in the field of neurological research. *Prog Neurobiol* 2013; 101-102:18-34.

Bibliografia

- Lopez OL, Kuller LH, Mehta PD, et al. Plasma amyloid levels and the risk of AD in normal subjects in the Cardiovascular Health Study. *Neurology* 2008; 70 (19):1664-71.
- Lovheim H, Elgh F, Johansson A, et al. Plasma concentrations of free amyloid beta cannot predict the development of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2017; 13 (7):778-82.
- Lui JK, Laws SM, Li QX, et al. Plasma amyloid-beta as a biomarker in Alzheimer's disease: the AIBL study of aging. *J Alzheimers Dis* 2010; 20 (4):1233-42.
- Maddalena AS, Papassotiropoulos A, Gonzalez-Agosti C, et al. Cerebrospinal fluid profile of amyloid beta peptides in patients with Alzheimer's disease determined by protein biochip technology. *Neurodegener Dis* 2004; 1 (4-5):231-5.
- Maler JM, Klafki HW, Paul S, et al. Urea-based two-dimensional electrophoresis of beta-amyloid peptides in human plasma: evidence for novel A β species. *Proteomics* 2007; 7 (20):3815-20.
- Mann DM, Brown A, Prinja D, et al. An analysis of the morphology of senile plaques in Down's syndrome patients of different ages using immunocytochemical and lectin histochemical techniques. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1989; 15 (4):317-29.
- Maruyama M, Higuchi M, Takaki Y, et al. Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2005; 57 (6):832-42.
- Masters CL, Beyreuther K. Alzheimer's centennial legacy: prospects for rational therapeutic intervention targeting the A β amyloid pathway. *Brain* 2006; 129 (Pt 11):2823-39.
- Masters CL, Cappai R, Barnham KJ, Villemagne VL. Molecular mechanisms for Alzheimer's disease: implications for neuroimaging and therapeutics. *J Neurochem* 2006; 97 (6):1700-25.
- Masters CL, Multhaup G, Simms G, et al. Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J* 1985; 4 (11):2757-63.
- Matsumoto Y, Yanase D, Noguchi-Shinohara M, et al. Blood-brain barrier permeability correlates with medial temporal lobe atrophy but not with amyloid-beta protein transport across the blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2007; 23 (4):241-5.
- Mattsson N, Andreasson U, Persson S, et al. The Alzheimer's Association external quality control program for cerebrospinal fluid biomarkers. *Alzheimers Dement* 2011; 7 (4):386-95.
- Mattsson N, Andreasson U, Persson S, et al. CSF biomarker variability in the Alzheimer's Association quality control program. *Alzheimers Dement* 2013; 9 (3):251-61.
- Mattsson N, Andreasson U, Zetterberg H, Blennow K. Association of Plasma Neurofilament Light With Neurodegeneration in Patients With Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* 2017:10.

- Mattsson N, Blennow K, Zetterberg H. CSF biomarkers: pinpointing Alzheimer pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2009a; 1180:28-35.
- Mattsson N, Blennow K, Zetterberg H. Inter-laboratory variation in cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease: united we stand, divided we fall. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48 (5):603-7.
- Mattsson N, Carrillo MC, Dean RA, et al. Revolutionizing Alzheimer's disease and clinical trials through biomarkers. *Alzheimers Dement (Amst)* 2015a; 1 (4):412-9.
- Mattsson N, Insel PS, Donohue M, et al. Independent information from cerebrospinal fluid amyloid-beta and florbetapir imaging in Alzheimer's disease. *Brain* 2015b; 138 (Pt 3):772-83.
- Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, et al. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* 2009b; 302 (4):385-93.
- Mattsson N, Zetterberg H, Janelidze S, et al. Plasma tau in Alzheimer disease. *Neurology* 2016; 87 (17):1827-35.
- Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, et al. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 2010; 330 (6012):1774.
- Mayeux R, Honig LS, Tang MX, et al. Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology* 2003; 61 (9):1185-90.
- Mayeux R, Sano M, Chen J, Tatemichi T, Stern Y. Risk of dementia in first-degree relatives of patients with Alzheimer's disease and related disorders. *Arch Neurol* 1991; 48 (3):269-73.
- Mayeux R, Schupf N. Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease: plasma Abeta40 and Abeta42, and genetic variants. *Neurobiol Aging* 2011; 32 Suppl 1:S10-S19.
- Mayeux R, Tang MX, Jacobs DM, et al. Plasma amyloid beta-peptide 1-42 and incipient Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999; 46 (3):412-6.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, et al. 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* 1984; 34 (7):939-44.
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, 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* 2011; 7 (3):263-9.
- Mehta PD, Pirttila T, Mehta SP, et al. Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2000; 57 (1):100-5.

Bibliografia

- Mehta PD, Pirttila T, Patrick BA, Barshatzky M, Mehta SP. Amyloid beta protein 1-40 and 1-42 levels in matched cerebrospinal fluid and plasma from patients with Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 2001; 304 (1-2):102-6.
- Menendez-Gonzalez M, Perez-Pinera P, Martinez-Rivera M, Calatayud MT, Blazquez MB. APP processing and the APP-KPI domain involvement in the amyloid cascade. *Neurodegener Dis* 2005; 2 (6):277-83.
- Meng XF, Yu JT, Wang HF, et al. Midlife vascular risk factors and the risk of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis* 2014; 42 (4):1295-310.
- Michaelis ML, Dobrowsky RT, Li G. Tau neurofibrillary pathology and microtubule stability. *J Mol Neurosci* 2002; 19 (3):289-93.
- Miller DL, Papayannopoulos IA, Styles J, et al. Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* 1993; 301 (1):41-52.
- Miners JS, Van HZ, Chalmers K, et al. Decreased expression and activity of neprilysin in Alzheimer disease are associated with cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65 (10):1012-21.
- Morra JH, Tu Z, Apostolova LG, et al. Automated mapping of hippocampal atrophy in 1-year repeat MRI data from 490 subjects with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and elderly controls. *Neuroimage* 2009; 45 (1 Suppl):S3-15.
- Morris JC, Roe CM, Xiong C, et al. APOE predicts amyloid-beta but not tau Alzheimer pathology in cognitively normal aging. *Ann Neurol* 2010; 67 (1):122-31.
- Morris JC, Storandt M, McKeel DW, Jr., et al. Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in "normal" aging: Evidence for presymptomatic and very mild Alzheimer's disease. *Neurology* 1996; 46 (3):707-19.
- Morris MC, Tangney CC, Wang Y, et al. MIND diet slows cognitive decline with aging. *Alzheimers Dement* 2015; 11 (9):1015-22.
- Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, et al. Reduction of beta-amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1995; 38 (4):643-8.
- Mulder C, Schoonenboom SN, Wahlund LO, et al. CSF markers related to pathogenetic mechanisms in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 2002; 109 (12):1491-8.
- Murphy MP, LeVine H, III. Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis* 2010; 19 (1):311-23.

- Narayanan S. Effect of anticoagulants used for blood collection on laboratory tests. *Proc JCLA* 1993; 7:1-10.
- Naslund J, Schierhorn A, Hellman U, et al. Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91 (18):8378-82.
- O'Bryant SE, Gupta V, Henriksen K, et al. Guidelines for the standardization of preanalytic variables for blood-based biomarker studies in Alzheimer's disease research. *Alzheimers Dement* 2015a; 11 (5):549-60.
- O'Bryant SE, Lista S, Rissman RA, et al. Comparing biological markers of Alzheimer's disease across blood fraction and platforms: Comparing apples to oranges. *Alzheimers Dement (Amst)* 2015b; 3:27-34.
- O'Bryant SE, Mielke MM, Rissman RA, et al. Blood-based biomarkers in Alzheimer disease: Current state of the science and a novel collaborative paradigm for advancing from discovery to clinic. *Alzheimers Dement* 2017; 13 (1):45-58.
- O'Bryant SE, Xiao G, Barber R, et al. A blood-based screening tool for Alzheimer's disease that spans serum and plasma: findings from TARC and ADNI. *PLoS One* 2011; 6 (12):e28092.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24 (8):1063-70.
- Okello A, Edison P, Archer HA, et al. Microglial activation and amyloid deposition in mild cognitive impairment: a PET study. *Neurology* 2009; 72 (1):56-62.
- Okereke OI, Xia W, Irizarry MC, et al. Performance characteristics of plasma amyloid-beta 40 and 42 assays. *J Alzheimers Dis* 2009; 16 (2):277-85.
- Olsson A, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, Blennow K. Unaltered plasma levels of beta-amyloid(1-40) and beta-amyloid(1-42) upon stimulation of human platelets. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2003; 16 (2):93-7.
- Olsson B, Lautner R, Andreasson U, et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 2016; 15 (7):673-84.
- Ost M, Nylen K, Csajbok L, et al. Initial CSF total tau correlates with 1-year outcome in patients with traumatic brain injury. *Neurology* 2006; 67 (9):1600-4.
- Ovod V, Ramsey KN, Mawuenyega KG, et al. Amyloid beta concentrations and stable isotope labeling kinetics of human plasma specific to central nervous system amyloidosis. *Alzheimers Dement* 2017 (17):10.

Bibliografia

- Pakrasi S, O'Brien JT. Emission tomography in dementia. *Nucl Med Commun* 2005; 26 (3):189-96.
- Palmqvist S, Zetterberg H, Blennow K, et al. Accuracy of brain amyloid detection in clinical practice using cerebrospinal fluid beta-amyloid 42: a cross-validation study against amyloid positron emission tomography. *JAMA Neurol* 2014; 71 (10):1282-9.
- Palmqvist S, Zetterberg H, Mattsson N, et al. Detailed comparison of amyloid PET and CSF biomarkers for identifying early Alzheimer disease. *Neurology* 2015; 85 (14):1240-9.
- Pascale CL, Miller MC, Chiu C, et al. Amyloid-beta transporter expression at the blood-CSF barrier is age-dependent. *Fluids Barriers CNS* 2011; 8:21-8.
- Perez-Grijalba V, Fandos N, Canudas J, et al. Validation of Immunoassay-Based Tools for the Comprehensive Quantification of Abeta40 and Abeta42 Peptides in Plasma. *J Alzheimers Dis* 2016; 54 (2):751-62.
- Perez-Grijalba V, Pesini P, Allue JA, et al. Abeta1-17 is a major amyloid-beta fragment isoform in cerebrospinal fluid and blood with possible diagnostic value in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2015; 43 (1):47-56.
- Perez-Grijalba V, Pesini P, Monleon I, et al. Several direct and calculated biomarkers from the amyloid-beta pool in blood are associated with an increased likelihood of suffering from mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis* 2013; 36 (1):211-9.
- Pesaresi M, Lovati C, Bertora P, et al. Plasma levels of beta-amyloid (1-42) in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2006; 27 (6):904-5.
- Pesini P, Perez-Grijalba V, Fandos N, et al. Assessment of plasma AB markers to estimate dichotomic amyloid PET among cognitively healthy people. *J Prev Alzheimers Dis* 2015; 2:280-1.
- Pesini P, Perez-Grijalba V, Monleon I, et al. Reliable Measurements of the beta-Amyloid Pool in Blood Could Help in the Early Diagnosis of AD. *Int J Alzheimers Dis* 2012; 2012:604141.
- Pesini P, Sarasa M. Beyond the controversy on amyloid-beta blood-based biomarkers. *J Prev Alz Dis* 2015; 2(1):51-5.
- Petersen RC, Morris JC. Mild cognitive impairment as a clinical entity and treatment target. *Arch Neurol* 2005; 62 (7):1160-3.
- Petersen RC, Trojanowski JQ. Use of Alzheimer disease biomarkers: potentially yes for clinical trials but not yet for clinical practice. *JAMA* 2009; 302 (4):436-7.
- Phelps ME. PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging. *J Nucl Med* 2000; 41 (4):661-81.

- Pike KE, Savage G, Villemagne VL, et al. Beta-amyloid imaging and memory in non-demented individuals: evidence for preclinical Alzheimer's disease. *Brain* 2007; 130 (Pt 11):2837-44.
- Pimplikar SW, Nixon RA, Robakis NK, Shen J, Tsai LH. Amyloid-independent mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci* 2010; 30 (45):14946-54.
- Plassman BL, Havlik RJ, Steffens DC, et al. Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology* 2000; 55 (8):1158-66.
- Poirier J. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A role in amyloid catabolism. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 924:81-90.
- Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, et al. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1993; 342 (8873):697-9.
- Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, et al. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 1998; 43 (6):815-25.
- Portelius E, Brinkmalm G, Tran AJ, et al. Identification of novel APP/Abeta isoforms in human cerebrospinal fluid. *Neurodegener Dis* 2009; 6 (3):87-94.
- Portelius E, Westman-Brinkmalm A, Zetterberg H, Blennow K. Determination of beta-amyloid peptide signatures in cerebrospinal fluid using immunoprecipitation-mass spectrometry. *J Proteome Res* 2006; 5 (4):1010-6.
- Price JL, McKeel DW, Jr., Buckles VD, et al. Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 2009; 30 (7):1026-36.
- Price JL, Morris JC. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999; 45 (3):358-68.
- Rai AJ, Gelfand CA, Haywood BC, et al. HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics* 2005; 5 (13):3262-77.
- Rai AJ, Vitzthum F. Effects of preanalytical variables on peptide and protein measurements in human serum and plasma: implications for clinical proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2006; 3 (4):409-26.
- Randall J, Mortberg E, Provuncher GK, et al. Tau proteins in serum predict neurological outcome after hypoxic brain injury from cardiac arrest: results of a pilot study. *Resuscitation* 2013; 84 (3):351-6.
- Reddy PH, Mani G, Park BS, et al. Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction. *J Alzheimers Dis* 2005; 7 (2):103-17.

Bibliografia

- Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2011; 7 (3):137-52.
- Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* 2014; 88 (4):640-51.
- Rembach A, Faux NG, Watt AD, et al. Changes in plasma amyloid beta in a longitudinal study of aging and Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2014a; 10 (1):53-61.
- Rembach A, Ryan TM, Roberts BR, et al. Progress towards a consensus on biomarkers for Alzheimer's disease: a review of peripheral analytes. *Biomark Med* 2013; 7 (4):641-62.
- Rembach A, Watt AD, Wilson WJ, et al. Plasma amyloid-beta levels are significantly associated with a transition toward Alzheimer's disease as measured by cognitive decline and change in neocortical amyloid burden. *J Alzheimers Dis* 2014b; 40 (1):95-104.
- Roberts KF, Elbert DL, Kasten TP, et al. Amyloid-beta efflux from the central nervous system into the plasma. *Ann Neurol* 2014; 76 (6):837-44.
- Roe CM, Xiong C, Miller JP, Morris JC. Education and Alzheimer disease without dementia: support for the cognitive reserve hypothesis. *Neurology* 2007; 68 (3):223-8.
- Rohan de Silva HA, Jen A, Wickenden C, et al. Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 47 (1-2):147-56.
- Roher AE, Esh CL, Kokjohn TA, et al. Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2009; 5 (1):18-29.
- Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, et al. beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90 (22):10836-40.
- Ronnemaa E, Zethelius B, Lannfelt L, Kilander L. Vascular risk factors and dementia: 40-year follow-up of a population-based cohort. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2011; 31 (6):460-6.
- Rosen C, Hansson O, Blennow K, Zetterberg H. Fluid biomarkers in Alzheimer's disease - current concepts. *Mol Neurodegener* 2013; 8:20-8.
- Rosler N, Wichart I, Jellinger KA. Clinical significance of neurobiochemical profiles in the lumbar cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *J Neural Transm (Vienna)* 2001; 108 (2):231-46.
- Rosner BA. *Fundamentals of Biostatistics*, Fourth ed., Duxbury Press, Belmont, CA. In: 1995:519.
- Rowe CC, Ellis KA, Rimajova M, et al. Amyloid imaging results from the Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle (AIBL) study of aging. *Neurobiol Aging* 2010; 31 (8):1275-83.

- Rowe CC, Ng S, Ackermann U, et al. Imaging beta-amyloid burden in aging and dementia. *Neurology* 2007; 68 (20):1718-25.
- Rusanen M, Kivipelto M, Quesenberry CP, Jr., Zhou J, Whitmer RA. Heavy smoking in midlife and long-term risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Intern Med* 2011; 171 (4):333-9.
- Sagare A, Deane R, Bell RD, et al. Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med* 2007; 13 (9):1029-31.
- Sagare AP, Deane R, Zetterberg H, et al. Impaired lipoprotein receptor-mediated peripheral binding of plasma amyloid-beta is an early biomarker for mild cognitive impairment preceding Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2011; 24 (1):25-34.
- Sagare AP, Deane R, Zlokovic BV. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1: a physiological Abeta homeostatic mechanism with multiple therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther* 2012; 136 (1):94-105.
- Saido TC, Iwatsubo T, Mann DM, et al. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron* 1995; 14 (2):457-66.
- Saito T, Suemoto T, Brouwers N, et al. Potent amyloidogenicity and pathogenicity of Abeta43. *Nat Neurosci* 2011; 14 (8):1023-32.
- Salloway S, Sperling R, Fox NC, et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2014; 370 (4):322-33.
- Samgard K, Zetterberg H, Blennow K, et al. Cerebrospinal fluid total tau as a marker of Alzheimer's disease intensity. *Int J Geriatr Psychiatry* 2010; 25 (4):403-10.
- Sando SB, Melquist S, Cannon A, et al. Risk-reducing effect of education in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 2008; 23 (11):1156-62.
- Sarasa L, Allue JA, Pesini P, Gonzalez-Martinez A, Sarasa M. Identification of beta-amyloid species in canine cerebrospinal fluid by mass spectrometry. *Neurobiol Aging* 2013; 34 (9):2125-32.
- Sarasa M. [Experimental models for Alzheimer's disease research]. *Rev Neurol* 2006; 42 (5):297-301.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 1993; 43 (8):1467-72.
- Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, et al. Alzheimer's disease. *Lancet* 2016; 388 (10043):505-17.
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, et al. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 1996; 2 (8):864-70.

Bibliografia

- Schilling S, Zeitschel U, Hoffmann T, et al. Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate A β and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Med* 2008; 14 (10):1106-11.
- Schlossmacher MG, Ostaszewski BL, Hecker LJ, et al. Detection of distinct isoform patterns of the beta-amyloid precursor protein in human platelets and lymphocytes. *Neurobiol Aging* 1992; 13 (3):421-34.
- Schneider P, Hampel H, Buerger K. Biological marker candidates of Alzheimer's disease in blood, plasma, and serum. *CNS Neurosci Ther* 2009; 15 (4):358-74.
- Scholl M, Lockhart SN, Schonhaut DR, et al. PET Imaging of Tau Deposition in the Aging Human Brain. *Neuron* 2016; 89 (5):971-82.
- Schoonenboom NS, Mulder C, Vanderstichele H, et al. Effects of processing and storage conditions on amyloid beta (1-42) and tau concentrations in cerebrospinal fluid: implications for use in clinical practice. *Clin Chem* 2005; 51 (1):189-95.
- Schoonenboom NS, van der Flier WM, Blankenstein MA, et al. CSF and MRI markers independently contribute to the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2008; 29 (5):669-75.
- Schupf N, Patel B, Silverman W, et al. Elevated plasma amyloid beta-peptide 1-42 and onset of dementia in adults with Down syndrome. *Neurosci Lett* 2001; 301 (3):199-203.
- Schupf N, Tang MX, Fukuyama H, et al. Peripheral A β subspecies as risk biomarkers of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105 (37):14052-7.
- Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 1999; 399 (6738 Suppl):A23-A31.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001; 81 (2):741-66.
- Selkoe DJ. Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. *Nat Med* 2011; 17 (9):1060-5.
- Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 2016; 8 (6):595-608.
- Seppala TT, Nerg O, Koivisto AM, et al. CSF biomarkers for Alzheimer disease correlate with cortical brain biopsy findings. *Neurology* 2012; 78 (20):1568-75.
- Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, et al. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 1992; 359 (6393):325-7.
- Shah NS, Vidal JS, Masaki K, et al. Midlife blood pressure, plasma beta-amyloid, and the risk for Alzheimer disease: the Honolulu Asia Aging Study. *Hypertension* 2012; 59 (4):780-6.

- Shaw LM, Vanderstichele H, Knapik-Czajka M, et al. Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Ann Neurol* 2009; 65 (4):403-13.
- Shibata M, Yamada S, Kumar SR, et al. Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 2000; 106 (12):1489-99.
- Shii K, Yokono K, Baba S, Roth RA. Purification and characterization of insulin-degrading enzyme from human erythrocytes. *Diabetes* 1986; 35 (6):675-83.
- Shoji M, Golde TE, Ghiso J, et al. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 1992; 258 (5079):126-9.
- Silverberg GD, Messier AA, Miller MC, et al. Amyloid efflux transporter expression at the blood-brain barrier declines in normal aging. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010a; 69 (10):1034-43.
- Silverberg GD, Miller MC, Messier AA, et al. Amyloid deposition and influx transporter expression at the blood-brain barrier increase in normal aging. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010b; 69 (1):98-108.
- Silverman DH, Small GW, Chang CY, et al. Positron emission tomography in evaluation of dementia: Regional brain metabolism and long-term outcome. *JAMA* 2001; 286 (17):2120-7.
- Simonini G, Azzari C, Gelli AM, et al. Neprilysin levels in plasma and synovial fluid of juvenile idiopathic arthritis patients. *Rheumatol Int* 2005; 25 (5):336-40.
- Skoog I, Davidsson P, Aevarsson O, et al. Cerebrospinal fluid beta-amyloid 42 is reduced before the onset of sporadic dementia: a population-based study in 85-year-olds. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2003; 15 (3):169-76.
- Skovronsky DM, Lee VM, Pratico D. Amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in human platelets. Role of cyclooxygenase and protein kinase C. *J Biol Chem* 2001; 276 (20):17036-43.
- Slaets S, Le BN, Martin JJ, et al. Cerebrospinal fluid Abeta1-40 improves differential dementia diagnosis in patients with intermediate P-tau181P levels. *J Alzheimers Dis* 2013; 36 (4):759-67.
- Slemmon JR, Painter CL, Nadanaciva S, et al. Distribution of Abeta peptide in whole blood. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 846 (1-2):24-31.
- Small GW, Bookheimer SY, Thompson PM, et al. Current and future uses of neuroimaging for cognitively impaired patients. *Lancet Neurol* 2008; 7 (2):161-72.
- Small SA, Duff K. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron* 2008; 60 (4):534-42.

Bibliografia

- Snyder HM, Carrillo MC, Grodstein F, et al. Developing novel blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2014; 10 (1):109-14.
- Solomon A, Kivipelto M, Wolozin B, Zhou J, Whitmer RA. Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2009; 28 (1):75-80.
- Song L, Lachno DR, Hanlon D, et al. A digital enzyme-linked immunosorbent assay for ultrasensitive measurement of amyloid-beta 1-42 peptide in human plasma with utility for studies of Alzheimer's disease therapeutics. *Alzheimers Res Ther* 2016; 8 (1):58.
- Sparks DL, Kryscio RJ, Sabbagh MN, et al. Tau is reduced in AD plasma and validation of employed ELISA methods. *Am J Neurodegener Dis* 2012; 1 (1):99-106.
- Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011; 7 (3):280-92.
- Sperling RA, Johnson KA, Doraiswamy PM, et al. Amyloid deposition detected with florbetapir F 18 ((18)F-AV-45) is related to lower episodic memory performance in clinically normal older individuals. *Neurobiol Aging* 2013a; 34 (3):822-31.
- Sperling RA, Karlawish J, Johnson KA. Preclinical Alzheimer disease-the challenges ahead. *Nat Rev Neurol* 2013b; 9 (1):54-8.
- Spillantini MG, Bird TD, Ghetti B. Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathol* 1998; 8 (2):387-402.
- Spinney L. Alzheimer's disease: The forgetting gene. *Nature* 2014; 510 (7503):26-8.
- Sprott RL. Biomarkers of aging and disease: introduction and definitions. *Exp Gerontol* 2010; 45 (1):2-4.
- Stern Y. Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2012; 11 (11):1006-12.
- Stern Y, Gurland B, Tatemichi TK, et al. Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA* 1994; 271 (13):1004-10.
- Stomrud E, Hansson O, Zetterberg H, et al. Correlation of longitudinal cerebrospinal fluid biomarkers with cognitive decline in healthy older adults. *Arch Neurol* 2010; 67 (2):217-23.
- Strozyk D, Blennow K, White LR, Launer LJ. CSF Abeta 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. *Neurology* 2003; 60 (4):652-6.

- Sullivan CP, Berg EA, Elliott-Bryant R, et al. Pyroglutamate-Abeta 3 and 11 colocalize in amyloid plaques in Alzheimer's disease cerebral cortex with pyroglutamate-Abeta 11 forming the central core. *Neurosci Lett* 2011; 505 (2):109-12.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, et al. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 1994; 264 (5163):1336-40.
- Tamaoka A, Fukushima T, Sawamura N, et al. Amyloid beta protein in plasma from patients with sporadic Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1996; 141 (1-2):65-8.
- Tamaoka A, Sawamura N, Fukushima T, et al. Amyloid beta protein 42(43) in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1997; 148 (1):41-5.
- Tammen H, Hess R. Collection and handling of Blood Specimens for peptidomics. In: Simpson RJ, Greening DW, Eds. *Serum/Plasma Proteomics. Methods and protocols*. Parkville, Victoria: Humana Press, 2011:151-9.
- Tammen H, Schulte I, Hess R, et al. Peptidomic analysis of human blood specimens: comparison between plasma specimens and serum by differential peptide display. *Proteomics* 2005; 5 (13):3414-22.
- Tanzi RE, Moir RD, Wagner SL. Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron* 2004; 43 (5):605-8.
- Tapiola T, Pennanen C, Tapiola M, et al. MRI of hippocampus and entorhinal cortex in mild cognitive impairment: a follow-up study. *Neurobiol Aging* 2008; 29 (1):31-8.
- Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 2002; 58 (12):1791-800.
- Thambisetty M, Lovestone S. Blood-based biomarkers of Alzheimer's disease: challenging but feasible. *Biomark Med* 2010; 4 (1):65-79.
- Thurfjell L, Lundqvist R, Buckley C, Smith A, Sherwin P. Automated quantification of [18F] flutemetamol data-Comparison with standard of truth based on histopathology. *J Nucl Med* 2013; 54:302.
- Tokuda T, Calero M, Matsubara E, et al. Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer's amyloid beta peptides. *Biochem J* 2000; 348 Pt 2:359-65.
- Tolboom N, van der Flier WM, Yaqub M, et al. Relationship of cerebrospinal fluid markers to 11C-PiB and 18F-FDDNP binding. *J Nucl Med* 2009; 50 (9):1464-70.
- Toledo JB, Shaw LM, Trojanowski JQ. Plasma amyloid beta measurements - a desired but elusive Alzheimer's disease biomarker. *Alzheimers Res Ther* 2013; 5 (2):8.

Bibliografia

- Toledo JB, Vanderstichele H, Figurski M, et al. Factors affecting Abeta plasma levels and their utility as biomarkers in ADNI. *Acta Neuropathol* 2011; 122 (4):401-13.
- Tomasi G, Edison P, Bertoldo A, et al. Novel reference region model reveals increased microglial and reduced vascular binding of 11C-(R)-PK11195 in patients with Alzheimer's disease. *J Nucl Med* 2008; 49 (8):1249-56.
- Toombs J, Paterson RW, Schott JM, Zetterberg H. Amyloid-beta 42 adsorption following serial tube transfer. *Alzheimers Res Ther* 2014; 6 (1):5.
- Vagelatos NT, Eslick GD. Type 2 diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: the confounders, interactions, and neuropathology associated with this relationship. *Epidemiol Rev* 2013; 35:152-60.
- Valentin MA, Ma S, Zhao A, Legay F, Avrameas A. Validation of immunoassay for protein biomarkers: bioanalytical study plan implementation to support pre-clinical and clinical studies. *J Pharm Biomed Anal* 2011; 55 (5):869-77.
- van Oijen M, Hofman A, Soares HD, Koudstaal PJ, Breteler MM. Plasma Abeta(1-40) and Abeta(1-42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study. *Lancet Neurol* 2006; 5 (8):655-60.
- van Rossum IA, Vos S, Handels R, Visser PJ. Biomarkers as predictors for conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer-type dementia: implications for trial design. *J Alzheimers Dis* 2010; 20 (3):881-91.
- Vandenberghe R, Van LK, Ivanoiu A, et al. 18F-flutemetamol amyloid imaging in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: a phase 2 trial. *Ann Neurol* 2010; 68 (3):319-29.
- Vanderstichele H, Bibl M, Engelborghs S, et al. Standardization of preanalytical aspects of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: a consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimers Dement* 2012; 8 (1):65-73.
- Vanderstichele H, Van KE, Hesse C, et al. Standardization of measurement of beta-amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid and plasma. *Amyloid* 2000; 7 (4):245-58.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999; 286 (5440):735-41.
- Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, et al. MRI and CSF biomarkers in normal, MCI, and AD subjects: diagnostic discrimination and cognitive correlations. *Neurology* 2009; 73 (4):287-93.

- Verwey NA, van der Flier WM, Blennow K, et al. A worldwide multicentre comparison of assays for cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease. *Ann Clin Biochem* 2009; 46 (Pt 3):235-40.
- Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberburg I, Schenk DB. Characterization of beta-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *J Neurochem* 1993; 61 (5):1965-8.
- Villemagne VL. Amyloid imaging: Past, present and future perspectives. *Ageing Res Rev* 2016; 30:95-106.
- Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, et al. Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol* 2013a; 12 (4):357-67.
- Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, et al. Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol* 2013b; 12 (4):357-67.
- Villemagne VL, Chetelat G. Neuroimaging biomarkers in Alzheimer's disease and other dementias. *Ageing Res Rev* 2016; 30:4-16.
- Villemagne VL, Doré V, Yates P, et al. En Attendant Centiloid. *Advances in Research* 2014; 2:723-9.
- Villemagne VL, Fodero-Tavoletti MT, Masters CL, Rowe CC. Tau imaging: early progress and future directions. *Lancet Neurol* 2015; 14 (1):114-24.
- Villemagne VL, Mulligan RS, Pejoska S, et al. Comparison of 11C-PiB and 18F-florbetaben for Abeta imaging in ageing and Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 39 (6):983-9.
- Villemagne VL, Rowe CC, Macfarlane S, Novakovic KE, Masters CL. Imaginem oblivionis: the prospects of neuroimaging for early detection of Alzheimer's disease. *J Clin Neurosci* 2005; 12 (3):221-30.
- Visser PJ, Verhey F, Knol DL, et al. Prevalence and prognostic value of CSF markers of Alzheimer's disease pathology in patients with subjective cognitive impairment or mild cognitive impairment in the DESCRIPA study: a prospective cohort study. *Lancet Neurol* 2009; 8 (7):619-27.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, et al. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 2002; 416 (6880):535-9.
- Walsh DM, Selkoe DJ. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 2007; 101 (5):1172-84.

Bibliografia

- Wang DS, Dickson DW, Malter JS. beta-Amyloid degradation and Alzheimer's disease. *J Biomed Biotechnol* 2006a; 2006 (3):58406.
- Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ, Lee VM. The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol* 1999; 158 (2):328-37.
- Wang T, Xiao S, Liu Y, et al. The efficacy of plasma biomarkers in early diagnosis of Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 2014; 29 (7):713-9.
- Wang YJ, Zhou HD, Zhou XF. Clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease: progress, problems and perspectives. *Drug Discov Today* 2006b; 11 (19-20):931-8.
- Watt AD, Perez KA, Rembach AR, et al. Variability in blood-based amyloid-beta assays: the need for consensus on pre-analytical processing. *J Alzheimers Dis* 2012; 30 (2):323-36.
- Weber M, Rabenau B, Stanisch M, et al. Influence of sample type on soluble CD40 ligand assessment in patients with acute coronary syndromes. *Thromb Res* 2007; 120 (6):811-4.
- Wertkin AM, Turner RS, Pleasure SJ, et al. Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90 (20):9513-7.
- West-Nielsen M, Hogdall EV, Marchiori E, et al. Sample handling for mass spectrometric proteomic investigations of human sera. *Anal Chem* 2005; 77 (16):5114-23.
- Wilkins HM, Swerdlow RH. Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Res Bull* 2016 (16):10.
- Willemsse E, van UK, Brix B, et al. How to handle adsorption of cerebrospinal fluid amyloid-beta (1-42) in laboratory practice? Identifying problematic handlings and resolving the issue by use of the Abeta42/Abeta40 ratio. *Alzheimers Dement* 2017 (17):10.
- Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, et al. Amyloid beta peptide ratio 42/40 but not A beta 42 correlates with phospho-Tau in patients with low- and high-CSF A beta 40 load. *J Neurochem* 2007; 101 (4):1053-9.
- Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, et al. Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated Abeta peptides 1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in Alzheimer's disease and in patients with chronic neuroinflammation. *J Neurochem* 2002; 81 (3):481-96.
- Wirhth O, Bethge T, Marcello A, et al. Pyroglutamate Abeta pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases. *J Neural Transm (Vienna)* 2010; 117 (1):85-96.

- Wirhns O, Multhaup G, Czech C, et al. Intraneuronal Abeta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci Lett* 2001; 306 (1-2):116-20.
- Wittnam JL, Portelius E, Zetterberg H, et al. Pyroglutamate amyloid beta (Abeta) aggravates behavioral deficits in transgenic amyloid mouse model for Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2012; 287 (11):8154-62.
- Wu J, Li J, Huang KP, Huang FL. Attenuation of protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase signal transduction in the neurogranin knockout mouse. *J Biol Chem* 2002; 277 (22):19498-505.
- Yaffe K, Weston A, Graff-Radford NR, et al. Association of plasma beta-amyloid level and cognitive reserve with subsequent cognitive decline. *JAMA* 2011; 305 (3):261-6.
- Yamada T, Sasaki H, Furuya H, et al. Complementary DNA for the mouse homolog of the human amyloid beta protein precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 149 (2):665-71.
- Yan SD, Chen X, Fu J, et al. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 1996; 382 (6593):685-91.
- Yasojima K, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL. Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci Lett* 2001a; 297 (2):97-100.
- Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL. Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain. *Brain Res* 2001b; 919 (1):115-21.
- Yates D, McLoughlin D. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Psychiatry* 2008; 7 (1):1-5.
- Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y. Genomic organization of the human-amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 1991; 102 (2):291-2.
- You JS, Gelfanova V, Knierman MD, et al. The impact of blood contamination on the proteome of cerebrospinal fluid. *Proteomics* 2005; 5 (1):290-6.
- Zetterberg H, Blennow K. Plasma Abeta in Alzheimer's disease--up or down? *Lancet Neurol* 2006; 5 (8):638-9.
- Zetterberg H, Wilson D, Andreasson U, et al. Plasma tau levels in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2013; 5 (2):9.
- Zhang Y, Lee DH. Sink hypothesis and therapeutic strategies for attenuating Abeta levels. *Neuroscientist* 2011; 17 (2):163-73.

Bibliografia

- Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 2011; 4:3-4.
- Zheng H, Koo EH. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 2006; 1:5.:5.
- Zimmermann R, Huber E, Schamber C, et al. Plasma concentrations of the amyloid-beta peptides in young volunteers: the influence of the APOE genotype. *J Alzheimers Dis* 2014; 40 (4):1055-60.
- Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 2008; 57 (2):178-201.
- Zlokovic BV, Yamada S, Holtzman D, Ghiso J, Frangione B. Clearance of amyloid beta-peptide from brain: transport or metabolism? *Nat Med* 2000; 6 (7):718-9.
- Zou K, Liu J, Watanabe A, et al. Abeta43 is the earliest-depositing Abeta species in APP transgenic mouse brain and is converted to Abeta41 by two active domains of ACE. *Am J Pathol* 2013; 182 (6):2322-31.

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

VALIDACIÓN ABEST40 Y ABTEST2

Sensibilidad

Cálculo de la mínima dosis detectable para ABtest40

Mínima Dosis Detectable ABtest40									
	Lote 1 (OD)			Lote 2 (OD)			Lote 3 (OD)		
Replicado	Ensayo I	Ensayo II	Ensayo III	Ensayo I	Ensayo II	Ensayo III	Ensayo I	Ensayo II	Ensayo III
1	0,128			0,074	0,062	0,078	0,099	0,136	0,138
2	0,127	0,132	0,132	0,071	0,057	0,084	0,097	0,139	0,133
3	0,130	0,122	0,132	0,079	0,059	0,066	0,097	0,126	0,139
4	0,114	0,130	0,115	0,071	0,056	0,076	0,098	0,131	0,126
5	0,119	0,116	0,130	0,069	0,056	0,066	0,092	0,125	0,122
6	0,108	0,111	0,131	0,062	0,050	0,063	0,089	0,126	0,126
7	0,112	0,113	0,126	0,065	0,057	0,073	0,092	0,124	0,124
8	0,123	0,114	0,118	0,057	0,063	0,085	0,083	0,119	0,120
9	0,102	0,107	0,111		0,064	0,066	0,091	0,117	0,115
10	0,114	0,106	0,118	0,064	0,057	0,067	0,087	0,116	0,121
Promedio OD	0,118	0,117	0,124	0,068	0,058	0,072	0,093	0,126	0,126
SD	0,009	0,009	0,008	0,007	0,004	0,008	0,005	0,008	0,008
2*SD	0,019	0,019	0,016	0,013	0,008	0,016	0,011	0,015	0,016
OD _b + 2SD	0,136	0,136	0,140	0,081	0,066	0,088	0,103	0,141	0,142
MDD (pg/ml)	6,30	5,61	3,97	5,11	4,05	5,92	2,32	3,23	3,21

$$MDD = OD \text{ blanco} + 2 * SD$$

↳ Cálculo de la concentración con la ecuación de la recta para cada ensayo y lote

MDD ABtest40		
Lote ABtest	MDD (pg/ml)	SD (OD)
Lote 1	5,29	0,009
Lote 2	5,03	0,006
Lote 3	2,92	0,007
Media	4,41	

Tabla S1. Mínima dosis detectable (MDD) ABtest40. Representación de los datos de absorbancia (OD: densidad óptica) obtenidos para las 90 réplicas del blanco repartidas en tres lotes diferentes de ABtest y en tres ensayos independientes (10 réplicas por ensayo y lote). El cálculo de la MDD se realizó sumando dos veces la SD al dato de absorbancia promedio y calculando la concentración de dicho resultado a partir de la ecuación de la curva obtenida en cada ensayo y para cada lote. La MDD de ABtest40 se obtuvo calculando el promedio de los resultados obtenidos para cada uno de los tres lotes.

Nota: tanto en esta tabla como en las siguientes se han eliminado datos anómalos claramente desviados del resto para evitar sesgar los resultados obtenidos.

Cálculo de la mínima dosis detectable para ABtest42

Mínima Dosis Detectable ABtest42									
Replicado	Lote 1 (OD)			Lote 2 (OD)			Lote 3 (OD)		
	Ensayo I	Ensayo II	Ensayo III	Ensayo I	Ensayo II	Ensayo III	Ensayo I	Ensayo II	Ensayo III
1		0,081		0,116	0,116	0,106	0,101	0,095	0,093
2		0,074		0,110	0,121	0,120	0,090	0,092	0,104
3		0,082	0,096	0,105	0,104	0,096	0,085	0,092	0,113
4	0,108	0,080	0,089	0,104	0,104	0,098	0,088	0,093	0,105
5	0,104	0,075	0,085	0,099		0,111	0,093	0,096	0,112
6	0,102	0,073	0,088	0,103	0,094	0,099	0,102	0,093	0,101
7	0,099	0,082	0,082	0,099	0,106	0,106	0,091	0,110	0,102
8	0,093	0,074	0,081	0,119	0,108	0,108	0,090	0,098	0,102
9	0,088	0,075	0,087	0,113	0,125	0,108	0,089	0,100	0,115
10	0,080	0,068	0,082	0,101	0,118	0,098	0,094	0,090	0,114
Promedio OD	0,096	0,076	0,086	0,107	0,111	0,105	0,092	0,096	0,106
SD	0,010	0,005	0,005	0,007	0,010	0,007	0,005	0,006	0,007
2*SD	0,020	0,009	0,010	0,014	0,020	0,015	0,011	0,012	0,014
OD_b + 2SD	0,116	0,086	0,096	0,121	0,131	0,120	0,103	0,108	0,120
MDD (pg/ml)	1,76	2,23	1,58	2,01	3,39	2,29	2,36	2,37	2,72

$$\text{MDD} = \text{OD blanco} + 2 * \text{SD}$$

↳ Cálculo de la concentración con la ecuación de la recta para cada ensayo y lote

MDD ABtest42		
Lote ABtest	MDD (pg/ml)	SD (OD)
Lote 1	1,86	0,006
Lote 2	2,56	0,008
Lote 3	2,48	0,006
Media	2,30	

Tabla S2. Mínima dosis detectable (MDD) ABtest42. Representación de los datos de absorbancia (OD: densidad óptica) obtenidos para las 90 réplicas del blanco repartidas en tres lotes diferentes de ABtest y en tres ensayos independientes (10 réplicas por ensayo y lote). El cálculo de la MDD se realizó sumando dos veces la SD al dato de absorbancia promedio y calculando la concentración de dicho resultado a partir de la ecuación de la curva obtenida en cada ensayo y para cada lote. La MDD de ABtest42 se obtuvo calculando el promedio de los resultados obtenidos para cada uno de los tres lotes.

Límite del blanco de ABtest40

		Límite del blanco ABtest40								
		Lote 1 (pg/ml)			Lote 2 (pg/ml)			Lote 3 (pg/ml)		
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Muestra 1		-3,34	-2,62	-2,76	5,06	2,19	5,33	7,69	0,07	6,33
		-5,76	-8,52		-0,89	7,36	3,28	1,82	6,51	4,05
		-4,14	-8,19	-9,37	-0,59	6,61	1,15	6,70	7,37	5,76
		-4,41	-5,35	-3,31	0,59	7,11	3,02	-0,87	0,26	0,57
		-4,94	-5,04	-5,27	5,06	5,34	4,57	6,45	5,82	4,48
		-3,87	-6,59	-5,56	6,91	5,59	3,80	8,19	6,16	6,05
Muestra 2		-4,67	-7,87	-3,31	4,52	5,34	7,06	-4,50	1,72	1,45
		-4,14	-5,66	-6,71	2,02	4,04	3,54	-4,79	0,63	1,89
		-3,34	-4,73	-6,42	2,30	4,30	2,76	-0,87	1,54	0,72
		-2,81	-5,35	-6,42	2,87	5,85	3,02	-0,05	0,07	1,30
		-1,76	-1,44	-5,27	0,88	2,72	5,58	1,02	-1,23	1,45
		-2,28	-4,42	-3,04	3,42	5,08	4,06	-1,69	-6,25	1,59
Muestra 3		7,22	4,16	-1,68	2,02	6,36	9,21	-2,25	3,35	3,04
		1,07	0,85	-5,27	0,00	5,34	7,06	-1,97	-1,61	1,89
		2,33	0,00	-4,15	1,74	4,82	4,06	-3,37	1,72	1,45
		2,83	-0,57	-3,59	0,88	5,85	3,54	-2,80	-1,61	1,30
		-0,98	2,25	0,71	2,02	4,82	4,06	1,29	4,06	0,72
		5,54	7,07	-2,22	4,52	5,08	4,57	-1,42	-2,36	2,61
Muestra 4		2,33	-1,15	-4,42	2,02	3,52	4,31	-2,80	5,99	-1,49
		0,05	-1,15	-5,56	1,45	5,85	4,57	-3,37	2,63	1,30
		-0,98	0,29	-8,17	-0,59	5,85	3,28	-2,25	1,91	2,18
		0,05	-1,74	-4,42	0,88	5,85	4,31	2,61	2,27	2,32
		-2,28	-1,74	-2,22	3,14	4,56	1,69	2,61	2,99	2,47
		1,83	4,70	-3,59	-0,29	4,56	6,07	6,20	-1,80	-0,16

$$LB = \mu_B + C_p * SD_B$$

$$C_p (\alpha = 5\%) = \frac{1,645}{\left(1 - \frac{1}{4(B-K)}\right)} \quad SD_B = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^K (n_i - 1)SD_i^2}{\sum_{i=1}^K (n_i - 1)}}$$

μ_B : concentración promedio de todas las medidas analizadas

B: número total de resultados (réplicas)

K: número de muestras diferentes

LB ABtest40				
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Media
μ_B	-2,55	3,86	1,46	
SD_B	2,73	2,17	2,64	
B	71	72	72	
K	4	4	4	
C_p	1,651	1,651	1,651	
LB (pg/ml)	1,96	7,44	5,83	5,07

Tabla S3. Límite del blanco de ABtest40. Representación de todos los datos de concentración obtenidos para las 72 réplicas de muestras con niveles próximos al blanco para cada lote de ABtest40. Cálculo del LB para cada lote según el método paramétrico y promedio de los LB obtenidos en los tres lotes. μ_B : concentración promedio. SD_B : desviación estándar de las muestras con niveles próximos al blanco.

Límite del blanco de ABtest42

Límite del blanco ABtest42									
Lote 1 (pg/ml)			Lote 2 (pg/ml)			Lote 3 (pg/ml)			
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Muestra 1	1,99	-0,30	-2,41	-1,00	-0,68	-4,72	-0,11	-2,29	-0,43
	-0,30	-0,66	-4,95	-3,42	-1,25	-5,67	-2,15	-0,63	0,42
	-0,96	0,51	-2,61	-3,42	-1,59	-4,95	0,45	-0,90	0,63
	0,24	-0,07	-3,00	-4,05	-1,14	-4,28	-1,12	-0,50	0,74
	-1,41	0,05	-3,83	-4,05	-0,91	-4,72	-0,83	-0,90	1,05
	0,03	-0,19	2,42	-2,38	-0,91	-5,67	-0,83	0,04	0,42
Muestra 2	0,98	1,61	0,51	-2,10	-0,80	-3,04	1,68	-1,87	-0,86
	1,59	1,07	-0,79	-2,82	-0,91	-3,85	-1,70	-1,87	-0,64
	0,98	0,96	-2,61	-3,12	-1,02	-5,19	-0,97	-1,87	-0,86
	-0,96	0,84	-3,00	-2,82	-1,25	-4,95	-1,12	-1,59	-1,18
	0,14	1,72	-1,31	-2,97	-0,01	-4,28	-1,56	-0,77	0,11
	-0,96	1,40	2,14	-0,74	0,54	-1,91	-0,83	-0,63	0,00
Muestra 3	0,98	3,98	0,35	0,66	2,79	-0,21	2,08	-0,77	0,53
	0,98	4,27	0,35	1,14	2,05	-1,55	1,00	-1,32	1,16
	0,24	4,18	0,35	0,78	0,87	-2,46	1,41	-0,63	0,95
	1,99	4,47	0,66	1,50	1,30	-0,87	2,21	1,86	2,09
	2,18	2,15	1,42	1,26	0,76	-2,28	1,27	1,61	2,91
	1,49	3,18	2,28	1,50	1,52	1,62	2,87	0,31	1,57
Muestra 4	-0,85	-0,42	-2,61	0,90		-4,06	0,45	-2,29	-0,32
	-1,76	0,28	-3,20	-1,13	-0,01	-1,91	-0,11	-2,43	-0,11
	-1,76	-0,07	-3,41	-2,38	-0,12	-3,24	0,72	-0,36	0,11
	-1,07	-0,54	-1,85	-2,82	0,32	-3,85	1,81	0,04	1,57
	-2,11	-0,07	-2,04	-2,53	-0,01	-2,46	1,14	0,83	0,95
	-0,62	0,05	3,24	-1,40	1,20	-2,84	3,77	-1,45	0,95

$$LB = \mu_B + C_p * SD_B$$

$$C_p (\alpha = 5\%) = \frac{1,645}{\left(1 - \frac{1}{4(B-K)}\right)} \quad SD_B = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^K (n_i - 1)SD_i^2}{\sum_{i=1}^K (n_i - 1)}}$$

μ_B : concentración promedio de todas las medidas analizadas

B: número total de resultados (réplicas)

K: número de muestras diferentes

LB ABtest42				
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Media
μ_B	0,08	-1,58	0,04	
SD_B	1,62	1,65	1,14	
B	72	71	72	
K	4	4	4	
C_p	1,651	1,651	1,651	
LB (pg/ml)	2,74	1,15	1,93	1,94

Tabla S4. Límite del blanco de ABtest42. Representación de todos los datos de concentración obtenidos para las 72 réplicas de muestras con niveles próximos al blanco para cada lote de ABtest40. Cálculo del LB para cada lote según el método paramétrico y promedio de los LB obtenidos en los tres lotes. μ_B : concentración promedio. SD_B : desviación estándar de las muestras con niveles próximos al blanco.

Límite de detección de ABtest40

Límite de detección ABtest40									
Lote 1 (pg/ml)			Lote 2 (pg/ml)			Lote 3 (pg/ml)			
Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	
Muestra 1	7,17	5,63	7,22	5,77	6,90	4,75	7,00	4,44	6,09
	6,34		7,22	5,27	6,67	3,31	4,21	4,07	6,09
	5,79	5,35		3,24	5,95	3,07	4,77	4,80	6,31
	6,62	4,21	7,22	3,76	4,48	3,31	4,77	5,34	5,64
	8,80	4,21	8,83	5,02	3,73	2,83	6,07	4,62	4,50
	7,45		7,22	4,01	5,70	3,80	5,14	5,88	3,59
Muestra 2	8,80	6,46	9,06	5,77	7,85	6,15	5,89	4,07	5,41
	5,79	5,06	10,19	5,52		3,07	3,46	4,44	8,32
	5,51	7,84		6,02	5,70	1,84	4,77	5,70	6,31
	6,07	5,91	11,52	5,52	5,70	2,34	4,40	5,88	6,76
	7,45	8,11	8,38	7,72	4,97	3,07	3,65	5,34	6,76
	5,23		6,52	6,02	7,85	3,80	5,70	5,34	4,05
Muestra 3	9,07	6,46	7,69	7,48	7,85	5,45		6,24	5,19
	7,72	7,02	7,22	5,52	5,70	2,83	6,44	6,06	4,73
	4,94	7,29	8,61	7,00	7,14	2,34	5,70	6,78	5,64
	6,34	5,06	7,92	5,27	5,70	2,09	4,58	4,80	4,28
	9,07	8,66	5,58	4,77	4,23	3,55	5,33	4,44	2,20
	5,79	7,02	6,52	4,52	5,95	4,51	4,96	7,31	4,96
Muestra 4	7,99	6,46	7,92	8,44	7,61	6,61	6,81	7,13	6,09
	7,72	7,84	7,92	8,44	5,46	4,27	6,63	6,42	6,54
	6,34	8,11	10,41	8,68	4,48	4,27	6,81	6,95	6,76
	7,45	6,19	8,83	8,92	3,22	4,51	7,00	8,02	5,64
	10,40		8,61	8,92	5,46	4,04	7,18	4,80	4,05
	7,17	5,63	5,34	8,92	5,95	4,51	8,83	5,70	3,36

$$LD = LB + C_p * SD_L$$

$$C_p(\alpha = 5\%) = \frac{1,645}{\left(1 - \frac{1}{4(L-J)}\right)} \quad SD_L = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^J (n_i - 1)SD_i^2}{\sum_{i=1}^J (n_i - 1)}}$$

LB: dato del límite del blanco previamente calculado

L: número total de resultados (réplicas)

J: número de muestras diferentes

LD ABtest40				
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Media
LB (pg/ml)	5,07	5,07	5,07	
SD _L	1,51	1,74	1,17	
L	66	71	71	
J	4	4	4	
C _p	1,652	1,651	1,651	
LD (pg/ml)	7,56	7,94	7,01	7,50

Tabla S5. Límite de detección de ABtest40. Representación de los 72 datos de concentración obtenidos con muestras con niveles próximos al LB para cada lote de ABtest40. Cálculo del LD para cada lote y del promedio de los tres lotes para establecer el LD del kit. LB: límite del blanco. LD: límite de detección. SD_L: desviación estándar de las muestras con niveles bajos de concentración.

Límite de detección ABtest42									
Lote 1 (pg/ml)			Lote 2 (pg/ml)			Lote 3 (pg/ml)			
Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	
Muestra 1	2,42	2,96	3,42	4,26	4,64	3,25	1,04	0,83	1,76
	2,33	2,51	2,22	2,28	2,96	1,69	1,82	1,14	2,01
	2,89	4,23	2,22	2,40	2,45	0,99	1,43	0,83	1,51
	2,89	3,96		3,23	1,12	0,99	1,56	0,19	2,01
	7,00	5,56	2,70	-0,04	0,98	1,92	1,95	1,14	1,76
	3,63	4,77	2,82	2,04	2,06	3,03	2,21	1,60	1,88
Muestra 2	1,95	3,25	2,46	4,03	-1,40	3,99	1,95	3,25	1,51
	2,33	2,96	2,46	4,59	2,19	2,15	2,72	1,60	2,01
	2,24	3,10	1,59		2,45	1,69	1,56	-0,62	1,63
	3,26	2,81	2,94	2,16	1,66	2,59	1,69	2,66	2,50
	2,89	2,66	1,20	1,03	2,45	3,46	2,33	2,51	5,59
	3,72	3,10	1,33	3,12	2,32	3,57	2,08	1,60	2,01
Muestra 3	2,24	4,77	2,58	2,88	3,08	3,57	1,69	2,21	2,99
	2,42	3,68	2,94	3,00	1,53	2,37	3,47	1,14	2,50
	2,33	3,54	2,22	1,91	2,58	2,59	2,21	2,21	2,38
	4,08	3,25	2,58	2,76	1,66	1,58	1,82	2,36	2,99
	3,17	3,39	1,59	2,28	0,13	1,46	2,08	2,21	2,87
	3,81	3,39	1,46	2,88	2,19	2,03	2,33	1,30	2,13
Muestra 4	2,24	3,39	2,82	3,81	4,41	5,21	5,44	1,91	3,11
	1,86	3,54	4,44	3,81	3,08	2,81	2,84	1,91	2,50
	1,76	2,96	4,22	3,12	1,53	1,92	3,47	2,21	2,99
	2,52	2,81	2,46	4,26	0,42	1,92	2,46	2,66	2,25
	2,33	3,10	3,53	3,00	2,06	2,92	2,84	3,54	2,50
	2,89	3,10	2,34	3,23	2,19	3,67	2,21	1,91	2,62

$$LD = LB + C_p * SD_L$$

$$C_p (\alpha = 5\%) = \frac{1,645}{\left(1 - \frac{1}{4(L-J)}\right)} \quad SD_L = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^J (n_i - 1) SD_i^2}{\sum_{i=1}^J (n_i - 1)}}$$

LB: dato del límite del blanco previamente calculado

L: número total de resultados (réplicas)

J: número de muestras diferentes

LD ABtest42				
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Media
LB (pg/ml)	1,94	1,94	1,94	
SD _L	0,93	1,15	0,82	
L	71	71	72	
J	4	4	4	
C _p	1,651	1,651	1,651	
LD (pg/ml)	3,47	3,84	3,29	3,54

Tabla S6. Límite de detección de ABtest42. Representación de los 72 datos de concentración obtenidos con muestras con niveles próximos al LB para cada lote de ABtest42. Cálculo del LD para cada lote y del promedio de los tres lotes para establecer el LD del kit. LB: límite del blanco. LD: límite de detección. SD_L: desviación estándar de las muestras con niveles de concentración.

Límite de cuantificación de ABtest40 y ABtest42

ABtest40. Lote 1 (pg/ml)				ABtest40. Lote 2 (pg/ml)			
11,24	4,16	7,20	8,57	11,81	5,72	7,81	6,91
6,30	5,39	6,60	8,57	6,93	5,72	8,40	8,29
7,20	10,11	5,39	7,22	8,98	9,27	5,42	7,19
8,96	7,79	5,39	7,22	7,81	10,69	5,72	7,19
6,30	7,20	10,22	6,88	6,33	8,69	9,27	5,21
5,39	6,90	9,89	6,19	6,33	7,81	10,44	6,06
6,90	6,60	6,54	8,57	8,11	7,52	9,91	10,70
6,60	7,79	7,22	10,22	9,56	4,18	8,56	8,29
6,60	9,25	5,14	6,88	7,81	6,33	8,29	8,29
5,70	6,90	6,88	11,19	6,93	9,84	9,91	9,10
6,60	7,79	8,57	8,24	6,63	9,27	7,19	8,83

ABtest42. Lote 1 (pg/ml)				ABtest42. Lote 2 (pg/ml)			
3,79	3,48	4,71	4,71	3,55	5,12	4,78	4,61
3,79	3,48	4,40	4,40	3,36	4,78	2,98	5,28
3,79	4,10	4,10	4,71	3,73	5,12	5,12	4,44
4,10	4,10	3,79	4,10	6,54	3,73	4,27	2,39
4,71	1,53	4,10	3,79	4,61	2,79	4,78	3,55
4,71	4,10	4,71	4,10	3,55	3,55	5,60	3,91
4,10	4,71	3,79	4,40	4,44	4,61	2,59	4,09
3,79	4,40	4,10	5,60	3,55	3,36	3,36	5,60
3,79	3,48	3,79	4,10	3,17	4,61	5,28	6,08
4,40	3,48	4,40	4,71	3,91	4,09	5,12	4,09
4,40	3,79	4,40	4,40	4,27	3,91	5,12	5,28

Tabla S7. Límite de cuantificación de ABtest40 y ABtest42. Representación de los 44 datos de concentración obtenidos en cada uno de los dos lotes de ABtest utilizados.

Exactitud

Exactitud de ABtest40 con muestras de plasma

		Exactitud ABtest40. Plasma									
	Replicado	LIC (pg/ml)	ER (%)	Baja (pg/ml)	ER (%)	Media (pg/ml)	ER (%)	Alta (pg/ml)	ER (%)	LSC (pg/ml)	ER (%)
Ensayo 1	1	17,90	11,27	31,08	3,54	58,96	10,31	110,05	-3,09	204,52	6,57
	2	17,24	7,14	32,82	9,36	59,59	11,50	105,72	-6,90	200,17	4,30
	3	15,80	-1,81	29,67	-1,13	56,38	5,49	108,53	-4,42	>ULOQ	
	4	15,04	-6,54	29,59	-1,43	54,12	1,27	107,88	-5,00	203,55	6,06
	5	15,04	-6,54	29,63	-1,28	56,87	6,40	104,18	-8,25	208,38	8,58
	6	15,80	-1,81	29,94	-0,24	55,83	4,46	99,80	-12,12	200,04	4,23
Ensayo 2	7	18,75	16,53	26,70	-11,06	48,51	-9,23	97,72	-13,95	183,76	-4,25
	8	18,62	15,74	27,39	-8,73	58,14	8,78	98,13	-13,59	188,86	-1,59
	9	18,16	12,88	26,88	-10,43	53,06	-0,72	97,18	-14,42	181,05	-5,66
	10	13,95	-13,30	24,92	-16,96	51,78	-3,12	115,21	1,45	193,16	0,65
	11	13,79	-14,33	24,66	-17,82	44,72	-16,33	112,97	-0,51	179,33	-6,56
	12	13,87	-13,82	25,96	-13,52	54,48	1,94	103,31	-9,02	177,98	-7,26
Ensayo 3	13	21,25	32,09	33,92	13,01	59,17	10,71	107,25	-5,55	193,25	0,70
	14	18,76	16,59	33,16	10,49	60,32	12,86	105,67	-6,94	194,44	1,32
	15	20,23	25,74	33,60	11,95	59,36	11,06	108,29	-4,64	188,59	-1,73
	16	18,28	13,60	31,87	6,20	59,01	10,40	116,34	2,46	187,83	-2,13
	17	17,35	7,85	31,63	5,37	61,87	15,76	111,97	-1,40	193,79	0,98
	18	18,30	13,72	33,28	10,89	58,34	9,16	106,78	-5,97	188,02	-2,03
Ensayo 4	19	19,22	19,46	31,30	4,30	55,77	4,35	107,42	-5,40	208,39	8,58
	20	17,49	8,69	31,35	4,45	59,36	11,07	114,74	1,04	200,51	4,48
	21	20,05	24,62	32,30	7,62	63,55	18,90	110,55	-2,65	203,83	6,21
	22	16,98	5,55	30,75	2,46	58,08	8,67	113,13	-0,37	198,91	3,64
	23	20,19	25,49	33,09	10,24	51,93	-2,83	116,96	3,00	198,83	3,61
	24	17,96	11,64	31,77	5,87	56,91	6,48	115,50	1,72	200,79	4,63
Ensayo 5	25	19,25	19,61	30,77	2,53	56,46	5,64	104,44	-8,02	205,43	7,04
	26	15,86	-1,44	30,77	2,53	59,80	11,89	105,82	-6,81	196,36	2,32
	27	17,25	7,21	31,26	4,17	56,78	6,24	103,90	-8,51	207,47	8,11
	28	14,95	-7,11	30,97	3,18	59,10	10,58	114,57	0,89	190,86	-0,55
	29	14,35	-10,82	28,40	-5,38	61,88	15,79	117,23	3,23	192,19	0,15
	30	14,65	-8,96	29,26	-2,52	55,49	3,83	110,67	-2,54	183,35	-4,46
Ensayo 6	31	20,09	24,87	32,83	9,37	59,77	11,84	111,08	-2,18	199,59	4,00
	32	17,83	10,78	31,68	5,54	60,35	12,93	112,27	-1,13	194,79	1,50
	33	17,60	9,35	30,75	2,44	58,20	8,89	111,68	-1,65	190,41	-0,78
	34	16,42	2,06	30,00	-0,03	60,10	12,46	113,66	0,09	188,57	-1,74
	35	16,06	-0,19	29,89	-0,42	59,15	10,68	115,21	1,46	187,59	-2,26
	36	14,65	-8,94	27,77	-7,47	55,75	4,31	112,37	-1,05	193,97	1,07

Tabla S8: Exactitud de ABtest40 con muestras de plasma sin diluir. Concentración y ER (%) con respecto a la concentración teórica previamente establecida de cada una de las réplicas analizadas en seis ensayos independientes y para cada muestra de plasma sin diluir.

Exactitud de ABtest42 con muestras de plasma

Exactitud ABtest42. Plasma											
	Replicado	LIC (pg/ml)	ER (%)	Baja (pg/ml)	ER (%)	Media (pg/ml)	ER (%)	Alta (pg/ml)	ER (%)	LSC (pg/ml)	ER (%)
Ensayo 1	1	5,30	-19,18	18,92	0,41	24,10	-10,39	52,20	-6,73	92,15	3,35
	2	6,18	-5,82	17,30	-8,20	26,14	-2,78	52,84	-5,59	93,68	5,07
	3	5,64	-14,03	15,68	-16,76	23,29	-13,41	53,32	-4,74	93,43	4,79
	4	5,46	-16,73	16,83	-10,69	23,63	-12,14	48,20	-13,88	92,05	3,24
	5	5,61	-14,45	13,83	-26,62	22,14	-17,68	48,10	-14,06	90,56	1,57
	6	5,65	-13,89	16,38	-13,07	23,45	-12,82	51,54	-7,90	91,28	2,38
Ensayo 2	7	6,00	-8,55	15,18	-19,43	22,86	-15,00	55,21	-1,35	82,82	-7,11
	8	4,84	-26,24	21,00	11,45	31,28	16,33	57,98	3,60	89,19	0,03
	9	6,56	0,10	20,25	7,49	24,05	-10,56	55,21	-1,35	81,37	-8,74
	10	5,68	-13,31	13,09	-30,55	27,71	3,05	64,24	14,79	93,72	5,12
	11	4,93	-24,87	9,16	-51,37	19,72	-26,68	62,31	11,33	80,54	-9,67
	12	3,47	-47,05	17,72	-5,96	29,17	8,47	55,21	-1,35	80,73	-9,46
Ensayo 3	13	5,72	-12,84	17,57	-6,73	27,18	1,09	54,85	-2,00	93,32	4,67
	14	5,04	-23,21	18,43	-2,19	29,04	7,98	54,42	-2,77	91,48	2,60
	15	5,84	-10,98	14,91	-20,86	28,20	4,88	54,64	-2,37	87,89	-1,42
	16	5,55	-15,31	16,08	-14,66	24,90	-7,41	56,51	0,97	93,02	4,33
	17	6,01	-8,28	12,20	-35,25	22,13	-17,70	52,88	-5,52	97,58	9,45
	18			17,79	-5,58	27,42	1,97	53,99	-3,53	93,39	4,75
Ensayo 4	19	6,31	-3,79	20,28	7,65	27,61	2,68	53,98	-3,55	93,20	4,54
	20	6,22	-5,12	19,67	4,40	26,99	0,37	54,10	-3,34	96,64	8,40
	21	6,20	-5,52	18,41	-2,27	27,60	2,62	52,95	-5,39	97,70	9,58
	22	6,21	-5,26	18,32	-2,79	27,38	1,80	50,25	-10,21	103,15	15,69
	23	7,55	15,15	17,65	-6,32	26,05	-3,14	54,22	-3,12	102,92	15,43
	24	5,05	-22,99	17,67	-6,23	26,98	0,34	52,77	-5,71	98,11	10,04
Ensayo 5	25	6,39	-2,56	19,76	4,88	28,06	4,35	56,74	1,39	94,90	6,44
	26	5,96	-9,18	20,30	7,76	29,20	8,57	55,62	-0,61	93,23	4,57
	27	5,41	-17,56	20,36	8,04	27,78	3,31	56,46	0,88	97,13	8,94
	28	5,39	-17,85	16,93	-10,14	28,97	7,71	58,93	5,30	110,04	23,42
	29	6,16	-6,11	18,74	-0,54	27,70	3,01	55,91	-0,10	111,32	24,86
	30	5,16	-21,36	19,07	1,21	27,60	2,61	55,37	-1,07	114,55	28,48
Ensayo 6	31	6,89	5,15	19,76	4,85	30,30	12,68	58,70	4,89	94,04	5,48
	32	5,59	-14,79	19,41	2,99	28,41	5,64	55,57	-0,70	95,66	7,29
	33	6,48	-1,24	18,64	-1,06	26,68	-0,79	56,18	0,39	92,38	3,61
	34	6,04	-7,88	19,36	2,78	29,86	11,03	58,04	3,71	96,11	7,80
	35	5,32	-18,85	17,81	-5,47	27,91	3,77	58,60	4,70	95,28	6,86
	36	4,74	-27,65	20,46	8,59	28,18	4,77	57,55	2,83	96,02	7,69

Tabla S9: Exactitud de ABtest42 con muestras de plasma sin diluir. Concentración y ER (%) con respecto a la concentración teórica previamente establecida de cada una de las réplicas analizadas en seis ensayos independientes y para cada muestra de plasma sin diluir.

Información suplementaria

Exactitud de ABtest40 con muestras de plasma diluido

		Exactitud ABtest40. Plasma diluido										
		Replicado	LIC (pg/ml)	ER (%)	Baja (pg/ml)	ER (%)	Media (pg/ml)	ER (%)	Alta (pg/ml)	ER (%)	LSC (pg/ml)	ER (%)
Ensayo 1	1	12,18	1,83	19,69	-7,36	51,69	11,46	105,80	10,39	161,37	12,50	
	2	11,82	-1,23	20,63	-2,93	53,46	15,27	109,29	14,03	157,61	14,76	
	3	14,89	24,41	19,88	-6,47	51,56	11,18	113,33	18,24	154,90	12,79	
	4	9,59	-19,83	19,50	-8,25	52,83	13,91	104,73	9,27	148,28	7,97	
	5	10,15	-15,14	20,63	-2,93	51,82	11,73	111,44	16,27	138,27	0,68	
	6	12,55	4,87	18,16	-14,57	51,69	11,46	118,64	23,78	141,49	3,03	
Ensayo 2	7	12,32	2,95	17,32	-18,52	41,27	-11,02	88,55	-7,61	133,12	-3,07	
	8	10,94	-8,61	20,51	-3,49	41,55	-10,41	90,04	-6,06	131,95	-3,92	
	9	11,63	-2,81	15,89	-25,23	41,27	-11,02	93,73	-2,20	153,07	11,46	
	10	10,52	-12,09	20,51	-3,49	46,47	0,20	89,44	-6,68	136,91	-0,31	
	11	9,40	-21,44	17,55	-17,42	47,00	1,35	90,43	-5,65	132,34	-3,64	
	12	10,52	-12,09	16,85	-20,74	51,19	10,39	99,79	4,11	129,34	-5,82	
Ensayo 3	13	11,28	-5,69	17,53	-17,52	49,69	7,14	95,28	-0,59	141,31	2,89	
	14	9,46	-20,92	18,51	-12,90	50,77	9,46	97,17	1,39	140,10	2,02	
	15	9,46	-20,92	17,43	-17,99	51,53	11,11	112,35	17,22	136,52	-0,59	
	16	9,77	-18,37	17,57	-17,35	51,68	11,43	95,70	-0,15	137,59	0,19	
	17	9,77	-18,37	17,11	-19,50	52,43	13,06	97,69	1,93	141,63	3,13	
	18	11,59	-3,18	18,74	-11,81	55,55	19,78	112,72	17,61	157,74	14,86	
Ensayo 4	19	11,61	-2,95	17,65	-16,95	48,52	4,63	118,26	23,39	154,09	12,20	
	20	11,75	-1,82	17,65	-16,95	42,84	-7,63	119,31	24,48	149,35	8,75	
	21	12,96	8,31	17,65	-16,95	43,69	-5,79	102,81	7,26	141,14	2,77	
	22	10,93	-8,62	22,18	4,38	49,06	5,79	103,53	8,02	152,46	11,01	
	23	10,53	-12,04	20,45	-3,79	48,52	4,63	109,11	13,84	145,43	5,89	
	24	11,34	-5,21	22,75	7,05	44,11	-4,88	98,74	3,02	144,54	5,25	
Ensayo 5	25	8,82	-26,29	22,64	6,51	52,65	13,53	101,11	5,49	143,88	4,77	
	26	9,70	-18,96	22,03	3,64	48,31	4,18	100,32	4,68	142,19	3,54	
	27	10,42	-12,89	22,84	7,47	51,11	10,22	101,02	5,40	141,85	3,29	
	28	8,97	-25,07	22,43	5,56	47,96	3,41	104,46	8,99	152,36	10,94	
	29	7,64	-36,13	20,58	-3,17	52,65	13,53	108,08	12,76	166,21	21,03	
	30	10,57	-11,68	21,62	1,71	49,55	6,84	120,29	25,50	162,33	18,20	
Ensayo 6	31	8,36	-30,16	25,27	18,91	48,19	3,91	105,10	9,66	144,40	5,14	
	32	10,23	-14,51	20,46	-3,74	47,06	1,47	99,29	3,60	133,36	-2,90	
	33	11,07	-7,49	17,31	-18,54	48,83	5,29	101,46	5,86	137,42	0,06	
	34	9,55	-20,16	24,35	14,56	45,75	-1,34	100,56	4,92	140,98	2,65	
	35	10,23	-14,51	20,21	-4,93	47,22	1,82	92,78	-3,19	153,31	11,63	
	36	10,73	-10,29	17,04	-19,82	46,25	-0,28	91,92	-4,09	132,31	-3,66	

Tabla S10: Exactitud de ABtest40 con muestras de plasma diluido. Concentración y ER (%) con respecto a la concentración teórica previamente establecida de cada una de las réplicas analizadas en seis ensayos independientes y para cada muestra de plasma diluido.

Exactitud de ABtest42 con muestras de plasma diluido

		Exactitud ABtest42. Plasma diluido									
	Replicado	LIC (pg/ml)	ER (%)	Baja (pg/ml)	ER (%)	Media (pg/ml)	ER (%)	Alta (pg/ml)	ER (%)	LSC (pg/ml)	ER (%)
Ensayo 1	1	9,44	-4,05	16,25	2,55	29,39	-12,42	55,95	14,14	95,26	9,22
	2	9,11	-7,42	16,53	4,29	29,79	-11,23	56,38	15,01	88,08	1,00
	3	9,73	-1,04	17,26	8,90	29,17	-13,09	48,50	-1,07	86,85	-0,42
	4	9,38	-4,62	15,49	-2,24	31,97	-4,74	49,33	0,63	84,64	-2,95
	5	8,55	-13,03	17,25	8,86	34,45	2,65	51,68	5,43	88,31	1,26
	6	8,05	-18,15	15,54	-1,94	30,23	-9,92	55,15	12,50	90,66	3,95
Ensayo 2	7	10,19	3,58	18,28	15,38	34,75	3,55	51,97	6,01	84,24	-3,42
	8	11,37	15,65	17,40	9,82	38,07	13,44	51,84	5,76	81,09	-7,03
	9	14,84	50,88	20,57	29,82	40,03	19,29	58,20	18,72	85,72	-1,71
	10	9,88	0,46	18,27	15,33	42,73	27,32	51,91	5,89	92,39	5,93
	11	9,13	-7,18	18,40	16,13	42,15	25,59	55,37	12,96	94,84	8,74
	12	10,47	6,44	17,98	13,48	34,15	1,76	55,84	13,91	84,54	-3,07
Ensayo 3	13	12,05	22,50	17,98	13,47	37,89	12,91	53,27	8,68	104,45	19,76
	14	11,69	18,89	18,96	19,68	36,10	7,58	55,20	12,61	>ULOQ	
	15	13,17	33,91	19,10	20,57	33,29	-0,81	49,41	0,79	88,20	1,12
	16	8,72	-11,37	17,84	12,60	40,11	19,51	54,72	11,62	97,69	12,01
	17	8,39	-14,65	16,67	5,23	40,14	19,59	47,26	-3,59	91,86	5,33
	18	10,99	11,71	17,82	12,45	38,89	15,89	47,88	-2,32	98,58	13,03
Ensayo 4	19	10,71	8,94	17,93	13,13	35,38	5,42	55,51	13,24	92,94	6,56
	20	10,37	5,45	17,53	10,66	33,63	0,20	55,22	12,65	91,84	5,30
	21	8,97	-8,78	18,36	15,90	33,62	0,17	49,44	0,85	90,30	3,54
	22	12,84	30,59	18,01	13,64	34,17	1,81	46,63	-4,87	96,74	10,92
	23	12,13	23,32	17,33	9,34	32,90	-1,97	47,64	-2,81	99,65	14,26
	24	9,08	-7,66	17,09	7,88	32,05	-4,51	47,33	-3,45	99,44	14,01
Ensayo 5	25	10,85	10,35	15,86	0,11	32,22	-4,00	51,49	5,04	88,60	1,59
	26	11,02	12,07	15,58	-1,70	32,83	-2,18	50,24	2,48	91,44	4,84
	27	10,81	9,89	17,12	8,02	34,39	2,48	51,29	4,63	90,29	3,52
	28	10,61	7,83	20,06	26,58	33,39	-0,52	49,59	1,16	93,47	7,17
	29	8,41	-14,48	15,29	-3,48	32,11	-4,32	51,74	5,55	91,32	4,70
	30	10,23	3,98	15,00	-5,36	32,20	-4,06	50,23	2,48	94,66	8,54
Ensayo 6	31	9,75	-0,86	17,53	10,63	31,91	-4,92	51,56	5,19	89,63	2,77
	32	11,51	17,07	18,51	16,83	33,20	-1,07	50,96	3,95	89,61	2,74
	33	9,47	-3,67	17,43	10,00	33,21	-1,05	50,50	3,03	93,79	7,54
	34	13,29	35,15	17,57	10,86	33,00	-1,68	57,39	17,06	88,74	1,75
	35	10,38	5,53	17,11	7,97	33,44	-0,35	50,15	2,30	89,60	2,73
	36	11,86	20,56	18,74	18,28	33,86	0,90	49,92	1,83	90,69	3,98

Tabla S11: Exactitud de ABtest42 con muestras de plasma diluido. Concentración y ER (%) con respecto a la concentración teórica previamente establecida de cada una de las réplicas analizadas en seis ensayos independientes y para cada muestra de plasma diluido.

Linealidad de la dilución

ABtest40 con muestras de plasma

		ABtest40					
		SSD			PBS		
		Abs corr	pg/ml	x diluc	Abs corr	pg/ml	x diluc
Muestra 1	Sin dil	0,774	98,01	98,01	0,774	98,01	98,01
	1/3	0,679	88,32	264,96	0,286	43,88	131,63
	1/6	0,255	39,99	239,96	0,133	24,01	144,08
	1/9	0,122	22,44	201,98	0,069	15,04	135,40
Muestra 2	Sin dil	0,721	92,65	92,65	0,721	92,65	92,65
	1/3	0,579	77,73	233,19	0,280	43,07	129,20
	1/6	0,250	39,30	235,79	0,138	24,62	147,74
	1/9	0,139	24,83	223,45	0,063	14,26	128,35
Muestra 3	Sin dil	0,767	97,31	97,31	0,767	97,31	97,31
	1/3	0,652	85,45	256,35	0,348	51,39	154,16
	1/6	0,264	41,06	246,39	0,190	31,56	189,37
	1/9	0,158	27,39	246,48	0,119	22,03	198,28
Muestra 4	Sin dil	0,612	81,27	81,27	0,612	81,27	81,27
	1/3	0,597	79,61	238,84	0,265	41,25	123,76
	1/6	0,255	39,93	239,58	0,142	25,17	150,99
	1/9	0,121	22,37	201,36	0,082	16,95	152,59
Muestra 5	Sin dil	0,816	102,19	102,19	0,816	102,19	102,19
	1/3	0,759	96,45	289,36	0,428	60,87	182,61
	1/6	0,312	47,02	282,12	0,175	29,65	177,90
	1/9	0,213	34,62	311,62	0,120	22,17	199,51
Media	Sin dil	0,738	94,29	94,29	0,738	94,29	94,29
	1/3	0,653	85,51	256,54	0,321	48,09	144,27
	1/6	0,267	41,46	248,77	0,155	27,00	162,02
	1/9	0,151	26,33	236,98	0,090	18,09	162,83

Tabla S12: Linealidad de la dilución con muestras de plasma para ABtest40. Representación de la absorbancia corregida (Abs corr), la concentración (pg/ml) y la concentración corregida (x diluc) tras aplicar el correspondiente factor de dilución para cada una de las cinco muestras de plasma analizadas. *SSD: sample/standard diluent.*

ABtest42 con muestras de plasma

		ABtest42					
		SSD			PBS		
		Abs corr	pg/ml	x diluc	Abs corr	pg/ml	x diluc
Muestra 1	Sin dil	0,297	30,46	30,46	0,297	30,46	30,46
	1/3	0,237	26,44	79,33	0,084	13,31	39,94
	1/6	0,054	9,76	58,59	0,028	5,97	35,80
	1/9	0,019	4,41	39,68	0,003	1,07	9,66
Muestra 2	Sin dil	0,259	27,99	27,99	0,259	27,99	27,99
	1/3	0,166	21,07	63,20	0,055	9,90	29,69
	1/6	0,067	11,34	68,06	0,003	0,95	5,71
	1/9	-0,007			-0,011		
Muestra 3	Sin dil	0,188	22,87	22,87	0,188	22,87	22,87
	1/3	0,154	20,10	60,31	0,048	8,96	26,88
	1/6	0,041	7,97	47,83	0,016	3,85	23,09
	1/9	0,011	2,86	25,71	-0,007		
Muestra 4	Sin dil	0,177	22,00	22,00	0,177	22,00	22,00
	1/3	0,151	19,85	59,54	0,054	9,76	29,29
	1/6	0,036	7,15	42,92	0,008	2,33	13,97
	1/9	0,001	0,58	5,19	0,004	1,31	11,81
Muestra 5	Sin dil	0,264	28,29	28,29	0,264	28,29	28,29
	1/3	0,255	27,68	83,05	0,025	5,47	16,40
	1/6	0,061	10,60	63,61	-0,015		
	1/9	0,024	5,21	46,88			
Media	Sin dil	0,237	26,32	26,32	0,237	26,32	26,32
	1/3	0,192	23,03	69,08	0,053	9,48	28,44
	1/6	0,052	9,37	56,20	0,014	3,27	19,64
	1/9	0,014	3,26	29,36	0,003	1,19	10,73

Tabla S13: Linealidad de la dilución con muestras de plasma para ABtest42. Representación de la absorbancia corregida (Abs corr), la concentración (pg/ml) y la concentración corregida (x diluc) tras aplicar el correspondiente factor de dilución para cada una de las cinco muestras de plasma analizadas. *Nota: las muestras con señal corregida negativa no se han tenido en cuenta para el cálculo del promedio.*

Efecto de los factores pre-analíticos en la cuantificación de A β en plasma

Efecto de la temperatura y el tiempo de retardo del procesamiento de la muestra

A β 40 con muestras conservadas en refrigeración (4 °C)

	A β 40 en plasma sin diluir						
	0 h (pg/ml)	8 h a 4 °C (pg/ml)	CV 0 vs 8 h (%)	% Diferencia (8 h - 0h)	30 h a 4 °C (pg/ml)	CV 0 vs 30 h (%)	% Diferencia (30 h - 0 h)
Muestra 1	29,37	28,64	1,78	-2,49	23,94	14,40	-18,48
Muestra 2	42,04	42,64	1,01	1,44	42,52	0,81	1,15
Muestra 3	20,03	19,12	3,29	-4,55	19,49	1,91	-2,67
Muestra 4	28,40	28,71	0,79	1,12	27,54	2,17	-3,02
Muestra 5	41,80	43,45	2,74	3,95	40,96	1,44	-2,01
Muestra 6	23,92	22,83	3,29	-4,55	21,88	6,30	-8,53
Muestra 7	39,71	28,75	22,64	-27,60	34,10	10,74	-14,12
Promedio	32,18	30,59	5,08	-4,67	30,06	5,40	-6,81

	A β 40 en plasma diluido						
	0 h (pg/ml)	8 h a 4 °C (pg/ml)	CV 0 vs 8 h (%)	% Diferencia (8 h - 0h)	30 h a 4 °C (pg/ml)	CV 0 vs 30 h (%)	% Diferencia (30 h - 0 h)
Muestra 1	72,39	62,77	10,06	-13,29	69,82	2,56	-3,55
Muestra 2	116,65	115,47	0,72	-1,01	106,56	6,39	-8,65
Muestra 3	76,50	65,18	11,30	-14,80	60,84	16,13	-20,47
Muestra 4	81,86	77,38	3,98	-5,47	74,43	6,72	-9,08
Muestra 5	92,36	102,06	7,05	10,50	92,87	0,39	0,55
Muestra 6	72,88	62,16	11,22	-14,70	65,12	7,95	-10,64
Muestra 7	73,41	79,37	5,52	8,12	77,05	3,42	4,95
Promedio	83,72	80,63	7,12	-4,38	74,43	6,22	-6,70

Tabla S14. Efecto del tiempo de retardo del procesamiento (TRP) de las muestras de sangre conservadas a 4 °C sobre los niveles de A β 40 cuantificados en plasma (tabla superior) y plasma diluido (tabla inferior). En las tablas se reflejan los niveles de A β 40 en muestras de plasma tras diferentes tiempos de almacenamiento de la sangre antes de su procesamiento: 0, 8 o 30 horas a 4 °C; CV: coeficiente de variación. % diferencia = $100 \times [((\text{pg/ml } X \text{ h}) - (\text{pg/ml } 0 \text{ h})) / (\text{pg/ml } 0 \text{ h})]$. Un dato negativo indica que los niveles de A β 40 son más bajos tras el TRP que en la muestra control procesada inmediatamente tras la extracción de la sangre. Todos los resultados representados pertenecen a muestras sin tratar con inhibidores de proteasas exógenas.

Aβ42 con muestras conservadas en refrigeración (4 °C)

	Aβ42 en plasma sin diluir						
	0 h (pg/ml)	8 h a 4 °C (pg/ml)	CV 0 vs 8 h (%)	% Diferencia (8 h - 0h)	30 h a 4 °C (pg/ml)	CV 0 vs 30 h (%)	% Diferencia (30 h - 0 h)
Muestra 1	20,22	16,51	14,29	-18,36	21,34	3,80	5,53
Muestra 2	32,97	44,61	21,23	35,33	46,58	24,20	41,30
Muestra 3	10,52	9,30	8,72	-11,62	11,50	6,29	9,32
Muestra 4	23,32	19,26	13,48	-17,41	19,00	14,42	-18,51
Muestra 5	6,49	8,52	19,17	31,35	7,96	14,40	22,68
Muestra 6	36,70	24,98	26,89	-31,95	26,50	22,84	-27,81
Muestra 7	7,62	5,66	20,91	-25,76	5,66	20,88	-25,73
Promedio	19,69	18,41	17,81	-5,49	19,79	15,26	0,97

	Aβ42 en plasma diluido						
	0 h (pg/ml)	8 h a 4 °C (pg/ml)	CV 0 vs 8 h (%)	% Diferencia (8 h - 0h)	30 h a 4 °C (pg/ml)	CV 0 vs 30 h (%)	% Diferencia (30 h - 0 h)
Muestra 1	43,51	41,92	2,63	-3,66	35,44	14,45	-18,54
Muestra 2	174,81	163,24	4,84	-6,62	165,05	4,06	-5,58
Muestra 3	35,03	28,09	15,53	-19,79	33,16	3,87	-5,33
Muestra 4	70,22	65,35	5,08	-6,94	46,63	28,55	-33,60
Muestra 5	20,25	22,32	6,90	10,26	23,49	10,50	16,04
Muestra 6	190,98	144,06	19,80	-24,57	148,51	17,69	-22,24
Muestra 7	13,48	19,30	25,11	43,19	19,16	24,63	42,17
Promedio	78,32	69,18	11,42	-1,16	67,35	14,82	-3,87

Tabla S15. Efecto del tiempo de retardo del procesamiento de las muestras de sangre conservadas a 4 °C sobre los niveles de Aβ42 cuantificados en plasma (tabla superior) y plasma diluido (tabla inferior). En las tablas se reflejan los niveles de Aβ42 en muestras de plasma tras diferentes tiempos de conservación de la sangre antes de su procesamiento: 0, 8 o 30 horas a 4 °C; CV: coeficiente de variación. % diferencia = $100 \times [((\text{pg/ml } X \text{ h}) - (\text{pg/ml } 0 \text{ h})) / (\text{pg/ml } 0 \text{ h})]$. Un dato negativo indica que los niveles de Aβ40 son más bajos tras el TRP que en la muestra control procesada inmediatamente tras la extracción de la sangre. Todos los resultados representados pertenecen a muestras sin tratar con inhibidores de proteasas exógenos.

	A β 40 en plasma sin diluir			
	0 h (pg/ml)	8 h RT (pg/ml)	CV 0 vs 8 h (%)	% Diferencia (8 h - 0 h)
Muestra 1	29,37	23,65	15,24	-19,46
Muestra 2	42,04	41,43	1,03	-1,44
Muestra 3	20,03	18,74	4,70	-6,44
Muestra 4	28,40	28,30	0,24	-0,34
Muestra 5	41,80	36,92	8,77	-11,68
Muestra 6	23,92	20,65	10,36	-13,65
Muestra 7	39,71	29,66	20,49	-25,31
Promedio	32,18	28,48	8,69	-11,19

	A β 40 en plasma diluido			
	0 h (pg/ml)	8 h RT (pg/ml)	CV 0 vs 8 h (%)	% Diferencia (8 h - 0 h)
Muestra 1	72,39	67,53	4,91	-6,71
Muestra 2	116,65	106,38	6,51	-8,81
Muestra 3	76,50	61,59	15,26	-19,48
Muestra 4	81,86	72,62	8,46	-11,29
Muestra 5	92,36	83,27	7,32	-9,84
Muestra 6	72,88	61,14	12,38	-16,10
Muestra 7	73,41	75,84	2,30	3,30
Promedio	83,72	75,48	8,16	-9,85

Tabla S16. Efecto del tiempo de retardo del procesamiento (TRP) de las muestras de sangre conservadas a temperatura ambiente sobre los niveles de A β 40 cuantificados en plasma (tabla superior) y plasma diluido (tabla inferior). En las tablas se reflejan los niveles de A β 40 en muestras de plasma tras diferentes tiempos de conservación de la sangre antes de su procesamiento: 0 y 8 horas a RT. % diferencia = $100 \times [((\text{pg/ml } 8 \text{ h}) - (\text{pg/ml } 0 \text{ h})) / (\text{pg/ml } 0 \text{ h})]$. Un dato negativo indica que los niveles de A β 40 son más bajos tras 8 h a RT en comparación con la muestra control procesada inmediatamente tras la extracción de la sangre. Todos los resultados representados pertenecen a muestras sin tratar con inhibidores de proteasas exógenas. CV: coeficiente de variación. RT: room temperature.

Aβ42 con muestras conservadas a temperatura ambiente

Aβ42 en plasma sin diluir				
	0 h (pg/ml)	8 h RT (pg/ml)	CV 0 vs 8 h (%)	% Diferencia (8 h - 0 h)
Muestra 1	20,22	20,00	0,80	-1,12
Muestra 2	32,97	40,20	13,97	21,93
Muestra 3	10,52	8,16	17,83	-22,39
Muestra 4	23,32	22,85	1,44	-2,02
Muestra 5	6,49	7,53	10,48	16,01
Muestra 6	36,70	33,29	6,90	-9,31
Muestra 7	7,62	5,06	28,51	-33,55
Promedio	19,69	19,58	11,42	-4,35

Aβ42 en plasma diluido				
	0 h (pg/ml)	8 h RT (pg/ml)	CV 0 vs 8 h (%)	% Diferencia (8 h - 0 h)
Muestra 1	43,51	39,31	7,18	-9,66
Muestra 2	174,81	164,69	4,22	-5,79
Muestra 3	35,03	39,16	7,88	11,80
Muestra 4	70,22	76,50	6,06	8,95
Muestra 5	20,25	15,57	18,46	-23,09
Muestra 6	190,98	188,01	1,11	-1,55
Muestra 7	13,48	23,14	37,30	71,64
Promedio	78,32	78,05	11,74	7,47

Tabla S17. Efecto del tiempo de retardo del procesamiento (TRP) de las muestras de sangre conservadas a temperatura ambiente sobre los niveles de Aβ42 cuantificados en plasma (tabla superior) y plasma diluido (tabla inferior). En las tablas se reflejan los niveles de Aβ42 en muestras de plasma tras diferentes tiempos de conservación de la sangre antes de su procesamiento: 0 y 8 horas a RT. % diferencia = $100 \times [((\text{pg/ml } 8 \text{ h}) - (\text{pg/ml } 0 \text{ h})) / (\text{pg/ml } 0 \text{ h})]$. Un dato negativo indica que los niveles de Aβ42 son más bajos tras 8 h a RT en comparación con la muestra control procesada inmediatamente tras la extracción de la sangre. Todos los resultados representados pertenecen a muestras sin tratar con inhibidores de proteasas exógenas. CV: coeficiente de variación. RT: room temperature.

La influencia del anticoagulante utilizado en la cuantificación de A β

A β 40 en plasma y plasma diluido

A β 40 en plasma (pg/ml)			% variación respecto a EDTA	A β 40 en plasma diluido (pg/ml)			% variación respecto a EDTA
Muestra	EDTA	CITRATO		Muestra	EDTA	CITRATO	
1	111,08	138,07	24,30	1	319,04	283,29	-11,21
2	101,26	115,63	14,19	2	290,88	254,91	-12,36
3	106,50	122,60	15,11	3	283,85	269,69	-4,99
4	108,85	128,77	18,30	4	316,25	277,10	-12,38
5	99,69	129,17	29,57	5	311,96	283,29	-9,19
6	99,84	135,00	35,22	6	337,02	325,26	-3,49
7	96,65	98,57	1,98	7	266,70	213,54	-19,93
8	118,17	127,57	7,96	8	305,83	284,03	-7,13
9	85,07	112,13	31,81	9	280,53	241,48	-13,92
10	80,89	99,39	22,87	10	285,89	244,52	-14,47
11	87,81	76,21	-13,21	11	181,09	147,41	-18,60
12	100,62	101,48	0,86	12	252,61	189,20	-25,10
13	167,83	178,52	6,37	13	397,08	367,99	-7,33
14	83,05	85,54	3,00	14	220,43	190,57	-13,54
Promedio	103,38	117,76	14,17	Promedio	289,22	255,16	-12,40

Tabla S18. Niveles de A β 40 en plasma (izquierda) y plasma diluido (derecha) de muestras tratadas con EDTA o citrato de sodio como anticoagulante. % variación respecto EDTA = 100 x ((niveles citrato – niveles EDTA)/niveles EDTA). Un dato negativo de este porcentaje implica que los niveles de A β son mayores con EDTA que con citrato de sodio. En el caso de la matriz de plasma vemos niveles más elevados en todas las muestras excepto una al tratar la muestra con el citrato de sodio. En el caso del plasma diluido todas las muestras analizadas presentan niveles más elevados en presencia de EDTA.

Aβ42 en plasma y plasma diluido

Aβ42 en plasma (pg/ml)			% variación respecto a EDTA	Aβ42 en plasma diluido (pg/ml)			% variación respecto a EDTA
Muestra	EDTA	CITRATO		Muestra	EDTA	CITRATO	
1	7,25	12,02	65,92	1	20,87	23,97	14,86
2	13,09	16,46	25,73	2	41,85	39,55	-5,48
3	11,29	15,45	36,81	3	35,60	35,96	1,01
4	9,70	15,16	56,38	4	27,72	30,25	9,15
5	8,97	13,92	55,20	5	23,87	23,30	-2,39
6	7,57	13,92	83,98	6	23,87	28,84	20,78
7	8,31	8,96	7,82	7	21,68	18,45	-14,91
8	11,70	14,91	27,45	8	31,21	30,47	-2,37
9	7,28	9,77	34,20	9	21,68	17,65	-18,60
10	5,33	7,89	47,97	10	20,57	16,38	-20,36
11	12,89	10,39	-19,41	11	24,87	24,20	-2,69
12	8,69	10,39	19,54	12	31,88	28,18	-11,62
13	18,82	20,98	11,47	13	39,35	29,38	-25,33
14	5,66	8,76	54,69	14	18,54	17,30	-6,70
Media	9,75	12,79	36,27	Media	27,40	25,99	-4,62

Tabla S19. Niveles de Aβ42 en plasma (izquierda) y plasma diluido (derecha) de muestras tratadas con EDTA o citrato de sodio como anticoagulante. % variación respecto EDTA = 100 x ((niveles citrato – niveles EDTA)/niveles EDTA). Un dato negativo de este porcentaje implica que los niveles de Aβ son mayores con EDTA que con citrato de sodio. En el caso de la matriz de plasma vemos niveles más elevados en todas las muestras excepto una al tratar la muestra con el citrato de sodio. En el caso del plasma diluido hay más heterogeneidad de comportamientos, aunque 10 de las 14 muestras presentan niveles más elevados en presencia de EDTA.

ANEXOS

ANEXO 1: DETALLES DEL EXPERIMENTO DE VALIDACIÓN CRUZADA PARA EL ANÁLISIS ROC

Para evaluar la eficacia de predecir el SUVR/BeCKeT dicotomizado se realizó un experimento de validación cruzada (VC). El clasificador se basó en un modelo de regresión lineal que incluía la ratio plasmática TP42/40 en unidades logarítmicas y la edad y el genotipo ApoE ϵ 4 como covariables. Las medidas de todas las visitas proporcionaron información útil para llevar a cabo la clasificación, ya que, para poder realizar una estimación fiable de la curva ROC, se requieren conjuntos de entrenamiento y evaluación con un número suficiente de datos. Por lo tanto, para maximizar el tamaño de la muestra se seleccionaron todos los pares de datos plasma-PET de las visitas 18, 36 y 54 meses.

A la hora de realizar los experimentos de VC para evaluar la eficacia de la clasificación, es necesario trabajar con mucho cuidado para evitar introducir un sesgo. Por ello, este experimento se realizó de forma que todas las medidas de un mismo individuo se incluyeron en el conjunto de entrenamiento o en el conjunto de evaluación para cada ronda de la VC. De manera adicional, para conseguir una estimación más fiable de la métrica de la clasificación, se garantizó que en cada ronda de muestreo la prevalencia de la muestra, es decir, la proporción de sujetos con un resultado positivo en la prueba PET amiloide, fuese la misma y similar a la prevalencia en el conjunto de muestras del estudio (40 %).

En cada ronda de VC el conjunto de evaluación consistió en 117 pares de medidas de 39 sujetos con medidas válidas en las 3 visitas. 16 de estos 39 sujetos se eligieron al azar de entre todos los sujetos con un resultado positivo de la prueba PET amiloide. Los otros 23 sujetos restantes se seleccionaron al azar del grupo de sujetos con resultado PET amiloide negativo. De esta manera la prevalencia en el set de evaluación fue del 41 % en cada ronda de la VC.

Validation of Immunoassay-Based Tools for the Comprehensive Quantification of A β ₄₀ and A β ₄₂ Peptides in Plasma

Virginia Pérez-Grijalba¹, Noelia Fandos¹, Jesús Canudas, Daniel Insua, Diego Casabona, Ana M. Lacosta, María Montañés, Pedro Pesini* and Manuel Sarasa
Araclon Biotech, Zaragoza, Spain

Accepted 15 June 2016

Abstract. Recent advances in neuroimaging and cerebrospinal fluid (CSF) biomarker assays have provided evidence of a long preclinical stage of Alzheimer's disease (AD). This period is being increasingly targeted for secondary prevention trials of new therapies. In this context, the interest of a noninvasive, cost-effective amyloid- β (A β) blood-based test does not need to be overstated. Nevertheless, a thorough validation of these bioanalytical methods should be performed as a prerequisite for confident interpretation of clinical results. The aim of this study was to validate ELISA sandwich colorimetric ABtest40 and ABtest42 for the quantification of A β ₄₀ and A β ₄₂ in human plasma. The validation parameters assessed included precision, accuracy, sensitivity, specificity, recovery, and dilution linearity. ABtest40 and ABtest42 proved to be specific for their target peptide using A β peptides with sequence similar to the target. Mean relative error in the quantification was found to be below 7.5% for both assays, with high intra-assay, inter-assay, and inter-batch precision (CV <9.0% on average). Sensitivity was assessed by determination of the limit of quantification fulfilling precision and accuracy criteria; it was established at 7.60 pg/ml and 3.60 pg/ml for ABtest40 and ABtest42, respectively. Plasma dilution linearity was demonstrated in PBS; however, dilution in a proprietary formulated buffer significantly increased the recovery of both A β ₄₀ and A β ₄₂ masked by matrix interactions, allowing a more comprehensive assessment of the free and total peptide levels in the plasma. In conclusion, both assays were successfully validated as tools for the quantification A β ₄₀ and A β ₄₂ in plasma.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid- β peptide, biomarker, immunoassay validation, plasma

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by the extracellular deposition of amyloid- β (A β) in cerebral A β plaques and the formation of intracellular neurofibrillary tangles in the brain [1]. A definite diagnosis of AD, which currently affects 46.8 million people worldwide [2], can only be established by postmortem evaluation of these two pathological hallmarks of the disease [3]. Nevertheless, recent advances in neuroimaging

and cerebrospinal fluid (CSF) biomarker assays have led to a new paradigm for the disease and have provided tools to identify the disease *in vivo*. The new paradigm considers a long preclinical stage during which AD pathologies are developing prior to the onset of clinical symptoms [4–6]. This preclinical period is being increasingly targeted for secondary prevention clinical trials of new therapies aimed to delay or avoid the apparition of incapacitating dementia symptoms. Since, by definition, preclinical AD cannot be detected by clinical measures, biomarkers are needed to identify individuals in this important stage of the disease in order to enrich cohorts for clinical trials with people at increased risk of developing the disease and eventually, when disease-modifying

¹These two authors contributed equally to this work.

*Correspondence to: Pedro Pesini, Araclon Biotech, Via Hispanidad 21, 50009 Zaragoza, Spain. Tel.: +34 976 796 562; E-mail: ppesini@araclon.com.

drugs become available, for management of patient treatment. Among them, A β biomarkers, measured either by increased accumulation of A β peptides in brain or A β ₄₂ reduction in CSF, have demonstrated their utility as preclinical biomarkers of AD [7–14].

A β species are also measurable in peripheral blood and mounting evidence shows that plasma A β peptide levels are associated with the risk of disease progression, brain A β levels, or other markers of neurodegeneration such as structural brain atrophy determined by MRI [15–20]. Nevertheless, the strength of this association remains to be definitively established, which will determine the potential utility of A β blood-based assays with regard to the diagnosis of AD.

The advantages of a blood-based test as a cost-effective non-invasive tool for clinical trial enrichment and population screening do not need to be stressed [21]. In fact, it has been proposed that blood-based methods could serve as the first step in a multistep diagnostic process [22]. With this in mind, together with special attention to pre-assay aspects, a thorough validation of the bioanalytical method should be performed to define performance characteristics as a prerequisite for confident interpretation of clinical results.

The quantification of these peptides at the low level in which they are found in plasma and the notorious difficulty associated with their handling could explain contradictory results to date and some past controversies. The hydrophobic nature of A β peptides makes them difficult to analyze due to their propensity to bind with plasma proteins such as albumin, α 2-macroglobulin, lipoproteins, or transthyretin [23–26]. These interactions are likely to cause epitope masking, preventing the A β peptides from being detected in an immunoassay. These physicochemical features of A β are related to other sources of variability in their determination, attributable to differences in pre-analytical and analytical procedures [27–30].

The present study reports the validation results of two specific tools, ABtest40 and ABtest42, developed by Araclon Biotech Ltd. for the quantification of both free and total A β ₄₀ and A β ₄₂ in plasma. The free A β in plasma (FP) fraction corresponds to the amount of those peptides that are readily available for immunoassay detection. Total A β in plasma (TP) refers to the amount of these peptides that can be measured after pre-treating the plasma sample with a formulated buffer that breaks the interactions of the peptide with other plasma components (mostly proteins), which could be masking up to 50% of the

peptide in the sample [31]. To the extent possible, regulatory guidelines for validation of bioanalytical methods [32, 33] were followed to conduct experimental designs and *a priori* establish acceptance criteria, as well as other recommendation papers focused on this specific field [34].

MATERIAL AND METHODS

Assay description and procedure

ABtest40 and ABtest42 (Araclon Biotech Ltd. Zaragoza, Spain) are two colorimetric tests based in the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique as described elsewhere [31]. Briefly, a monoclonal antibody (1F3, Araclon Biotech) specific to the N-terminal fragment of A β and immobilized in a microplate well, reacts with A β species during an overnight incubation at 2–8°C. Dilution of both standards and samples is always performed in Sample/Standard Diluent. After a 5-cycle washing step to remove any non-specific binding, the immobilized peptides are detected by the addition of a biotinylated polyclonal antibody, also developed by Araclon Biotech, specific of the C-terminal end of either A β ₄₀ (pAB002) or A β ₄₂ (pAB031). The detection reaction is carried out during 1 h at room temperature and shaking (30 rpm 3D orbital shaking). After repeating the washing step, a streptavidin-HRP amplification reaction takes place (1 h, room temperature, shaking), followed by a washing cycle and a colorimetric reaction during 30 min in the dark with a chromogen substrate, TMB. Analyte concentration is proportional to optical density at 450 nm.

The pair of antibodies implied in each assay are developed and produced by Araclon Biotech. Polyclonal antibodies are purified by antigen-affinity chromatography using the same A β fragment inoculated to the rabbits. The monoclonal antibody is purified by class-specific affinity using protein-G columns. Each production batch is subjected to an exhaustive quality control, including specificity and sensitivity evaluation to ensure lot-to-lot consistency, especially relevant when using polyclonal antibodies. The stock of polyclonal antibody in the kit is supplied at a batch-to-batch adjusted concentration to keep inter-lot consistency.

The validation experiments were performed using human plasma samples obtained from the Aragón Tissue and Blood Bank (Zaragoza, Spain) in accordance with the Helsinki Declaration of 1975.

Assay calibration

The standard calibration curve was prepared from synthetic A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ peptides (Araclon Biotech Ltd.). The amino acid sequence of both peptides matches that from the complete corresponding human peptide. The synthesis of both complete A β species was carried out using Fmoc solid phase in an automatic synthesizer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) and released from the resin by a cleavage process. The A β peptides were purified by HPLC and their sequence was confirmed by mass spectrometry (MALDI-TOF), ensuring in the process, the purity and identity of the specific A β peptide.

ABtest calibrators are prepared after a disaggregation procedure and resuspension of controlled-weight lyophilized aliquots to 1 mg/ml in NH₄OH 0.1%. A first dilution step is carried out in guanidine hydrochloride 6M to a concentration of 200 μ g/ml, followed by serial dilutions in Sample/Standard Diluent to obtain the calibrator stock provided with the kit. Quality control procedures, including mass spectrometry, HPLC and ELISA, are applied in-process and after batch releasing, to ensure batch to batch consistency. Each calibrator batch needs to fulfill quality control criteria of accuracy (less than 10% signal deviation at the maximum of quantification range) with regard to three independent reference stocks of the corresponding peptide. Additionally, ABtest calibrators must meet requirements of back-calculated concentration accuracy (less than 20% bias at each calibration point, regarding the theoretical concentration), as well as goodness of fit in a routine calibration curve procedure.

Calibrators for ABtest40 and ABtest42 were diluted 1/100 in Sample/Standard Diluent. Then, serial dilutions were carried out to obtain the 7 levels of concentration of the standard curve, reducing half the concentration in each step. In each assay, a calibration curve was assayed in duplicate and plotted using a 4-parameter logistic regression with a 1/y weighting variable, using the Gen5 software (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

To validate the dynamic range of the assay that goes from 3,125 to 200 pg/ml for both ABtest, each standard level should meet precision and accuracy criteria. The coefficients of variation (CV) of the calibrator duplicates should be $\leq 20\%$, except for the lowest calibrator for which CV $\leq 25\%$ is accepted. Back-calculated concentrations for calibrators should be $\pm 20\%$ of the theoretical for acceptance ($\pm 25\%$

for the lowest standard). To assess the suitability of the calibration method, 6 runs of the standard curve were prepared independently in each assay from different aliquots of the same calibrator batch, both with ABtest40 and ABtest42.

Analytical specificity

The specificity of both assays was evaluated by analyzing different A β peptides with a sequence similar to the target peptide. Serially truncated sequences of A β , both in C- and N-terminal, were assayed at the highest concentration of the dynamic range of the test (200 pg/ml). Investigation of the specificity in N-terminal was performed in ABtest40 (same results were expected for ABtest42 since they share the same capture antibody) with A β ₂₋₄₀, A β ₃₋₄₀, [Pyr3]A β ₃₋₄₀, A β ₄₋₄₀, A β ₁₁₋₄₀, and murine A β ₁₋₄₀ (AnaSpec, Inc., Fremont, CA, USA). Specificity in C-terminal was evaluated with the truncated species A β ₁₋₃₇ (Bachem, Budendorf, Switzerland), A β ₁₋₃₈ (Araclon Biotech Ltd., Zaragoza, Spain) and A β ₁₋₄₃ (AnaSpec), besides A β ₄₀ or A β ₄₂ depending on the ABtest used.

Specificity was established as the percentage of cross reactivity of the truncated species regarding the target A β peptide signal.

Limit of quantification

The limit of quantification (LoQ) of both ABtest assays was established following the guidelines included in the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [35]. First, the limit of blank (LoB) was estimated by repeated determination of four plasma samples without A β ₄₀ or A β ₄₂ using three different batches of ABtest40 and ABtest42, in three runs with six replicates per assay. The depletion of plasma was carried out after incubation of the samples in a solid phase conjugated with 1F3, the specific anti N-terminal A β antibody. The apparent concentration of A β ₄₀ or A β ₄₂ in these A β depleted samples was determined for each replicate and the concentration corresponding to the LoB was established following the procedure proposed by CLSI [35].

$$LoB = \mu_B + C_p SD_B$$

where μ_B is the mean apparent concentration and SD_B the standard deviation; C_p (for a set α error of 5%) = $\frac{1.645}{\sqrt{1 - (1/(4(B-K)))}}$ being B the number of replicates and K the number of samples.

Following this, the limit of detection (LoD) of ABtest40 and ABtest42 was estimated by analyzing four samples with a concentration of A β ₄₀ or A β ₄₂ close to the LoB previously established. Quantification of these samples was repeated in three different assays including six replicates in each run. This experimental design was performed with three different batches of ABtest40 and ABtest42 and LoD was determined following the guidelines proposed in EP17-A2 report [35]

$$LoD = LoB + C_p SD_L$$

$$\text{Where } SD_L = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^J (n_i - 1) SD_i^2}{\sum_{i=1}^J (n_i - 1)}}$$

$$C_p (\alpha = 5\%) = \frac{1.645}{1 - (1/(4(L - J)))}$$

being L the number of replicates and J the number of samples assayed.

Finally, the limit of quantification (LoQ) of the assay was established as the lowest A β ₄₀ or A β ₄₂ concentration above the LoD which can be determined with precision and accuracy. In this sense, samples with progressively increased concentration of A β ₄₀ or A β ₄₂ from LoD were assayed in 44 replicates with two batches of ABtest40 or ABtest42, respectively. The lowest concentration that meets the criteria of precision (CV \leq 25%) and accuracy (RE \leq 25%) was established as the LoQ of the assay.

Precision

To evaluate precision, five plasma samples with A β ₄₀ or A β ₄₂ levels covering the whole dynamic range of the assay were prepared so that reproducibility was guaranteed independent of the A β concentration. When it was not possible to find natural samples at a particular concentration level, they were partially depleted as previously described or artificially enriched with the corresponding synthetic peptide by spiking A β ₄₀ or A β ₄₂.

Precision of ABtest40 and ABtest42 was assessed at different levels. Intra and inter-assay reproducibility was examined by quantifying the same five samples as replicates ($n=6$) in the same run and in six different and independent runs, both with ABtest40 and ABtest42. Inter-batch precision was assessed comparing the concentration obtained in each of these five samples with three different batches of ABtest40 or ABtest42, in three independent runs.

Precision was determined by calculating the CV of the different measurements of the same sample carried out in the same run, among different runs and among different ABtest batches. The acceptance criterion was established as a CV \leq 20%, with the exception of the sample close to the lower limit of quantification (LLOQ) of the assay where a CV \leq 25% is allowed.

Accuracy

ABtest40 and ABtest42 accuracy was also evaluated in the whole dynamic range of the assay with the same five samples described in precision assessment. Firstly, the A β ₄₀ and A β ₄₂ theoretical concentration in these samples was determined by repeated quantification including all the factors that could affect the assay: six replicates of each sample in four independent runs with two different batches of either ABtest40 or ABtest42 (total quantifications of each sample = 48).

Once the theoretical concentration of A β ₄₀ and A β ₄₂ was determined, the accuracy assessment implied the quantification of these five samples with a different batch of ABtest40 or ABtest42 in six different runs with six replicates of each sample per run ($n=36$). The accuracy was established in terms of the relative error (RE), i.e., the percentage of the difference between an observed concentration and the theoretical concentration divided by the theoretical concentration. Mean RE was calculated for each concentration level (taking the absolute values) and the acceptance limit established at RE \leq 20% (except LLOQ, where RE \leq 25%).

Analyte spike recovery

The effect of the plasma matrix in the recovery of synthetic A β peptides was investigated. A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ standards were added to undiluted plasma and to plasma after three-fold dilution in Sample/Standard Diluent, which is the dilution usually carried out for analysis. To study the recovery in the whole range of the assay, three A β ₄₀ and A β ₄₂ concentrations (150 pg/ml, 75 pg/ml, and 20 pg/ml) were added to three different plasma samples and repeated in three different runs. The volume of A β peptides added to the samples never exceeded 5% of the final sample volume, in order to minimize matrix alteration while keeping pipetting accuracy in the procedure. Samples were assayed with ABtest within 30 min after spiking. Every step was carried out at room temperature.

The matrix effect in these samples was evaluated by calculating the percentage of recovery of the known concentration of A β added, as an average of the three individuals and assays.

Dilution linearity

Five different plasma samples were serially diluted three, six, and nine times either in the assay's Sample/Standard Diluent or in a saline buffer as PBS, in parallel with both buffers and always in duplicate. The linearity of the association was assessed graphically by plotting either the signal or concentration obtained versus the inverse of the corresponding dilution factor.

Statistical treatment

The parameters studied in each validation step were included as summary descriptive statistics where the mean and range estimates were calculated.

Descriptive statistics included the calculation of mean, range, standard deviation (SD), CV, RE, and percentage of recovery.

RESULTS

The main results obtained in the validation assays of ABtest40 and ABtest42 are summarized in Table 1, both for ABtest40 and ABtest42.

Assay calibration

The calibration range was selected taking into account the expected levels of A β ₄₀ and A β ₄₂ in plasma. A quantification range from 3.125 pg/ml to 200 pg/ml was evaluated to accomplish the precision and accuracy goals. All the calibration levels fulfilled the acceptance criteria previously established with a mean RE of 4.5% for ABtest40 and 2.9% for ABtest42. On average, the variability (CV) of all the concentration replicates of the calibration curve was 5.2% and 4.2% for ABtest40 and ABtest42, respectively. The RE and CV values obtained at each calibrator level in the six runs performed are summarized in Supplementary Table 1.

Analytical specificity

The anti-A β N-terminal antibody, shared by ABtest40 and ABtest42, did not show any significant (lower than 4%) cross reactivity with A β species

starting at amino acid 4 and subsequent amino acids or with murine A β (see Supplementary Table 2). The antibody 1F3 is reactive to A β peptides containing at least amino acid 3 of the A β sequence, even when it is modified as with the pyroglutamate in [Pyr3]A β ₃₋₄₀, i.e., it is reactive 100% to A β ₁₋₄₀, and above 96% for A β ₂₋₄₀, A β ₃₋₄₀, and [Pyr3]A β ₃₋₄₀.

ABtest40 was completely specific for the target A β ₄₀ peptide with cross reactivity of similar species (A β ₁₋₃₇, A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₄₂, and A β ₁₋₄₃) below 2% in all cases. Similarly, ABtest42 showed high specificity for A β ₄₂, without recognizing A β ₁₋₃₇, A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₄₀, or A β ₁₋₄₃; the signal percentage of these species regarding the target A β ₄₂ was below 5% in all cases (results shown in Supplementary Table 2).

Limit of quantification

After determining the LoD (see Supplementary Table 3), the lowest concentration empirically tested for precision and accuracy was 7.60 pg/ml for ABtest40 and 3.60 pg/ml for ABtest42. Both concentrations proved to be accurate (RE of 3.4% for ABtest40 and 16.8% for ABtest42) and precise (CV of 21.6% for ABtest40 and 18.1% for ABtest42), confirmed in one run with 44 replicates, using two different batches of each ABtest (see Supplementary Table 4). Therefore, the limit of quantification was established in 7.60 pg/ml for ABtest40 and 3.60 pg/ml for ABtest42.

Precision

For a given plasma sample, the variability between concentrations determined in the same assay, in different assays and with different ABtest batches was always below 15% (Fig. 1). Both ABtest40 and ABtest42 demonstrated good reproducibility when analyzing samples in the same assay with a mean CV of 5.8% for ABtest40 and 5.4% for ABtest42. The inter-assay variability was found to be 7.7% and 7.5%, respectively, for ABtest40 and ABtest42, as an average of the five concentration levels studied. The same five samples were analyzed in parallel with three different ABtest batches, with a mean CV of 4.8% for A β ₄₀ and 8.8% for A β ₄₂ quantification (Supplementary Figure 1).

Accuracy

Accuracy was evaluated in each concentration level by the relative difference between each deter-

Table 1
Summary of validation results for ABtest40 and ABtest42 quantification of A β ₄₀ and A β ₄₂ in plasma

Validation parameter		ABtest40		ABtest42	
		Mean	Range	Mean	Range
Calibration	Quantification range (pg/ml)		3.125 to 200 pg/ml		3.125 to 200 pg/ml
	Accuracy, RE (%)	4.5	-17.2 to 12.4	2.9	-12.4 to 8.4
	Precision, CV (%)	5.2	0.5 to 11.7	4.2	0.2 to 19.7
Precision	Intra-assay, CV (%)	5.8	3.9 to 12.0	5.4	3.8 to 7.9
	Inter-assay, CV (%)	7.7	3.6 to 15.0	7.5	4.6 to 11.0
	Inter-batch, CV (%)	4.8	3.2 to 6.2	8.8	5.1 to 13.5
Accuracy		7.2	-17.8 to 32.1	7.1	-35.2 to 28.4
Spike recovery	Undiluted plasma, recovery (%)	60.4	39.9 to 82.7	63.6	53.6 to 85.4
	Diluted plasma, recovery (%)	96.0	82.1 to 122.0	94.9	81.9 to 125.2
Specificity	Cross-reactivity (%)		0.0 to 1.4%		0.8 to 4.1%
Sensitivity	Limit of quantification (pg/ml)	7.60		3.60	

RE, relative error; CV, coefficient of variation. The calibration method was evaluated in terms of accuracy (with the back-calculated calibrator concentration) and precision of the calibrator duplicates.

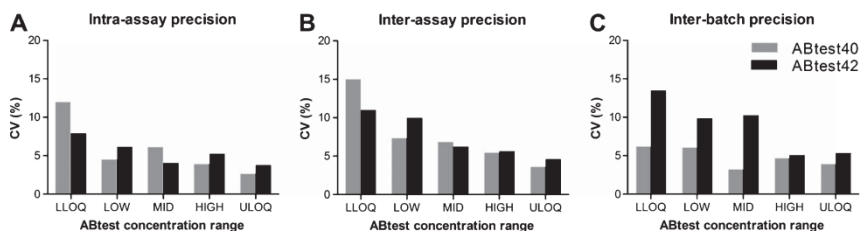


Fig. 1. Precision parameters for ABtest40 and ABtest42. Intra-assay (A), inter-assay (B), and inter-batch (C) mean variability for each concentration level studied. CV, coefficient of variation. LLOQ (concentration close to the lower limit of quantification of the dynamic range of the assay): 16.09 pg/ml A β ₄₀, 18.84 pg/ml A β ₄₂. LOW: 30.01 pg/ml A β ₄₀, 26.89 pg/ml A β ₄₂. MID (middle concentration): 53.44 pg/ml A β ₄₀, 55.96 pg/ml A β ₄₂. HIGH: 113.55 pg/ml A β ₄₀, 89.16 pg/ml A β ₄₂. ULOQ (concentration close to the upper limit of quantification of the dynamic range): 191.91 pg/ml A β ₄₀, 162.35 pg/ml A β ₄₂.

mination carried out ($n=36$ for each concentration level) and the theoretical concentration of A β ₄₀ or A β ₄₂ previously determined for each sample. In Fig. 2, the RE obtained for each determination is plotted regarding each concentration level. Mean RE values are summarized in Supplementary Table 5, with an average accuracy for ABtest40 of 7.2% and 7.1% for ABtest42.

Analyte spike recovery

The mean recovery percentage of A β spiked in undiluted plasma was 60.4% for A β ₄₀ and 63.6% for A β ₄₂, whereas it rose up to 94.0–95.0% for both A β ₄₀ and A β ₄₂ peptides from the three-fold dilution of plasma in Sample/Standard Diluent. Recovery was constant for the different concentration levels added to the samples, and did not differ significantly among different individuals ($n=3$, see Supplementary Table 6).

Dilution linearity

The signal obtained after serially diluting a plasma sample in PBS follows a linear tendency to decline (Fig. 3). In contrast, the dilution of the same samples in Sample/Standard Diluent provided a nonlinear association since the signal drop, especially with a 3-fold dilution, was smaller than expected for a linear association and comparing to the PBS dilution (Fig. 3A, B). Consequently, the maximum A β concentration measured in each of the 5 samples assayed was obtained when they were diluted 1/3 in Sample/Standard Diluent (Fig. 3C, D). See further information in Supplementary Table 7.

DISCUSSION

The ELISA technique is frequently used for measurement of low-abundance biomarkers. However, the quality of ELISA methods varies, which may introduce both systematic and random errors. The

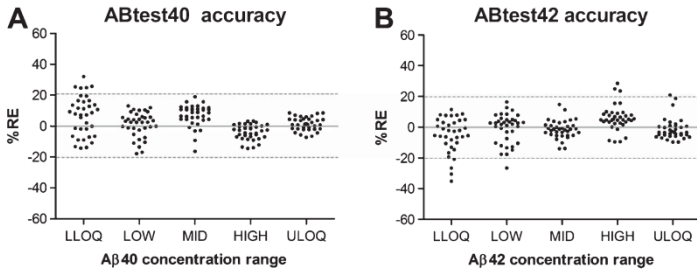


Fig. 2. Accuracy in the quantification with ABtest40 and ABtest42. Each point represents the relative error (RE) in percentage in each of the 36 determinations carried out at each concentration level regarding the theoretical concentration of the plasma sample. LLOQ: concentration close to the lower limit of quantification of the dynamic range of the assay. MID: middle concentration. ULOQ: concentration close to the upper limit of quantification of the dynamic range.

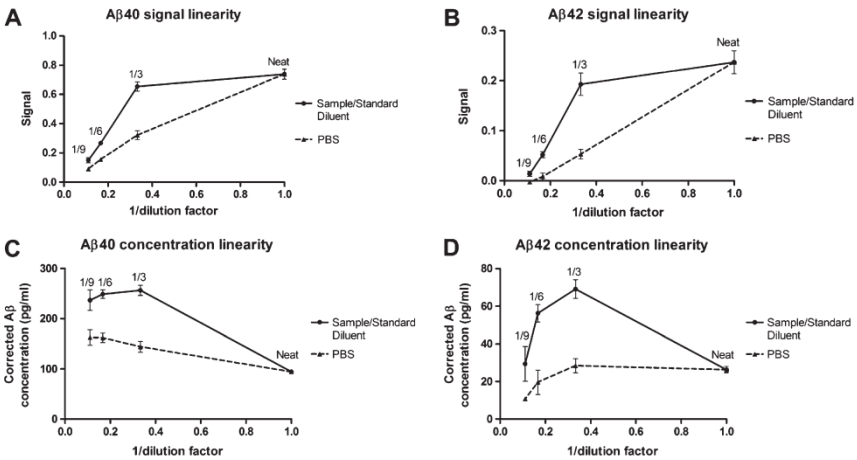


Fig. 3. Dilution linearity of ABtest40 and ABtest42. Linearity was evaluated by three-, six- and nine-fold serial dilution from five undiluted plasma samples, either in a standard saline buffer as PBS or in Sample/Standard Diluent. Panels A and B represent the association of the signal obtained with respect to the dilution performed for A β_{40} and A β_{42} , respectively. Panels C and D show the association of the corrected concentration (after applying the corresponding dilution factor) obtained with regard to dilution, for A β_{40} and A β_{42} , respectively. Each point represents the mean response or concentration obtained for the five samples. Bars represent the standard mean error.

aim of this study was to assess the performance of ABtest40 and ABtest42 in terms of specificity, sensitivity, precision, and accuracy, including an evaluation of the matrix effect and a validation of the calibration method. Regarding the later, a 4-parameter weighted logistic regression demonstrated good precision and accuracy in the whole dynamic range of the assay, allowing a non-biased quantification from the sample signal obtained.

The specificity tests confirmed the complete lack of recognition of A β_{42} by ABtest40 and of A β_{40} by ABtest42, which guarantees that only the target A β form is being recognized in each case. Moreover, no other C-terminal truncated A β peptides, either shorter or longer than the specific A β , produced any signal in the test, providing robustness to the quantification. This may be relevant given the promising value as an AD biomarker of the ratio A $\beta_{42}/_{40}$

suggested in previous studies [15–18]. Specificity in N-terminal, shared by ABtest40 and ABtest42, showed that at least the presence of amino acid 3 (glutamic), even modified as pyro-glutamic, is needed for the recognition of A β . Therefore, ABtest40 and ABtest42 are reactive for the full-length A β _{1-40/42} as well as the N-terminal truncated forms A β _{2-40/42}, A β _{3-40/42}, and [Pyr3]A β _{3-40/42}, and do not recognize further truncated species in N-terminal. Hence, the final A β concentration provided by these tests will include the aforementioned forms of the A β peptide. The recognition of the cycled form of A β _{3-x} could be of potential interest since there is some evidence showing this species as an important part of the pathological process of AD implied in aggregation processes [36, 37]. A remarkably higher signal for the A β form A β ₃₋₄₀ compared to the other specific peptides was observed. Although remarkable, this finding has limited relevance concerning the specificity of the capture antibody and most probably is not due to a higher reactivity to this A β species. In our opinion, this could be explained by differences in the concentration accuracy from commercial peptides since, in some cases, the counterion effect is not reflected in the amount of peptide declared. On the other hand, ABtest40 and ABtest42 are species specific and do not recognize the murine form of A β , which could be useful for possible use in studies with transgenic mice.

Sensitivity was evaluated following an exigent procedure in sequential and confirmatory steps, to ensure that the lowest concentration, which can be reliably quantified with ABtest40 and ABtest42, truly corresponds to that obtained empirically in this study. The lowest A β concentration that can be quantified with precision and accuracy was 7.60 pg/ml for A β ₄₀ and 3.60 pg/ml for A β ₄₂. Both limits of quantification are adequate for the existing levels of A β in plasma.

Precision and accuracy were thoroughly assessed with five samples spanning the dynamic range of the assay. Regarding the precision results, variability was always far below the standard acceptance criteria, for each concentration level and for intra and inter-assay as well as inter-batch determinations, with a mean global precision of 6.1% for ABtest40 and 7.2% for ABtest42. Although these precision levels are more than acceptable and similar to other A β quantification methods more experienced in clinical practice application, as CSF analysis [38], it is still a key point affecting robustness of the measurements. Considering the significant lower levels of A β in plasma

regarding CSF, precision is even a more critical feature for a blood-based test.

Concerning accuracy evaluation, only one in 36 A β ₄₀ determinations was out of the acceptance range (32.0% RE in LLOQ). For ABtest42, 3 determinations at LLOQ showed a RE above 25% (26.6%, 30.5%, and 35.2%). For the other four concentration levels as a whole, a RE slightly over 20% was found in five cases, but below 28% in all cases. Apart from these unusual biased determinations, both ABtest40 and ABtest42 showed good accuracy in quantification, being that the average relative error obtained was about 7%. Consequently, precision and accuracy in the quantification of A β ₄₀ and A β ₄₂ were confirmed to be within the a priori established acceptance criteria along the whole dynamic range of the assay and in accordance with other tests results [39–43].

Recovery tests demonstrated a matrix effect in the plasma sample that was preventing ABtest40 and ABtest42 from quantifying 40–45% of the peptide present in the untreated sample, as shown by a recovery limited to a 60–65% of the A β ₄₀ and A β ₄₂ added to the undiluted plasma sample. Nevertheless, the adequate dilution (1/3) of the plasma sample in an appropriate buffer (Sample/Standard Diluent) increased recovery to more than 90%, demonstrating a substantial removal of the interference in the plasma matrix. The 3-fold dilution was selected from previous results evaluating a whole range of dilution factors as it provided the best recovery results. Interestingly, linearity assays corroborate this effect by the Sample/Standard Diluent observed in the recovery evaluation. Thus, serial dilution of neat plasma in a standard saline buffer such as PBS yielded a linear association of signal regarding the dilution carried out. However, the parallel dilution of the same plasma samples in Sample/Standard Diluent produced a signal drop unexpectedly much smaller than that caused by PBS dilution, especially at a 3-fold dilution (Fig. 3). As a consequence, the 3-fold dilution of plasma in Sample/Standard Diluent provided the maximum A β that can be quantified both with ABtest40 and ABtest42, giving a determination with biological meaning itself as the total amount of A β present in the sample that can be determined in this immunoassay. Other assays developed for the quantification of A β species in plasma dilute the plasma matrix in detergent based diluents [44], even finding a maximum signal at 1/3 dilution of plasma [42]. However, many publications dealing with A β blood-based test do not report any pre-dilution of the plasma samples [15, 45, 46], which should be considered an

important factor to be standardized and taken into account for a comprehensive quantification of A β in plasma.

These results support the hypothesis that the formulated Sample/Standard Diluent has a specific and active influence over the interactions of A β with other plasma components that are well described in the bibliography [23–26, 47]. Thus, the dilution in Sample/Standard Diluent goes beyond what is expected for the dilution of a biological matrix, as can be seen compared to PBS; its specific formulation is releasing A β previously bound to plasma components and not accessible for its quantification by ELISA in the undiluted sample. Consequently, quantification of A β in an undiluted plasma matrix includes only the peptide that is directly accessible to be measured (or that is not interacting with masking components) whereas assaying the plasma sample diluted 1/3 in Sample/Standard Diluent allows for the determination of the total quantifiable A β after recovering the peptide masked by these interactions.

Blood-based tests for the diagnosis of AD are still in a discovery phase and in these initial stages a more comprehensive assessment of the concentration and distribution of A β in the plasma may afford an incremental benefit compared with single snapshot determinations, which are affected by the complex interaction of A β peptides with the individuals' plasma matrix. Previous results in pilot studies support the idea that this comprehensive approach might help to develop blood-based tests into useful tools for the screening of people at increased risk of developing AD and warrant additional research in this area [48–50].

ABtest40 and ABtest42 have proved to be robust and reliable tools for quantification of A β ₄₀ and A β ₄₂ in plasma and this study provides important information about the quantitative performance expected from them which is relevant as there is an urgent need for an early and easily accessible AD biomarker and many studies have been carried out to explore the association between plasma A β and AD, although with contradictory results [16, 43, 46, 51–57]. We believe that part of this controversy could be due to the lack of standardization and validation of the plasma A β determination, which raises numerous issues that may impact upon the reproducibility of results. Diverse assay methodologies, antibodies produced under different conditions and/or from different sources and varied detection techniques can result in different outcomes and performance (see Supplementary Table 8). The variation in detectable

levels of A β could also likely be produced by the use of different diluents and/or dilution factor in the assay [42]. Together with these analytical-phase factors, the importance of standardizing pre-analytical factors such as sample collection procedures, sample storage and pre-assay preparation for reliable and reproducible AD biomarker measurements has been highlighted previously [27, 29, 58–60]. The aforementioned issues reinforce the reason why a validation of any quantitative tool is mandatory.

The limitations of this validation study comprise the lack of stability assessment of samples (both long-term stability and freeze-thaw cycles effect) and of some kit's components. It is also important to evaluate the reproducibility of the quantification in different laboratories, since it has been shown to be a critical aspect in the evaluation of other A β assays [29]. In agreement with this and to keep under control this important source of variability, ABtest is currently being provided as a service by a reference laboratory. Additionally, no clinical data have been included in this work; the clinical utility of ABtest is already under evaluation in independent studies with well-defined cohorts, and the corresponding manuscripts are in preparation. Besides these aspects, other sample-related potential factors that could affect A β determination, such as creatinine or total protein levels, should be evaluated to confirm the robustness of the test in clinical settings.

In conclusion, ABtest40 and ABtest42 have proven to be specific, sensitive, precise and accurate enough to quantify A β ₄₀ and A β ₄₂ at the levels existing in plasma. This validation gives reliability to any quantification with ABtest in a clinical trial environment, which brings to light its capabilities as a cost-effective tool for the determination of potential AD biomarkers in plasma. So far, A β ₄₀ and A β ₄₂ determinations in plasma, although of great scientific interest, have not been validated as a diagnostic tool in clinical settings. Hence, the next step should be the evaluation of the clinical utility of these measurements to validate the intended use of ABtest. Regarding this objective, several studies in consolidated and well-characterized populations are already being carried out.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been financed by Araclon Biotech Ltd. All the authors are full time employees at Araclon Biotech Ltd.

Authors' disclosures available online (<http://j-alz.com/manuscript-disclosures/16-0325r2>).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The supplementary material is available in the electronic version of this article: <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-160325>.

REFERENCES

- [1] Selkoe DJ (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* **6**, 487-498.
- [2] (2015) Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* **11**, 332-384.
- [3] Montine TJ, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Dickson DW, Duyckaerts C, Frosch MP, Masliah E, Mirra SS, Nelson PT, Schneider JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Vinters HV, Hyman BT (2012) National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: A practical approach. *Acta Neuropathol* **123**, 1-11.
- [4] Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ (2010) Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* **9**, 119-128.
- [5] Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis KA, Salvado O, Szoec K, Macaulay SL, Martins R, Maruff P, Ames D, Rowe CC, Masters CL (2013) Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: A prospective cohort study. *Lancet Neurol* **12**, 357-367.
- [6] Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Ivatsubo T, Jack CR Jr, Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV, Phelps CH (2011) Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **7**, 280-292.
- [7] Hampel H, Burger K, Teipel SJ, Bokde AL, Zetterberg H, Blennow K (2008) Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **4**, 38-48.
- [8] Shaw LM, Korecka M, Clark CM, Lee VM, Trojanowski JQ (2007) Biomarkers of neurodegeneration for diagnosis and monitoring therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 295-303.
- [9] Zhang S, Smaïlagic N, Hyde C, Noel-Storr AH, Takwoingi Y, McShane R, Feng J (2014) (11)C-PIB-PET for the early diagnosis of Alzheimer's disease dementia and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI). *Cochrane Database Syst Rev* **2014**, CD010386.
- [10] Blennow K, Dubois B, Fagan AM, Lewczuk P, de Leon MJ, Hampel H (2015) Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **11**, 58-69.
- [11] Bouwman FH, Schoonenboom NS, Verwey NA, van Elk EJ, Kok A, Blankenstein MA, Scheltens P, van der Flier WM (2009) CSF biomarker levels in early and late onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **30**, 1895-1901.
- [12] Blennow K (2004) Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx* **1**, 213-225.
- [13] Anoop A, Singh PK, Jacob RS, Maji SK (2010) CSF biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis. *Int J Alzheimers Dis* **2010**, pii: 606802.
- [14] Fagan AM, Perrin RJ (2012) Upcoming candidate cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Biomark Med* **6**, 455-476.
- [15] van OM, Hofman A, Soares HD, Koudstaal PJ, Breteler MM (2006) Plasma A β (1-40) and A β (1-42) and the risk of dementia: A prospective case-cohort study. *Lancet Neurol* **5**, 655-660.
- [16] Koyama A, Okereke OI, Yang T, Blacker D, Selkoe DJ, Grodstein F (2012) Plasma amyloid-beta as a predictor of dementia and cognitive decline: A systematic review and meta-analysis. *Arch Neurol* **69**, 824-831.
- [17] Chouraki V, Beiser A, Younkin L, Preis SR, Weinstein G, Hansson O, Skoog I, Lambert JC, Au R, Launer L, Wolf PA, Younkin S, Seshadri S (2015) Plasma amyloid-beta and risk of Alzheimer's disease in the Framingham Heart Study. *Alzheimers Dement* **11**, 249-257.
- [18] Kaffashian S, Tzourio C, Soumare A, Dufouil C, Mazoyer B, Schraen-Maschke S, Buee L, Debette S (2015) Association of plasma beta-amyloid with MRI markers of structural brain aging in the 3-City Dijon study. *Neurobiol Aging* **36**, 2663-2670.
- [19] Roberts KF, Elbert DL, Kasten TP, Patterson BW, Sigurdson WC, Connors RE, Ovod V, Munsell LY, Mawuenyega KG, Miller-Thomas MM, Moran CJ, Cross DT III, Derdeyn CP, Bateman RJ (2014) Amyloid-beta efflux from the central nervous system into the plasma. *Ann Neurol* **76**, 837-844.
- [20] Rembach A, Watt AD, Wilson WJ, Villemagne VL, Burnham SC, Ellis KA, Maruff P, Ames D, Rowe CC, Macaulay SL, Bush AI, Martins RN, Masters CL, Doecke JD (2014) Plasma amyloid-beta levels are significantly associated with a transition toward Alzheimer's disease as measured by cognitive decline and change in neocortical amyloid burden. *J Alzheimers Dis* **40**, 95-104.
- [21] Toledo JB, Shaw LM, Trojanowski JQ (2013) Plasma amyloid beta measurements - a desired but elusive Alzheimer's disease biomarker. *Alzheimers Res Ther* **5**, 8.
- [22] Schneider P, Hampel H, Buerger K (2009) Biological marker candidates of Alzheimer's disease in blood, plasma, and serum. *CNS Neurosci Ther* **15**, 358-374.
- [23] Kuo YM, Emmerling MR, Lampert HC, Hempelman SR, Kokjohn TA, Woods AS, Cotter RJ, Roher AE (1999) High levels of circulating A β (42) are sequestered by plasma proteins in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **257**, 787-791.
- [24] Costa M, Ortiz AM, Jorquera JI (2012) Therapeutic albumin binding to remove amyloid-beta. *J Alzheimers Dis* **29**, 159-170.
- [25] Sagare AP, Deane R, Zetterberg H, Wallin A, Blennow K, Zlokovic BV (2011) Impaired lipoprotein receptor-mediated peripheral binding of plasma amyloid-beta is an early biomarker for mild cognitive impairment preceding Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **24**, 25-34.
- [26] Biere AL, Ostaszewski B, Strimston ER, Hyman BT, Maggio JE, Selkoe DJ (1996) Amyloid beta-peptide is transported on lipoproteins and albumin in human plasma. *J Biol Chem* **271**, 32916-32922.
- [27] Watt AD, Perez KA, Rembach AR, Masters CL, Villemagne VL, Burnham KJ (2012) Variability in blood-based amyloid-beta assays: The need for consensus on pre-analytical processing. *J Alzheimers Dis* **30**, 323-336.
- [28] Leitao MJ, Baldeiras I, Herukka SK, Pikkariainen M, Leinonen V, Simonsen AH, Perret-Liaudet A, Fourier A, Quadrio I, Veiga PM, de Oliveira CR (2015) Chasing the effects of pre-analytical confounders - a multicenter study on CSF-AD biomarkers. *Front Neurol* **6**, 153.

- [29] Bjerke M, Portelius E, Minthon L, Wallin A, Anckarsater H, Anckarsater R, Andreasen N, Zetterberg H, Andreasson U, Blennow K (2010) Confounding factors influencing amyloid Beta concentration in cerebrospinal fluid. *Int J Alzheimers Dis* **2010**, pii: 986310.
- [30] Toombs J, Paterson RW, Lunn MP, Nicholas JM, Fox NC, Chapman MD, Schott JM, Zetterberg H (2013) Identification of an important potential confound in CSF AD studies: Aliquot volume. *Clin Chem Lab Med* **51**, 2311-2317.
- [31] Pesini P, Perez-Grijalba V, Montleon I, Boada M, Tarraga L, Martinez-Lage P, San-Jose I, Sarasa M (2012) Reliable measurements of the beta-amyloid pool in blood could help in the early diagnosis of AD. *Int J Alzheimers Dis* **2012**, 604141. doi:10.1155/2012/604141
- [32] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) (2013) *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*.
- [33] European medicines agency (2015) Guideline on bioanalytical method validation.
- [34] Andreasson U, Ferret-Liaudet A, van Waalwijk van Doorn LJ, Blennow K, Chiasserini D, Engelborghs S, Fladby T, Gene S, Kruse N, Kuiperij HB, Kulic L, Lewczuk P, Mollenhauer B, Mroczko B, Parnetti L, Vanmechelen E, Verbeeck MM, Winblad B, Zetterberg H, Koel-Simmelink M, Teunissen CE (2015) A practical guide to immunoassay method validation. *Front Neurol* **6**, 179.
- [35] Pierson-Perry JF, Vacks JE, Durham AP, Fischer C, Guenbrunner C, Hillyard D, Kondratovich MV, Ladwig P, Middleberg RA (2012) EP17-A2: Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; Approved guideline-Second edition. *Clinical Standards Laboratory Institute* **32** (8).
- [36] D'Arrigo C, Tabaton M, Perico A (2009) N-terminal truncated pyroglutamylyl beta amyloid peptide Abeta₃₋₄₂ shows a faster aggregation kinetics than the full-length Abeta₁₋₄₂. *Biopolymers* **91**, 861-873.
- [37] Wittman JL, Portelius E, Zetterberg H, Gustavsson MK, Schilling S, Koch B, Demuth HU, Blennow K, Wirths O, Bayer TA (2012) Pyroglutamate A β (beta) aggravates behavioral deficits in 5XFAD mice. *J Biol Chem* **287**, 8154-8162.
- [38] Lachno DR, Evert BA, Maloney K, Willis BA, Talbot JA, Vandijck M, Dean RA (2014) Validation and clinical utility of ELISA methods for quantification of amyloid-beta peptides in cerebrospinal fluid specimens from Alzheimer's disease studies. *J Alzheimers Dis* **45**, 527-542.
- [39] Lachno DR, Emerson JK, Vanderstichele H, Gonzales C, Martenyi F, Konrad RJ, Talbot JA, Lowe SL, Oefinger PE, Dean RA (2012) Validation of a multiplex assay for simultaneous quantification of amyloid-beta peptide species in human plasma with utility for measurements in studies of Alzheimer's disease therapeutics. *J Alzheimers Dis* **32**, 905-918.
- [40] Lachno DR, Evert BA, Vanderstichele H, Robertson M, Demattos RB, Konrad RJ, Talbot JA, Racke MM, Dean RA (2013) Validation of assays for measurement of amyloid-beta peptides in cerebrospinal fluid and plasma specimens from patients with Alzheimer's disease treated with solanezumab. *J Alzheimers Dis* **34**, 897-910.
- [41] Lewczuk P, Kornhuber J, Vanmechelen E, Peters O, Heuser I, Maier W, Jessen F, Burger K, Hampel H, Frolich L, Henn F, Falkai P, Ruther E, Jahn H, Luckhaus C, Pernecky R, Schmidtke K, Schroder J, Kessler H, Pantel J, Gertz HJ, Vanderstichele H, De MG, Shapiro F, Wolf S, Bibl M, Wiltfang J (2010) Amyloid beta peptides in plasma in early diagnosis of Alzheimer's disease: A multicenter study with multiplexing. *Exp Neurol* **223**, 366-370.
- [42] Hansson O, Zetterberg H, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Andreasson U, Londoos E, Wallin A, Minthon L, Blennow K (2010) Evaluation of plasma Abeta₄₀ and Abeta₄₂ as predictors of conversion to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* **31**, 357-367.
- [43] Yaffe K, Weston A, Graff-Radford NR, Satterfield S, Simonick EM, Younkin SG, Younkin LH, Kuller L, Ayonayon HN, Ding J, Harris TB (2011) Association of plasma beta-amyloid level and cognitive reserve with subsequent cognitive decline. *JAMA* **305**, 261-266.
- [44] Blennow K, De MG, Hansson O, Minthon L, Wallin A, Zetterberg H, Lewczuk P, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Kornhuber J, Wiltfang J, Heuser I, Maier W, Luckhaus C, Ruther E, Hull M, Jahn H, Gertz HJ, Frolich L, Hampel H, Pernecky R (2009) Evolution of Abeta₄₂ and Abeta₄₀ levels and Abeta₄₂/Abeta₄₀ ratio in plasma during progression of Alzheimer's disease: A multicenter assessment. *J Nutr Health Aging* **13**, 205-208.
- [45] Seppala TT, Herukka SK, Hanninen T, Tervo S, Hallikainen M, Soinen H, Pirttila T (2010) Plasma Abeta₄₂ and Abeta₄₀ as markers of cognitive change in follow-up: A prospective, longitudinal, population-based cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **81**, 1123-1127.
- [46] Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J, Boeve BF, Knopman DS, Ivnik RJ, Smith GE, Younkin LH, Petersen RC, Younkin SG (2007) Association of low plasma Abeta₄₂/Abeta₄₀ ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol* **64**, 354-362.
- [47] Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic BV (2009) Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: Implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **8**, 16-30.
- [48] Perez-Grijalba V, Pesini P, Montleon I, Boada M, Tarraga L, Ruiz-Laza A, Martinez-Lage P, San-Jose I, Sarasa M (2013) Several direct and calculated biomarkers from the amyloid-beta pool in blood are associated with an increased likelihood of suffering from mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis* **36**, 211-219.
- [49] Pesini P, Perez-Grijalba V, Fandos N, Olmos S, Bossa M, Masters CL, Villenague VL, Doecke JD, Fowler CJ, Rembach A, Sarasa M, The AIBL, Research Group (2015) Assessment of plasma AB markers to estimate dichotomic amyloid PET among cognitively healthy people. *J Prev Alzheimers Dis* **2**, 280-281.
- [50] Fagan AM, Perez-Grijalba V, Fandos N, Pesini P, Olmos S, Bossa M, Sarasa M, The ACS, Research Group (2015) Longitudinal plasma biomarker changes in middle-aged individuals at risk for Alzheimer disease. *J Prev Alzheimers Dis* **2**, 304-305.
- [51] Gabelle A, Richard F, Gutierrez LA, Schraen S, Delva F, Rouaud O, Buee L, Dartigues JF, Touchon J, Lambert JC, Berr C (2013) Plasma amyloid-beta levels and prognosis in incident dementia cases of the 3-City Study. *J Alzheimers Dis* **33**, 381-391.
- [52] Hansson O, Stomrud E, Vanmechelen E, Ostling S, Gustafson DR, Zetterberg H, Blennow K, Skoog I (2012) Evaluation of plasma Abeta as predictor of Alzheimer's disease in older individuals without dementia: A population-based study. *J Alzheimers Dis* **28**, 231-238.

- [53] Toledo JB, Vanderstichele H, Figurski M, Aisen PS, Petersen RC, Weiner MW, Jack CR Jr, Jagust W, Decarli C, Toga AW, Toledo E, Xie SX, Lee VM, Trojanowski JQ, Shaw LM (2011) Factors affecting Abeta plasma levels and their utility as biomarkers in ADNI. *Acta Neuropathol* **122**, 401-413.
- [54] Schupf N, Zigman WB, Tang MX, Pang D, Mayeux R, Mehta P, Silverman W (2010) Change in plasma A β peptides and onset of dementia in adults with Down syndrome. *Neurology* **75**, 1639-1644.
- [55] Lui JK, Laws SM, Li QX, Villemagne VL, Ames D, Brown B, Bush AI, De Rk, Dromey J, Ellis KA, Faux NG, Foster J, Fowler C, Gupta V, Hudson P, Laughton K, Masters CL, Portile K, Rembach A, Rimajova M, Rodrigues M, Rowe CC, Rumble R, Szoeke C, Taddei K, Taddei T, Tronson B, Ward V, Martins RN, Research AIBL Group (2010) Plasma amyloid-beta as a biomarker in Alzheimer's disease: The AIBL study of aging. *J Alzheimers Dis* **20**, 1233-1242.
- [56] Sundelof J, Giedraitis V, Irizarry MC, Sundstrom J, Ingelsson E, Ronnema E, Arnlov J, Gunnarsson MD, Hyman BT, Basun H, Ingelsson M, Lannfelt L, Kilander L (2008) Plasma beta amyloid and the risk of Alzheimer disease and dementia in elderly men: A prospective, population-based cohort study. *Arch Neurol* **65**, 256-263.
- [57] Mayeux R, Honig LS, Tang MX, Manly J, Stern Y, Schupf N, Mehta PD (2003) Plasma A β [40] and A β [42] and Alzheimer's disease: Relation to age, mortality, and risk. *Neurology* **61**, 1185-1190.
- [58] Lachno DR, Vanderstichele H, De GG, Kostanjevecki V, De MG, Siemers ER, Willey MB, Bourdage JS, Konrad RJ, Dean RA (2009) The influence of matrix type, diurnal rhythm and sample collection and processing on the measurement of plasma beta-amyloid isoforms using the INNO-BIA plasma Abeta forms multiplex assay. *J Nutr Health Aging* **13**, 220-225.
- [59] Mattsson N, Zetterberg H, Blennow K (2010) Lessons from multicenter studies on CSF biomarkers for Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* **2010**, pii: 610613.
- [60] Vanderstichele H, Bibl M, Engelborghs S, Le BN, Lewczuk P, Molinuevo JL, Parnetti L, Perret-Liaudet A, Shaw LM, Teunissen C, Wouters D, Blennow K (2012) Standardization of preanalytical aspects of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: A consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimers Dement* **8**, 65-73.

Supplementary Material

Supplementary Table 1. Validation parameters of the calibration method.

<i>ABtest40</i>												
pg/ml	Run I		Run II		Run III		Run IV		Run V		Run VI	
	RE (%)	CV (%)	RE (%)	CV (%)	RE (%)	CV (%)	RE (%)	CV (%)	RE (%)	CV (%)	RE (%)	CV (%)
200	-0.1	0.5	0.8	2.4	1.5	1.4	0.9	3.2	0.1	2.9	0.5	1.8
100	0.6	6.5	-3.4	3.6	-3.2	4.0	-3.6	4.8	-0.1	5.7	-3.4	5.4
50	-1.8	7.7	2.1	4.7	2.0	3.2	1.8	5.5	-1.1	5.2	-0.4	4.9
25	1.0	5.5	5.1	4.7	6.5	8.5	4.7	6.7	2.0	5.3	0.6	0.6
12.5	-0.7	7.1	9.5	5.5	12.4	5.7	7.6	2.9	3.8	2.5	5.2	3.6
6.25	9.9	11.7	-16.6	5.7	4.3	7.8	10.0	4.7	-8.6	4.2	-9.9	10.2
3.125	-17.2	6.7	-1.7	2.1	-3.8	9.9	3.6	8.6	-6.4	11.5	-9.6	2.3

<i>ABtest42</i>												
pg/ml	Run I		Run II		Run III		Run IV		Run V		Run VI	
	RE (%)	CV (%)	RE (%)	CV (%)	RE (%)	CV (%)	RE (%)	CV (%)	RE (%)	CV (%)	RE (%)	CV (%)
200	0.4	4.7	0.0	4.6	0.2	0.2	1.4	3.8	-2.4	8.4	0.0	6.4
100	-3.4	1.5	0.4	5.7	-0.4	3.1	-3.2	4.9	-2.4	2.5	0.0	0.4
50	1.1	3.3	-1.5	5.4	0.3	1.3	1.1	4.1	1.4	2.6	-0.3	2.4
25	2.0	3.3	1.4	4.0	3.0	5.2	4.0	4.6	5.6	2.3	0.9	4.5
12.5	7.8	1.1	3.6	2.0	-2.8	1.0	6.0	1.9	8.4	3.8	-0.6	0.6
6.25	-2.9	8.5	-7.9	1.8	-0.9	3.3	-5.0	8.0	-12.4	5.3	-1.8	2.3
3.125	-12.1	19.7	4.6	16.2	-1.9	1.1	-5.0	2.0	-2.0	3.6	0.4	6.7

RE, relative error of the back-calculated concentration regarding the theoretical concentration of the calibration; CV, coefficient of variation of the duplicates at each concentration level of the quantification range (from 3.125 to 200 pg/ml of A β ₄₀ or A β ₄₂ standards).

Supplementary Table 2. Specificity of the antibodies involved in ABtest40 and ABtest42.

	Cross-reactivity (%)
Anti N-terminal	
A β ₂₋₄₀	97.0%
A β ₃₋₄₀	149.6%
[Pyr3] A β ₃₋₄₀	129.5%
A β ₄₋₄₀	3.8%
A β ₁₁₋₄₀	0.5%
Murine A β ₁₋₄₀	1.2%
Anti Aβ₄₀	
A β ₁₋₃₇	0.6%
A β ₁₋₃₈	1.4%
A β ₁₋₄₂	0.0%
A β ₁₋₄₃	0.0%
Anti Aβ₄₂	
A β ₁₋₃₇	4.1%
A β ₁₋₃₈	1.8%
A β ₁₋₄₀	0.9%
A β ₁₋₄₃	0.8%

Anti N-terminal: monoclonal 1F3 antibody. Anti A β ₄₀: pAB002. Anti A β ₄₂: pAB031. Percentage of cross reactivity, regarding the target A β species signal (100%) of 200 pg/ml of A β peptides serially truncated in N- and C-terminal.

Supplementary Table 3. Limit of blank (LoB) and limit of detection (LoD) estimated for ABtest40 and ABtest42.

Batch	Limit of blank				Limit of detection			
	ABtest40		ABtest42		ABtest40		ABtest42	
	LoB (pg/ml)	SD _L	LoB (pg/ml)	SD _L	LoD (pg/ml)	SD _L	LoD (pg/ml)	SD _L
#1	1.94	2.72	2,74	1.62	7.56	1.51	3.51	0.93
#2	7.44	2.17	1,26	1.65	7.93	1.74	3.88	1.15
#3	5.83	2.64	1,93	1.14	7.01	1.17	3.32	0.81
Mean	5.07		1.98		7.50		3.57	

LoB was estimated with 18 replicates of four samples without Aβ with three different batches of ABtest40 and ABtest42 (batch#1, batch#2, and batch#3). Variability of the determinations was

represented as the global standard deviation, $SD_L = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^J (n_i - 1) SD_i^2}{\sum_{i=1}^J (n_i - 1)}}$. LoD was established from

the previously determined LoB after repetition (18 replicates) of the quantification of four samples with Aβ₄₀ or Aβ₄₂ levels close to LoB using three different ABtest batches.

Supplementary Table 4. Limit of quantification of ABtest40 and ABtest42.

	ABtest40			ABtest42		
	Concentration tested	CV (%)	RE (%)	Concentration tested	CV (%)	RE (%)
#1	7.60 pg/ml	22.1	-2.4	3.60 pg/ml	14.4	14.5
#2	7.60 pg/ml	21.2	4.4	3.60 pg/ml	21.8	19.1
Mean		21.6	3.4		18.1	16.8

LoQ was determined as the lowest concentration of A β ₄₀ and A β ₄₂ fulfilling the accuracy (RE \leq 25%) and precision (CV \leq 25%) criteria. The quantification of 7.60 pg/ml in ABtest40 and 3.60 pg/ml in ABtest42 met the acceptance criteria assaying 44 replicates in a single run with two different ABtest40 and ABtest42 batches.

Supplementary Table 5. Accuracy validation results for each concentration level.

	<i>Mean RE %</i>				
	LLOQ	Low	Mid	High	ULOQ
ABtest40	12.2	6.5	8.8	4.8	3.7
ABtest42	10.4	7.5	4.5	8.0	5.3

RE, relative error as the mean of the difference between each of the 36 determinations carried out at each concentration level regarding the theoretical concentration. LLOQ, concentration close to the lower limit of quantification of the dynamic range of the assay. MID, middle concentration. ULOQ, concentration close to the upper limit of quantification of the dynamic range.

Supplementary Table 6. Recovery percentages of A β added in plasma.

A β spiked concentration	ABtest40				ABtest42			
	Undiluted plasma		Diluted plasma		Undiluted plasma		Diluted plasma	
	Recovery (%)	SD	Recovery (%)	SD	Recovery (%)	SD	Recovery (%)	SD
150 pg/ml	59.6	2.0	87.1	4.7	64.9	4.9	93.6	10.6
75p g/ml	63.5	4.1	93.3	6.3	66.9	5.9	97.4	7.3
20 pg/ml	58.2	5.6	101.7	8.5	59.0	4.9	93.6	7.7
Mean	60.4	3.9	94.0	6.5	63.6	5.3	94.9	8.6

Recovery, average percentage of recovery of known concentration of A β added to three different undiluted and three-fold diluted plasma samples in Sample/Standard Diluent. SD, standard deviation of % recovery in the different samples. Three different concentrations levels were added to each sample in order to guarantee recovery in the whole range of the assay.

Supplementary Table 7. Further dilution linearity study.

Dilution	ABtest40												Mean recovery (%)	
	Sample 1				Sample 2				Sample 3					
	Obs. Conc	CV	Theor. Conc	% recovery	Obs. Conc	CV	Theor. Conc	% recovery	Obs. Conc	CV	Theor. Conc	% recovery		
1/3	181.14	4.3	181.14	100.0	164.4	4.9	164.4	100.0	154.69	1.6	154.69	100.0	103.0	
1/6	94.61	3.2	90.57	104.5	83.35	4.7	82.2	101.4	79.74	1.6	77.35	103.1		98.4
1/12	44.93	5.2	45.28	99.2	39.85	6.1	41.1	97.0	38.31	2.0	38.67	99.1		91.8
1/24	22.00	3.9	22.64	97.2	17.98	5.7	20.55	87.5	17.52	5.2	19.34	90.6		77.0
1/48	9.55	13.9	11.32	84.4	8.06	18.6	10.27	78.4	6.6	19.4	9.67	68.2		

Dilution	ABtest42												Mean recovery (%)	
	Sample 1				Sample 2				Sample 3					
	Obs. Conc	CV	Theor. Conc	% recovery	Obs. Conc	CV	Theor. Conc	% recovery	Obs. Conc	CV	Theor. Conc	% recovery		
1/3	188.91	4.3	188.91	100.0	179.4	5.3	179.4	100.0	178.98	3.4	178.98	100.0	106.6	
1/6	100.66	1.8	94.45	106.6	95.45	6.3	89.7	106.4	95.63	1.6	89.49	106.9		102.8
1/12	48.41	2.1	47.23	102.5	45.45	6.1	44.85	101.3	46.84	2.1	44.74	104.7		104.1
1/24	24.22	2.9	23.61	102.6	23.32	7.3	22.42	104.0	23.64	4.2	22.37	105.7		101.3
1/48	11.74	1.1	11.81	99.4	11.21	14.1	11.21	100.0	11.68	7.6	11.19	104.4		

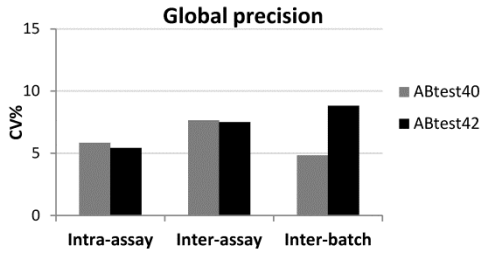
Assessment of dilution linearity starting from 1/3 dilution, which is considered as the reference concentration (maximum dilution effect, total A β quantifiable in ABtest). Three high A β concentration samples were serially diluted in triplicates using Sample/Standard Diluent. The theoretical concentration corresponds to the reference concentration of the 1/3 sample serially divided by the dilution factor. These results showed that linearity is maintained beyond the 1/3 dilution of the plasma in Sample/Standard Diluent, further supporting that maximal A β concentration in plasma is measured at the 1/3 dilution. Obs. Conc, observed concentration (pg/ml); CV, coefficient of variation of replicates of the same sample (%); Theor. Conc, theoretical concentration (pg/ml). % recovery=100x(Obs. Conc/Theor. Conc).

Supplementary Table 8. Validation parameters of different plasma A β quantification assays.

Study	Intra-assay CV		Inter-assay CV		LLOQ (pg/ml)		Quantification range (pg/ml)	
	A β ₄₀	A β ₄₂	A β ₄₀	A β ₄₂	A β ₄₀	A β ₄₂	A β ₄₀	A β ₄₂
ABtest validation	3.9-12.0%	3.8-7.9%	3.6-15.0%	4.6-11.0%	7.6	3.6	3.125-200	3.125-200
Vanderstichele et al., 2000 ¹ [1]				7.1%		5		
Mehta et al., 2000 ² [2]	8-16%		10-18%		20	40		
Mayeux et al., 2003 ³ [3]					5	10		
van Oijen et al., 2006 ⁴ [4]	4.4%	4.9%	10.1%	14.8%			10-1000	5-100
Schupf et al., 2008 ⁵ [5]			< 10%		9	10		
Blasko et al., 2008 ⁶ [6]		8.1%		17.3%				5-1000
Blennow et al., 2009 ⁷ [7]			<i>3-7.3%</i>	<i>1.9-7.2%</i>			30-3000	15-600
Hansson et al., 2010 ⁸ [8]			<i>6.4%</i>	<i>2.7%</i>				
Lewzuck et al., 2010 ⁹ [9]	1.8-4.1%	1.3-3.8%	2.2-10.4%	2.3-11.5%				
Yaffe et al., 2011 ¹⁰ [10]	3.5%	2.5%	9.9%	9.3%				
Figurski et al., 2012 ¹¹ [11]	7.2%	4.5%	6.4%	4.8%			3.75-1256	1.25-530
Shah et al., 2012 ¹² [12]			3.1-7.9%	12-20%			3.9-250	0.49-125
Lachno et al., 2012 ¹³ [13]	2-9%	1-7%	7-10%	5-17%	8.0	6.3	8.4-1545	7.6-1485
Lachno et al., 2013 ¹⁴ [14]	2-8%	2-7%	8-9%	7-11%			15.6-750	43.9-750
Kaffashian et al., 2015 ¹⁵ [15]			<i>1.8%</i>	<i>11.2%</i>				
Chouraki et al., 2015 ¹⁶ [16]	3.2%	2.6%	10.5%	7.6%				

CV, coefficient of variation; LLOQ, lower limit of quantification. Data in italics refer to global variability of the assay. This review of validation parameters of different assays was based on PubMed search of the key words “validation OR performance AND amyloid AND plasma AND immunoassay” and a result of data extraction from plasma A β quantification studies that included this information about the test. The assay methodology used in every study is presented as follows: ¹double-antibody colorimetric sandwich ELISA; ²DELFIA time-resolved fluorescence (TRF) immunodetection in ELISA; ³Luminex xMAP technology using INNO-BIA plasma A β forms assays.

Supplementary Figure 1. Average global precision of ABtest40 and ABtest42.



Average intra-assay, inter-assay, and inter-batch precision. CV, coefficient of variation.

REFERENCES

[1] Vanderstichele H, Van KE, Hesse C, Davidsson P, Buyse MA, Andreasen N, Minthon L, Wallin A, Blennow K, Vanmechelen E (2000) Standardization of measurement of beta-amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid and plasma. *Amyloid* **7**, 245-258.

[2] Mehta PD, Piirttila T, Mehta SP, Sersen EA, Aisen PS, Wisniewski HM (2000) Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol* **57**, 100-105.

[3] Mayeux R, Honig LS, Tang MX, Manly J, Stern Y, Schupf N, Mehta PD (2003) Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology* **61**, 1185-1190.

[4] van OM, Hofman A, Soares HD, Koudstaal PJ, Breteler MM (2006) Plasma Abeta(1-40) and Abeta(1-42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study. *Lancet Neurol* **5**, 655-660.

[5] Schupf N, Tang MX, Fukuyama H, Manly J, Andrews H, Mehta P, Ravetch J, Mayeux R (2008) Peripheral Abeta subspecies as risk biomarkers of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14052-14057.

[6] Blasko I, Jellinger K, Kemmler G, Krampfl W, Jungwirth S, Wichart I, Tragl KH, Fischer P (2008) Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: prediction by plasma amyloid beta 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine. *Neurobiol Aging* **29**, 1-11.

[7] Blennow K, De MG, Hansson O, Minthon L, Wallin A, Zetterberg H, Lewczuk P, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Kornhuber J, Wiltfang J, Heuser I, Maier W, Luckhaus C, Ruther E, Hull M, Jahn H, Gertz HJ, Frolich L, Hampel H, Pernetzki R (2009) Evolution of

Abeta42 and Abeta40 levels and Abeta42/Abeta40 ratio in plasma during progression of Alzheimer's disease: a multicenter assessment. *J Nutr Health Aging* **13**, 205-208.

[8] Hansson O, Zetterberg H, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Andreasson U, Londos E, Wallin A, Minthon L, Blennow K (2010) Evaluation of plasma Abeta(40) and Abeta(42) as predictors of conversion to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* **31**, 357-367.

[9] Lewczuk P, Kornhuber J, Vanmechelen E, Peters O, Heuser I, Maier W, Jessen F, Burger K, Hampel H, Frolich L, Henn F, Falkai P, Ruther E, Jahn H, Luckhaus C, Perneckzy R, Schmidtko K, Schroder J, Kessler H, Pantel J, Gertz HJ, Vanderstichele H, De MG, Shapiro F, Wolf S, Bibl M, Wiltfang J (2010) Amyloid beta peptides in plasma in early diagnosis of Alzheimer's disease: A multicenter study with multiplexing. *Exp Neurol* **223**, 366-370.

[10] Yaffe K, Weston A, Graff-Radford NR, Satterfield S, Simonsick EM, Younkin SG, Younkin LH, Kuller L, Ayonayon HN, Ding J, Harris TB (2011) Association of plasma beta-amyloid level and cognitive reserve with subsequent cognitive decline. *JAMA* **305**, 261-266.

[11] Figurski MJ, Waligorska T, Toledo J, Vanderstichele H, Korecka M, Lee VM, Trojanowski JQ, Shaw LM (2012) Improved protocol for measurement of plasma beta-amyloid in longitudinal evaluation of Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative study patients. *Alzheimers Dement* **8**, 250-260.

[12] Shah NS, Vidal JS, Masaki K, Petrovitch H, Ross GW, Tilley C, Demattos RB, Tracy RP, White LR, Launer LJ (2012) Midlife blood pressure, plasma beta-amyloid, and the risk for Alzheimer disease: the Honolulu Asia Aging Study. *Hypertension* **59**, 780-786.

[13] Lachno DR, Emerson JK, Vanderstichele H, Gonzales C, Martenyi F, Konrad RJ, Talbot JA, Lowe SL, Oefinger PE, Dean RA (2012) Validation of a multiplex assay for

simultaneous quantification of amyloid-beta peptide species in human plasma with utility for measurements in studies of Alzheimer's disease therapeutics. *J Alzheimers Dis* **32**, 905-918.

[14] Lachno DR, Evert BA, Vanderstichele H, Robertson M, Demattos RB, Konrad RJ, Talbot JA, Racke MM, Dean RA (2013) Validation of assays for measurement of amyloid-beta peptides in cerebrospinal fluid and plasma specimens from patients with Alzheimer's disease treated with solanezumab. *J Alzheimers Dis* **34**, 897-910.

[15] Kaffashian S, Tzourio C, Soumare A, Dufouil C, Mazoyer B, Schraen-Maschke S, Buee L, Debette S (2015) Association of plasma beta-amyloid with MRI markers of structural brain aging the 3-City Dijon study. *Neurobiol Aging* **36**, 2663-2670.

[16] Chouraki V, Beiser A, Yountkin L, Preis SR, Weinstein G, Hansson O, Skoog I, Lambert JC, Au R, Launer L, Wolf PA, Yountkin S, Seshadri S (2015) Plasma amyloid-beta and risk of Alzheimer's disease in the Framingham Heart Study. *Alzheimers Dement* **11**, 249-257.



Blood-Based Biomarkers

Plasma amyloid β 42/40 ratios as biomarkers for amyloid β cerebral deposition in cognitively normal individuals

Noelia Fandos^{a,1}, Virginia Pérez-Grijalba^{a,1}, Pedro Pesini^{a,*}, Salvador Olmos^b, Matías Bossa^b, Victor L. Villemagne^c, James Doecke^d, Christopher Fowler^c, Colin L. Masters^c, Manuel Sarasa^a, and the AIBL Research Group

^aR&D Department, Araclon Biotech Ltd., Zaragoza, Spain

^bAragon Institute of Engineering Research, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain

^cThe Florey Institute of Neuroscience and Mental Health, University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia

^dCSIRO Health and Biosecurity/Australian E-Health Research Centre, Brisbane, Queensland, Australia

Abstract

Introduction: Plasma amyloid β (A β) peptides have been previously studied as candidate biomarkers to increase recruitment efficiency in secondary prevention clinical trials for Alzheimer's disease.

Methods: Free and total A β 42/40 plasma ratios (FP42/40 and TP42/40, respectively) were determined using ABtest assays in cognitively normal subjects from the Australian Imaging, Biomarker and Lifestyle Flagship Study. This population was followed-up for 72 months and their cortical A β burden was assessed with positron emission tomography.

Results: Cross-sectional and longitudinal analyses showed an inverse association of A β 42/40 plasma ratios and cortical A β burden. Optimized as a screening tool, TP42/40 reached 81% positive predictive value of high cortical A β burden, which represents 110% increase over the population prevalence of cortical A β positivity.

Discussion: These findings support the use of plasma A β 42/40 ratios as surrogate biomarkers of cortical A β deposition and enrichment tools, reducing the number of subjects submitted to invasive tests and, consequently, recruitment costs in clinical trials targeting cognitively normal individuals.

© 2017 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of the Alzheimer's Association. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Keywords:

Amyloid β ; Plasma amyloid β ratio; Biomarker; Preclinical Alzheimer's disease; β -Amyloid imaging; Positron emission tomography; Clinical trials

1. Introduction

Dementia is a major public health problem worldwide, which currently affects 46 million people, a number estimated to increase up to 131.5 million by 2050, entailing an enormous social and financial burden [1]. Alzheimer's

disease (AD) accounts for 60% to 70% of all cases of dementia; thus, the benefits of a successful therapeutic intervention that could stop or, ideally, prevent the development of AD are undeniable. However, therapeutic trials have had limited success so far, partly because of the advanced neurodegenerative stage of individuals typically targeted in clinical trials over the last two decades. Considering that the efficacy of potential AD treatments would likely depend on an early intervention, there is a growing need for accurate identification of asymptomatic (preclinical) individuals with underlying pathology for inclusion in the current and more favored secondary prevention trials [2–4].

Conflicts of interest: The authors have no conflicts of interest related to this work.

¹These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. Tel.: +34-976796562; Fax: +34-976217802.

E-mail address: ppesini@araclon.com

<http://dx.doi.org/10.1016/j.dadm.2017.07.004>

2352-8729/© 2017 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of the Alzheimer's Association. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Consequently, considerable investigational effort has been devoted in recent years to identify biological markers indicative of preclinical and/or prodromal AD before the onset of dementia [5,6]. This new concept of AD has also emphasized the importance of biomarkers as eligibility criteria to enrich clinical trial cohorts with subjects at increased risk of suffering more rapid cognitive decline. Amyloid β ($A\beta$) is the most likely cause of the pathophysiological process leading to AD dementia and, consequently, $A\beta$ -related biomarkers should be ideal for the identification of the earliest stages of the disease [7,8].

$A\beta$ peptides are most frequently measured in the cerebrospinal fluid (CSF) or through brain imaging of $A\beta$ deposition with positron emission tomography ($A\beta$ -PET). Both biomarkers have demonstrated high diagnostic and prognostic value [9–12], and they might start changing decades before the clinical onset of AD [8,13,14]. However, despite the robustness of these biomarkers, they are not suitable for a broad screening of the population, either because of invasiveness or high cost and low availability of the technology in primary care clinical settings. Given the greater accessibility of blood sampling, there is considerable interest in examining whether circulating $A\beta$ levels correlate with brain $A\beta$ levels and, therefore, with risk of developing AD dementia. A blood-based biomarker would be a less invasive and cost-effective screening method to identify individuals at-risk who could be subsequently confirmed by neuroimaging or CSF analysis. In this context, several large studies have consistently reported that a lower $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ ratio in plasma is associated with higher risk of dementia [15–19], and greater cognitive decline in healthy control subjects at follow-up [20]. Nevertheless, some studies have reported weak or no association of the $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ plasma ratio with AD [21–23].

Some of these contradictory findings likely reflect the complexity of measuring $A\beta$ in plasma and the preanalytical and analytical differences between quantitative methods [24,25]. Differences in study populations with regard to factors such as age or disease stage [26] are also confounding factors. Moreover, to date, assessment of the accuracy of blood $A\beta$ biomarkers relies essentially on the use of clinical diagnosis as the gold standard, despite the fact that it has shown sensitivities ranging from 70.9% to 87.3%, and specificities from 44.3 to 70.8 [27], which could seriously skew the results of any test and is almost certainly a relevant source of variability between studies.

The aim of this study was to examine the potential of the plasma $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ ratio as a marker of cortical $A\beta$ deposition and its use as a screening tool for clinical trial enrichment of cognitively normal (CN) subjects with high brain $A\beta$ levels. With this in mind, we focused on the CN group of the Australian Imaging, Biomarker and Lifestyle Flagship (AIBL) Study using $A\beta$ -PET as the gold standard, supported by previous results showing an association between $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ plasma ratio and brain $A\beta$ levels [28–31]. Moreover, we have taken a comprehensive approach for the

evaluation of $A\beta_{42}/40$ plasma ratio, differentiating the peptide fractions that are found free in plasma (FP42/40) from the total $A\beta$ peptides in plasma (TP42/40) and the amount of $A\beta$ that is bound to other plasma components (BP42/40), by means of validated enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) [32]. In this study, the cross-sectional and longitudinal association of these plasma markers with brain $A\beta$ -PET results was evaluated, together with an assessment of their diagnostic performance and ability to predict brain $A\beta$ deposition trajectories, evaluating the potential of plasma $A\beta$ ratios as enrichment tools for secondary prevention clinical trials.

2. Methods

2.1. Study population

CN subjects from the AIBL cohort included in this study were selected from those who underwent $A\beta$ imaging with PET. Complete description of the clinical classification procedures in this study was described previously [33]. Subjects were followed-up for 72 months with visits at baseline (bl) and 18-month intervals (visits m18, m36, m54, and m72).

2.2. Amyloid PET imaging

At each of these time points, cortical $A\beta$ burden was assessed using PET with either ^{11}C -Pittsburgh Compound-B (PiB) or ^{18}F -flutemetamol. The PET methodology for each tracer has been previously described [34,35] (see [Supplementary material, Imaging Methods](#) for detailed description). To use the results of both PET tracers as a single continuous variable, flutemetamol results were transformed into PiB-like standardized uptake value ratios (SUVR) termed BeCKeT [36]. The SUVR/BeCKeT was then dichotomized into high ($A\beta+$) or low ($A\beta-$) $A\beta$ burden using a cutoff value of 1.5 [36].

Those individuals with both a valid $A\beta$ -PET measurement and a valid corresponding plasma measurement at visits m18, m36, and/or m54 were considered in the cross-sectional and in the discriminating performance analysis. For longitudinal analysis, subjects with both valid plasma and $A\beta$ -PET data at bl and at least a valid $A\beta$ -PET measurement during the whole follow-up were considered.

2.3. Plasma $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ quantification

Plasma samples were obtained using ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as anticoagulant and following AIBL procedures [30], and were conserved at $-70^{\circ}C$ until analysis without undergoing any extra freezing/thaw cycles. Only plasma samples from visits m18, m36, and m54 were available for $A\beta$ plasma analysis in this study. $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ peptides were quantified using ABtest40 and ABtest42, respectively (Araclon Biotech Ltd. Zaragoza, Spain), being blinded to all participant characteristics at the time of

Table 1
Descriptive statistics of demography, Aβ-PET data, and plasma biomarkers at each visit and amyloid PET status

	bl		m18		m36		m54		m72	
	PET Aβ−	PET Aβ+	PET Aβ−	PET Aβ+	PET Aβ−	PET Aβ+	PET Aβ−	PET Aβ+	PET Aβ−	PET Aβ+
Participants, n	49	27	49	30	42	30	52	36	44	20
Age (mean ± SD)	72.0 ± 7.3	74.4 ± 7.4	73.7 ± 7.3	74.9 ± 7.4	74.9 ± 7.5	76.4 ± 7.2	76.7 ± 6.8	77.2 ± 7.7	77.3 ± 6.7	78.9 ± 7.1
Female, n (%)	28 (57.1)	11 (40.7)	30 (61.2)	11 (36.7) ^a	28 (66.7)	12 (40.0) ^a	33 (63.5)	17 (47.2)	26 (59.1)	9 (45.0)
APOE ε4 carriers, n (%)	15 (30.6)	17 (63.0) ^a	17 (34.7)	22 (73.3) ^a	11 (26.2)	20 (66.7) ^a	15 (28.8)	24 (66.7) ^a	9 (20.5)	9 (45.0)
Years of education (mean ± SD)	12.5 ± 2.3	12.2 ± 2.7	12.4 ± 2.3	12.1 ± 2.9	12.4 ± 2.4	12.1 ± 2.7	12.6 ± 2.7	12.0 ± 2.5	12.5 ± 2.8	12.0 ± 2.5
TP42/40; median (IQR)	—	—	0.083 (0.028)	0.068 (0.020) [†]	0.088 (0.024)	0.071 (0.027) ^a	0.085 (0.034)	0.067 (0.015) [†]	—	—
BP42/40; median (IQR)	—	—	0.089 (0.046)	0.067 (0.038) ^a	0.094 (0.042)	0.070 (0.032) [†]	0.095 (0.041)	0.069 (0.030)	—	—
FP42/40; median (IQR)	—	—	0.074 (0.040)	0.066 (0.016) ^a	0.081 (0.029)	0.074 (0.016)	0.077 (0.037)	0.069 (0.015) ^a	—	—

Abbreviations: APOE, apolipoprotein E; Aβ, amyloid β; Aβ+ or Aβ−, Aβ positive or negative subjects regarding categorical Aβ-PET measurements; bl, baseline; IQR, interquartile range; median, median value of plasma Aβ ratios in individuals classified as Aβ+ or Aβ−; PET, positron emission tomography; SD, standard deviation.

NOTE. Aβ plasma analysis was only performed at visits month 18 (m18), m36, and m54; participants included had both valid plasma and PET measurements at these visits. Visits bl (baseline) and m72 include subjects with a valid Aβ-PET measurement at these visits and a valid plasma measurement at visit m18. Fisher exact test was performed for categorical variables and Mann-Whitney test for quantitative variables.

^aSignificant differences between PET amyloid negative/positive groups at the P value level of .05.

[†]Significant differences between PET amyloid negative/positive groups at the P value level of .001.

analysis. Analytical procedures and performance characteristics of these tests are described elsewhere [32].

Samples were assayed both undiluted and after treatment by a three-fold dilution in sample/standard diluent, specifically formulated to disrupt Aβ interactions with other plasma components. This previously validated approach allows the quantification of Aβ peptides (either Aβ40 or Aβ42) in two plasma fractions: free Aβ in plasma (FP), which is measured in the undiluted sample, and the total Aβ in plasma (TP) fraction measured in the diluted sample [37]. The difference between the concentrations of TP and FP fractions corresponds to the amyloid peptide bound to plasma (BP) components. The Aβ42/Aβ40 ratios in each of these plasma fractions (FP42/40, TP42/40, and BP42/40) were calculated as the plasma markers to be evaluated.

2.4. Statistical analysis

As an initial exploratory analysis for assessing the association between plasma Aβ42/40 ratios and PET measurements, a Mann-Whitney U test was performed at visits m18, m36, and m54 to evaluate plasma ratio differences between subject groups defined by the dichotomized SUVR/BeCKeT (Aβ+ and Aβ−).

To explore the effects of covariates (age, apolipoprotein E (APOE) ε4 genotype, and gender) on the association between the SUVR/BeCKeT and plasma ratios, a linear regression model using the SUVR/BeCKeT as a quantitative response variable was performed at each visit from m18 to m54. In each model, a single plasma marker was used in log-units. Log transformation of ratio variables provided better-behaved statistics.

Linear mixed-effects models were used to assess the association between the first plasma measurement (at visit m18) and the trajectories of the SUVR/BeCKeT at follow-up (visits bl-m72). The fixed-effects terms were the contribution of the plasma variable to the intercept and slope of the SUVR/BeCKeT trajectories, as well as the demographic covariates. The random-effects terms included intercept and slope at the individual level.

A Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis was used to assess the prediction performance of the dichotomic SUVR/BeCKeT from a single plasma marker measurement. In addition to sensitivity/specificity performance measures, positive predictive value (PPV) is of special interest in this study. The criterion for choosing the operating point along the ROC curve was Youden's index maximum. Classification performance was assessed by means of a repeated random subsampling cross-validation (CV) experiment with 10,000 rounds and a data split distribution of about 50% to 50% for training and testing sets, respectively. More details of the CV experiment are given in the [Supplementary material](#).

Statistical analysis was performed with MATLAB (The MathWorks, Inc, Natick, MA, USA).

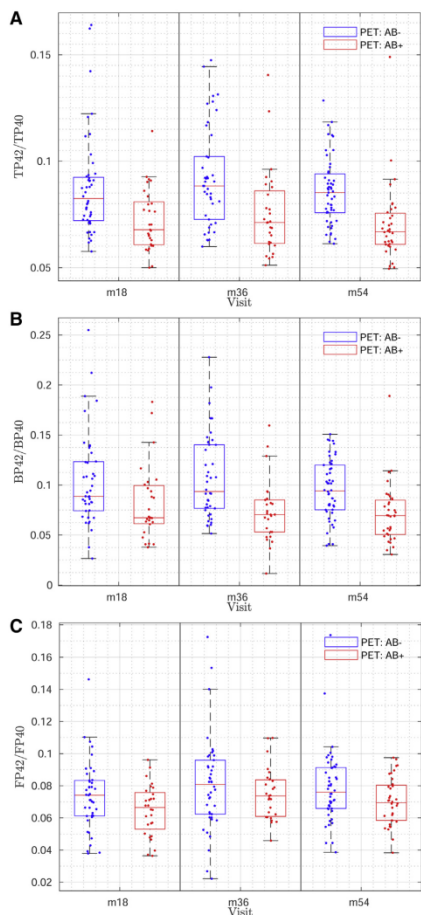


Fig. 1. Box-and-whisker plots of plasma markers with regards to categorical $A\beta$ -PET status ($A\beta+$ or $A\beta-$) measurements at each visit. (A) TP42/40, for visualization purposes three outliers (of the 236 valid measurements) with TP42/40 values between 0.19 and 0.54 were discarded. (B) BP42/40, (C) FP42/40, for visualization purposes three outliers (of the 217 valid measurements) with FP42/40 values between 0.19 and 0.29 are not shown. See data in Table 1. Abbreviations: BP, amyloid peptide bound to plasma; FP, free in plasma; TP, total amyloid β in plasma.

3. Results

The demographic characteristics of individuals included in this study at each visit are presented in the upper rows of Table 1. The bottom rows provide descriptive statistics

of plasma $A\beta$ ratios, which were lower in the group of subjects with positive $A\beta$ -PET scans than in those with negative $A\beta$ -PET scans. This association reached statistical significance in all the three analyzed visits for TP42/40 and BP42/40 ($P < .001$ in two of the three visits) and only in two visits for FP42/40 (see also Fig. 1).

The cross-sectional linear regression modeling of the SUVR/BeCKeT as a function of each plasma ratio, adjusting for demographic covariates, is summarized in Table 2. The linear association between the SUVR/BeCKeT and plasma ratios (TP42/40, BP42/40, and FP42/40) was consistent with the previous exploratory analysis, although statistical significance was reached at a lower number of visits. The negative sign of the coefficients is in agreement with the previous hypothesis testing: lower plasma $A\beta$ ratios were associated with higher SUVR/BeCKeT values. Regarding covariates, *APOE* genotype effects on the SUVR/BeCKeT were statistically significant at all visits and for all the plasma ratios (see Supplementary Table 1). Gender effects were not significant.

In the longitudinal analysis, linear mixed-effects models showed a significant association between the slope of the SUVR/BeCKeT trajectories and the first available plasma measurement at m18 (Table 3; complete information is provided in Supplementary Table 2). The negative sign of the models' coefficients indicated that the lower the plasma $A\beta$ ratios at visit m18, the steeper the SUVR/BeCKeT trajectory. The inverse association between plasma $A\beta$ ratios and SUVR/BeCKeT was also observed at bl (intercept), although with a weaker or borderline significance, which was in line with the results of the cross-sectional study. Among the three plasma ratios, TP42/40 showed the most significant association with SUVR/BeCKeT slope. This inverse association between the $A\beta$ 42/40 plasma ratio and the SUVR/BeCKeT slope is in correspondence with the fact that in those individuals with low plasma $A\beta$ 42/40 ratio, the change in SUVR/BeCKeT from bl increased along the follow-up, whereas on average it did not change in those subjects with a high $A\beta$ 42/40 plasma ratio (Fig. 2). *APOE* genotype also had significant effects on both the intercept and slope of the SUVR/BeCKeT trajectories, whereas age had only significant effects on the intercept (see Supplementary Table 2). The direction of the association was as expected: *APOE* $\epsilon 4$ carriers had SUVR/BeCKeT trajectories with both a larger amplitude and a steeper slope than noncarriers. Regarding age, older subjects had trajectories with larger amplitude.

The plasma marker with the most significant association with the SUVR/BeCKeT in both cross-sectional and longitudinal analyses (TP42/40) was selected for a subsequent ROC curve analysis. The inclusion of TP42/40 in the classifier yielded a statistically significant improvement (DeLong test P value .0017) in the area under the ROC curve with only demographic covariates (age and *APOE*) from 74% to 79%. Mean difference (95% confidence interval [95% CI]) was 5.4% (2.0% to 8.8%) (see Supplementary Section

Table 2
Association between log-transformed plasma ratio levels and the SUVR/BeCKeT score in the cross-sectional study

Biomarker	Coefficient	m18	m36	m54
log(TP42/40)	Estimate (95% CI)	-0.40 (-0.76, -0.027)	-0.10 (-0.43, 0.22)	-0.59 (-0.94, -0.24)
	P value	.036	.52	.0013
log(BP42/40)	Estimate (95% CI)	-0.086 (-0.32, 0.14)	-0.29 (-0.51, -0.066)	-0.30 (-0.54, -0.065)
	P value	.46	.012	.013
log(FP42/40)	Estimate (95% CI)	-0.35 (-0.63, -0.067)	-0.055 (-0.36, 0.25)	-0.32 (-0.64, 0.0042)
	P value	.016	.72	.053

Abbreviations: APOE, apolipoprotein E; BP, amyloid peptide bound to plasma; 95% CI, 95% confidence interval; FP, free in plasma; m18, month 18; m36, month 36; m54, month 54; TP, total amyloid β in plasma.

NOTE. Estimate: coefficient of the plasma ratio as the explanatory variable in a generalized linear regression model adjusted for relevant demographic variables (age, gender, and APOE genotype) at each visit.

III and Supplementary Fig. 3). Gender was not included in this analysis because of the lack of significant associations found in previous analyses. The average performance for the classifier including TP42/40 at Youden's index maximum (indicative of its best expected performance) was 71% sensitivity with 78% specificity. Interestingly, the distribution of the SUVR/BeCKeT threshold values that maximized Youden's index had a median value of 1.57 with a 95% CI of 1.40 to 1.73. As expected, these threshold values are close to the cutoff selected for the definition of the dichotomic SUVR/BeCKeT variable.

For trial enrichment purposes, a biomarker with a large value of PPV is desired, which can be obtained by selecting a large value of the threshold in the classifier so that the false-positive rate is reduced. Fig. 3 shows the distribution of the PPV measure across CV rounds as a function of the threshold value. The classifier including TP42/40 plus demographic covariates provided a median PPV performance of 81% for a model threshold value of 1.73. In concordance with the improvement in the area under the ROC curve mentioned previously, the inclusion of TP42/40 in the model together with the demographic covariates provided a statistically significant improvement in the classifier

PPV (see also Supplementary Material, Section III). Note that this threshold value is slightly higher than the one that maximized Youden's index. This median PPV performance represented over a 110% increase over the prevalence of A β -PET positivity in the study population, which was about 37.5%.

4. Discussion

In this study, we report that in CN individuals, low levels of FP42/40, BP42/40, and TP42/40 plasma ratios are associated with higher levels of cerebral fibrillary A β deposition as determined by PET. This inverse association was found to be significant for BP42/40 and TP42/40 at each of the three visits analyzed and in two of them for FP42/40. The association between plasma A β 42/40 ratios and A β -PET SUVR/BeCKeT was still significant in two of the three visits after adjusting the comparisons for the most relevant demographic covariates (age, APOE genotype, and gender) providing robustness to the findings. Furthermore, our results showed that low levels of A β 42/40 ratios (particularly TP42/40) at bl are associated with faster increase (slope) of A β -PET SUVR/BeCKeT over time, establishing the potential of A β 42/40 plasma ratios as predictors of A β -PET individual trajectories.

These results are in concordance with previous studies [28-31,38]. In particular, present results are consistent with the inverse association between plasma A β 42/40 and cortical A β burden determined by PiB-PET previously observed in the AIBL population including CN, mild cognitive impairment (MCI), and AD patients, as shown by Rembach et al. [31]. In this study, we have extended the follow-up from 18 to 72 months and have used A β -PET SUVR/BeCKeT scores obtained with either PiB or flutemetamol, confirming this inverse association and its ability to predict faster cortical A β deposition over time. Remarkably, this study provides added value because, to the best of our knowledge, it is the first study in which the association between A β plasma ratios and cortical A β burden is explored within a population of stable CN individuals. Moreover, our results are congruent with the association of low A β 42/40 plasma ratio with greater cognitive decline in

Table 3
Association between log-transformed plasma ratio levels and the SUVR/BeCKeT score in the longitudinal study

Biomarker	Coefficient	Estimate (95% CI)	P Value
log(TP42/40)	Intercept	-0.34 (-0.62, -0.064)	.016
	Interaction with time	-0.034 (-0.054, -0.015)	.0006
log(BP42/40)	Intercept	-0.13 (-0.31, 0.047)	.15
	Interaction with time	-0.014 (-0.028, -0.00094)	.036
log(FP42/40)	Intercept	-0.22 (-0.43, 0.0045)	.055
	Interaction with time	-0.026 (-0.42, -0.0098)	.0017

Abbreviations: APOE, apolipoprotein E; BP, amyloid peptide bound to plasma; 95% CI, 95% confidence interval; FP, free in plasma; TP, total amyloid β in plasma.

NOTE. Estimate: coefficient of the plasma ratio as the explanatory variable in a generalized linear mixed-effects model adjusted for relevant demographic variables (age, gender, and APOE genotype).

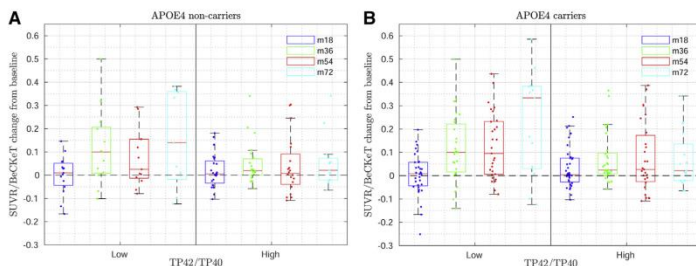


Fig. 2. Box-and-whisker plot of changes in the SUVR/BeCKeT along the follow-up for subjects with low or high baseline TP42/40 plasma ratio. Each point represents the change in each individual in SUVR/BeCKeT at visit month 18 (m18, blue), m36 (green), m54 (red), or m72 (cyan), with respect to the baseline SUVR/BeCKeT in *APOE* ϵ 4 noncarriers (A) and *APOE* ϵ 4 carriers (B). In (A or B), left panel contains the individuals with low (<the population median) TP42/40 levels at baseline (m18) and right panel the individuals with high (\geq the population median) TP42/40 levels at baseline (m18). Note that in those individuals with low baseline TP42/40, average change in SUVR/BeCKeT significantly increased over visits, whereas in those with high baseline TP42/40 there was almost no change in the SUVR/BeCKeT during the follow-up. Similar figures are also obtained for the other markers FP42/40 and BP42/40 (see Table 3). Abbreviations: APOE, apolipoprotein E; BP, amyloid peptide bound to plasma; FP, free in plasma; TP, total amyloid β in plasma.

elderly people without dementia [20] and the increased risk of developing AD observed by others [15,19,39]. The robustness of this association has been reinforced over the last 10 years by reports from well-known large population-

based studies such as the Framingham [17], the Rotterdam [18], the Three-City [16], and BioFINDER Studies [38], as well as the findings of a meta-analysis including more than 10,000 subjects [40].

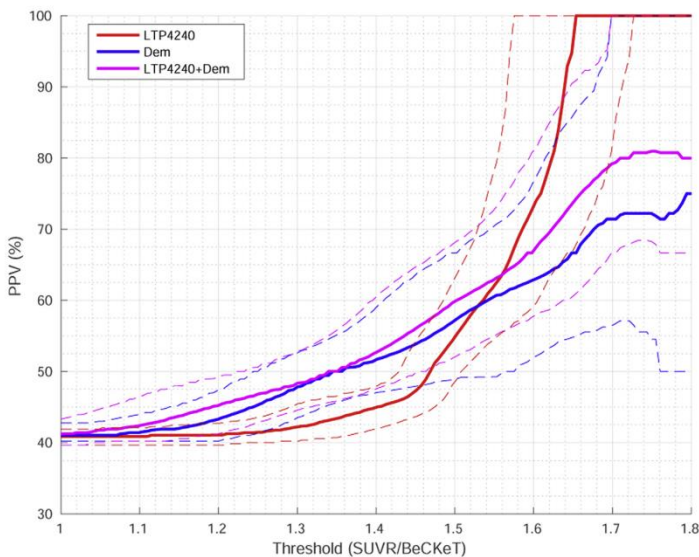


Fig. 3. Comparison of the performance on PPV for three different classifiers as a function of the threshold value. In red, classifier including only the plasma marker $\log(\text{TP42/40})$. In blue, classifier including age + *APOE* ϵ 4 variables. In pink, classifier with all previous variables. The thick line represents the median value of the performance, and the thin dashed lines represent the 5th and 95th percentile values. Abbreviations: APOE, apolipoprotein E; PPV, positive predictive value; TP, total $\text{A}\beta$ in plasma.

Nevertheless, discrepant results from other studies [21–23] cannot be disregarded and emphasize the need for further substantial investigation on A β plasma levels as preclinical biomarkers. In this line, thorough preanalytical and analytical standardization is required to obtain reliable data that facilitate comparison between studies. The variety of assay formats used in different studies may have also contributed to these varying results. The use of A β 42/40 ratios instead of single peptide measurements may attenuate possible bias in single A β peptide levels caused by inconsistencies in sample handling [41]. In line with this, recent studies in CSF have reported better diagnostic performance for the A β 42/40 ratio than for A β 42 alone [42]. Furthermore, our approach allows a deeper knowledge of A β behavior in blood [32], by the assessment of A β bound to plasma components [43–45]. It is becoming increasingly clearer that sensitivity to cortical A β burden varied substantially among individuals and that the rate of SUVR change over time could be more relevant to predict disease progression than single cross-sectional measurements [46]. Similarly, change in the relative abundance and distribution of A β peptides in plasma could be more effectively reflecting the progression of AD than absolute plasma levels. Having higher proportion of free A β , prone to aggregate or re-enter the brain could be more relevant pathologically than the absolute total A β levels [47]. In addition, the proportion of bound peptides in plasma might reflect A β clearance capacity at the individual's level [48]. Further experiments will be necessary to test these ideas, which in first place require a more comprehensive assessment of the different A β species in the different plasma fractions.

Yet, the use of A β plasma ratios for diagnostic purposes remains problematic and seriously limited because of the extensive overlapping of individual measurements among CN, MCI, and AD patients, previously discussed in [39]. This situation is reflected in the ROC curve analysis in which our classifier including TP42/40 (together with age and *APOE* genotype) reached 71% sensitivity with 78% specificity to discriminate cortical-A β positivity at the maximum of Youden's index, which would not be enough for a stand-alone diagnosis. However, beyond diagnostic purposes, noninvasive and cost-effective plasma biomarkers would be of great utility as a screening tool in secondary prevention clinical trials to preselect a cohort enriched for people with presumptive cortical amyloid pathology. The cortical A β burden of these subjects would have to be subsequently confirmed by A β -PET scans. In this scenario, the plasma classifier cut-point that maximizes the trade-off between sensitivity and specificity (at the maximum of Youden's index) may not be optimal. Instead, a higher cutoff may be a better choice to increase the PPV of the prescreening test, reducing the number of false positive decisions and, consequently, the number of subjects needed to receive confirmatory A β -PET scans. This strategy has already been explored by others in the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) cohort [49].

With this in mind, we have evaluated the distribution of the PPV as a function of the classifier's threshold. At the optimal threshold, an average 81% PPV was obtained, which is more than two times higher than the prevalence of A β -PET positivity in this population (37.5%). Therefore, in a recruiting scenario targeting CN cortical-A β + people, a prescreening step with our plasma classifier would reduce the number of individuals undergoing A β -PET scans by more than half. Remarkably, considering the 5% percentile, the PPV of the classifier including TP42/40 will be more than 68% with 95% certainty, which represents an improvement of 81% over the sample prevalence in the identification of preclinical subjects with a positive A β -PET scan (Fig. 3). The magnitude of this improvement can be adequately assessed if compared with the 60% increase over the prevalence of A β -PET positivity obtained in the ADNI cohort (including CN, MCI, and AD), with a classifier combining demographics (*APOE*) and cognitive decline [49]. Thus, considering the invasiveness, technical requirements and high costs of A β -PET scans (up to \$5000; [49]), in an average phase III clinical trial including hundreds of subjects, the recruitment process could be simplified and the associated costs considerably reduced by preselecting the subjects with a classifier including the TP42/40 ratio. Nevertheless, it should be noted that sensitivity monotonically decreases for larger threshold values of the classifier. Thus, in a practical enrichment scenario the PPV must be "traded-off" with sensitivity and specificity to balance costs, logistical considerations, and general benefit to the clinical trial in question. This will be explored further in future work.

It also deserves to be emphasized that the inclusion of the TP42/40 ratio in the classifier significantly improved the identification of cortical-A β + subjects regardless their *APOE* genotype. This would allow a recruitment strategy not restricted to the presence of a risk factor such as *APOE* ϵ 4, which could lead to a biased cohort selection and, eventually, to uncertainties when translating clinical trial results (and claims) to the general population.

Our work has a weakness that must be noted in the relatively small sample size available for this study, particularly relevant for the CV approach of the ROC analysis, which required the partition of the sample population in two independent training and testing sets and obviously would have to be replicated in a larger sample population. However, we have assessed the 95% CI for this variability and present results were still relevant from a practical point of view at the 95% certainty.

In conclusion, our results show an inverse association between A β 42/40 plasma ratios and fibrillary A β deposition in the brain. The population screening application of this blood-based biomarker, which is inexpensive, minimally invasive, and can easily be performed at multiple time points, could be translated into a more efficient use of neuroimaging resources in clinical trials. Present results warrant further research on the development of plasma

A β 42/40 ratios as surrogate biomarkers of A β deposition in brain.

Acknowledgments

This work was financially supported by Araclon Biotech Ltd, Spain. N.F., V.P.-G., P.P., and M.S. are employees of Araclon Biotech. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dadm.2017.07.004>.

RESEARCH IN CONTEXT

1. Systematic review: The literature was reviewed using PubMed database and bibliography included in target articles to identify previous research about the association of plasma amyloid β (A β) levels and Alzheimer's disease (AD). Most studies show that low levels of A β 42/40 in plasma are associated with increased risk of AD or cortical fibrillary A β burden.
2. Interpretation: Our results are consistent with most of the previous research showing an association of low A β 42/40 plasma ratios with high A β deposition in brain determined by A β imaging with positron emission tomography and considerable potential as an enrichment tool in clinical trials.
3. Future directions: These findings support and encourage further research in the development of plasma A β 42/40 ratios as surrogate biomarkers of cortical A β deposition.

References

- [1] 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 2015; 11:332–84.
- [2] Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2014;370:322–33.
- [3] Doody RS, Thomas RG, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, et al. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2014;370:311–21.
- [4] Sperling RA, Jack CR Jr, Aisen PS. Testing the right target and right drug at the right stage. *Sci Transl Med* 2011;3:111cm33.
- [5] Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011;7:280–92.
- [6] Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Hampel H, Molinuevo JL, Blennow K, et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol* 2014;13:614–29.
- [7] Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* 2010;9:119–28.
- [8] Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis KA, Salvado O, et al. Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol* 2013;12:357–67.
- [9] Pike KE, Savage G, Villemagne VL, Ng S, Moss SA, Maruff P, et al. Beta-amyloid imaging and memory in non-demented individuals: evidence for preclinical Alzheimer's disease. *Brain* 2007;130:2837–44.
- [10] Rowe CC, Bourgeat P, Ellis KA, Brown B, Lim YY, Mulligan R, et al. Predicting Alzheimer disease with beta-amyloid imaging: results from the Australian imaging, biomarkers, and lifestyle study of ageing. *Ann Neurol* 2013;74:905–13.
- [11] Blennow K, Mattsson N, Scholl M, Hansson O, Zetterberg H. Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 2015; 36:297–309.
- [12] Shaw LM, Vanderstichele H, Knapik-Czajka M, Figurski M, Coast E, Blennow K, et al. Qualification of the analytical and clinical performance of CSF biomarker analyses in ADNI. *Acta Neuropathol* 2011;121:597–609.
- [13] Toledo JB, Shaw LM, Trojanowski JQ. Plasma amyloid beta measurements—a desired but elusive Alzheimer's disease biomarker. *Alzheimers Res Ther* 2013;5:8.
- [14] Jack CR Jr, Holtzman DM. Biomarker modeling of Alzheimer's disease. *Neuron* 2013;80:1347–58.
- [15] Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J, Boeve BF, Knopman DS, Ivnik RJ, et al. Association of low plasma Abeta42/Abeta40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2007;64:354–62.
- [16] Lambert JC, Schraen-Maschke S, Richard F, Fievet N, Rouaud O, Berr C, et al. Association of plasma amyloid beta with risk of dementia: the prospective Three-City Study. *Neurology* 2009;73:847–53.
- [17] Chouraki V, Beiser A, Younkin L, Preis SR, Weinstein G, Hansson O, et al. Plasma amyloid-beta and risk of Alzheimer's disease in the Framingham Heart Study. *Alzheimers Dement* 2015;11:249–57.
- [18] van OM, Hofman A, Soares HD, Koudstaal PJ, Breteler MM. Plasma Abeta(1–40) and Abeta(1–42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study. *Lancet Neurol* 2006;5:655–60.
- [19] Abdullah L, Luis C, Paris D, Mouzon B, Ait-Ghezala G, Keegan AP, et al. Serum Abeta levels as predictors of conversion to mild cognitive impairment/Alzheimer disease in an ADAPT subcohort. *Mol Med* 2009;15:432–7.
- [20] Yaffe K, Weston A, Graff-Radford NR, Satterfield S, Simonsick EM, Younkin SG, et al. Association of plasma beta-amyloid level and cognitive reserve with subsequent cognitive decline. *JAMA* 2011; 305:261–6.
- [21] Hansson O, Zetterberg H, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Andreasson U, Londos E, et al. Evaluation of plasma Abeta(40) and Abeta(42) as predictors of conversion to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2010; 31:357–67.
- [22] Lopez OL, Kuller LH, Mehta PD, Becker JT, Gach HM, Sweet RA, et al. Plasma amyloid levels and the risk of AD in normal subjects in the Cardiovascular Health Study. *Neurology* 2008;70:1664–71.
- [23] Lovheim H, Elgh F, Johansson A, Zetterberg H, Blennow K, Hallmans G, et al. Plasma concentrations of free amyloid-beta cannot predict the development of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2017;13:778–82.
- [24] Henriksen K, O'Bryant SE, Hampel H, Trojanowski JQ, Montine TJ, Jeromin A, et al. The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2014;10:115–31.

- [25] Watt AD, Perez KA, Rembach AR, Masters CL, Villemagne VL, Barnham KJ. Variability in blood-based amyloid-beta assays: the need for consensus on pre-analytical processing. *J Alzheimers Dis* 2012;30:323–36.
- [26] Toledo JB, Vanderstichele H, Figurski M, Aisen PS, Petersen RC, Weiner MW, et al. Factors affecting Abeta plasma levels and their utility as biomarkers in ADNI. *Acta Neuropathol* 2011;122:401–13.
- [27] Beach TG, Monsell SE, Phillips LE, Kukull W. Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005–2010. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012;71:266–73.
- [28] Lui JK, Laws SM, Li QX, Villemagne VL, Ames D, Brown B, et al., AIBL Research Group. Plasma amyloid-beta as a biomarker in Alzheimer's disease: the AIBL study of aging. *J Alzheimers Dis* 2010;20:1233–42.
- [29] Devanand DP, Schupf N, Stern Y, Parsey R, Pelton GH, Mehta P, et al. Plasma Abeta and PET PiB binding are inversely related in mild cognitive impairment. *Neurology* 2011;77:125–31.
- [30] Rembach A, Faux NG, Watt AD, Pertile KK, Rumble RL, Tronson BO, et al. Changes in plasma amyloid beta in a longitudinal study of aging and Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2014;10:53–61.
- [31] Rembach A, Watt AD, Wilson WJ, Villemagne VL, Burnham SC, Ellis KA, et al. Plasma amyloid-beta levels are significantly associated with a transition toward Alzheimer's disease as measured by cognitive decline and change in neocortical amyloid burden. *J Alzheimers Dis* 2014;40:95–104.
- [32] Perez-Grijalba V, Fandos N, Canudas J, Insua D, Casabona D, Lacosta AM, et al. Validation of Immunoassay-Based Tools for the Comprehensive Quantification of Abeta40 and Abeta42 Peptides in Plasma. *J Alzheimers Dis* 2016;54:751–62.
- [33] Ellis KA, Bush AI, Darby D, De FD, Foster J, Hudson P, et al. The Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle (AIBL) study of aging: methodology and baseline characteristics of 1112 individuals recruited for a longitudinal study of Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr* 2009;21:672–87.
- [34] Rowe CC, Ellis KA, Rimajova M, Bourgeat P, Pike KE, Jones G, et al. Amyloid imaging results from the Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle (AIBL) study of aging. *Neurobiol Aging* 2010;31:1275–83.
- [35] Vandenbergher R, van LK, Ivanou A, Salmon E, Bastin C, Triau E, et al. 18F-flutemetamol amyloid imaging in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: a phase 2 trial. *Ann Neurol* 2010;68:319–29.
- [36] Villemagne VL, Doré V, Yates P, Brown B, Mulligan R, Bourgeat P, et al. En attendant centiloid. *Adv Res* 2014;2:723–9.
- [37] Perez-Grijalba V, Pesini P, Monleon I, Boada M, Tarraga L, Ruiz-Laza A, et al. Several direct and calculated biomarkers from the amyloid-beta pool in blood are associated with an increased likelihood of suffering from mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis* 2013; 36:211–9.
- [38] Janelidze S, Stomrud E, Palmqvist S, Zetterberg H, van WD, Jeromin A, et al. Plasma beta-amyloid in Alzheimer's disease and vascular disease. *Sci Rep* 2016;6:26801.
- [39] Pesini P, Sarasa M. Beyond the Controversy on Abeta Blood-Based Biomarkers. *J Prev Alz Dis* 2015;2:51–5.
- [40] Koyama A, Okereke OI, Yang T, Blacker D, Selkoe DJ, Grodstein F. Plasma amyloid-beta as a predictor of dementia and cognitive decline: a systematic review and meta-analysis. *Arch Neurol* 2012;69:824–31.
- [41] Willemsse E, Uffelen K, Brix B, Engelborghs S, Vanderstichele H, Teunissen C. How to handle adsorption of cerebrospinal fluid amyloid-beta(1–42) in laboratory practice? Identifying problematic handlings and resolving the issue by use of the AB42/AB40 ratio. *Alzheimers Dement* 2017;13:885–92.
- [42] Janelidze S, Zetterberg H, Mattsson N, Palmqvist S, Vanderstichele H, Lindberg O, et al. CSF Abeta42/Abeta40 and Abeta42/Abeta38 ratios: better diagnostic markers of Alzheimer disease. *Ann Clin Transl Neurol* 2016;3:154–65.
- [43] Kuo YM, Emmerling MR, Lampert HC, Hempelman SR, Kokjohn TA, Woods AS, et al. High levels of circulating Abeta42 are sequestered by plasma proteins in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:787–91.
- [44] Costa M, Ortiz AM, Jorquera JI. Therapeutic albumin binding to remove amyloid-beta. *J Alzheimers Dis* 2012;29:159–70.
- [45] Biere AL, Ostaszewski B, Stimson ER, Hyman BT, Maggio JE, Selkoe DJ. Amyloid beta-peptide is transported on lipoproteins and albumin in human plasma. *J Biol Chem* 1996;271:32916–22.
- [46] Insel PS, Ossenkoppele R, Gessert D, Jagust W, Landau S, Hansson O, et al. Time to amyloid positivity and preclinical changes in brain metabolism, atrophy, and cognition: evidence for emerging amyloid pathology in Alzheimer's disease. *Front Neurosci* 2017;11:281.
- [47] Deane R, Du YS, Subramanian RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, et al. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* 2003;9:907–13.
- [48] Sagare AP, Deane R, Zetterberg H, Wallin A, Blennow K, Zlokovic BV. Impaired lipoprotein receptor-mediated peripheral binding of plasma amyloid-beta is an early biomarker for mild cognitive impairment preceding Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2011; 24:25–34.
- [49] Insel PS, Palmqvist S, Mackin RS, Nosheny RL, Hansson O, Weiner MW, et al. Assessing risk for preclinical beta-amyloid pathology with APOE, cognitive, and demographic information. *Alzheimers Dement (Amst)* 2016;4:76–84.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Plasma A β 42/40 ratios as biomarkers for A β cerebral deposition in cognitively normal individuals.

I. IMAGING METHODS

A β -amyloid imaging was performed with two different radiotracers: ¹¹C-Pittsburgh Compound-B (PiB) and ¹⁸F-flutemetamol (FLUTE). The PET methodology for each tracer has been previously described [1;2]. For semi-quantitative analysis, a volume of interest template was applied to the summed and spatially normalized PET images in order to obtain a standardized uptake value (SUV). The images were then scaled to the SUV of each tracer recommended reference region to generate a tissue ratio termed SUV ratio (SUVR). A cortical measure of A β burden was computed using the mean SUVR in the frontal, superior parietal, lateral temporal, lateral occipital, and anterior and posterior cingulate regions. For PiB, the SUVs were normalized to the cerebellar cortex and the pons was used as the reference region for FLUTE [3]. In order to use the results of both PET tracers as a single continuous variable, FLUTE results were transformed into PiB-like SUVR termed BeCKeT [4]. The SUVR/BeCKeT was then dichotomized into high (A β +) or low (A β -) A β burden using a ≥ 1.5 SUVR/BeCKeT cut-off [4].

II. STATISTICAL METHODS

Details of the cross-validation experiment for ROC analysis

A cross-validation experiment was designed in order to assess the performance of predicting dichotomic SUVR/BeCKeT. The classifier was based on a linear regression model including the plasma ratio $\log(\text{TP42}/40)$, and the age and the APOE4 status as covariates. In order to maximize the sample size, all plasma-PET data pairs from visits m18 to m54 were selected for this experiment since a large enough amount of data is required for both training and testing sets, in order to obtain a smooth and reliable estimation of the ROC curve.

When using cross-validation for assessing classification performance, caution must be taken to avoid bias. In this experiment, it was ensured that for each cross-validation round all measurements from each subject were either in the training or in the testing set, i.e.,

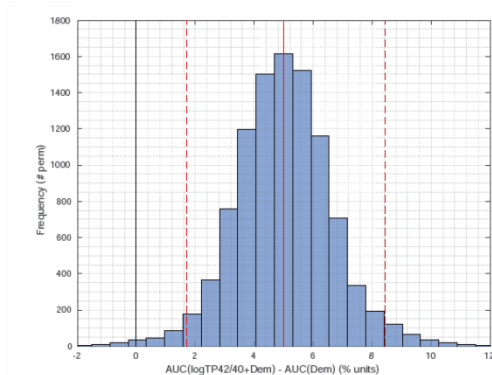
the random selection for either training or testing sets was performed at subject level. Additionally, in order to get a more reliable estimation of the classification metrics, the sample prevalence, i.e. an equal proportion of PET amyloid β positive subjects in each random data sampling was purposefully maintained similar to the sample prevalence in the complete sample of the study ($\approx 40\%$).

In each cross-validation round, the testing set consisted of 117 measurement-pairs from 39 subjects with valid measurements at all three visits. Sixteen out of these 39 subjects for testing were randomly selected among the set of amyloid-PET positive subjects. The remaining 23 subjects were randomly selected from the A β -PET negative subjects. In this way, the sample prevalence in the testing set was 41% for each CV round.

III. CLASSIFICATION PERFORMANCE DIFFERENCES BETWEEN THE MODEL WITH AND WITHOUT TP42/40

AUC

In the cross-validation experiment, each of the random splitting of the data was used to assess both models, with and without the plasma marker TP42/40. Accordingly, direct comparison of the classification performance metrics (such as AUC, sensitivity, specificity, PPV, etc.) from both models at each of the cross-validation rounds was carried out. **Supplementary Fig. 1** illustrates the histogram of the AUC difference between both models: AUC of the model including log(TP42/40) and the model only including Age+APOE4 as explanatory variables. The difference in AUC was found to be statistically significant, with an average difference of 5%, and a 95% confidence interval of (1.70-8.42). Only at 64 out of the 10,000 permutations, the AUC of the demographic model was equal or higher than the AUC of the model including the plasma marker TP42/40, so the inclusion of TP42/40 provides a significant improvement in AUC comparing with the model with only age and APOE4.

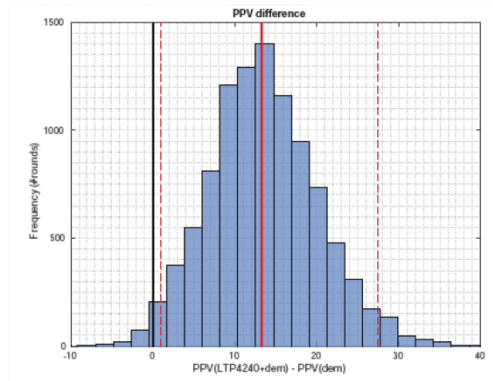


Supplementary Fig. 1. Histogram of the difference of the AUC of the model including $\log(\text{TP42}/40)$ and the AUC with only age+APOE4 variables in the cross-validation experiment. The red vertical lines represent the distribution percentiles: solid line for 50% (median value) and dashed lines for 2.5% and 97.5% percentile values.

In addition to this non-parametric estimation of the performance difference, DeLong test was used to assess the AUC difference between the models with and without the plasma marker, providing a P value of .0017. These findings show a strong agreement between the result of DeLong test and the estimation with the cross-validation experiment, which confirms the significant improvement in AUC with the inclusion of TP42/40 in the model.

PPV

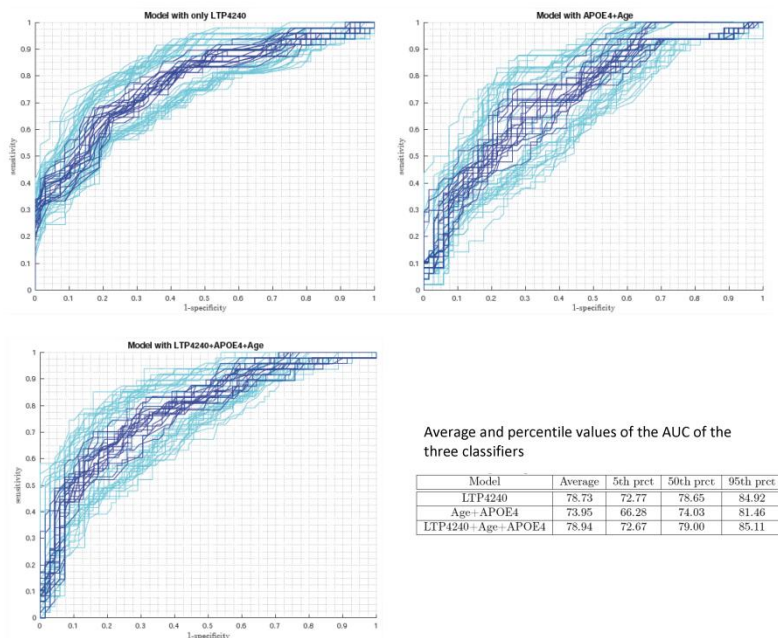
At each cross-validation round, the threshold value of the classifier was chosen in order to achieve a given value of sensitivity. The difference in the PPV using those threshold values are shown in **Supplementary Fig. 2**. The improvement in PPV was found to be statistically significant, showing an average effect-size of 13.3%, and a 95% confidence interval in the improvement of (1.02-27.43%). A positive PPV difference was observed in 9,798 rounds out of 10,000 rounds performed in the cross-validation experiment, providing a probability of 97.98%.



Supplementary Fig. 2. Comparison of the performance difference of PPV between the classifiers with/without the plasma marker $\log(TP42/40)$ as a function of the threshold value. The thick red line represents the median value of the performance increment, and the thin red lines the 2.5th and the 97.5th percentile values of the distribution.

IV. ROC CURVES COMPARISON

Illustrative ROC curves in the cross-validation experiment are shown in **Supplementary Fig. 3**. The average and percentile values of the AUC from the three classifiers are given in the table below.



Supplementary Fig. 3. Distribution of ROC curves obtained in the cross-validation experiment for the three classifiers: (top-left) with only log(TP42/40) marker; (top-right) with demographic variables Age+APOE4; (bottom-left) with plasma + demographic variables. Representative ROC curves show the performance variability across cross-validation (CV) rounds. The variability is caused by the limited size of the datasets used for training and testing. A different ROC curve is obtained for each CV round. Curves whose AUC are between percentiles 49.9% and 50.1% are shown in blue color, while cyan is used for ROC curves in the percentile intervals (2.4%–2.6%) and (97.4%–97.6%).

Supplementary Table 1. Coefficient estimates, 95% confidence interval and significance of the linear regression models for each visit in the cross-sectional study.

	Visit m18			Visit m36			Visit m54		
	Estimate	CI 95%	P value	Estimate	CI 95%	P value	Estimate	CI 95%	P value
Intercept	-0.7	-2, 0.62	0.29	-0.18	-1.4, 1	0.77	-0.7	-1.9, 0.53	0.26
log(TP42/40)	-0.4	-0.76, -0.027	0.036	-0.1	-0.43, 0.22	0.52	-0.59	-0.94, -0.24	0.0013
Age	0.013	4.6e-05, 0.027	0.049	0.016	0.0014, 0.031	0.033	0.0076	-0.0055, 0.021	0.235
APOE4 carrier	0.31	0.11, 0.52	0.0033	0.36	0.14, 0.59	0.00224	0.28	0.086, 0.47	0.005
Gender Male	0.15	-0.039, 0.35	0.12	0.18	-0.027, 0.39	0.086	0.03	-0.15, 0.21	0.75

	Visit m18			Visit m36			Visit m54		
	Estimate	CI 95%	P value	Estimate	CI 95%	P value	Estimate	CI 95%	P value
Intercept	0.038	-1.2, 1.3	0.95	-0.45	-1.6, 0.66	0.42	0.11	-0.97, 1.2	0.84
log(BP42/40)	-0.086	-0.32, 0.14	0.46	-0.29	-0.51, -0.066	0.012	-0.3	-0.54, -0.065	0.013
Age	0.014	-0.001, 0.029	0.067	0.014	-0.00014, 0.028	0.052	0.0067	-0.0072, 0.021	0.34
APOE4 carrier	0.34	0.11, 0.56	0.0042	0.37	0.16, 0.58	0.00095	0.27	0.074, 0.47	0.0078
Gender Male	0.15	-0.055, 0.36	0.15	0.12	-0.088, 0.32	0.26	0.043	-0.15, 0.23	0.65

	Visit m18			Visit m36			Visit m54		
	Estimate	CI 95%	P value	Estimate	CI 95%	P value	Estimate	CI 95%	P value
Intercept	-0.65	-1.9, 0.65	0.32	-0.26	-1.7, 1.1	0.71	-0.51	-1.9, 0.91	0.48
log(FP42/40)	-0.35	-0.63, -0.067	0.016	-0.055	-0.36, 0.25	0.72	-0.32	-0.64, 0.0027	0.052
Age	0.014	-0.00041, 0.028	0.057	0.018	0.0039, 0.033	0.014	0.013	-5.8e-05, 0.027	0.047
APOE4 carrier	0.33	0.11, 0.54	0.0033	0.42	0.2, 0.63	0.00029	0.31	0.12, 0.51	0.0021
Gender Male	0.13	-0.071, 0.33	0.2	0.19	-0.014, 0.39	0.067	0.077	-0.11, 0.27	0.42

Regression models of the cross-sectional association of plasma A β ratios as log-transformed continuous variables and the SUVR/BeCKeT, adjusted for age, APOE genotype and gender. The estimate column refers to the corresponding coefficient of the particular plasma variable or the selected covariates in the model. CI 95%: 95% confidence interval.

Supplementary Table 2. Coefficients, 95% confidence interval and significance of the linear mixed-effects models in the longitudinal study.

	CI 95%			
	Estimate	Lower	Upper	P value
Intercept	-0.79	-1.8	0.17	0.1
Time	-0.098	-0.17	-0.028	0.0063
log(TP42/40)	-0.34	-0.62	-0.064	0.016
Age	0.016	0.0062	0.027	0.0017
APOE4 carrier	0.32	0.17	0.48	4.4e-05
Gender Male	0.076	-0.068	0.22	0.3
log(TP42/40):Time	-0.034	-0.054	-0.015	0.0006
Age:Time	0.00016	-0.00051	0.00083	0.64
APOE4 carrier:Time	0.018	0.0069	0.029	0.0016
Gender Male:Time	0.0012	-0.0095	0.012	0.82

	CI 95%			
	Estimate	Lower	Upper	P value
Intercept	-0.39	-1.3	0.53	0.4
Time	-0.045	-0.11	0.022	0.19
log(BP42/40)	-0.13	-0.31	0.047	0.15
Age	0.018	0.0073	0.029	0.0012
APOE4 carrier	0.34	0.18	0.51	4.6e-05
Gender Male	0.07	-0.083	0.22	0.37
log(BP42/40):Time	-0.014	-0.028	-0.00094	0.036
Age:Time	8.9e-05	-0.00066	0.00083	0.81
APOE4 carrier:Time	0.019	0.007	0.031	0.0021
Gender Male:Time	0.002	-0.0092	0.013	0.73

	CI 95%			
	Estimate	Lower	Upper	P value
Intercept	-0.47	-1.4	0.47	0.32
Time	-0.084	-0.16	-0.0091	0.028
log(FP42/40)	-0.22	-0.43	0.0045	0.055
Age	0.016	0.0051	0.027	0.0042
APOE4 carrier	0.33	0.17	0.5	5.9e-05
Gender Male	0.054	-0.097	0.21	0.48
log(FP42/40):Time	-0.026	-0.042	-0.0098	0.0017
Age:Time	0.00023	-0.00052	0.00097	0.55
APOE4 carrier:Time	0.018	0.0061	0.03	0.0033
Gender Male:Time	0.0012	-0.01	0.012	0.84

Estimate: coefficient of the adjusted LMM including baseline levels of TP42/40, BP42/40 or FP42/40 as explanatory variables in each case and the SUVR/BeCKeT as a continuous response variable during follow-up. In bold, the magnitude of the effect (estimate) of the different A β plasma ratios on the intercept (without interaction with time) and on the slope (ratio:Time) of the SUVR/BeCKeT

score trajectory . CI 95%: lower and upper limits of the 95% confidence interval. The demographic covariates are APOE genotype, age and gender. As could be expected, the age and the APOE genotype had significant effects (estimate) on the baseline levels of SUVR/BeCKeT. Furthermore, the presence of one ApoE ϵ 4 allele also had a significant effect on the trajectory of SUVR/BeCKeT (slope) over time (APOE4 carrier:Time).

Reference List

- [1] Rowe CC, Ellis KA, Rimajova M, Bourgeat P, Pike KE, Jones G, Fripp J, Tochon-Danguy H, Morandau L, O'Keefe G, Price R, Raniga P, Robins P, Acosta O, Lenzo N, Szoek C, Salvado O, Head R, Martins R, Masters CL, Ames D, Villemagne VL. Amyloid imaging results from the Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle (AIBL) study of aging. *Neurobiol Aging* 2010; 31: 1275-1283.
- [2] Vandenberghe R, van LK, Ivanoiu A, Salmon E, Bastin C, Triau E, Hasselbalch S, Law I, Andersen A, Korner A, Minthon L, Garraux G, Nelissen N, Bormans G, Buckley C, Owenius R, Thurfjell L, Farrar G, Brooks DJ. 18F-flutemetamol amyloid imaging in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: a phase 2 trial. *Ann Neurol* 2010; 68: 319-329.
- [3] Thurfjell L, Lundqvist R, Buckley C, Smith A, Sherwin P. Automated quantification of [18F] flutemetamol data-Comparison with standard of truth based on histopathology. *J Nucl Med* 2013; 54: 302.
- [4] Villemagne VL, Doré V, Yates P, Brown B, Mulligan R, Bourgeat P, Veljanoski R, Rainey-Smith SR, Ong K, Rembach A, Williams R, Burnham SC, Laws SM, Salvado O, Taddei K, Macaulay L, Martins RN, Ames D, Masters CL, Rowe CC. En Attendant Centiloid. *Advances in Research* 2014; 2: 723-729.

BACKGROUND

Pre-assay handling of peripheral blood samples for identification of A β peptides is critical when a diagnostic use is intended. It has been described physical and biochemical cues affecting A β quantification in blood-derived samples, suggesting that differences in sample processing may result in variations in the quantification. Stringent standardization, but on tested practical grounds, is advisable.

PURPOSE

In this study, we tested the effect of two factors in the levels of A β 40 and A β 42 in undiluted plasma (UP) and diluted plasma (DP).

- addition of protease inhibitors (PI)
- processing delay time (PDT)

METHODS

Peripheral blood from seven healthy donors was collected in polypropylene vials with EDTA, divided into aliquots with or without protease inhibitors and maintained at either 4°C or room temperature (RT) during a PDT of 0 (control sample, CS), 8 or 30 hours. Then, plasma samples were centrifuged and stored at -80°C until use. The levels of A β were determined by ELISA (A β 40 and A β 42; Araclon Biotech, Zaragoza, Spain).

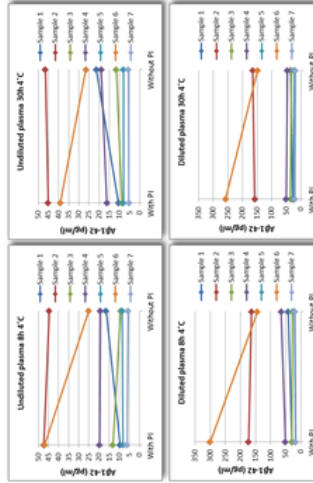


CONCLUSIONS

Our results indicate that a PDT of up to 30 hours could be allowed without introducing substantial variability in the determination of A β , provided the blood samples are stored at 4°C immediately after collection. The addition of protease inhibitors does not seem to confer further benefit.

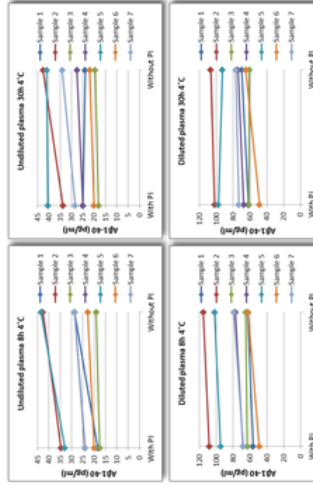
RESULTS I: EFFECT OF THE ADDITION OF PROTEASE INHIBITORS (PI) INTO THE BLOOD SAMPLE

➢ A β 42 in undiluted plasma (UP) and diluted plasma (DP)



No significant differences (except for sample 6) were found in the levels of A β 42 in UP and DP samples with or without protease inhibitors after either 8h or 30h of PDT at 4°C.

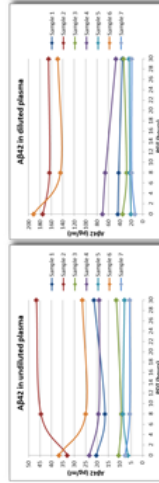
➢ A β 40 in undiluted plasma (UP) and diluted plasma (DP)



The levels of A β 40 in both the UP and DP fractions were lower when the blood samples were collected with protease inhibitors (PI) comparing to the levels found when the blood samples were collected without PI.

RESULTS II: EFFECT OF THE PROCESSING DELAY TIME (PDT) AND TEMPERATURE

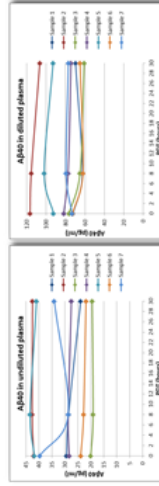
➢ A β 42 in undiluted plasma (UP) and diluted plasma (DP)



No significant differences were found in the levels of A β 42 between the control sample (CS), processing delay time: 0 (hours) and the samples maintained at 4°C for 8 or 30 hours of PDT.

Note: in the left panel, 2 out of the 7 subjects showed substantial change of A β 42 levels after 8 hours of PDT at 4°C, each in an opposite direction.

➢ A β 40 in undiluted plasma (UP) and diluted plasma (DP)



A β 40 levels were similar in the CS and in samples processed after 8h and 30h at 4°C.

A β 40 levels showed a trend to decrease (~10%) after 8 hours of PDT at RT (data not shown).

BACKGROUND

Platelets have been pointed as major contributors to the Aβ levels in blood. Centrifugal force and spin time are two pre-analytical factors which could determine the final composition of the sample fractions. A variety of protocols are in use in different labs (see table below), but no data are available on the influence of centrifuge conditions on blood based biomarkers, particularly Aβ.

Protocol	Centrifugation force	Spin time	Centrifugation force and spin time used for plasma and cell fraction separation
AMC2	1300g	15min	1300g 30min RT
AMC1	3000g	15min	2000g 15min RT
AMC	3000g	15min	2000g 15min RT
AMC5	3000g	10min	2000g 15min RT
AMC3	3000g	10min	2000g 15min RT

From: Sit O'Byrne, *Alz Disord* 2008;11:100-106. doi:10.1007/s12338-007-0011-3

PURPOSE

In this study, we have evaluated the influence of centrifugal force and spin time on plasma platelet concentration and Aβ40 and Aβ42 levels.

METHODS

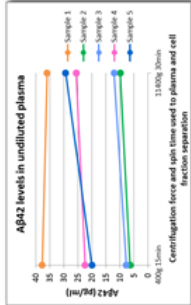
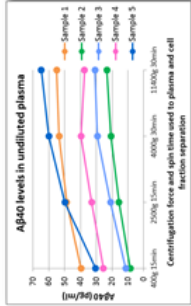
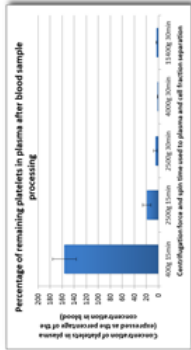
Peripheral blood from five healthy donors was obtained by venipuncture and collected in polypropylene vials with EDTA. Each sample was divided in different tubes and centrifuged at 4°C under various conditions. After centrifugation, plasma fractions were collected and platelet concentration was measured by using an hematology analyzer. Levels of Aβ40 and Aβ42 were quantified by ELISA (Aβtest40 and Aβtest42, Araclon Biotech, Zaragoza, Spain) in undiluted plasma (UP). Selected aliquots were filtered (0.22µm) to obtain platelet-free plasma samples as a control.

CONCLUSIONS

Centrifugation conditions affect Aβ quantification by ELISA in plasma. As expected, platelet concentration in plasma is also dependent on centrifugation force and spin time. However, the presence of platelets in plasma samples does not appear to generate steric interferences in the ELISA.

RESULTS

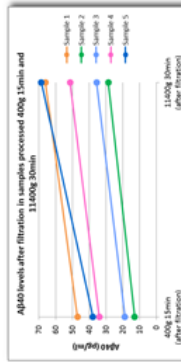
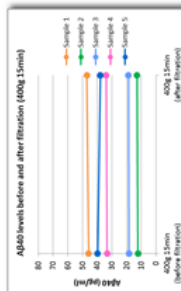
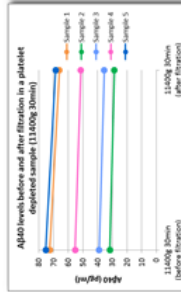
- ❖ Platelet concentration in plasma after blood processing.
- ❖ Levels of Aβ40 and Aβ42 in plasma after different centrifugation settings of the blood sample.



The number of platelets in plasma decreased proportionally as centrifugation force and spin time increase. Complete elimination of platelets from plasma required at least 4000g for 30min.

The levels of Aβ40 (left panel) and Aβ42 (right panel) were higher in samples centrifuged with progressively more energetic protocols. Plasma samples were frozen after blood processing and thawed for ELISA. This freezing-thawing cycle could produce release of cytoplasmic components affecting Aβ measurements.

- ❖ Quantification of Aβ40 in ELISA after the complete removal of platelet by plasma sample filtration.



As a control of the procedure, we checked that the filtration of platelet-free plasma (left panel) did not affect the Aβ levels. The filtration of plasma samples with high platelet concentration (400g 15min) did not affect Aβ levels either (right panel). This suggests that the presence of platelets in plasma samples does not generate steric interferences in the ELISA.

However, Aβ levels measured in platelet-free plasma (11400g 30min) were higher than those measured in samples containing a high concentration of platelets after mild centrifugation (400g 15min), in spite that they were later on removed by filtration.

Total Aβ42 / Aβ40 Ratio in Plasma (TP42/40) Is an Early Biomarker of Alzheimer's Disease Progression

Pedro Pesini¹, Virginia Pérez-Grijalba¹, Noelia Fandos¹, Salvador Olmos², Matias Bossa², Colin L Masters³, Victor L Villemagne³, James D Doecke³, Christopher Fowler³, Alan Rembach³, Manuel Sarasa¹ and the AIBL Research Group³
(1) Araclon Biotech, Zaragoza, Spain; (2) University of Zaragoza; (3) <http://www.aibl.csiro.au/>



BACKGROUND

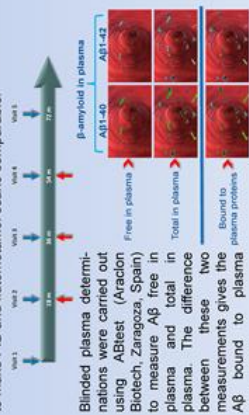
Beta-amyloid (Aβ) peptides, particularly Aβ40 and Aβ42, are directly involved in the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD). The alteration of their levels in the brain, measured either by amyloid PET (A-PET) scans or CSF analysis, is considered one of the earliest observable changes related to AD. However, both PET and lumbar puncture for CSF studies present problems that limit their widespread acceptability in global clinical trials. Thus, development of other measures as potential surrogates of brain amyloid positivity should be pursued, particularly for the earlier stages of AD.

PURPOSE

The aim of this work is to study the cross-sectional and longitudinal association of plasma Aβ markers with A-PET positivity.

METHODS

This longitudinal study included 162 healthy controls (HC) at baseline from AIBL dataset. Assayed plasma samples corresponded to 3 visits: at months 18, 36 and 54. A-PET scans were performed every 18 months on 128 subjects out of these HC individuals at several visits (median 4, min=1, max=5 visits). PET measurements were coded using a Beckett score to make PIB and flutemetamol scans comparable.

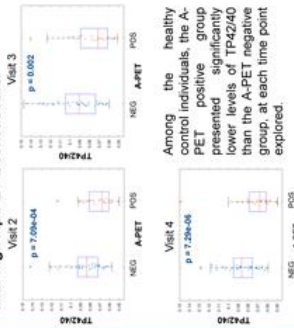


Blinded plasma determinations were carried out using Aβtest (Araclon Biotech, Zaragoza, Spain) to measure Aβ free in plasma and total in plasma. The difference between these two measurements gives the Aβ bound to plasma components.

For the cross-sectional study, Kruskal-Wallis analysis was used to assess associations between the total Aβ42/Aβ40 ratio in plasma (TP42/40) and A-PET measurements. Linear-mixed effect models were used for the longitudinal study.

CROSS-SECTIONAL STUDY

➤ Low TP42/40 in plasma is associated with high Aβ PET Beckett score.



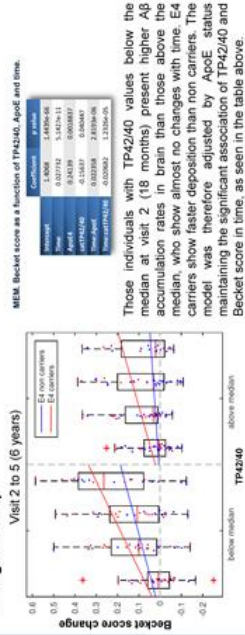
➤ TP42/40 in plasma correlates with Aβ PET Beckett score in all visits.

Beckett Score	Visit	r	p
TP42/40	Visit 2	-0.29	0.004
TP42/40	Visit 3	-0.38	0.0009
TP42/40	Visit 4	-0.31	0.0032

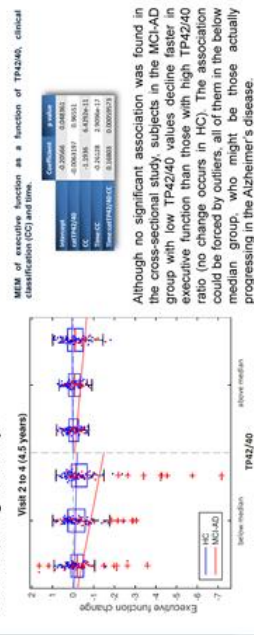
Spearman's rho Correlation (whole population sample). There is an inverse association of TP42/40/Aβ40 ratio and amyloid deposition in brain. The bound to plasma proteins ratio (BP42/40) is also inversely associated with A-PET.

LONGITUDINAL STUDY

➤ Low TP42/40 at baseline is associated with faster cortical deposition of Aβ during follow-up.



➤ Lower TP42/40 at baseline is associated with faster cognitive executive function decline during follow-up.



CONCLUSIONS

Low values of plasma TP42/40 in healthy individuals are associated with high A-PET score as well as with faster progression of brain amyloidosis during follow-up. Furthermore, a low TP42/40 ratio is associated with faster executive function decline in Alzheimer's disease patients. Thus, plasma TP42/40 has potential for being considered as a cost-effective and non-invasive biomarker for AD as well as a useful tool for recruitment in early stage clinical trials.