

vt

informe de vigilancia tecnológica

mi+d

vt
18

últimos avances en el diagnóstico molecular y por imagen de la enfermedad de alzheimer

Cecilia González de Orduña

Esther García

Cristina Rodríguez Rivero

Javier Benito

www.madrimasd.org

cibt
mi+d

ceim
CONFEDERACIÓN
EMPRESARIAL
DE MADRID
CEDE

EM
La Suma de Todos

Comunidad de Madrid

www.madrid.org

vt

informe de **v**igilancia **t**ecnológica

mi+d

18

últimos avances en el diagnóstico molecular y por imagen de la enfermedad de alzheimer

Cecilia González de Orduña

Esther García

Cristina Rodríguez Rivero

Javier Benito

www.madrimasd.org

cibt
mi+d

ceim 
CONFEDERACIÓN
EMPRESARIAL
DE MADRID
CEDE

EM
La Suma de Todos
 **Comunidad de Madrid**
www.madrid.org

Colección de Informes de Vigilancia Tecnológica madri+d

Dirigida por:

José de la Sota Rius

Coordinada por:

Fundación madri+d para el Conocimiento
CEIM Confederación Empresarial de Madrid - CEOE

cibt
mied



Informe realizado para:



El Círculo de Innovación en Biotecnología (CIBT) se enmarca dentro del IV Plan Regional de Investigación Científica e Innovación Tecnológica (IV PRICIT). El CIBT es una iniciativa de la Dirección General de Universidades e Investigación de la Comunidad de Madrid en la que participan el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y Parque Científico de Madrid (PCM).

Los autores agradecen los consejos y correcciones del informe original a:

- Dr. D. Fernando Valdivieso (Universidad Autónoma de Madrid)

Agradecimientos especiales a los técnicos del CIBT que han participado y revisado el informe:

- Jose Luis Fernández
- José Manuel González

Título: Informe de Vigilancia Tecnológica madri+d
"últimos avances en el diagnóstico molecular y por imagen de la enfermedad de alzheimer"

Autores: Cecilia González de Orduña, Esther García, Cristina Rodríguez Rivero y Javier Benito

© De los textos: Los autores

© De la colección «vt» y de la presente edición:
CEIM Confederación Empresarial de Madrid - CEOE
Dirección General de Universidades e Investigación
Fundación madri+d para el Conocimiento

Edita: Fundación madri+d para el Conocimiento
Velázquez, 76. E-28001 Madrid

Proyecto Gráfico: base12 diseño y comunicación s.l.

Ilustraciones: Los autores

ISBN: 978-84-612-9486-2

- 5 **CAPÍTULO 1**
Antecedentes
- 7 **CAPÍTULO 2**
Introducción
- 15 **CAPÍTULO 3**
Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer
3.1 Diagnóstico *in vitro* (PÁG. 18)
3.2 Diagnóstico por imagen (PÁG. 36)
- 51 **CAPÍTULO 4**
Entorno científico y empresarial
- 53 **CAPÍTULO 5**
Legislación
- 57 **CAPÍTULO 6**
Principales retos y tendencias
- 61 **CAPÍTULO 7**
Conclusiones
- 65 **CAPÍTULO 8**
Referencias
- 71 **CAPÍTULO 9**
Abreviaturas

CAPÍTULO 1

Antecedentes

La **Asociación Nacional del Alzheimer, Afal Contigo (AFALcontigo)** está interesada en conocer los últimos avances y las líneas de investigación más recientes en el ámbito del diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. En concreto, esta Asociación desea saber cuáles son las técnicas de diagnóstico molecular y diagnóstico por imagen para la enfermedad de Alzheimer.

La Asociación contacta con el **Círculo de Innovación en Biotecnología (CIBT)** del Sistema Madri+d y plantea este tema de interés como una posible línea de trabajo conjunta. Como resultado se acuerda la firma de un convenio-marco de colaboración entre ambas entidades en el que se establece la elaboración de un informe de vigilancia tecnológica por parte del CIBT sobre el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

El objetivo del informe es dar una visión global de la situación actual que existe en el campo del diagnóstico molecular *in vitro* y del diagnóstico por imagen de la enfermedad de Alzheimer.

CAPÍTULO 2

Introducción

La **enfermedad de Alzheimer** es un trastorno cerebral degenerativo asociado al envejecimiento, que está producido por la pérdida gradual de neuronas que termina afectando a las áreas del cerebro que controlan el pensamiento, la memoria y el lenguaje.

Aunque cada vez es mayor el conocimiento sobre esta enfermedad, todavía se desconoce la causa exacta de la misma, si bien se sabe que existen algunos factores de riesgo, entre los que se podrían destacar los factores genéticos, ambientales y sociales que parecen influir en el desarrollo de esta demencia.

En 1906 el Dr. Alois Alzheimer, médico alemán que dio su nombre a la enfermedad, describió por primera vez la enfermedad como cambios inusuales en el tejido cerebral. Hoy en día se conocen esos cambios como **placas seniles o neuríticas**, formadas por depósitos insolubles de la proteína β -**amiloide** alrededor de las neuronas y **ovillos neurofibrilares**, formados por depósitos dentro de las propias neuronas cuyo principal componente es la **proteína tau**. Además se han descubierto otras alteraciones asociadas a la enfermedad, como pérdida de neuronas, alteraciones cerebro vasculares y cambios en las concentraciones de neurotransmisores.

El proceso degenerativo comienza probablemente 20-30 años antes de que la enfermedad se manifieste clínicamente. Durante este periodo preclínico, el número de placas y ovillos neurofibrilares va aumentando hasta que sobrepasa un determinado umbral que provoca la aparición de los primeros síntomas. Después, durante el transcurso de la enfermedad se produce la alteración de procesos críticos como la comunicación entre neuronas, el metabolismo celular y la capacidad de reparación del tejido nervioso [2].

Sintomatología

La característica principal de esta enfermedad es la pérdida de memoria que afecta a la comunicación, al aprendizaje, al pensamiento y al razonamiento. Aunque los síntomas de la enfermedad de Alzheimer pueden ser variables, se podrían agrupar en tres esferas, la cognitiva, la conductual y la funcional que sufren un progresivo empeoramiento.

Los primeros síntomas de la enfermedad comienzan normalmente con la aparición de pequeños olvidos frecuentes, que se engloban dentro de los síntomas del deterioro cognitivo leve. En esta fase de la enfermedad se produce la destrucción de neuronas de una determinada parte del cerebro, denominada hipocampo, que se encarga de controlar la memoria. Con la pérdida de las neuronas del hipocampo la memoria a corto plazo empieza a fallar y se deteriora la capacidad de la persona para realizar tareas sencillas.

A continuación el deterioro afecta a la corteza cerebral y como consecuencia se reducen las capacidades lingüísticas y de razonamiento de la persona. Los pacientes, además pueden sufrir cambios de personalidad, arrebatos emocionales y conductas perturbadoras, que se hacen cada vez más frecuentes a medida que avanza la enfermedad.

Finalmente se afectan otras áreas del cerebro, que se atrofian y conducen al paciente a un estado vegetativo hasta el fallecimiento.

Prevalencia e incidencia

Esta enfermedad es el tipo más frecuente de demencia, afectando a más de 20 millones de personas en el mundo. Se calcula que a partir de los 65 años su frecuencia se duplica cada 5 años, hasta afectar al 30% de los mayores de 85 años.

Además, según indican los estudios poblacionales esta cifra crecerá enormemente en los próximos años. Esto se debe a que el aumento en la esperanza de vida en los países desarrollados provocará un incremento importante de la población mayor de 65 años y, por tanto, aumentará el número de enfermedades ligadas a la edad, entre las que se encuentra la enfermedad de Alzheimer.

Este hecho supondrá un aumento en las necesidades sanitarias, sociales y económicas en la sociedad, por lo que los métodos diagnósticos y los tratamientos ayudarán a reducir dichos costes y a mejorar la calidad de vida de los enfermos.

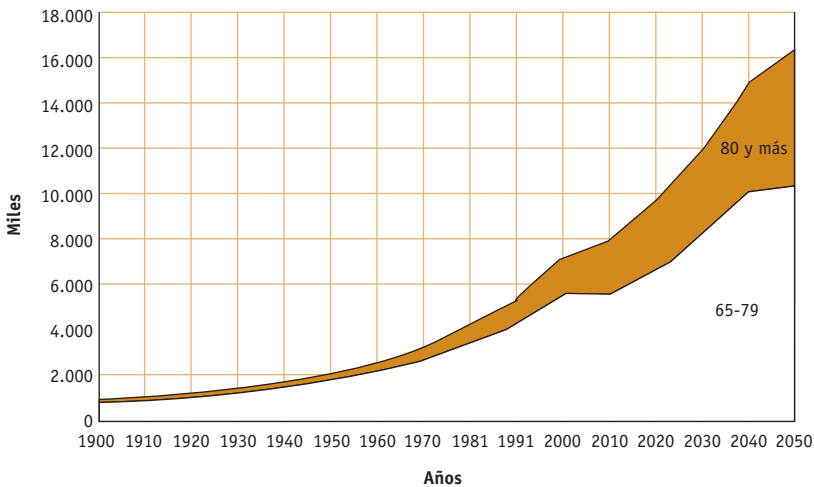


FIGURA 1 Evolución de la población mayor desde 1900 hasta el 2050. De 1900 a 2003 los datos son reales, pero de 2010 a 2050 se trata de proyecciones [3].

TABLA 1 *Prevalencia de la enfermedad de Alzheimer. ^a por 100.000 habitantes, ^b Datos de Mölsa, ^c Estudio prospectivo de Baltimore.*

<i>Prevalencia de la enfermedad de Alzheimer</i>	
<i>Intervalos de edad</i>	<i>Prevalencia</i>
45-54	25 ^b
55-65	72 ^b
66-69	590 ^c
70-74	1.780 ^c
75-79	4.110 ^c
80-84	8.620 ^c
85-90	17.030 ^c
90-94	31.630 ^c
95 +	53.610 ^c

Diagnóstico

Hasta el momento, el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer era fundamentalmente clínico, basándose en la existencia de los déficits cognitivos que ocurren durante el desarrollo de la enfermedad como los trastornos del lenguaje (afasia), la disminución o incapacidad en la realización de actividades motrices (apraxia), el reconocimiento o identificación de objetos aunque no presente ningún trastorno de la visión (agnosia) y disminución de la memoria.

Para realizar este diagnóstico se elabora la historia clínica, una exploración neurológica y se evalúa la memoria y otras funciones mentales siguiendo los criterios de diagnóstico NINCDS-ADRDA, que proporcionan una sensibilidad cercana al 100% y una especificidad alrededor del 70%. Además, se realizan otras pruebas complementarias, que permiten descartar otras causas de demencia y con el conjunto de todas las pruebas se emite el **diagnóstico probable** de la enfermedad de Alzheimer.

Las pruebas diagnósticas se clasifican en función del grado de recomendación, que se muestran en la siguiente tabla. Estos grados se basan en la evidencia científica, estratificando la fuerza de cada recomendación según los niveles de evidencia.

TABLA 2 *Grados de recomendación para pruebas diagnósticas de la enfermedad de Alzheimer.*

<i>Grados de recomendación</i>	
<i>Grado</i>	<i>Descripción</i>
A	Existen pruebas sólidas para hacer esta recomendación. Estudios o alguna revisión sistemática de buena calidad con resultados homogéneos y claros.
B	Existen pruebas suficientes para hacer la recomendación con claridad. Hay al menos un estudio de muy buena calidad o múltiples estudios con diseño aceptable que la sustentan.
C	Existen pruebas limitadas. Al menos algún estudio aceptable.
D	No hay pruebas basadas en estudios clínicos. La recomendación se sustenta únicamente en la opinión de expertos.

A pesar de todo, la valoración clínica es difícil de realizar en los estadios tempranos de la enfermedad, donde se puede confundir con otras demencias, por lo que el proceso diagnóstico se alarga hasta comprobar la progresión de la enfermedad, llegando a durar años.

Una detección más temprana de la enfermedad aumentaría en gran medida las posibilidades de tratamiento de los enfermos de Alzheimer, al poder comenzar una terapia en una fase inicial de evolución de la enfermedad. Por este motivo cada vez es más frecuente completar el diagnóstico clínico con pruebas de imagen y técnicas de diagnóstico *in vitro*, aunque hasta la fecha no existe ninguna prueba que por sí misma pueda establecer el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

La investigación sobre métodos de **diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer** ha producido resultados recientes que permiten pensar que en el futuro se podrá contar con métodos diagnósticos moleculares para la detección precoz de esta enfermedad. Actualmente se aborda el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico en dos frentes, técnicas de diagnóstico *in vitro* y diagnóstico por imagen.

Diagnóstico en situaciones preclínicas: Deterioro Cognitivo Leve

El diagnóstico temprano del Alzheimer resulta crucial para frenar el avance de la enfermedad sin embargo, los métodos de diagnóstico hasta ahora utilizados, básicamente clínicos, no permiten dar un resultado inequívoco hasta que la patología está ciertamente avanzada. Es por esto que, en la actualidad, las investigaciones se centran en buscar posibles alteraciones moleculares, estructurales y conductuales durante la fase preclínica de la enfermedad que reflejen la posibilidad de padecer Alzheimer aún cuando no existan síntomas evidentes.

El Deterioro Cognitivo Leve (en inglés *Mild Cognitive Impairment MCI*) es considerado un estado intermedio entre el envejecimiento normal y la demencia. Está caracterizado

por leves alteraciones de la memoria y mínimas pérdidas de la capacidad de realizar actividades. Actualmente, el MCI es considerado como un posible indicador temprano de la enfermedad de Alzheimer [3].

Aunque no todos los afectados por MCI desarrollan demencia, los estudios demuestran que ciertas alteraciones en la zona hipocampal o frontal de los cerebros de pacientes de MCI correlacionan con el posterior desarrollo de la enfermedad de Alzheimer [4, 5].

En este sentido, la iniciativa *Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative* o ADNI realiza estudios de neuroimagen con el fin de establecer el grado de correlación entre el MCI y el desarrollo del Alzheimer. Este proyecto será tratado con más extensión en el apartado 3.2.8.

La posibilidad de contar con un sistema de diagnóstico efectivo en etapas preclínicas, ha fomentado la realización investigaciones con el fin de determinar los posibles marcadores bioquímicos del MCI.

Diversos estudios longitudinales han comprobado que casi todos los sujetos con Deterioro Cognitivo Leve que evolucionan hacia una enfermedad de Alzheimer tienen niveles altos de τ en el LCR, mientras que en el Deterioro Cognitivo Leve no progresivo esos niveles de τ se mantienen bajos [6, 7].

Esto indica que la determinación de τ en el LCR podría ser usado de manera eficaz en la identificación de sujetos con enfermedad de Alzheimer incipiente entre pacientes clínicamente diagnosticados de Deterioro Cognitivo Leve.

Por otro lado se ha determinado que ciertos marcadores plasmáticos, detectados en enfermos de Deterioro Cognitivo Leve, permiten prever que pacientes desarrollarán demencia a largo plazo [8]. El descubrimiento de estos marcadores, que engloban moléculas implicadas en procesos como la respuesta inmune, la hematopoyesis y la apoptosis, permitirá en un futuro realizar diagnósticos precoces de la enfermedad de Alzheimer.

TABLA 3 *Marcadores predictivos de Alzheimer en el Deterioro Cognitivo Leve.*

<i>Marcadores biológicos</i>			
<i>Líquido Cefalorraquídeo (LCR)</i>	<i>Sangre</i>		
Péptido A β	CCL-18	TRAIL-R4	EGF
t-tau	ANG-2	CCL15	CCL5
p-tau	IGFBP-6	CCL7	GDNF
Mioinositol	CXCL8	IL-3	G-CSF
	ICAM-1	IL-1 α	M-CSF
	IL-11	PDGF-BB	TNF α

Tratamiento

Hoy por hoy no existe ningún tratamiento capaz de curar la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, se han desarrollado medicamentos que, en algunas personas en fases tempranas de la enfermedad, son capaces de prevenir el empeoramiento de algunos síntomas durante un tiempo.

El tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer aborda diferentes aspectos, por un lado se han desarrollado fármacos para tratar la disminución de acetilcolina que se produce en la enfermedad, **tratamiento colinérgico**. También se emplean fármacos que ayudan a retrasar la progresión de la enfermedad y que tratan los trastornos conductuales y afectivos.

Los fármacos más empleados en las primeras etapas de la enfermedad son los inhibidores de la acetilcolinesterasa, la enzima que degrada la acetilcolina. Debido a la pérdida de neuronas productoras de esta sustancia en la enfermedad de Alzheimer, los niveles en el cerebro se encuentran disminuidos, por lo que estos fármacos contribuyen a aumentar los niveles. Cuando la enfermedad se encuentra en una etapa más avanzada para frenar su progresión se emplea la memantina, sustancia antagonista del glutamato, que evita la muerte neuronal.

En la actualidad existen muchas líneas de investigación abiertas, orientadas a la búsqueda de tratamientos eficaces que ayuden a frenar el progreso de la enfermedad. En la tabla 3 se muestran algunos de los fármacos más empleados. Aunque cada vez son más los compuestos que empiezan las fases de ensayos clínicos, para poder aplicarlos es necesario disponer de un diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer de manera temprana.

TABLA 4 *Tratamientos para la enfermedad de Alzheimer.*

<i>Fármacos para el tratamiento del Alzheimer</i>		
<i>Nombre</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Acción</i>
Donepezilo		Anticolinesterásicos
Rivastigmina	 	Anticolinesterásicos
Galantamina		Anticolinesterásicos
Memantina		Antagoniza los receptores NMDA glutaminérgicos

CAPÍTULO 3

Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

- 3.1 Diagnóstico *in vitro* (PÁG. 18)
- 3.2 Diagnóstico por imagen (PÁG. 36)

En los últimos años se han realizado grandes avances en la comprensión de la patogenia de la enfermedad de Alzheimer. Se han identificado cambios moleculares y estructurales asociados a la enfermedad de Alzheimer.

Estos nuevos conocimientos permiten identificar los elementos clave que participan en el desarrollo de la enfermedad y que podrían ser utilizados como potenciales marcadores biológicos en su diagnóstico. Sin embargo, a día de hoy el único diagnóstico definitivo sigue siendo el análisis histológico *post mortem* del cerebro del paciente.

El diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer se basa en los **criterios clínicos de posible o probable** de la cuarta edición del Manual de Diagnóstico y Estadísticas de Trastornos Mentales de la Sociedad Americana de Psiquiatría (DSM-IV-TR) y del grupo de trabajo del Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos, Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados (NINCDS-ADRDA) [9].

El criterio aceptado para el proceso diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer consta de dos etapas. Una inicial en la que se identifica la existencia de síntomas de demencia y una posterior en la que se aplican criterios para identificar de qué tipo de demencia se trata. Estos criterios clínicos deben completarse con los resultados de pruebas de diagnóstico molecular *in vitro* y por imagen.

El principal reto de las técnicas de diagnóstico reside en poder distinguir los pacientes con enfermedad de Alzheimer en estadios tempranos, de los pacientes con otros tipos de demencia, ya que existen muchas otras enfermedades distintas capaces de producir los mismos síntomas de demencia. Además, el diagnóstico temprano puede suponer ventajas en la eficacia de los tratamientos, ya que se podrían aplicar cuando los daños son aún pequeños.

Para poder realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad es necesario disponer de métodos fiables. Gracias a los marcadores de la enfermedad, que se conocen hasta el momento, se pueden emplear diferentes técnicas para el diagnóstico molecular *in vitro* y por imagen. En la siguiente tabla se recogen las técnicas de diagnóstico que se describen en el presente informe por estar implicadas en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

TABLA 5 *Clasificación de las técnicas de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer.*

<i>Técnicas de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer</i>	
<i>Diagnóstico in vitro</i>	<i>Diagnóstico por imagen</i>
Ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA	Imagen estructural
ELISA tipo sandwich	Tomografía computarizada
ELISA competitivo	Resonancia magnética nuclear
Western Blot	Imagen funcional
Técnicas proteómicas	Espectroscopía por resonancia magnética
Espectrometría de masas	Resonancia magnética nuclear funcional
Microarrays de proteínas	Tomografía por emisión de positrones
Diagnóstico genético	Tomografía por emisión de fotón único
Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR	Magnetoencefalografía
Microarrays de ADN	

3.1 Diagnóstico molecular *in vitro*

3.1.1 Marcadores para el diagnóstico *in vitro*

El conocimiento de las bases moleculares implicadas en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, ha supuesto un avance en la búsqueda de marcadores biológicos, que pueden emplearse para un diagnóstico precoz de la enfermedad.

Para que un marcador pueda utilizarse como herramienta diagnóstica debe cumplir una serie de requisitos que se resumen en la siguiente tabla.

TABLA 6 *Características de un biomarcador deseables para la detección de la enfermedad de Alzheimer [1, 2].*

Requisitos para un marcador biológico

- Detectar la característica esencial de la patología.
- Ser validado en casos confirmados.
- Sensibilidad mayor del 85% para detectar la enfermedad.
- Especificidad mayor del 75-80% para detectar y diferenciar la enfermedad de Alzheimer de otras demencias.
- Preciso, fiable y barato.
- Reproducible.
- No invasivo.
- Fácil de realizar.

Las características neuropatológicas como la formación de ovillos neurofibrilares, placas neuríticas, angiopatía amiloide, pérdida sináptica y neuronal, son fenómenos que definen la enfermedad de Alzheimer y por tanto, representan la base para poder encontrar marcadores biológicos que permitan establecer un diagnóstico *in vitro* de la enfermedad.

Los **ovillos neurofibrilares**, que se muestran en la figura 2, son agregaciones intracelulares de la proteína denominada **tau**, que a día de hoy constituye uno de los principales marcadores biológicos [10]. Por otra parte, las **placas neuríticas o seniles** se forman por la acumulación extracelular de varias proteínas alrededor de un núcleo de péptido β -**amiloide**, que también se deposita en los vasos sanguíneos, formando la llamada angiopatía amiloide. Este péptido β -amiloide también es considerado un buen marcador de la enfermedad.

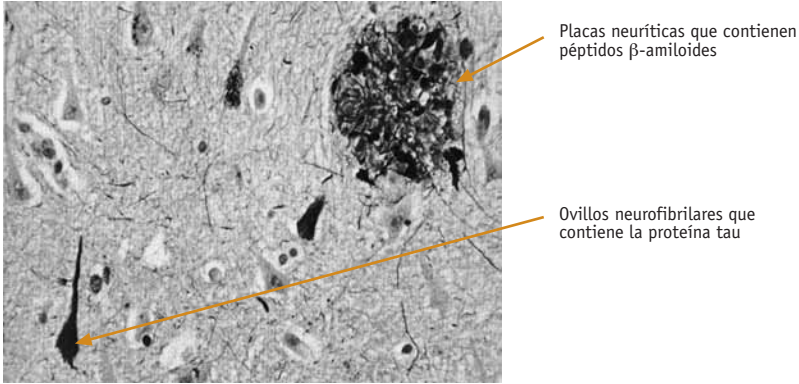


FIGURA 2 *Placas neuríticas y ovillos neurofibrilares en el cortex cerebral de un enfermo de Alzheimer.*

Aunque en menor medida que los anteriores, la determinación de la **apolipoproteína E** (ApoE) puede reforzar el diagnóstico molecular de la enfermedad y, por tanto, se considera un marcador biológico.

Además de estas proteínas, que claramente están implicadas en los procesos que conducen a la degeneración neuronal en la enfermedad de Alzheimer, existen otras posibles moléculas, que se está estudiando, para emplear como biomarcadores en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. En la tabla 7 se recogen algunas de las moléculas estudiadas hasta el momento.

TABLA 7 *Marcadores biológicos [2, 10].*

<i>Marcadores biológicos</i>	
<i>Líquido Cefalorraquídeo (LCR)</i>	<i>Sangre</i>
Péptido Aβ42	CFH
t-tau	α-2-macroglobulina
p-tau	P97 melanotransferrina
t-tau/Aβ42	Hemo-oxigenasa-1 (HO-1)
p-tau/ Aβ42	Supresor Hemo-oxigenasa-1 (HOS)
Apolipoproteína E (ApoE)	
F2-isoprostanos	
<i>Orina</i>	<i>Plaquetas</i>
Proteína de cadena neural (AD7C-NTP)	APP
	β-secretasa (BACE)
	α-secretasa (ADAM10)

Las proteínas β -amiloide y tau representan los principales marcadores biológicos aceptados para emplear en pruebas de diagnóstico *in vitro* por estar relacionadas directamente con los procesos patológicos que tienen lugar en la enfermedad de Alzheimer. A continuación se describe la implicación que tiene cada una de estas proteínas con la aparición de la enfermedad y las características que las convierten en buenos biomarcadores para el diagnóstico *in vitro*.

Péptido β -amiloide

El descubrimiento de que existía una correlación entre el número de placas neuríticas o seniles y la severidad de la demencia en la enfermedad de Alzheimer, hizo que se prestara más atención a las placas seniles como elementos clave para el desarrollo de la enfermedad, identificando el péptido β -**amiloide** como el principal componente. De hecho, la hipótesis más aceptada sobre la causa de la enfermedad de Alzheimer se conoce como la **cascada amiloide**, que señala que el desequilibrio entre la producción y reciclaje de estos péptidos en el cerebro es el primer fenómeno que tiene lugar en el inicio de la enfermedad[11].

El péptido β -amiloide se produce por el metabolismo normal de la células, a partir del procesamiento de una proteína de mayor tamaño, denominada proteína precursora del β -amiloide **APP** (*Amyloid Precursor Protein*). Mediante la acción de determinadas enzimas se producen diversas fragmentaciones que dan lugar a la aparición de péptidos β -amiloide de diferentes tamaños, siendo las formas β -amiloide_{40, 42} (A β 40 y A β 42) las más relacionadas con la patología de la enfermedad. En la figura 3 se muestra un esquema de la formación de placas seniles por la acumulación de péptidos β -amiloide.

En condiciones normales este péptido se degrada por otras enzimas o bien se elimina del cerebro a través de la barrera hematoencefálica. Sin embargo, cuando hay una sobreproducción del péptido o anomalías para depurarlo, se produce un fenómeno de agregación, debido a que los péptidos se vuelven insolubles y adquieren una conformación fibrilar, que es la que aparece en las placas seniles.

El depósito de los péptidos β -amiloide ocurre en diferentes etapas, a lo largo de las cuales las placas aparecen en diversas regiones del cerebro, tendiendo a concentrarse en los espacios interneuronales, en el parénquima cerebral y en las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales. De esta manera, comienzan a producirse alteraciones en las funciones de las neuronas que, a medida que avanza la formación de placas en las diferentes áreas del cerebro, terminan causando la degeneración neuronal. Esto queda reflejado en el característico deterioro de la memoria que acompaña a esta enfermedad.

La proteína β -amiloide, en su metabolismo normal, se secreta al espacio extracelular como una proteína soluble que pasa a formar parte de los componentes del líquido cefalorraquídeo (LCR). Gracias a que el LCR está en contacto directo con el espacio extracelular del cerebro, es una buena fuente para detectar biomarcadores que indiquen cambios bioquímicos en el cerebro. Mediante la medida de los niveles de péptido β -amiloide, especialmente de la forma β -amiloide_{40, 42'} se puede ayudar en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. La detección de una disminución en los niveles de péptido β -amiloide puede indicar que existe una alteración en el metabolismo de β -amiloide, que al no eliminarse correctamente se deposita formando las placas seniles.

Esta proteína también se secreta al torrente sanguíneo, lo que implica que se pueden medir sus niveles en plasma. Sin embargo, las pruebas realizadas hasta el momento no han logrado detectar cambios en los niveles de β -amiloide₄₂ en enfermos de Alzheimer, por lo que esta medida no refleja los cambios en el cerebro [12].

Características de los péptidos β -amiloide como marcadores biológicos

- Niveles disminuidos del péptido β -amiloide₄₂ en el LCR, indica deposición del péptido en las placas y degeneración axonal.
- 86% de sensibilidad para diferenciar entre enfermedad de Alzheimer y envejecimiento.
- 89% de especificidad para diferenciar entre enfermedad de Alzheimer y otras demencias.

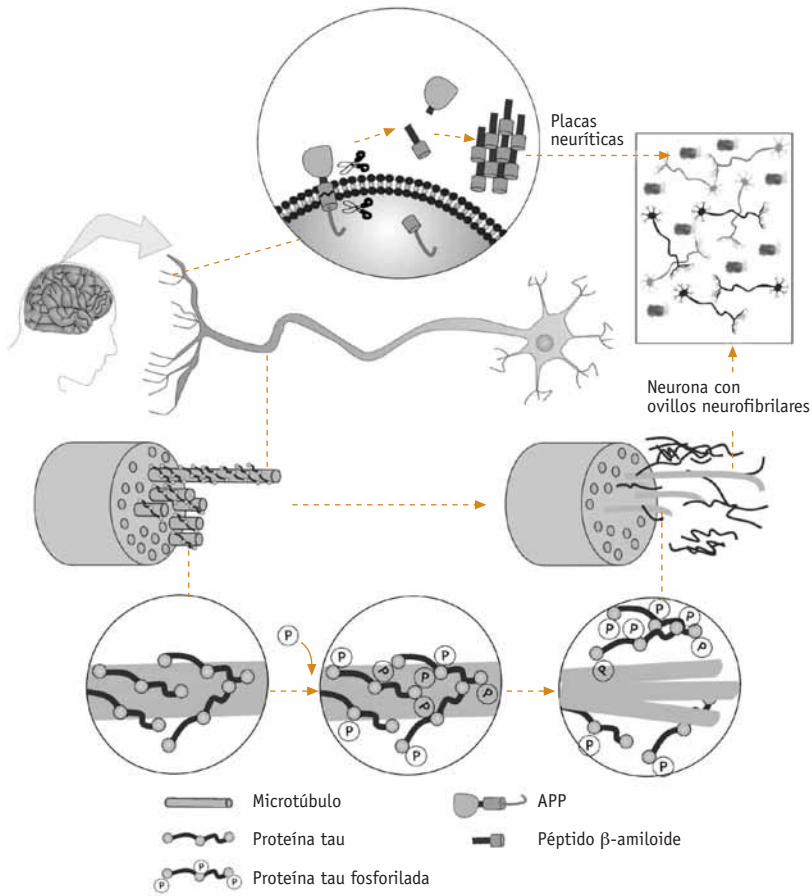


FIGURA 3 *Formación de placas seniles y ovillos neurofibrilares en la enfermedad de Alzheimer. En la parte superior de la figura se muestra como los péptidos β -amiloideos, formados a partir de la proteína precursora APP, se agregan en el espacio extracelular dando lugar a la formación de las placas neuríticas. En la parte inferior se observa como la hiperfosforilación de la proteína tau causa la desagregación de los microtúbulos en el axón de las neuronas y se forman agregaciones intracelulares que constituyen los ovillos neurofibrilares.*

Proteína tau

En paralelo con la identificación de los péptidos β -amiloideos en las placas seniles, se descubrió que los ovillos neurofibrilares estaban formados por la acumulación intracelular de fragmentos helicoidales pareados (PHF) compuestos por la proteína tau hiperfosforilada.

Tau es una proteína presente en las neuronas, que se une a microtúbulos, promoviendo su ensamblaje y estabilidad para regular la morfología axonal. Además de estabilizar el esqueleto celular participa en la comunicación neuronal y es liberada, en condiciones normales, fuera de las neuronas siendo detectable en el LCR.

Esta proteína puede encontrarse en dos estados diferentes:

- Fosforilada, disminuye su capacidad para promover el ensamblaje de microtúbulos.
- Defosforilada, promueve la polimerización de microtúbulos.

En la enfermedad de Alzheimer se produce una hiperfosforilación de tau, así como fenómenos de agregación, que contribuyen a la formación de los ovillos neurofibrilares, como se muestra en la figura 3.

Los fenómenos de hiperfosforilación de tau provocan el desensamblaje de los microtúbulos, causando daño en el transporte de neurotransmisores y comprometiendo la función sináptica de comunicación de la célula. Además tau tiene una alta capacidad para autoagregarse dando lugar a la formación de fibrillas insolubles que forman los ovillos neurofibrilares, terminando por afectar a la función neuronal.

El análisis de los niveles totales de tau presentes en el LCR es un reflejo del daño neuronal y por tanto, su aumento puede observarse en otros desórdenes neurodegenerativos, además de en la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, las medidas de los niveles de tau fosforilada parecen ser más específicas de la enfermedad de Alzheimer. Existen muchos sitios en la proteína tau susceptibles de ser fosforilados. En función de qué fosforilaciones se analicen la especificidad es también mayor [13].

Características de tau como marcador biológico

- Niveles aumentados de tau total y fosforilada en el LCR indican daño axonal y degeneración neuronal.
- 80% de sensibilidad para diferenciar entre enfermedad de Alzheimer y envejecimiento si se utilizan los niveles totales de tau.
- 74% de sensibilidad para diferenciar entre enfermedad de Alzheimer y envejecimiento si se utilizan los niveles de tau fosforilada.
- 89% de especificidad para diferenciar entre enfermedad de Alzheimer y otras demencias si se utilizan los niveles totales de tau.
- 92% de especificidad para diferenciar entre enfermedad de Alzheimer y otras demencias si se utilizan los niveles de tau fosforilada.

Aunque ninguno de estos marcadores, utilizado aisladamente en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, puede aportar datos concluyentes, su combinación si que aumenta considerablemente la sensibilidad y especificidad del diagnóstico.

3.1.2 Técnicas de diagnóstico *in vitro*

Las técnicas de diagnóstico *in vitro* se emplean para identificar y cuantificar los marcadores biológicos previamente descritos y establecer diferencias entre pacientes con la enfermedad de Alzheimer y personas con otras demencias o personas sanas. Los marcadores más fiables se determinan a partir del LCR, por lo que no se cuantifican de forma rutinaria[14].

3.1.2.1 Ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA

La **técnica de inmovilización ligada a enzima** o **ELISA** (del inglés *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) está basada en el principio inmunológico del reconocimiento y unión de los anticuerpos a las moléculas que reconocen como extrañas (antígenos). Este método es ampliamente utilizado en el ámbito del diagnóstico clínico. Para el caso del diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer se han empleado diferentes anticuerpos que reconocen proteínas implicadas en la patología, principalmente anticuerpos frente a péptidos β -amiloides y frente a la proteína tau, en su estado fosforilado o defosforilado.

Los ensayos tipo ELISA se realizan sobre un soporte sólido, como el fondo de un tubo de ensayo o una placa multipocillo, en el que se encuentra inmovilizado bien el anticuerpo bien la proteína de interés. Los anticuerpos empleados reconocen, de manera específica, los antígenos y se unen a estas moléculas formando un complejo antígeno-anticuerpo. Para detectar esa unión se emplean enzimas, normalmente unidas a un anticuerpo, que catalizan la formación de un producto coloreado, que se cuantificará mediante la medida de luz absorbida por dicho compuesto (espectrofotometría).

Los ensayos ELISA se han empleado en varios estudios para valorar la eficacia de los péptidos β -amiloide y tau como marcadores de la enfermedad de Alzheimer. Las observaciones que se derivan de estos estudios indican que los pacientes con enfermedad de Alzheimer muestran una reducción de los niveles de β -amiloide y un aumento en los niveles de tau [15, 16]. Sin embargo, existen otras enfermedades que pueden producir también estas mismas alteraciones. Todas las enfermedades en las que se produce una degeneración neuronal provocan un aumento de los niveles de tau en LCR. Además el depósito de los péptidos β -amiloides en las placas seniles es un proceso común en la demencia con cuerpos de Lewy y en el envejecimiento normal. Por tanto, para aumentar la especificidad del diagnóstico es necesario realizar la combinación de estos marcadores junto con los niveles de tau fosforilada, que parece ser específico de la enfermedad de Alzheimer [17].

Ventajas de las técnicas ELISA

- Sencillos de realizar.
- Permiten procesar un gran número de muestras.
- Los análisis son rápidos.
- Alta sensibilidad.

Inconvenientes de las técnicas ELISA

- Los kits ELISA son costosos.
- Las muestras procedentes de LCR suponen la realización de un método invasivo para obtener la muestra por lo que no se realizan de rutina.

Existen diferentes modalidades de ensayos ELISA, en función del número de anticuerpos que se emplean y de la molécula que se detecta con la reacción enzimática (complejos antígeno-anticuerpo, anticuerpos libres). Los más empleados en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer son los ensayos tipo sándwich y los ensayos competitivos para valorar los niveles de β -amiloide y tau en muestras procedentes normalmente del LCR.

ELISA tipo sandwich

En el **ELISA tipo sandwich** se emplean dos anticuerpos diferentes que se unen de manera directa a la proteína de interés, que queda atrapada entre ambos como en un sandwich.

En esta técnica se inmoviliza uno de los anticuerpos en los pocillos de la placa. Cuando se añade la muestra, las proteínas que se quieren detectar se unen al anticuerpo de manera específica. A continuación, se añade un segundo anticuerpo que lleva unida una enzima que cataliza una reacción cuyo producto final es coloreado y nos permite cuantificar la proteína de interés [18].

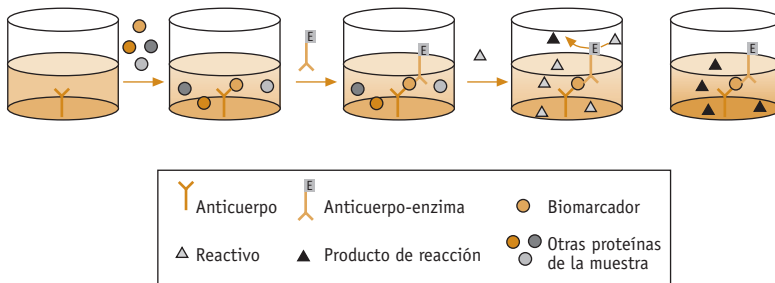


FIGURA 4 Esquema de un ensayo inmunoenzimático ELISA tipo sándwich.

ELISA competitivo

En el **ELISA competitivo** hay una primera fase en la que se incuba la muestra con el anticuerpo, produciéndose la unión específica de éste con la proteína que se quiere detectar. A continuación se añade esta mezcla sobre una superficie previamente recubierta con el antígeno de manera que el anticuerpo libre no unido a su antígeno en la fase inicial, se une a la superficie. Se cuantifica la cantidad de anticuerpo libre para determinar la cantidad de proteína de interés en la muestra. Cuanto más anticuerpo libre se detecta, menos cantidad de proteína de interés contiene la muestra.

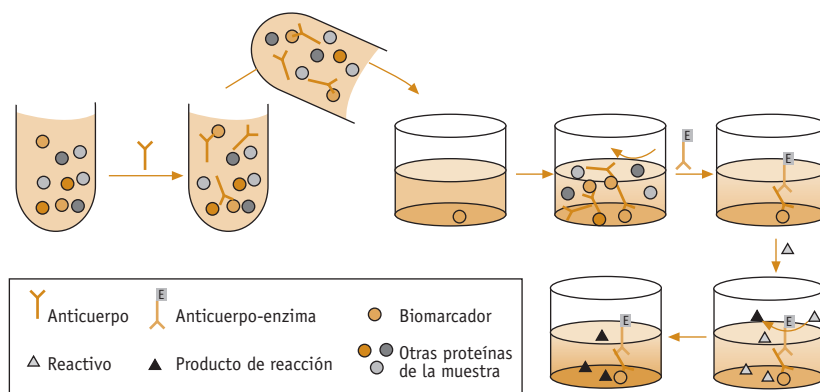


FIGURA 5 Esquema de un ensayo inmunoenzimático ELISA competitivo.

3.1.2.2 Técnica de inmunodetección en membrana (Western Blot)

La técnica de **inmunodetección en membrana** también conocida como **Western Blot**, se trata, al igual que los ELISA de un ensayo inmunoenzimático para la detección de proteínas concretas (β -amiloide, tau, etc.) de una muestra mediante el uso de anticuerpos específicos. En el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer esta técnica se ha empleado para la confirmación de resultados obtenidos por otras metodologías como la proteómica.

Este ensayo consta de dos fases. Una primera en la que se produce la separación de las proteínas de una muestra mediante un proceso conocido como electroforesis. En una segunda etapa se produce la transferencia de las proteínas a una membrana sintética, quedando éstas en su superficie. En esta membrana se produce la unión de la proteína con el anticuerpo, que lleva una enzima unida a él. Esta enzima cataliza una reacción cuyo producto final permite identificar la proteína de interés. Un sistema comúnmente empleado para la detección es la quimioluminiscencia.

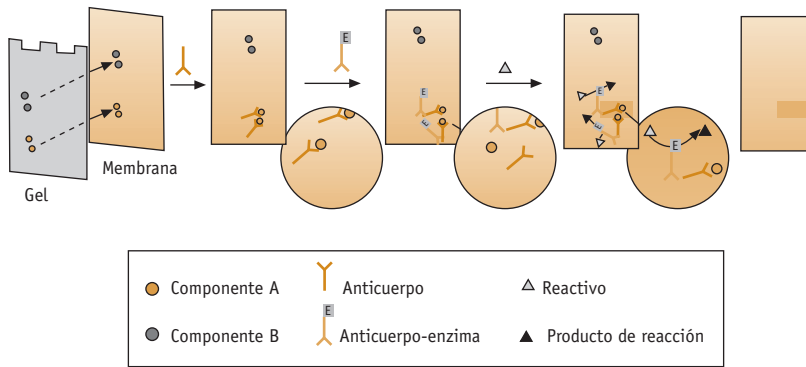


FIGURA 6 Esquema de las diferentes etapas de la inmunodetección en membrana o Western Blot para la detección del componente de interés (componente A) de una muestra compleja.

Si bien esta técnica se emplea en investigación, siendo útil para la identificación y detección de biomarcadores en determinados fluidos, también puede utilizarse en la clínica para la confirmación de los resultados de otras pruebas como los ELISA.

Ventajas la técnica de Western Blot

- Método altamente específico.

Inconvenientes de la técnica de Western Blot

- Método lento, se necesitan al menos 24 horas para obtener los resultados.
- Este método no permite cuantificar.

3.1.2.3 Técnicas proteómicas

La **proteómica** estudia el conjunto completo de proteínas que genera un genoma, célula o tejido mediante métodos bioquímicos, con el fin de obtener una visión global e integrada de los procesos celulares en un momento dado y bajo determinadas condiciones.

Las células expresan varios miles de proteínas diferentes y cada una de ellas puede experimentar numerosas modificaciones distintas, por lo que el estudio de las diferencias en la expresión de cada proteína individualmente supondría una tarea imposible de realizar sino fuera por las técnicas proteómicas, que proporcionan un análisis a gran escala. Por este motivo, la aplicación de la proteómica tiene un enorme potencial en el área de la biomedicina para el desarrollo de fármacos, métodos de diagnóstico, desarrollo de vacunas, etc.

Mediante la comparación de la información contenida en el proteoma, el conjunto de proteínas expresadas por un tejido o por una célula en un momento determinado, de un

individuo sano y un paciente con enfermedad de Alzheimer puede ser de gran utilidad a la hora de descubrir nuevos marcadores biológicos para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Espectrometría de masas

La **espectrometría de masas** es una técnica analítica para la detección de compuestos químicos y biológicos en función de su relación masa-carga (m/z). Mediante esta técnica es posible obtener información de la masa molecular del compuesto analizado así como información estructural del mismo.

En la espectrometría de masas las muestras se dotan de carga, ionizadas, en una fuente de ionización. Los iones al tener una carga, pueden ser transportados bajo la influencia de un determinado campo eléctrico o magnético hasta un analizador. La fuente de ionización, el analizador de masas y el detector están en alto vacío para permitir el libre movimiento de los iones. El tiempo que tardan hasta alcanzar el analizador depende de su relación masa por unidad de carga, produciendo un patrón específico, un espectro de masa, que permite determinar la composición de un compuesto químico o biológico.

Hay muchos tipos de espectrómetros de masas que no solamente analizan los iones sino que también producen diversos tipos de iones. Entre los más utilizados para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer se encuentran **MALDI-TOF** (desorción/ionización por láser asistida por matriz acoplada a un detector de tiempo de vuelo), **ESI** (electrospray o electronebulización), cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masa en tandem (**LC/MS/MS**).

Esta técnica se ha empleado como herramienta para la identificación de un alto número de marcadores biológicos para la enfermedad de Alzheimer [19]. Mediante la comparación de los niveles de expresión de proteínas en personas sanas y pacientes confirmados de la enfermedad de Alzheimer, se obtiene un listado de posibles marcadores para el diagnóstico de la enfermedad, que posteriormente se validarán [20]. Gracias a estas técnicas se puede avanzar más rápidamente en la búsqueda de marcadores biológicos en diferentes fluidos como LCR, sangre y orina.

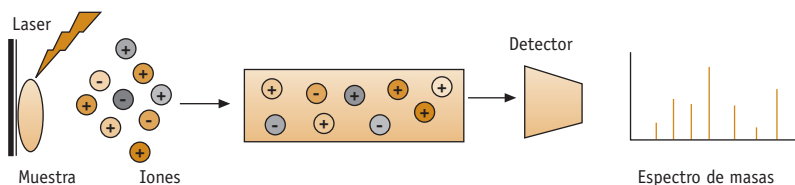


FIGURA 7 Representación esquemática de la técnica MALDI-TOF para identificar proteínas a partir de una muestra compleja.

Ventajas de la espectrometría de masas

- Permite la identificación de un alto número de proteínas.
- Rapidez del análisis.
- Reproducibilidad.

Inconvenientes de la espectrometría de masas

- Instrumentación compleja.
- El equipamiento es costoso.
- Requiere personal cualificado.
- No es una técnica cuantitativa.
- Difícil de automatizar.

Microarrays de proteínas

Esta técnica permite comparar las diferencias en los niveles de expresión de miles de proteínas a la vez, en enfermos de Alzheimer y personas sanas, posibilitando la identificación de marcadores potenciales para el diagnóstico de la enfermedad.

Un **microarray** es un conjunto de puntos de ensayo miniaturizados sobre una superficie sólida, que permite realizar muchos ensayos simultáneamente, obteniendo como resultado una gran cantidad de información biológica a partir de una pequeña cantidad de muestra. Se basan en la captura de proteínas por medio de moléculas de diversa naturaleza que permanecen ancladas a la superficie del *microarray*. Estas moléculas pueden ser antígenos, proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, anticuerpos y otras moléculas. Aunque hay una gran variedad, los anticuerpos suelen ser las moléculas más empleadas para inmovilizar en los *microarrays* de proteínas.

En función de la aplicación que se persiga existen diversos tipos de *microarrays* de proteínas. Para diagnóstico los más empleados son los *microarrays* de identificación y cuantificación de proteínas mediante el uso de anticuerpos. Las estrategias de detección, en este caso se basan en las técnicas inmunológicas. Se pueden emplear anticuerpos secundarios marcados o bien realizar un marcaje químico o fluorescente de las proteínas de la muestra.

Estudios recientes empleando esta metodología han identificado dieciocho proteínas en sangre que podrían ser empleadas como marcadores biológicos de la enfermedad de Alzheimer [8]. Estas proteínas son indicadores de alteraciones que se producen en diversos procesos como la hematopoyesis, la respuesta inmune o la apoptosis (muerte celular programada), que pueden reflejar una situación pre-sintomática de la enfermedad de Alzheimer.

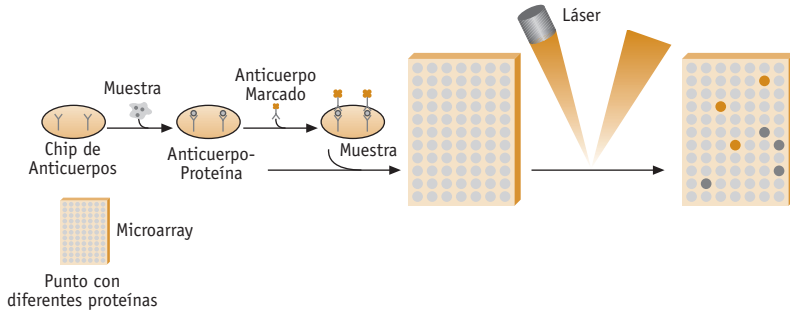


FIGURA 8 Esquema de las diferentes etapas que componen un Microarrays de proteínas.

Ventajas de los microarrays de proteínas

- Permiten el análisis simultáneo de muchos marcadores diferentes en un mismo ensayo.
- Rápido de realizar.
- Permiten realizar muchos ensayos simultáneamente.
- Se pueden automatizar.

Inconvenientes de los microarrays de proteínas

- Los anticuerpos empleados pueden tener reactividad cruzada con otras proteínas.
- Coste elevado para producir tantos anticuerpos.

3.1.2.4 Técnicas de diagnóstico genético

Desde el punto de vista genético, se sabe que un porcentaje bajo de casos de la enfermedad de Alzheimer presentan un patrón de herencia mendeliano autosómico dominante. Hasta el momento se han identificado 3 genes responsables del **componente hereditario de la enfermedad de Alzheimer**.

El gen de la proteína precursora de amiloide (**APP**), situado en el cromosoma 21, el gen de la proteína presentilina 1 (**PSEN1**), en el cromosoma 14 y el gen de la proteína presentilina 2 (**PSEN2**), en el cromosoma 1 [21].

El resto de casos se debe a la existencia de **polimorfismos**, pequeñas variaciones en la secuencia de ADN que originan existan distintas formas o alelos de un mismo gen. Así, en una población cada individuo porta una serie de alelos determinados.

En enfermedades como el Alzheimer, la expresión de un alelo concreto implica una mayor susceptibilidad al padecimiento de la forma esporádica de la enfermedad.

Existen diversos estudios que indican que los portadores del alelo $\epsilon 4/\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E (ApoE) tienden a presentar un inicio más precoz y frecuente de la enfermedad de Alzheimer, que se asocia a un aumento de los cambios

anatomopatológicos neurofibrilares. La determinación de la presencia de este alelo puede ayudar a aumentar la especificidad del diagnóstico de la enfermedad.

Otro gen que se asocia con la aparición tardía de la enfermedad de Alzheimer es el que codifica para la proteína α 2-macroglobulina plasmática. Esta proteína se une a la proteína β -amiloide soluble, favoreciendo su degradación. Cuando hay cantidades anormalmente elevadas de esta proteína se producen efectos neurotóxicos [22].

Los factores genéticos que intervienen en la enfermedad de Alzheimer podrían ser de utilidad en el proceso diagnóstico y predictivo de personas con antecedentes familiares de la enfermedad de Alzheimer, aunque la utilidad del consejo genético está aún por determinar.

TABLA X *Clasificación de los genes implicados en la enfermedad de Alzheimer.*

<i>Genes implicados en la enfermedad de Alzheimer</i>	
<i>Autosómicos Dominantes</i>	<i>Polimorfismos</i>
APP (proteína precursora amiloide)	alelo ϵ 4/ ϵ 4 gen APOE
PSEN1 (presenilina 1)	α 2-macroglobulina plasmática
PSEN2 (presenilina 2)	

Técnica de PCR

La técnica de la **reacción en cadena de la polimerasa** o **PCR** permite detectar fragmentos específicos del ADN responsable de la síntesis de las proteínas, proceso conocido como expresión génica y que constituye la base del funcionamiento de todos los seres vivos.

Esta tecnología fue desarrollada a principios de los años 80 por Kary Mullis y sus colaboradores y, desde su descubrimiento, se ha convertido en una herramienta de biología molecular indispensable, con aplicaciones tales como la búsqueda de mutaciones en enfermedades hereditarias, criminalística y ciencia forense, análisis genéticos, pruebas de paternidad, identificación de especies y búsqueda de microorganismos patógenos. Hoy en día, el proceso de amplificación de fragmentos de ADN se encuentra automatizado.

Mediante esta técnica se pueden detectar mutaciones concretas de los genes implicados en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. La PCR permite obtener múltiples copias de un fragmento específico de ADN a partir de una muestra compleja, para realizar su detección y estudio posterior, como puede ser la identificación de mutaciones en un gen determinado.

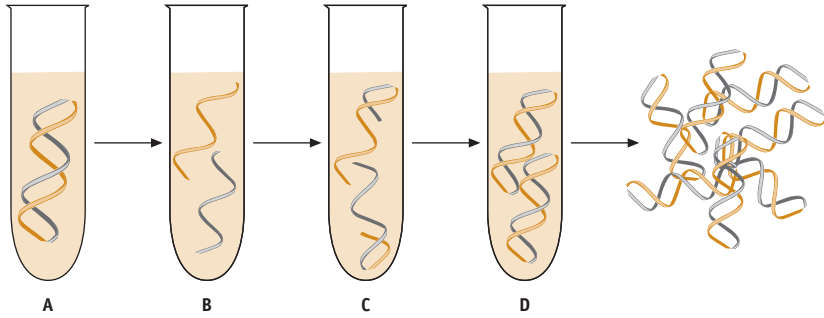


FIGURA 9 *Reacción en cadena de la polimerasa mediante los siguientes pasos: obtención de ADN (A), separación de las hebras de la doble hélice de ADN (B), hibridación de fragmentos de ADN concretos a la secuencia de ADN (C) y creación de nuevas copias (D).*

Ventajas de la PCR
<ul style="list-style-type: none">· Alta sensibilidad en la detección del ADN.· Permite discriminar entre una mutación y otra.· Se necesita poco material de partida.
Inconvenientes de la PCR
<ul style="list-style-type: none">· Se necesita personal cualificado para el análisis.· El ADN puede fragmentarse durante el procesamiento de la muestra.

Microarrays de ADN

La secuenciación del genoma humano ha sentado las bases para el desarrollo de estudios comparados de la expresión génica a gran escala. Gracias a esta tecnología es posible analizar la expresión génica de un tipo celular o un tejido en una situación determinada, permitiendo identificar genes como dianas terapéuticas, genes marcadores del pronóstico o predisposición de enfermedades, entre otras aplicaciones.

Esta técnica se basa en la inmovilización de colecciones de moléculas de ADN, que recogen la secuencia conocida de genes, sobre un soporte sólido, *microarray*. Después de la extracción del ADN de las células de interés, éste es marcado, por ejemplo con sondas fluorescentes. En la siguiente fase el ADN marcado se pone en contacto con el *microarray*. Cuando se produce el reconocimiento de una secuencia igual se une a ella en un proceso conocido como hibridación. Posteriormente se analiza la señal mediante un escáner de fluorescencia que da información sobre la expresión de los genes. Cuantificando la intensidad de la señal y comparándola con un caso control se determina si la expresión de un gen se encuentra aumentada, disminuida o no ha experimentado modificaciones.

En el caso del diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer esta técnica se ha empleado para establecer diferencias de expresión génica entre individuos sanos e individuos con enfermedad de Alzheimer o individuos con alto riesgo de desarrollar la enfermedad. Mediante el análisis de los resultados se pueden identificar nuevos marcadores genéticos de la enfermedad, pero también obtener información acerca de los procesos que se encuentran alterados.

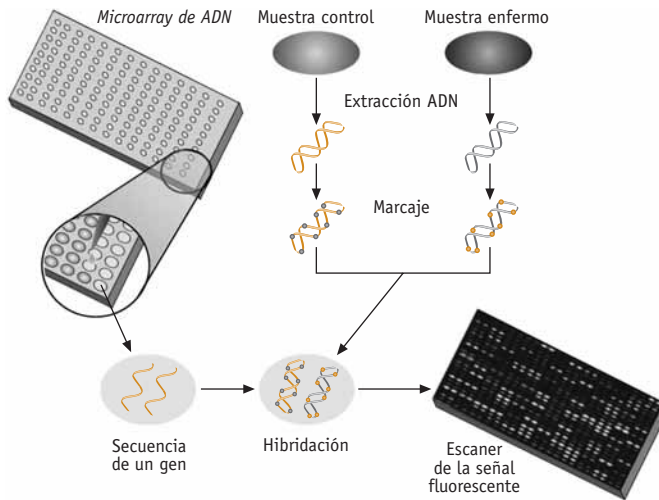


FIGURA 10 Representación del proceso de análisis de la expresión génica mediante microarrays de ADN.

Ventajas de los microarrays de ADN

- Permiten analizar rápidamente y en paralelo un gran número de muestras.
- Se puede estudiar la expresión de todos los genes del organismo.
- Alta sensibilidad.
- Se puede automatizar.

Inconvenientes de los microarrays de ADN

- Se necesita personal cualificado para el análisis.
- Análisis complejo de los resultados.

Aplicación PCR y microarrays en la detección de polimorfismos: Técnicas de genotipado

En el ADN humano los polimorfismos apenas representan un 0,1% del genoma global, siendo la forma más frecuente de polimorfismo la variación de una única base (también denominadas SNP) generalmente por sustitución.

Puesto que la mayoría de los casos de la enfermedad de Alzheimer están relacionados con la existencia de polimorfismos que incrementan la susceptibilidad de padecerla, es

imprescindible para el proceso diagnóstico, disponer de una herramienta que permita de modo fiable, determinar qué alelos se expresan en cada individuo, para ello se recurre a diversas **técnicas de genotipado**.

Entre las técnicas de genotipado más frecuentes destacan la PCR-cuantitativa, hibridación de ADN en microarrays e hibridación en microesferas.

PCR-cuantitativa

La PCR cuantitativa o PCR en tiempo real no es más que una variación de la PCR convencional, en ella la amplificación del ADN puede ser detectada mediante moléculas fluorescentes (fluorocromos) no específicas (**Sybr Green**) o mediante sondas específicas fluorescentes (**TaqMan**® o **KASPar**®).

La principal ventaja de la PCR a tiempo real con respecto a la PCR convencional, es el hecho de que la amplificación mediante fluorocromos permite la monitorización del proceso, de modo que podemos conocer la cantidad exacta de ADN amplificada en cada ciclo, también acorta el tiempo de análisis al no requerirse ningún experimento adicional para la visualización de los resultados.

En el genotipado de alelos se utilizan generalmente sondas específicas, puesto que este tipo de tecnología permite la detección de los distintos alelos en un mismo tubo de reacción, cosa que no sucede con el Sybr green.

Hibridación en microarrays

La principal ventaja de los microarrays con respecto a otras técnicas de genotipado es la posibilidad de detectar de forma simultánea y en una misma muestra de un mayor número de SNPs (generalmente entre 12-48 SNPs por ensayo según la tecnología aplicada).

La principal diferencia entre las distintas técnicas de genotipado por microarray radica fundamentalmente en el método de discriminación entre alelos, entre los que podemos distinguir:

Uso de la ligación específica de alelo (OLA)/PCR combinada con **electroforesis capilar** (técnica SNPlex® de Applied Biosystems), en este caso la sonda fluorescente que se une específicamente a cada SNP posee una movilidad electroforética determinada (se desplaza hasta un determinado punto al ser sometida a una separación electroforética en un capilar), esto permite, discriminar entre los distintos alelos.

Separación por **MALDI-TOF** (tecnología MassArray® de Sequenom), en ella la discriminación de alelos se realiza por espectrometría de masas (se ioniza la muestra para realizar una posterior separación por masa/carga) que permite determinar los distintos elementos que forman parte de un compuesto.

Hibridación en microesferas

En este tipo de arrays cada pocillo de la placa contiene una pequeña esfera (de unas 3 micras) de sílice que está recubierta de pequeños fragmentos de ADN que inmovilizan las secuencias presentes en la muestra que son complementarias.

3.2 Diagnóstico por imagen

Las técnicas de neuroimagen cada vez se emplean más para realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer. Entre las técnicas de diagnóstico por imagen más empleadas se distingue la **resonancia magnética** y la **tomografía computarizada** como herramientas para analizar los cambios estructurales que tienen lugar en el transcurso de la enfermedad como la reducción del volumen del hipocampo, relacionado con la pérdida de memoria y el desarrollo de procesos neuropatológicos característicos de la enfermedad. Además el desarrollo de técnicas de imagen funcional, como la **tomografía por emisión de positrones** y la **tomografía por emisión de fotón único**, aportan información adicional sobre las alteraciones que se producen en el cerebro de los pacientes con enfermedad de Alzheimer como la reducción en el metabolismo de la glucosa y del flujo sanguíneo en determinadas regiones del cerebro.

Muchas investigaciones recientes optan por la combinación de distintas técnicas de imagen, aunque en ningún caso se puede emitir un diagnóstico empleando exclusivamente una de estas técnicas.

3.2.1 Tomografía computarizada

La **tomografía computarizada (TC)**, o también conocida como **tomografía axial computarizada (TAC)**, es una técnica de imagen estructural.

Esta técnica se basa en la utilización de los rayos X para obtener imágenes tomográficas, que ofrecen información sobre las diferencias entre las densidades radiológicas de los tejidos. Las imágenes obtenidas mediante TC son de gran utilidad en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer para descartar otros fallos orgánicos como causa de demencia.

La obtención de imágenes de tomografía computarizada se realiza a través de un tubo de rayos X que gira alrededor del individuo. El aparato emite un haz muy fino de rayos X que incide sobre el paciente, al que atraviesa la radiación. Se detecta la atenuación de los rayos X, es decir, la radiación que no se absorbe por el individuo. Esta medida se repite hasta que el tubo de rayos X da una vuelta completa alrededor del paciente. Las señales recibidas se analizan después en un ordenador que reconstruye la imagen.

Las imágenes de TC proporcionan más detalles que una imagen radiográfica convencional ya que se obtienen muchas vistas diferentes del mismo órgano o estructura. Gracias a esta técnica se ha observado que pacientes con enfermedad de Alzheimer muestran, en relación con individuos sanos, una reducción de los lóbulos temporales, especialmente del hipocampo [23].

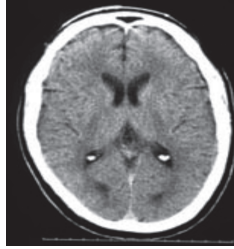


FIGURA 11 *Imagen de TC.*

Por el momento la información que se extrae de esta técnica no permite obtener un patrón específico de neuroimagen para utilizarlo en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y en la actualidad se emplea para descartar otras causas de demencia como la hidrocefalia, tumores cerebrales o infartos cerebrales, entre otros.

Agentes de contraste empleados en TC

Los agentes de contraste se emplean para mejorar la calidad de las imágenes, gracias a que aumentan la sensibilidad y especificidad en la detección, permitiendo distinguir más fácilmente las áreas anormales que pudieran indicar la presencia de una patología. Estas sustancias pueden administrarse por vía oral o bien por vía intravenosa. En la siguiente tabla se recogen algunos de los agentes de contraste más empleados.

TABLA 7 *Agentes de contraste empleados en la TC.*

<i>Trazadores</i>	
<i>Compuesto</i>	<i>Acción</i>
Bario	Para hacer opaco el tracto gastrointestinal.
Yodo en agua	Para tomar artrografías.
Yodo hidrosoluble	Para hacer opacos los vasos sanguíneos.

Ventajas de la tomografía computarizada

- Técnica rápida de realizar.
- No es un proceso invasivo.
- Las imágenes obtenidas presentan gran nitidez.
- Se obtienen imágenes de huesos, tejidos blandos y vasos sanguíneos al mismo tiempo.

Inconvenientes de la tomografía computarizada

- Se recibe una dosis de radiación ionizante.
- A veces es necesario el uso de agentes de contraste.
- Se pueden producir alergias por el agente de contraste.

3.2.2 Resonancia magnética nuclear

La **resonancia magnética nuclear (RMN)**, es una técnica de medicina nuclear que permite obtener imágenes de diferentes planos de los tejidos blandos como el cerebro y el corazón, entre otros.

Gracias a la utilización de la RMN en la práctica clínica se obtienen imágenes, de forma no invasiva y sin emitir radiaciones ionizantes, que permiten diferenciar, mejor que otras pruebas de radiología, las distintas estructuras anatómicas.

El uso de esta técnica para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer es útil como primer paso para descartar otras lesiones. Los estudios realizados indican que una de las primeras alteraciones morfológicas que se producen es la reducción del volumen de los lóbulos temporales y, en especial, atrofia del hipocampo [24, 25]. Esto se correlaciona con los procesos neuropatológicos que dan lugar a la pérdida de memoria en fases precoces de la enfermedad, por lo que la determinación del volumen de la región del hipocampo aporta información muy útil para realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad de Alzheimer [26].

Esta técnica debe su nombre al fenómeno físico de la resonancia, que ocurre cuando el núcleo de ciertos átomos se somete a un campo magnético. Estos núcleos son capaces de aceptar y emitir energía, resonando, al someterse a la acción de ondas de radiofrecuencia [27].

Durante el estudio de RMN el paciente, a través de una camilla, se sitúa dentro del aparato, de estructura similar a un tubo, cuyo elemento principal es un imán generador de un campo magnético de gran intensidad. Los cambios físicos que se producen en el organismo se devuelven como señal eléctrica que capta el instrumental adecuado y que servirá para construir la imagen.

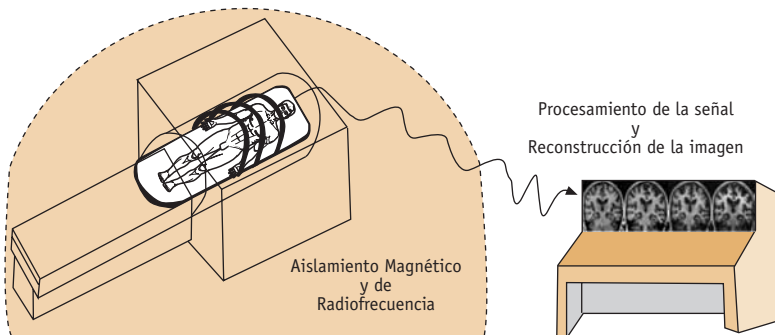


FIGURA 12 Esquema de un aparato de resonancia magnética.

Las diferencias de señal entre los distintos tejidos se traducen en mayor o menor brillo de la imagen final, que reflejan las diferencias en el contenido de agua. Esta técnica es útil para detectar trastornos que aumenten el líquido en determinadas áreas del cuerpo.

Las imágenes obtenidas a partir de la RMN pueden dar información de diferentes tipos y en función de este criterio se clasifican en:

- **Volumétricas**, dan información acerca del volumen de los tejidos.
- **De Difusión**, reflejan el movimiento al azar de las moléculas de agua dando información acerca de la integridad estructural del parénquima cerebral. El aumento de la difusión en el cerebro puede reflejar cambios en la organización de tejidos del cerebro representando un marcador de atrofia neuronal. En pacientes con la enfermedad de Alzheimer se ha observado un aumento de la difusión en el lóbulo temporal.
- **De Perfusión**, que permiten analizar el flujo sanguíneo gracias al uso de agentes de contraste. En la enfermedad de Alzheimer se ha observado como se produce una reducción del flujo sanguíneo en determinadas áreas del cerebro [26].

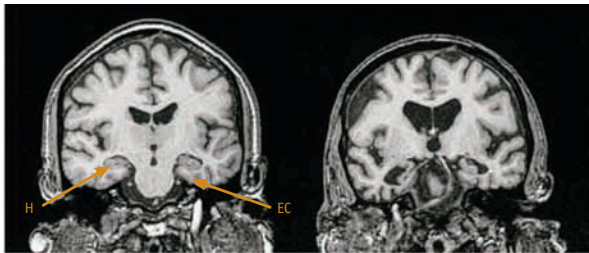


FIGURA 13 *Imagen de RMN. A la izquierda individuo de edad avanzada sin patología y a la derecha paciente con enfermedad de Alzheimer. H indica la localización del hipocampo y EC muestra el córtex entorrinal. Imagen tomada de [28].*

Agentes de contraste empleados en RMN

Los agentes de contraste más utilizados en la RMN son los denominados paramagnéticos, que son aquellos que por sus propiedades magnéticas son capaces de modificar las señales de resonancia de las estructuras que las rodean. El agente de contraste paramagnético más empleado es el denominado **gadolinio** que tiene la propiedad de realzar la señal de las zonas a las que accede. El modo de administración suele ser por la vía intravenosa.

Aunque existen estudios que indican que mediante la RMN se puede medir la atrofia del hipocampo permitiendo diferenciar enfermos de Alzheimer de enfermos con deterioro

cognitivo leve, se ha observado que este fenómeno ocurre también en otras demencias por lo que los datos de imagen obtenidos por esta técnica no son suficientes, por sí solos, para establecer un diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer [11].

Ventajas de la RMN

- Ausencia de efectos nocivos conocidos al no utilizar radiaciones ionizantes.
- Las imágenes permiten observar detalles anatómicos no apreciables con otras técnicas.
- Las imágenes se obtienen en los planos axial, sagital y coronal permitiendo el estudio tridimensional.
- Detecta los cambios en el contenido de agua de los tejidos.
- Es una técnica no invasiva, que no causa dolor.

Inconvenientes de la RMN

- Elevado coste económico.
- Puede producir claustrofobia.
- En algunos casos es necesario inyectar un agente de contraste.
- Las personas con determinados tipos de implantes no pueden someterse a esta prueba.

3.2.3 Espectroscopía por resonancia magnética

La **espectroscopía por resonancia magnética (ERM)** se trata de una modalidad de la resonancia magnética nuclear, que permite determinar *in vivo* la concentración de distintos compuestos de interés y aporta, por tanto, información sobre el metabolismo cerebral [28].

Los núcleos atómicos que se estudian mediante esta técnica son los mismos que en la resonancia magnética nuclear. El más estudiado es el ^1H por encontrarse en abundancia en la composición de los metabolitos.

Los núcleos se someten a un campo magnético y a pulsos de radiofrecuencia. Esto provoca que los núcleos entren en resonancia y que regresen a su situación original al suspender el pulso de radiofrecuencia. Este cambio se detecta como una diferencia de voltaje por un detector. Cuando la señal se analiza se obtiene un espectro de resonancia, que se caracteriza por dos parámetros:

1. La frecuencia de resonancia, que va a ser diferente en función del compuesto.
2. La intensidad del pico, que da información sobre la concentración del metabolito [27].

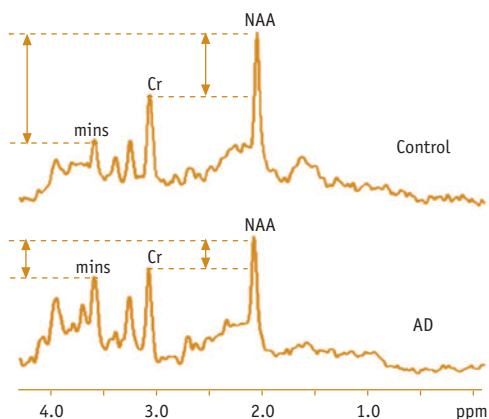


FIGURA 14 Espectro de resonancia magnética. Imagen tomada de [25].

En la siguiente tabla se recogen algunos de los metabolitos estudiados mediante esta técnica, cuyos niveles se han visto alterados en pacientes con enfermedad de Alzheimer respecto a individuos sanos.

TABLA 8 *Compuestos de interés que se estudian mediante ERM.*

<i>Metabolitos cerebrales detectables mediante ERM</i>	
<i>Compuesto</i>	<i>Descripción</i>
N-acetil aspartato (NAA)	Marcador neuronal
Colina	Síntesis de membranas
Creatina y lactato	Indicadores del estado energético
Mioinositol	Marcador de células gliales

El **N-acetil aspartato (NAA)** es un aminoácido presente únicamente en el sistema nervioso central, que refleja la densidad y viabilidad de las neuronas. La disminución en sus niveles se relaciona con la muerte neuronal en las regiones cerebrales que se ven afectadas en la enfermedad de Alzheimer en las fases iniciales[29]. De hecho, diversos estudios realizados tanto *in vitro*, con cerebros de pacientes fallecidos por causa de la enfermedad, como *in vivo*, han mostrado que se produce una disminución en los niveles de este aminoácido [28].

Mediante esta técnica también se ha mostrado que en los pacientes con enfermedad de Alzheimer se produce un aumento en los niveles de **mioinositol**, que es un componente de las membranas lipídicas, que podría estar relacionado con disfunciones en las membranas y anomalías del citoesqueleto que provocan alteraciones en el cerebro [29].

En la mayoría de los estudios de ERM en pacientes de Alzheimer se valora la proporción de estos metabolitos en relación con los niveles de creatina, que se considera un metabolito cerebral que permanece constante en casos de alteraciones cerebrales.

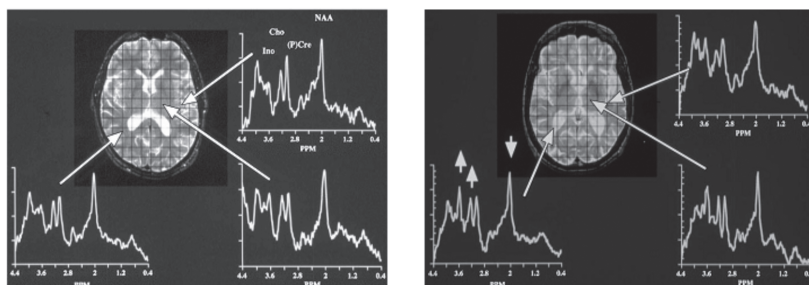


FIGURA 15 *Espectro de resonancia magnética. A la izquierda se muestran los resultados de un individuo de 62 años sano y a la derecha los datos obtenidos de un paciente de 80 años con enfermedad de Alzheimer. Los espectros muestran el aumento en los niveles de mioinositol (Ino) y colina (Cho), y la disminución en los niveles de NAA. Imagen tomada de [28].*

A pesar de los datos obtenidos hasta el momento en diversos estudios, esta técnica no es lo suficientemente específica como para discriminar entre casos de enfermedad de Alzheimer y otras causas de demencia, motivo por el cual todavía no se aplica rutinariamente en la clínica. Sin embargo, las medidas de NAA en combinación con las imágenes de RMN volumétrica ayudan a completar el diagnóstico de esta enfermedad.

Ventajas de la ERM

- Permite obtener información de procesos metabólicos.
- Se trata de una técnica no invasiva.

Inconvenientes de la ERM

- Poca especificidad para diferenciar entre la enfermedad de Alzheimer y otras demencias.

3.2.4 Resonancia magnética nuclear funcional

La **resonancia magnética nuclear funcional (RMNF)** combina las imágenes de resonancia magnética nuclear con la identificación de zonas que se activan en el cerebro en respuesta a un determinado estímulo sensorial o tarea cognitiva. Mediante la comparación de las imágenes obtenidas durante el estímulo y las obtenidas en periodos de reposo se puede generar un mapa de activación del cerebro.

El principio en el que se basa esta técnica fue descrito en los 40 años por Linus Pauling, quien describió el magnetismo del pigmento que transporta el oxígeno de la sangre y da color a los glóbulos rojos, la hemoglobina. En función del grado de oxigenación de la hemoglobina se la denomina oxihemoglobina, cuando está oxigenada, o deoxihemoglobina, cuando se encuentra desoxigenada.

Se sabe que la actividad cerebral va acompañada de un aumento del flujo sanguíneo en los vasos locales que provoca una reducción en los niveles de deoxihemoglobina. Este fenómeno se emplea por la RMNf que mide la actividad cerebral indirectamente mediante la determinación del nivel de oxigenación de la sangre dependiente de respuesta hemodinámica a un estímulo determinado. A este parámetro se le denomina **BOLD**, de sus siglas en inglés *Blood Oxygenation Level Dependent* [30].

Para determinar el cambio entre las concentraciones de oxihemoglobina y deoxihemoglobina, después de la estimulación, se emplean las propiedades magnéticas de la hemoglobina como agente de contraste endógeno para obtener imágenes de resonancia magnética y poder estudiar las funciones cerebrales, sin tener que acudir a la administración de agentes de contraste.

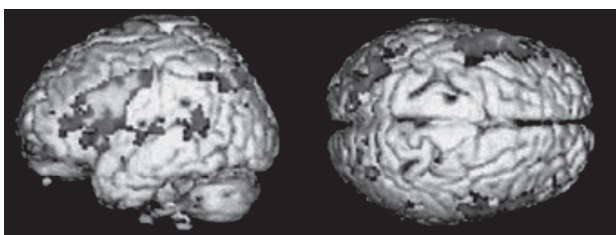


FIGURA 16 *Mapa de activación cerebral en las regiones frontal y temporal, obtenido durante la estimulación con actividades de memoria. Imagen modificada de [28]*

Gracias a esta técnica se sabe qué regiones del cerebro se activan en función de la tarea a desarrollar lo que permite realizar comparaciones entre individuos sanos y enfermos, ayudando en el diagnóstico de enfermedades del cerebro.

Para el caso del diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer el empleo de esta técnica indica que los pacientes con enfermedad de Alzheimer sufren una disminución en la señal o inactivación en respuesta a estímulos, en las regiones del lóbulo medio temporal donde se encuentran estructuras relacionadas con la memoria como el hipocampo o la amígdala, en comparación con sujetos sanos [28, 31].

Ventajas de la RMNf

- Técnica no invasiva.
- No requiere la inyección de un agente radioactivo, por lo que se pueden repetir las medidas más a menudo.
- Rápida de realizar.
- Disponible como técnica en la práctica clínica.

Inconvenientes de la RMNf

- Las personas con determinados tipos de implantes no pueden someterse a esta prueba.
- Se tarda más tiempo en realizar la prueba que otras pruebas de imagen.

3.2.5 Tomografía por emisión de positrones

La **tomografía por emisión de positrones (PET)**, de sus siglas en inglés *Positron Emission Tomography*, es una técnica de diagnóstico por imagen, no invasiva, que permite analizar *in vivo* diversos procesos fisiológicos o fisiopatológicos en tejidos y órganos.

Esta técnica de medicina nuclear se basa en el análisis y detección, mediante un tomógrafo, de la distribución de un radiofármaco, que es un compuesto marcado radiactivamente unido a una molécula que se desea analizar. Tras la administración del radiofármaco, generalmente por vía intravenosa, éste se distribuye en el interior del cuerpo según el flujo sanguíneo y se capta por las células para metabolizarlo del mismo modo que su análogo no marcado. En función del radiofármaco empleado, se obtiene información de diferentes procesos biológicos como el metabolismo de la glucosa, la proliferación celular, la actividad enzimática, la tasa de consumo de oxígeno, el flujo sanguíneo o la transmisión de señales, entre otros [32].

La obtención de imágenes mediante esta técnica de imagen funcional se realiza a través de un tomógrafo que está formado por varios anillos de detectores, permitiendo el paso por la zona central de la camilla del enfermo hasta la región del cuerpo donde se realiza la medida. Las moléculas marcadas que se utilizan son emisoras de partículas subatómicas denominadas positrones. Estas partículas son destruidas, en un proceso conocido como aniquilación, por los electrones orbitales próximos de los pacientes, dando lugar a la emisión de radiación gamma en un ángulo de 180°. Esta radiación se detecta de manera simultánea por los detectores situados a lo largo del anillo uno frente a otro. La señal que reciben los detectores de la localización e intensidad de la señal se procesa por un ordenador mostrando la imagen de la región del cerebro deseada en tiempo real [33, 34].

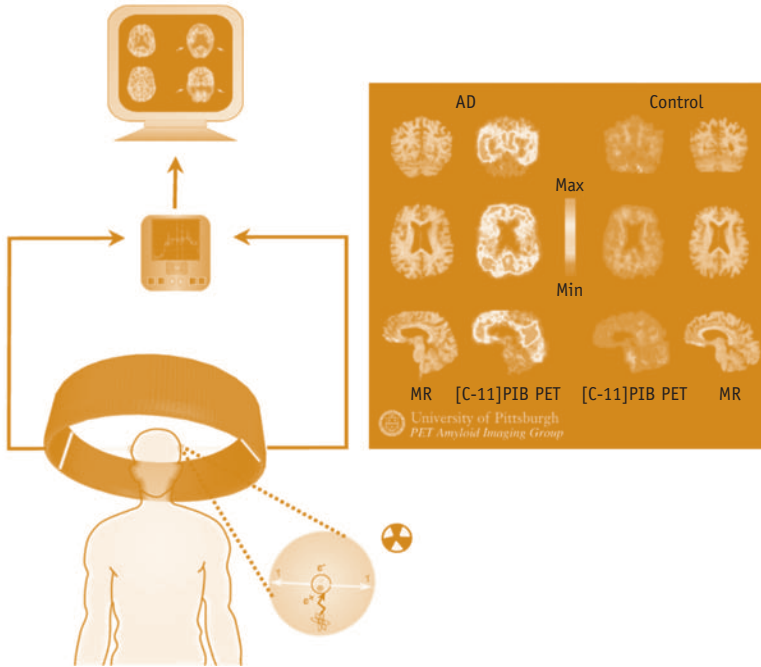


FIGURA 17 Esquema del sistema empleado para la obtención de imágenes de PET. Imagen modificada de [35].

Trazadores empleados en PET

Los trazadores o radiofármacos que se emplean se administran en pequeñas cantidades. Además la vida media de estas sustancias radiactivas es muy corta, por lo que las medidas deben realizarse en un breve periodo de tiempo tras su administración. Las características ideales de un trazador son:

- Llegar fácilmente al tejido que se desea estudiar.
- Metabolización escasa para permitir la detección.
- No producir efectos farmacodinámicos.
- Elevada afinidad por su sitio de unión.

Hay diversos radioisótopos emisores de positrones que se utilizan en la práctica clínica para ayudar en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. La molécula que más se emplea es la 2-[¹⁸F]-fluoro-2-desoxi-D-glucosa (**FDG**), que lleva unida el ¹⁸F, como isótopo radiactivo que emite positrones. Esta molécula, es un análogo de la glucosa que atraviesa la barrera hematoencefálica y se capta por las células. Una vez en el interior de la célula sufre atrapamiento metabólico, por no poder seguir el ciclo bioquímico normal de la glucosa, reflejando de esta manera la utilización de glucosa por los tejidos [32, 36].

La señal de radiación que se recoge tras administrar el compuesto FDG, cuando se analiza el cerebro, se relaciona directamente con la actividad neuronal. Las alteraciones en las conexiones neuronales, que se producen en la enfermedad de Alzheimer, son una de las características de la enfermedad que originan una disminución en el número de neuronas. Como consecuencia se producen variaciones en el metabolismo de la glucosa, que gracias a las técnicas de imagen como el PET se pueden identificar, localizar y cuantificar en determinadas regiones del cerebro como las áreas del neocórtex asociativo parietal, temporal y cingulado posteriores así como en el hipocampo. De esta manera se describe la reducción en el consumo de glucosa, hipometabolismo, como una característica más de la enfermedad de Alzheimer [30, 37].

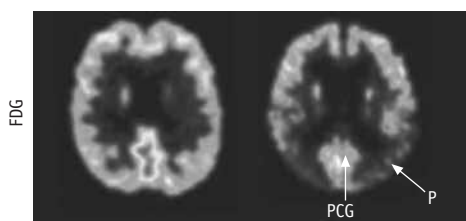


FIGURA 18 *Imágenes FDG-PET. A la izquierda se muestra una imagen tomada de un individuo sano y a la derecha la de un paciente con enfermedad de Alzheimer. Las áreas rojas y amarillas indican incorporación de glucosa. Imagen modificada de [38].*

Para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer mediante PET, el Dr. Bill Klunk y sus colaboradores desarrollaron, en el año 2004 en la Universidad de Pittsburg en Pensilvania, el compuesto [N-metil- ^{11}C]2-(4'-metilaminofenil)-6-hidroxi-benzotiazolio, que tras ser administrado se unía a los depósitos de β -amiloide, permitiendo visualizar *in vivo* las placas seniles. El compuesto recibió el nombre de "Pittsburg Compound-B" (PIB) [39] y se ha convertido en una herramienta importante en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Los pacientes con esta enfermedad muestran una marcada acumulación del compuesto PIB en las regiones corticales, en comparación con individuos sanos.

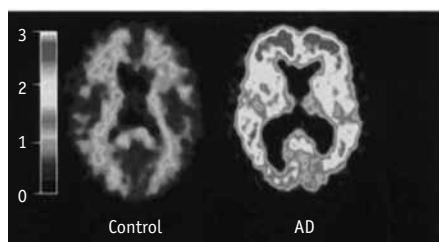


FIGURA 19 *Imagen que muestra las diferencias en la retención del compuesto PIB en individuos control y en enfermos de Alzheimer (AD) mediante PET. Imagen modificada de [39].*

En la actualidad se están desarrollando nuevas moléculas que sirvan de marcadores para visualizar las placas de β -amiloide y los ovillos neurofibrilares mediante PET. Por ejemplo, en el año 2006 Gary Small describió como el compuesto ^{18}F -FDDNP podía unirse a los péptidos β -amiloides y a los ovillos neurofibrilares. [38, 40]

Además de los compuestos mencionados existen diversos radiofármacos que se emplean para estudiar diferentes procesos, como se muestra en la tabla 8, que podrían ayudar a establecer un diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

TABLA 9 *Trazadores empleados en la técnica PET [32, 38, 39].*

<i>Trazadores</i>	
<i>Compuesto</i>	<i>Actividad que detecta</i>
$(^{18}\text{F})\text{FDG}$	Metabolismo de la glucosa
L-(metil- ^{11}C)metionina	Metabolismo de aminoácidos
$(^{11}\text{C})\text{Timidina}$	Proliferación
$(^{15}\text{O})\text{agua}$	Flujo sanguíneo
$(^{11}\text{C})\text{PIB}$	Acumulación β -amiloide
$(^{18}\text{F})\text{FDDNP}$	β -amiloide y ovillos neurofibrilares

El diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer mediante PET puede dar información antes de la manifestación de los síntomas clínicos gracias a la detección de las alteraciones metabólicas, que preceden a las lesiones [37]. Gracias a los avances en esta técnica se aumentan la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico, permitiendo diferenciar entre enfermedad de Alzheimer y otras demencias [41].

Ventajas de PET
<ul style="list-style-type: none"> · Alta sensibilidad y especificidad. · Analiza procesos bioquímicos in vivo. · Imágenes con mejor resolución espacial que el SPECT.
Inconvenientes de PET
<ul style="list-style-type: none"> · Requiere de personal cualificado. · Escasa definición anatómica. · Falsos positivos en pacientes con hiperglucemia y diabetes. · Utilización de trazadores marcados radiactivamente. · Costes elevados.

3.2.6 Tomografía por emisión de fotón único

La **tomografía por emisión de fotón único (SPECT)**, es una técnica de imagen funcional que permite obtener imágenes tridimensionales sobre el flujo sanguíneo en el cerebro ofreciendo información relativa a la actividad metabólica [30].

Esta técnica, del mismo modo que la técnica PET, se fundamenta en la detección de radiación gamma para la obtención de imágenes. Sin embargo, a diferencia del PET el compuesto radiactivo que se administra permanece en la sangre en lugar de ser absorbido por las células.

Esta técnica emplea moléculas biológicamente activas marcadas con un radioisótopo, que tras ser introducidas por vía intravenosa en el cuerpo del individuo, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica distribuyéndose en las estructuras del cerebro en función del flujo sanguíneo. Las imágenes obtenidas mediante SPECT se utilizan para valorar el metabolismo del cerebro ya que las medidas del flujo sanguíneo en el cerebro se relacionan estrechamente con la actividad metabólica [42].

La adquisición de imágenes se realiza a través de una gamma cámara que rota alrededor del individuo, adquiriendo imágenes de diferentes proyecciones. Después, mediante programas informáticos estas imágenes se procesan dando una reconstrucción topográfica en tres dimensiones. Las imágenes reconstruidas se representan mediante una gama de colores que indican más o menos perfusión del radiofármaco.

Trazadores empleados en SPECT

El radiofármaco más utilizado para obtener neuroimágenes es el $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ (^{99m}Tc -d,l-hexametilpropilnamino-oxima). Este compuesto, de características lipofílicas cruza rápidamente la barrera hematoencefálica y permite su empleo en los estudios de perfusión cerebral. Los estudios de SPECT con este radiofármaco en pacientes con la enfermedad de Alzheimer muestran que se produce un déficit en la perfusión en la región parietal y en el lóbulo temporal [2].

Gracias a esta técnica, una de las más empleadas para la evaluación de las demencias, se caracteriza la reducción en el flujo sanguíneo de determinadas regiones del cerebro, cortical y regiones temporales y parietales, como una característica de las fases tempranas de la enfermedad de Alzheimer [2]. Además, diversos estudios muestran que esta técnica es útil para mejorar el diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer, sobre todo en los casos de deterioro cognitivo leve, y para diferenciarlo de otras demencias [28].

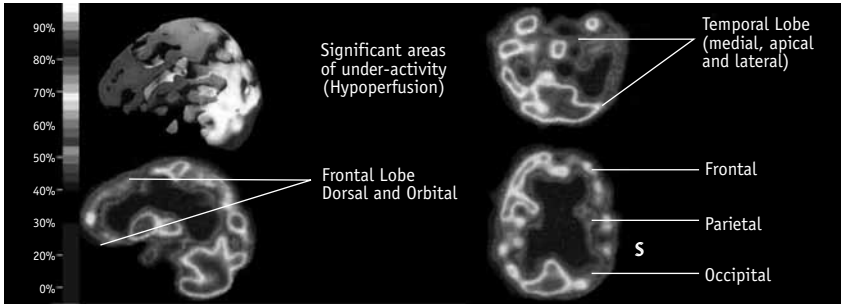


FIGURA 20 *Imagen de SPECT de un paciente con enfermedad de Alzheimer. Imagen tomada de <http://www.drrobertkohn.com/BrainSpect/SPECTscans/DementAlzh.htm>*

Ventajas de SPECT

- Menos costosa que PET.
- Permite conocer información acerca del metabolismo.
- Alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Inconvenientes de SPECT

- Peor resolución espacial que en PET.
- Empleo de agentes radiactivos.
- Requiere personal cualificado.
- Costes elevados.

3.2.7 Magnetoencefalografía

La **magnetoencefalografía (MEG)**, es una técnica de diagnóstico por imagen que permite detectar la actividad cerebral mediante el registro de campos magnéticos generados por las neuronas activas del cerebro.

Con esta técnica se registra la actividad postsináptica de millones de neuronas obteniendo información sobre la actividad cerebral en milisegundos y con una delimitación de la estructura cerebral de hasta milímetros cúbicos. Las medidas se realizan en una situación basal y en respuesta a un estímulo determinado permitiendo, de manera similar a la RMNF, comparar ambas situaciones.

La obtención de imágenes se realiza a través de magnetógrafos localizados a lo largo de la convexidad craneal en una sala magnéticamente aislada. La actividad de las neuronas crea corrientes eléctricas que originan campos magnéticos. Éstos son detectados y amplificados mediante los sensores que están dentro del magnetógrafo. Posteriormente se reconstruye la imagen por ordenador.

Una de las aplicaciones de esta metodología es la detección de áreas con ritmos de baja frecuencia o actividad disminuida, que ocurren en las regiones dañadas. De esta manera, se observa que los pacientes con enfermedad de Alzheimer muestran valores de

frecuencias menores que sujetos control, en las regiones temporales, indicando que la velocidad para procesar información disminuye [43, 44].

Los datos obtenidos de estos estudios muestran resultados coincidentes con los hallazgos obtenidos mediante otras técnicas de imagen, que permiten pensar que existe un patrón característico de esta patología.

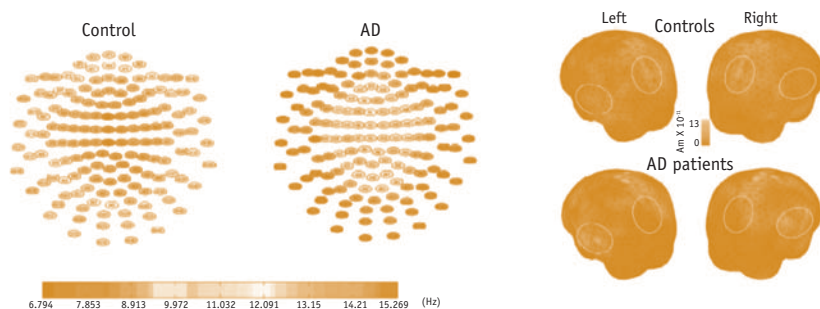


FIGURA 21 Se muestran los resultados de un estudio de las intensidades de frecuencias obtenidas mediante MEG en pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD) y sujetos control. Imagen modificada de [44, 45].

3.2.8 Diagnóstico global: la iniciativa ADNI

La iniciativa ADNI (del inglés Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative) intenta establecer la relación directa entre el Deterioro Cognitivo Leve y la enfermedad de Alzheimer, para ello estudia, desde el año 2004, el progreso de pacientes diagnosticados con MCI con el fin de determinar cuales acaban padeciendo Alzheimer.

ADNI aúna las diferentes técnicas de diagnóstico con el fin de identificar, mediante el uso de la neuroimagen, datos clínicos y biomarcadores, los cambios cognitivos asociados al Deterioro Cognitivo Leve y la enfermedad de Alzheimer. Diversas investigaciones han demostrado que el uso de técnicas de neuroimagen como el PET o la RMN, son más adecuadas y sensibles que los criterios neurológicos aplicados hasta ahora para el diagnóstico y medida de la progresión de enfermedades en las que se produce una pérdida de memoria.

La realización un proyecto de esta envergadura busca establecer un modelo estandarizado que sirva de guía para realización de ensayos clínicos, reduciendo los costes y el tiempo necesario para testar un determinado fármaco y mejorando la seguridad y eficacia de los nuevos fármacos en desarrollo.

El proyecto de investigación cuenta con la colaboración de más de 400 afectados por Deterioro Cognitivo Leve, 200 pacientes de la enfermedad de Alzheimer y 200 individuos control.

CAPÍTULO 4

Entorno científico y empresarial

Los anexos del presente informe incluyen información acerca de los grupos de investigación españoles identificados, que realizan labores de investigación en el ámbito del diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Se han detectado cincuenta grupos de investigación en toda España de los cuales veintiuno se encuentran en la Comunidad de Madrid, quince en Cataluña y los catorce restantes distribuidos entre el resto de Comunidades Autónomas.

La información correspondiente a cada grupo incluye los datos de la institución a la que pertenecen, los datos de contacto del investigador, las líneas de investigación y los proyectos en los que colabora cada grupo.

En los anexos también se ha incluido información relacionada con empresas dedicadas al diagnóstico molecular de la enfermedad de Alzheimer. En este apartado se recogen las empresas que se han identificado por estar vinculadas con el diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer. Debido a que las técnicas de diagnóstico por imagen se llevan a cabo en muchos centros y clínicas hospitalarias únicamente se presentan los datos de empresas relacionadas con el diagnóstico *in vitro*.

En formato de tabla se ofrece la información correspondiente a cada empresa indicándose los datos de contacto, la página Web, una breve descripción sobre la compañía y los productos y servicios que ofrecen relacionados con el diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer.

De todas las empresas identificadas por ofrecer servicios o productos para el diagnóstico *in vitro* seis son españolas y nueve extranjeras, siendo EE.UU. uno de los países con mayor número de empresas. En su mayoría los servicios que ofrecen estas empresas están basados en kits ELISA para detectar biomarcadores o en análisis genéticos para el estudio de genes implicados y algunas ofrecen reactivos para emplear en investigación.

CAPÍTULO 5

Legislación

En materia de diagnóstico molecular existe una serie de disposiciones legales destinadas a controlar la calidad de los dispositivos de diagnóstico, la seguridad de su uso y la información obtenida a partir de ellos.

Diagnóstico *in vitro*

En la legislación vigente en España el **Real Decreto 1143/2007**, de 31 de agosto [46], por el que se modifica el Real Decreto 1662/2000, de 29 de septiembre, sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro* [47] se recogen las condiciones que deben cumplirse para su comercialización y requisitos para su utilización. Asimismo, esta normativa recoge los procedimientos de evaluación de la conformidad que aplican a estos productos.

Diagnóstico por imagen

En lo relativo a la normativa que aplica en España en materia de diagnóstico por imagen existen directivas que regulan aspectos concretos que tienen que ver con las instalaciones donde se realizan las medidas de diagnóstico, las normas de seguridad relacionadas con los niveles de exposición a radiaciones y los criterios de calidad en radiodiagnóstico y medicina nuclear.

La **Directiva 2004/40/CE**, sobre las disposiciones mínimas de seguridad y de salud relativas a la exposición de los trabajadores a los riesgos derivados de los agentes físicos (campos electromagnéticos) [48], establece los límites de exposición para las densidades de corriente y los coeficientes de absorción específica en el interior del personal que trabaja en una instalación que emite campos electromagnéticos (incluyendo equipos de resonancia magnética).

El empleo de las radiaciones ionizantes en el campo de la medicina ha permitido realizar importantes progresos y desarrollar nuevas técnicas para el diagnóstico, la terapia y la prevención, que resultan ventajosas si se utilizan en el momento oportuno y adoptando las medidas necesarias. Las siguientes normativas fijan estas medidas fundamentales relativas a la protección radiológica de los pacientes que permite mejorar la calidad y eficacia del acto radiológico médico, evitando exposiciones inadecuadas o excesivas, sin impedir el uso de las radiaciones ionizantes en el plano de la detección precoz, diagnóstico o tratamiento de las enfermedades, atendiendo así a las recomendaciones formuladas por la *Comisión Internacional de Protección Radiológica, Organización Mundial de la Salud* y el *Comité Científico de las Naciones Unidas* para el estudio de los efectos de las radiaciones ionizantes.

El **Real Decreto 1841/1997**, de 5 de diciembre, por el que se establecen los criterios de calidad en medicina nuclear [49], tiene como objetivo asegurar la optimización de la

administración de radiofármacos y de la protección radiológica del paciente. Esta normativa se refiere a los métodos de medicina nuclear *in vivo*, ya que se trata de una disposición de desarrollo relativa a la protección del paciente, y exige la implantación de un programa de garantía de calidad en las unidades asistenciales de medicina nuclear.

El **Real Decreto 1976/1999**, de 23 de diciembre, por el que se establecen los criterios de calidad en radiodiagnóstico [50], establece los criterios de calidad en radiodiagnóstico para asegurar la optimización en la obtención de las imágenes y la protección radiológica del paciente en las unidades asistenciales de radiodiagnóstico y que las dosis recibidas por los trabajadores expuestos y el público en general, tiendan a valores tan bajos como pueda razonablemente conseguirse. Además este Real Decreto incluye los procedimientos necesarios para dar cumplimiento a lo previsto en el artículo 4 del **Real Decreto 1132/1990**, de 14 de septiembre, por el que se establecen medidas fundamentales de protección radiológica de las personas sometidas a exámenes y tratamientos médicos [51].

El **Real Decreto 815/2001**, de 13 de julio, sobre justificación del uso de las radiaciones ionizantes para la protección radiológica de las personas con ocasión de exposiciones médicas [52], incorpora al ordenamiento jurídico español la **Directiva 97/43/EURATOM**, relativa a la protección de la salud frente a los riesgos derivados de las radiaciones ionizantes en exposiciones médicas [53]. El objeto del presente Real Decreto es establecer los principios de justificación del uso de las radiaciones ionizantes para la protección radiológica de las personas siguiendo los criterios de calidad en medicina nuclear, radioterapia y radiodiagnóstico. Asimismo se establecen medidas fundamentales de protección radiológica de las personas sometidas a exámenes y tratamientos médicos.

En cuanto a las instalaciones de medicina nuclear, que incluye las instalaciones radiológicas destinadas al diagnóstico médico también están sujetas al Real Decreto 1976/1999, de 23 de diciembre, por el que se establecen los criterios de calidad en radiodiagnóstico y al **Real Decreto 1891/1991**, de 30 de diciembre, sobre instalación y utilización de aparatos de rayos X con fines de diagnóstico médico [54]. En este último decreto se indica que las instalaciones constituidas por aceleradores de partículas, equipos de rayos X para terapia y demás equipos generadores de radiaciones ionizantes utilizados con fines médicos se regirán por lo establecido en el reglamento de instalaciones nucleares y radiactivas en el **Real Decreto 1836/1999**, de 3 de diciembre, por el que se aprueba el reglamento sobre instalaciones nucleares y radiactivas [55].

Además, de acuerdo con la legislación vigente en España, las instalaciones radiactivas deben tener una autorización de funcionamiento otorgada por la Dirección General de Política Energética y Minas del Ministerio de Industria, Turismo y Comercio o del organismo competente de la comunidad autónoma correspondiente, cuando esta competencia se haya transferido.

CAPÍTULO 6

Principales retos y tendencias

Retos

El número creciente de casos de enfermedad de Alzheimer que se producen al año y las previsiones de crecimiento, como consecuencia del “baby boom”, convierten la gestión de esta enfermedad en un gran reto.

El primer paso para poder afrontar esta gestión sería disponer de un método de diagnóstico temprano, que permitiera la aplicación de tratamientos en fases iniciales de la enfermedad aumentando de esta manera su eficacia.

En este sentido, durante los últimos diez años se ha producido un importante avance en el conocimiento de las bases moleculares de la enfermedad de Alzheimer que han permitido conocer desde las proteínas responsables de que se produzcan estructuras aberrantes en los cerebros de los enfermos, hasta los mecanismos que originan estas alteraciones y los genes implicados. Con ayuda de estos avances las investigaciones tratan de resolver cuestiones como el evitar que se produzcan las alteraciones, detectarlas una vez que se han producido e impedir su progresión.

Cada vez son más los recursos que se destinan a la investigación en la enfermedad de Alzheimer, y en concreto al campo del diagnóstico. Uno de los principales retos que existen en este campo es encontrar biomarcadores fiables, no invasivos, sencillos y baratos, imprescindibles para establecer de manera segura el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en etapas tempranas, que a menudo se presentan como asintomáticas.

La obtención de estos biomarcadores permitiría desarrollar pruebas estandarizadas que se podrían emplear de rutina en el diagnóstico precoz. Por este motivo, muchas de las investigaciones actuales se encaminan hacia la búsqueda de cambios bioquímicos en la sangre, líquido cefalorraquídeo y orina, que permitan hallar algún marcador biológico representativo de esta enfermedad. Gracias al desarrollo de técnicas en el campo de la genómica y la proteómica, que permiten analizar un gran número de moléculas a la vez, cada vez son más los estudios que se publican mostrando la implicación de nuevas proteínas con la aparición de la enfermedad.

Otro gran reto que se presenta en el área del diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer es la mejora en las técnicas de imagen, que permitan examinar la relación entre daño precoz en el tejido cerebral y síntomas externos. Gracias a estas metodologías se podrán medir los cambios iniciales en la función o estructura cerebral para identificar a aquellas personas que están en estados iniciales de la enfermedad. Son muchas las investigaciones que se desarrollan en este área y en los últimos años se han conseguido grandes avances en el diagnóstico por imágenes, sin embargo todavía es necesario seguir avanzando en la aplicación de estas técnicas al diagnóstico temprano de la enfermedad.

Tendencias

En los últimos años se han producido importantes avances en la investigación sobre la enfermedad de Alzheimer y cada vez son más los recursos que se destinan a su investigación. Una de las áreas sobre las que más se ha investigado es en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la enfermedad, existiendo más de trescientos compuestos diferentes, en distintas etapas de desarrollo [56]. Sin embargo, se ha observado que los estudios que se llevan a cabo para el desarrollo de nuevas drogas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer serían más eficaces si se pudieran aplicar en etapas tempranas. Por este motivo se han incrementado las investigaciones encaminadas hacia el diagnóstico.

Si se tuviera un marcador de la enfermedad fiable, que permitiera un diagnóstico temprano, se podría acelerar el desarrollo de terapias porque se facilitaría la toma de decisiones sobre los agentes empleados en los ensayos clínicos. Además se reducirían los costes asociados al desarrollo de nuevas medicinas para el tratamiento ya que se podría seleccionar una población de pacientes más pequeña y los ensayos clínicos serían más coste efectivo.

Pero además de encontrar un marcador biológico para el diagnóstico de la enfermedad, cada vez se investiga más en el desarrollo y mejora de las técnicas de imagen. De hecho, el descubrimiento del compuesto Pittsburg B (PIB), agente para visualizar las placas β -amiloides, es uno de los más prometedores avances en técnicas de imagen, estimándose que este y otros compuestos lleguen al mercado en el 2011 y que incrementen el número de pacientes diagnosticados [57].

Además, aunque las técnicas de imagen no son empleadas rutinariamente en el diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer, y se utilizan más como herramientas de investigación, cada vez es más frecuente realizar pruebas de RMN, PET o SPECT para complementar el diagnóstico de la enfermedad.

CAPÍTULO 7

Conclusiones del informe

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno degenerativo que supone una de las formas más frecuentes de demencia en los ancianos. Esta enfermedad supone un grave problema de salud pública por la magnitud de población afectada, que además se prevé aumente considerablemente en los próximos años y por el impacto social y familiar que provoca.

Los esfuerzos investigadores en el campo del Alzheimer se centran en la búsqueda de nuevos tratamientos y terapias que frenen el progreso de la enfermedad y en los métodos de diagnóstico para la detección precoz. En el presente informe se han recogido diversas técnicas que se emplean para apoyar el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, o que se encuentran en fase de investigación y podrían tener una aplicación para el diagnóstico temprano, ya que hasta el momento el diagnóstico se basa únicamente en la historia clínica.

Los métodos diagnósticos descritos en el informe se han clasificado en dos frentes, técnicas de diagnóstico molecular *in vitro* y técnicas de diagnóstico por imagen.

En el primer caso se han detectado siete tecnologías diferentes que engloban métodos inmunológicos y diversas técnicas de proteómica y genómica. Mediante estas técnicas se detectan y cuantifican biomarcadores de la enfermedad que se podrían emplear en el diagnóstico temprano.

De esta manera, se ha observado que los marcadores biológicos más empleados por los métodos inmunológicos son los péptidos b-amiloides y la proteína tau total y tau en su estado fosforilado, medidos en el LCR. Sin embargo, gracias a las técnicas proteómicas se están identificando numerosos nuevos biomarcadores a partir de diferentes fluidos corporales, como la sangre o la orina, que suponen un método menos agresivo para obtener muestras que del LCR, en el que se requiere someter al paciente a una punción lumbar.

Además las técnicas genómicas se están empleando cada vez más, aunque nunca de forma rutinaria, para realizar pruebas de diagnóstico genético en los casos de enfermedad de Alzheimer familiar, así como para detectar el riesgo de poder desarrollar la enfermedad por la presencia de determinadas mutaciones.

En el caso del diagnóstico por imagen han sido siete las metodologías identificadas a lo largo de la elaboración de este informe. A su vez estas técnicas se diferencian en las que sirven para dar información de neuroimagen estructural e información de neuroimagen funcional.

La tomografía computarizada y la resonancia magnética nuclear, técnicas de imagen estructural, se emplean cada vez con más frecuencia en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer para excluir otras causas alternativas de demencias como tumores o infartos cerebrales, entre otras. Sin embargo, por sí solas no aportan suficiente información como para establecer un diagnóstico de la enfermedad de

Alzheimer. Por el contrario, las técnicas de imagen funcional han mostrado un gran desarrollo en los últimos años. El descubrimiento de compuestos como el PIB que se utiliza en la tomografía por emisión de positrones, que permiten localizar marcadores moleculares como los depósitos de las placas β -amiloides en el cerebro, ha supuesto un gran avance. Así como la posibilidad de analizar el metabolismo del cerebro con técnicas como el SPECT o la espectroscopia por resonancia magnética.

La introducción de estas técnicas con fines diagnósticos es cada vez más usual para apoyar el diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer, pero además las investigaciones recientes tienden a la combinación de distintas técnicas de imagen funcional y estructural para mejorar la especificidad y fiabilidad del diagnóstico.

En cuanto al entorno científico en España, relacionado con el diagnóstico molecular de la enfermedad de Alzheimer, se han identificado cincuenta grupos de referencia que se dedican a investigar en este campo, de los cuales más de la mitad (veintiuno) se encuentran en la Comunidad de Madrid. Sin embargo, el número de científicos que dedican su actividad investigadora al estudio de diversos aspectos de la enfermedad de Alzheimer, como nuevas terapias, es mucho mayor. Este hecho pone de manifiesto que existe un creciente interés por avanzar en el conocimiento sobre esta enfermedad.

En el anexo II del presente informe se recoge una relación de las patentes españolas relacionadas con técnicas de diagnóstico molecular, que se han detectado desde el año 1999 hasta la actualidad. Se observa que se ha pasado de patentar en temas relacionados con las bases genéticas de la enfermedad a patentar en temas relacionados con la detección de biomarcadores mediante métodos inmunológicos. En este anexo también se recogen los resultados de las búsquedas de patentes sobre métodos de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, en el resto del mundo, restringiendo el periodo de tiempo desde el año 2006. En este caso se observa que existe un mayor número de patentes del campo del diagnóstico *in vitro* que por imagen. El uso de péptidos y anticuerpos para emplear en métodos de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer ha originado la solicitud de una gran cantidad de patentes.

Por último, se ha recopilado información de dieciseis empresas que cuentan con servicios y productos para el diagnóstico molecular *in vitro*. Entre las distintas empresas que figuran en el anexo III una parte se dedican a la realización de test genéticos para analizar la predisposición a padecer la enfermedad de Alzheimer y otra parte se dedican a la producción y comercialización de diferentes kits ELISA, para la detección de los principales marcadores descritos en el presente informe.

Debido a que las técnicas de imagen requieren instalaciones especiales y se encuentran en un gran número de centros hospitalarios no se ha incluido información relativa a centros que ofrecen estos servicios.

CAPÍTULO 8

Referencias

1. Formichi, P., Battisti, C., Radi, E., Federico, A., *Cerebrospinal fluid tau, A beta, and phosphorylated tau protein for the diagnosis of Alzheimer's disease*. J Cell Physiol, 2006. **208**(1): p. 39-46.
2. Borroni, B., M. Di Luca, and A. Padovani, *Predicting Alzheimer dementia in mild cognitive impairment patients. Are biomarkers useful?* Eur J Pharmacol, 2006. **545**(1): p. 73-80.
3. Abellán García A, P.G.M., Pérez Ortiz L, Sancho Castiello M, *INFORME 2004 Las Personas Mayores en España*. Observatorio de Personas Mayores.
4. Luis CA, L.D., Acevedo A, Barker WW, Duara R., *Mild cognitive impairment: directions for future research*. Neurology, 2003. **61**(4): p. 438-44.
5. Mueller SG, D.B., *Atrophy accelerates with conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer disease*. Neurology, 2008. **70**(19 Pt 2): p. 1728-9.
6. Ewers M, B.K., Teipel SJ, Scheltens P, Schröder J, Zinkowski RP, Bouwman FH, Schönknecht P, Schoonenboom NS, Andreasen N, Wallin A, DeBernardis JF, Kerkman DJ, Heindl B, Blennow K, Hampel H., *Multicenter assessment of CSF-phosphorylated tau for the prediction of conversion of MCI*. Neurology, 2007. **69**(24): p. 2205-12.
7. Hansson O, Z.H., Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L., *Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study*. Lancet Neurol, 2006 **5**(3): p. 228-34.
8. Ray S, B.M., Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, Friedman LF, Galasko DR, Jutel M, Karydas A, Kaye JA, Leszek J, Miller BL, Minthon L, Quinn JF, Rabinovici GD, Robinson WH, Sabbagh MN, So YT, Sparks DL, Tabaton M, Tinklenberg J, Yesavage JA, Tibshirani R, Wyss-Coray T., *Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins*. Nat Med, 2007 **13**(11): p. 1359-62.
9. Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Dekosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Stern, Y., Visser, P. J., Scheltens, P., *Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria*. Lancet Neurol, 2007. **6**(8): p. 734-46.
10. Schipper, H.M., *The role of biologic markers in the diagnosis of Alzheimer's disease*. Alzheimer's & Dementia, 2007. **3**: p. 325-332.
11. Blennow, K., M.J. de Leon, and H. Zetterberg, *Alzheimer's disease*. Lancet, 2006. **368**(9533): p. 387-403.
12. Blennow, N.A.a.k., *B-Amyloid(AB) proteinin cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease*. Peptides, 2002. **23**: p. 1205-1214.
13. Andreasen, N. and K. Blennow, *CSF biomarkers for mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease*. Clin Neurol Neurosurg, 2005. **107**(3): p. 165-73.
14. Mora Pueyo F.J., F.G.A., *Marcadores biológicos en la enfermedad de Alzheimer*. Servicio de Neurología, Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
15. Andreasen, N., Hesse, C., Davidsson, P., Minthon, L., Wallin, A., Winblad, B., Vanderstichele, H., Vanmechelen, E., Blennow, K., *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): p. 673-80.
16. Andreasen, N., Minthon, L., Clarberg, A., Davidsson, P., Gottfries, J., Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Winblad, B., Blennow, K., *Sensitivity, specificity, and stability of CSF-tau in AD in a community-based patient sample*. Neurology, 1999. **53**(7): p. 1488-94.
17. Blennow, K. and E. Vanmechelen, *CSF markers for pathogenic processes in Alzheimer's disease: diagnostic implications and use in clinical neurochemistry*. Brain Res Bull, 2003. **61**(3): p. 235-42.

18. Englund, H., Sehlin, D., Johansson, A. S., Nilsson, L. N., Gellerfors, P., Paulie, S., Lannfelt, L., Pettersson, F. E., *Sensitive ELISA detection of amyloid-beta protofibrils in biological samples*. J Neurochem, 2007. **103**(1): p. 334-45.
19. Hye, A., Lynham, S., Thambisetty, M., Causevic, M., Campbell, J., Byers, H. L., Hooper, C., Rijdsdijk, F., Tabrizi, S. J., Banner, S., Shaw, C. E., Foy, C., Poppe, M., Archer, N., Hamilton, G., Powell, J., Brown, R. G., Sham, P., Ward, M., Lovestone, S., *Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease*. Brain, 2006. **129**(Pt 11): p. 3042-50.
20. Ho, L., Sharma, N., Blackman, L., Festa, E., Reddy, G., Pasinetti, G. M., *From proteomics to biomarker discovery in Alzheimer's disease*. Brain Res Brain Res Rev, 2005. **48**(2): p. 360-9.
21. Molinuevo Guix JL, R.G.L., *Aspectos generales de la enfermedad de Alzheimer*. Prous Science. Unidad Memoria-Alzheimer, Institut Clínic de Neurociències (ICN), Hospital Clínic i Provincial, Barcelona, 2007.
22. *Revisión sobre la enfermedad de Alzheimer: primera parte*. Prous Science. Departamento médico, 2006.
23. Rodríguez Fernández RM, Y.B.R., *Utilidad de la tomografía computarizada y la resonancia magnética en la valoración del paciente con demencia*. Prous Science. Servicio de Neurología, Complejo Hospitalario de Ourense,.
24. Molinuevo Guix J.L, B.G.R., *La enfermedad de Alzheimer*. Prous Science. Unidad de Memoria-Alzheimer, Servicio de Neurología-ICMSN, Hospital Clínic, Barcelona, 2003.
25. Lehericy, S., Marjanska, M., Mesrob, L., Sarazin, M., Kinkingnehun, S., *Magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease*. Eur Radiol, 2007. **17**(2): p. 347-62.
26. Ramani, A., J.H. Jensen, and J.A. Helpert, *Quantitative MR imaging in Alzheimer disease*. Radiology, 2006. **241**(1): p. 26-44.
27. Torró, C.M., *Espectroscopía por resonancia magnética de protón en el diagnóstico de tumores cerebrales*. . Jaume Gilí Planas, Juli Alonso Farré, Josep Maria Mercader Sobrequès (dir.) Tesis doctoral de la Universidad de Barcelona, Facultad de Medicina. Barcelona (1999).
28. Petrella, J.R., R.E. Coleman, and P.M. Doraiswamy, *Neuroimaging and early diagnosis of Alzheimer disease: a look to the future*. Radiology, 2003. **226**(2): p. 315-36.
29. González, L.R., *La resonancia magnética en el estudio del deterioro cognitivo*. Prous Science. Servicio de Neurología, Hospital Clínic i Universitari de Barcelona.
30. Borrie, M., *Functional neuroimaging in the diagnosis of dementia*. Alzheimer & Dementia, 2007. **3**: p. 336-340.
31. Prince, S.E., Woo, S., Doraiswamy, P. M., Petrella, J. R., *Functional MRI in the early diagnosis of Alzheimer's disease: is it time to refocus?* Expert Rev Neurother, 2008. **8**(2): p. 169-75.
32. Sánchez, I.P., *Radiofármacos PET*. Rev. Esp. Med. Nuclear, 2001. **20**(6): p. 477-498.
33. Gamez, C., *Positron emission tomography/computed tomography (PET/CT): present and future of a new imaging technique in oncology*. Cir Esp, 2005. **77**(3): p. 111-3.
34. Ruiz Guijarro, J.A., Melgarejo Icaza, M., Ossola Lentati, G., Martín Jorge, R., Ordovas Oromendia, A., Kostvintseva, O., *PET tomographies*. Rev Esp Med Nucl, 2001. **20**(7): p. 561-74.
35. Nichols, L., Pike, V. W., Cai, L., Innis, R. B., *Imaging and in vivo quantitation of beta-amyloid: an exemplary biomarker for Alzheimer's disease?* Biol Psychiatry, 2006. **59**(10): p. 940-7.
36. Suarez Fernandez, J.P., Maldonado Suarez, A., Dominguez Grande, M. L., Santos Ortega, M., Rodriguez Villalba, S., Garcia Camanaque, L., Resino, M. C., Pozo Garcia, M. A., *Positron emission tomography (PET) imaging in head and neck cancer*. Acta Otorrinolaringol Esp, 2004. **55**(7): p. 303-9.

37. Montz Andree, R., Jimenez Vicioso, A., Coullaut Jauregui, J., Lopez-Ibor Alino, J. J., Carreras Delgado, J. L., *PET in neurology and psychiatry I. PET with FDG in the study of the CNS*. Rev Esp Med Nucl, 2002. **21**(5): p. 370-86; quiz 387-9.
38. Small, G.W., Kepe, V., Ercoli, L. M., Siddarth, P., Bookheimer, S. Y., Miller, K. J., Lavretsky, H., Burggren, A. C., Cole, G. M., Vinters, H. V., Thompson, P. M., Huang, S. C., Satyamurthy, N., Phelps, M. E., Barrio, J. R., *PET of brain amyloid and tau in mild cognitive impairment*. N Engl J Med, 2006. **355**(25): p. 2652-63.
39. Klunk, W.E., Engler, H., Nordberg, A., Wang, Y., Blomqvist, G., Holt, D. P., Bergstrom, M., Savitcheva, I., Huang, G. F., Estrada, S., Ausen, B., Debnath, M. L., Barletta, J., Price, J. C., Sandell, J., Lopresti, B. J., Wall, A., Koivisto, P., Antoni, G., Mathis, C. A., Langstrom, B., *Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B*. Ann Neurol, 2004. **55**(3): p. 306-19.
40. Trampal, C., Engler, H., *PET in neurology and psychiatry. II*. Rev Esp Med Nucl, 2002. **21**(6): p. 439-55.
41. Mosconi, L., Tsui, W. H., Herholz, K., Pupi, A., Drzezga, A., Lucignani, G., Reiman, E. M., Holthoff, V., Kalbe, E., Sorbi, S., Diehl-Schmid, J., Pernecky, R., Clerici, F., Caselli, R., Beuthien-Baumann, B., Kurz, A., Minoshima, S., de Leon, M. J., *Multicenter Standardized 18F-FDG PET Diagnosis of Mild Cognitive Impairment, Alzheimer's Disease, and Other Dementias*. J Nucl Med, 2008. **49**(3): p. 390-398.
42. Caballero E., S.R., *Técnicas de neuroimagen funcional en el diagnóstico de las demencias*. Prous Science. Servicio de Neurología, Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia.
43. Rossini, P.M., Rossi, S., Babiloni, C., Polich, J., *Clinical neurophysiology of aging brain: from normal aging to neurodegeneration*. Prog Neurobiol, 2007. **83**(6): p. 375-400.
44. Osipova, D., Rantanen, K., Ahveninen, J., Ylikoski, R., Happola, O., Strandberg, T., Pekkonen, E., *Source estimation of spontaneous MEG oscillations in mild cognitive impairment*. Neurosci Lett, 2006. **405**(1-2): p. 57-61.
45. Fernandez, A., Hornero, R., Mayo, A., Poza, J., Gil-Gregorio, P., Ortiz, T., *MEG spectral profile in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment*. Clin Neurophysiol, 2006. **117**(2): p. 306-14.
46. Real Decreto 1143/2007, de 31 de agosto, por el que se modifican los Reales Decretos 634/1993, de 3 de mayo, sobre productos sanitarios implantables activos; 414/1996, de 1 de marzo, por el que se regula los productos sanitarios; y 1662/2000, de 29 de septiembre, sobre productos sanitarios para diagnóstico «in vitro».
47. Real Decreto 1662/2000, de 29 de septiembre, sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro.
48. Directiva 2004/40/CE, sobre las disposiciones mínimas de seguridad y de salud relativas a la exposición de los trabajadores a los riesgos derivados de los agentes físicos.
49. Real Decreto 1841/1997, de 5 de diciembre, por el que se establecen los criterios de calidad en medicina nuclear.
50. Real Decreto 1976/1999, de 23 de diciembre, por el que se establecen los criterios de calidad en radiodiagnóstico.
51. Real Decreto 1132/1990, de 14 de septiembre, por el que se establecen medidas fundamentales de protección radiológica de las personas sometidas a exámenes y tratamientos médicos.
52. Real Decreto 815/2001, de 13 de julio, sobre justificación del uso de las radiaciones ionizantes para la protección radiológica de las personas con ocasión de exposiciones médicas.
53. Directiva 97/43/EURATOM, relativa a la protección de la salud frente a los riesgos derivados de las radiaciones ionizantes en exposiciones médicas.
54. Real Decreto 1891/1991, de 30 de diciembre, sobre instalación y utilización de aparatos de rayos X con fines de diagnóstico médico.

55. Real Decreto 1836/1999, de 3 de diciembre, por el que se aprueba el reglamento sobre instalaciones nucleares y radiactivas.
56. *Alzheimers Disease - Beta Treatments on the Horizon*. (Research and markets) <http://www.researchandmarkets.com/reports/312407>, 2008.
57. *Emerging Diagnostic Markers in Alzheimers Disease*. Research and markets <http://researchandmarkets.com/reports/314594>, 2005.

CAPÍTULO 9

Abreviaturas

APP	Proteína precursora del β -amilode (<i>Amyloid Precursor Protein</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ApoE	Apolipoproteína E
BOLD	<i>Blood Oxygenation Level Dependent</i>
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
ERM	Espectroscopia por resonancia magnética
ESI	Electrospray (<i>Electrospray ionization</i>)
FDG	2-[¹⁸ F]-fluoro-2-desoxi-D-glucosa
LC/MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masa en tandem (<i>Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry</i>)
LCR	líquido cefalorraquídeo
MALDI-TOF	Desorción/ ionización por láser asistida por matriz acoplada a un detector de tiempo de vuelo (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight</i>)
MEG	Magnetoencefalografía
NAA	N-acetil aspartato
NINCDS-ADRDA	Instituto Nacional de Desórdenes Neurológicos, Enfermedad de Alzheimer y Desórdenes Relacionados
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PET	Tomografía por emisión de positrones
PHF	Fragmentos Helicoidales Pareados
PIB	Pittsburg Compound-B
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMNf	Resonancia magnética nuclear funcional
SPECT	Tomografía por emisión de fotón único
TAC	Tomografía axial computarizada
TC	Tomografía computarizada

vt
mi+d

fundación para el
conocimiento
madri+d