



Estudios multimodales de resonancia magnética y de líquido cefalorraquídeo en la enfermedad de Alzheimer preclínica familiar y esporádica

Juan Fortea Ormaechea

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

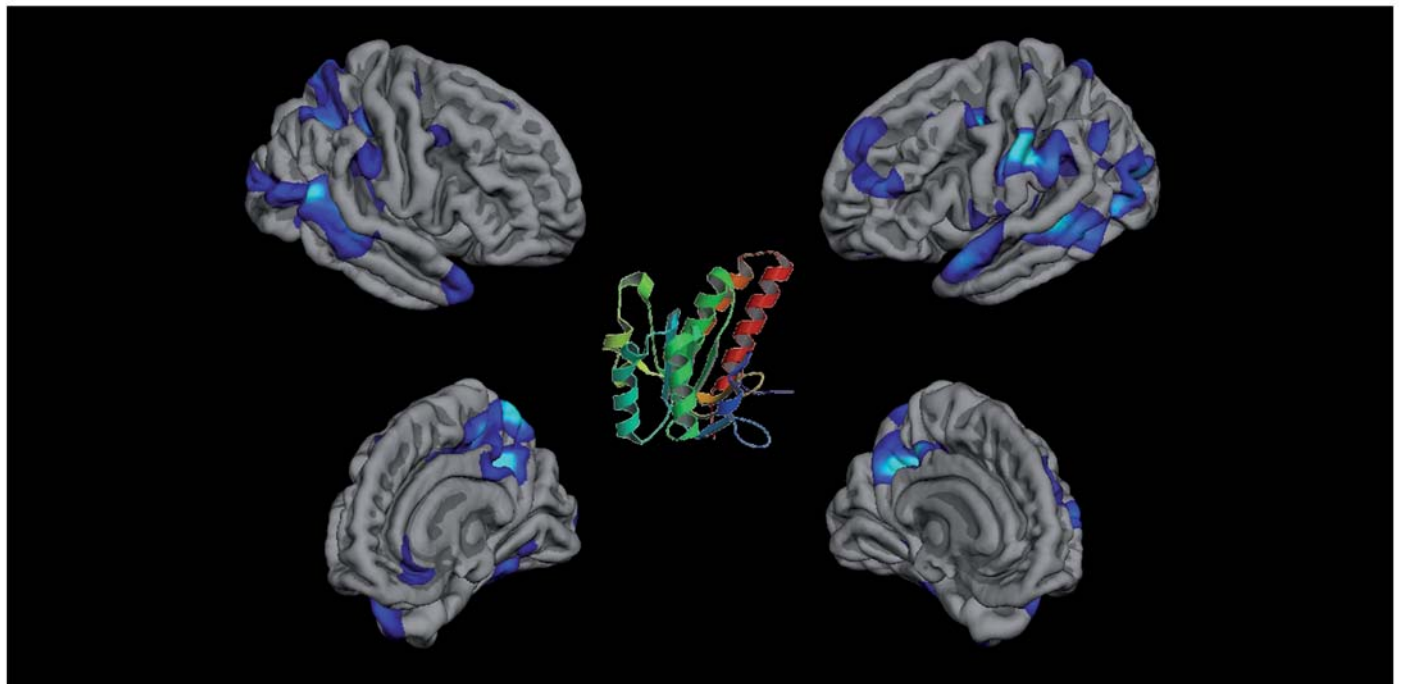
WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Programa de Doctorado de Medicina
Departament de Medicina
Universitat de Barcelona
Mayo de 2011

TESIS DOCTORAL

Estudios multimodales de resonancia magnética y de líquido cefalorraquídeo en la enfermedad de Alzheimer preclínica familiar y esporádica

Juan Fortea Ormaechea





TESIS DOCTORAL

*‘Estudios multimodales de resonancia magnética
y de líquido cefalorraquídeo en la enfermedad
de Alzheimer preclínica familiar y esporádica’*

Doctorando

JUAN FORTEA ORMAECHEA

Directores

Dr. José Luís Molinuevo Guix

Dr. David Bartrés Faz

PROGRAMA DE DOCTORADO DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE MEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Mayo de 2011

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

El Dr. JOSÉ LUIS MOLINUEVO GUIX, Doctor en Medicina por la Universidad de Barcelona, Coordinador de la Unidad de Alzheimer y otros trastornos cognitivos del Servicio de Neurología del Hospital Clínic de Barcelona y el Dr. DAVID BARTRÉS FAZ, Doctor en Psicología por la Universidad de Barcelona y Profesor Agregat del Department de Psiquiatria i Psicobiologia Clínica de la Universitat de Barcelona,

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada “*Estudios multimodales de resonancia magnética y de líquido cefalorraquídeo en la enfermedad de Alzheimer preclínica familiar y esporádica*”, presentada por Juan Fortea Ormaechea para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Barcelona se ha realizado bajo nuestra dirección y cumple todos los requisitos necesarios para ser defendida ante el Tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona.

Firmado,

Dr. José Luis Molinuevo Guix
Unidad de Alzheimer
y otros trastornos cognitivos
Servicio de Neurología
Hospital Clínic de Barcelona

Dr. David Bartrés Faz
Departament de Psiquiatria
i Psicobiologia Clínica
Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona

Barcelona, mayo de 2011

Este trabajo fue financiado por el Hospital Clínic a través de una beca fin de residencia Ajut a la Recerca Josep Font junto con la financiación del Ministerio español de Educación y Ciencia con la adjudicación de proyectos de investigación (FIS080036 a la Dra. Sánchez del Valle y el programa Miquel Servet a la Dra. Rami [CP08/00147]).

A Mateo.

INDICE:

I. Agradecimientos	15
II. Presentación.....	17
III. Glosario de abreviaturas	23
IV. Introducción	27
1. El <i>continuum</i> de la enfermedad de Alzheimer: de la demencia a la EA preclínica	29
2. La enfermedad de Alzheimer familiar y el consejo genético.....	32
3. Biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer	34
3.1. Biomarcadores genéticos	35
3.2. Biomarcadores clínicos/neuropsicológicos.....	36
3.3. Biomarcadores bioquímicos en líquido cefalorraquídeo	37
3.4. Biomarcadores de neuroimagen	38
3.5. Estudios multimodales	39
4. Biomarcadores en la EA preclínica familiar y esporádica	41
4.1. Evolución de la disfunción cognitiva en la EA preclínica.....	41
4.2. Biomarcadores en la EA preclínica familiar.....	
4.3. Biomarcadores en la EA preclínica esporádica	
5. Modelo integrado de la fisiopatología de la EA. Perfil temporal de la alteración de los diferentes biomarcadores.....	44
V. Hipótesis y objetivos	47
VI. Métodos.....	51

VII. Resultados	59
1. Trabajo 1	61
2. Trabajo 2	69
3. Trabajo 3	85
4. Trabajo 4	91
5. Trabajo 5	101
VIII. Discusión	111
1. Análisis de biomarcadores de LCR en la enfermedad de Alzheimer preclínica	113
2. Asociación de las alteraciones en biomarcadores bioquímicos en LCR y los resultados de los test neuropsicológicos	115
3. Análisis de la estructura cerebral en la fase asintomática de la enfermedad de Alzheimer preclínica	116
4. Contextualización de los hallazgos dentro del modelo dinámico de biomarcadores de la EA	117
5. Implicaciones y limitaciones de los hallazgos dentro del campo de la EA preclínica	123
IX. Conclusiones	127
X. Bibliografía	131

I. A GRADECIMIENTOS

La mejor manera de comenzar esta tesis es agradeciendo la ayuda de todas las personas que han hecho realidad este trabajo. Probablemente no sea posible hacerlo al completo, pero es una oportunidad para reconocer la inmensa colaboración y ayuda recibida.

Mi primer agradecimiento es para mis directores de tesis. De ser esta tesis una película de *gansters*, ellos serían los padrinos. José Luis me introdujo en la organización siendo todavía residente. Durante toda la singladura no ha dejado de ofrecerme oportunidades y constituir un ejemplo, por su visión estratégica para identificar problemas relevantes, su originalidad y, a la vez, realismo, que han hecho factible en la Unidad eso tan manido y difícil como es la investigación traslacional. A David quiero agradecerle, en primer lugar, su generosidad. Me abrió de par en par las puertas de su laboratorio y sentó las bases de mi formación en neuroimagen. Me ha transmitido su pasión por un mundo en el que me gustaría continuar mucho más allá de esta tesis.

La parte central de la trama se desarrolla en la Unidad de Alzheimer y otros trastornos cognitivos del Hospital Clínic donde me enseñaron la importancia del trabajo en equipo y de generar un buen ambiente de trabajo. Allí se cometían los delitos. Como en todo *thriller*, en esta tesis también hay que *chercher la femme*. En primer lugar, por tanto, quiero agradecer a Raquel su constante ayuda y apoyo y las muchas, muchas horas de discusiones que fueron cruciales en todos los trabajos. A Albert quiero agradecerle su claridad de ideas y rigor científico, rigor que comparte con Lorena, persona a la que tengo que agradecer muchos de los resultados ya que con su sentido práctico acotaba, en lo posible, mi fuga de ideas. A Bea, le agradezco su dedicación y entrega como por ejemplo, con algunas de las RM que perpetrábamos con mucha nocturnidad y menos alevosía. A Mircea, porque no permitiremos que nuestros nuevos contratos se interpongan en una bonita amistad... A Anna, Cristina, Magda y Jaume porque son el tipo de personas que generan el ambiente de trabajo idóneo y me han ayudado en más de un sentido. A Gloria y Rosa María por toda la ayuda en las PL y en hacer desaparecer las huellas del crimen.

El *Departament de Psiquiatria i Psicobiologia Clínica de la Universitat de Barcelona* es otro marco fundamental en esta historia, el lugar donde se llevaba a cabo el *Crime Scene Investigation*. Agradezco a todos sus miembros la acogida recibida. Pero quiero señalar muy especialmente toda la ayuda de Roser, la otra *femme à chercher* en esta historia. Quien conozca mis habilidades informáticas sabe de la mucha, mucha ayuda recibida. Roser ha sido fundamental en los trabajos de esta tesis.

Me refugiare en la confidencialidad que exige el símil para justificar el no dar, en lo que sigue, sino unos pocos nombres, pero queriendo aludir a muchos más. Los llamaré “Rs”. En primer lugar, a mis “coRS”, colegas conscriptos de otras organizaciones hospitalarias. En segundo lugar a los “Rs” grandes y pequeños de otros servicios con los que estableces una relación difícil de entender para los no familiarizados con las organizaciones hospitalarias y de las que muchas veces nacen bonitas amistades entre las que sólo nombraré a personas como Sira, Mireia y Cris.

Ya dentro de la renombrada organización neurológica mis “Rs” mayores, Manu, Xabi, Yarco, Jordi y Santi me enseñaron a desenvolverse en el mundo de la neurología clínica y dieron otros consejos, todos útiles y no siempre confesables. Consejos que, en la medida que pude, intenté transmitir a los siguientes en llegar. Guardo un muy grato recuerdo de las muchas horas que pasamos juntos, así como del apoyo por parte de enfermería y de personas como Betty durante todos estos años.

Quiero agradecer también al Hospital Clínic el haberme concedido el *Ajut a la Recerca Josep Font*, beca que me ha dado estabilidad laboral en estos años de trabajo, así como al Servicio de Neurorradiología por la adquisición de las imágenes de RM y al Laboratorio de Neurología Experimental por el análisis de biomarcadores en LCR.

Una mención especial a tres personas. A Sara, mi “coR”, a quien debo innumerables favores tanto dentro como fuera del hospital. A los *consiglieres*, mis compañeros de piso de estos años, auténticas tumbas: con Sergi me une la lealtad que vincula a veteranos de guerra, exR mayor, excompañero de piso, excompañero de Master y siempre un referente. Chus es una persona siempre dispuesta a hacerte favores, y un apoyo constante. Me gustaría tener también un recuerdo para mis amigos de Santander. Sé que me he dejado varios cadáveres en el armario, pero hay crímenes que no se pueden confesar y además, pese a dedicarme a la memoria, soy bastante despistado.

Last, but (desde luego) not least, la familia. A mis abuelos, a mi tío Javier y resto de la familia, pero sobre todo a mis padres y hermano; por ellos estoy aquí. A Jana, por la mucha paciencia, pero, sobre todo, por ser una magnífica madre para Mateo, y a Uca, su otra abuela. Y claro, a Mateo, por su vitalidad y alegría contagiosas y por ser el único en conseguir que me olvidara de la tesis.

Por último quiero tener unas palabras para los pacientes y voluntarios de todos los trabajos que de forma desinteresada accedieron a participar en los estudios. Ellos constituyen el objeto y el fin último de todos los trabajos. Sin su generosidad no hubiera sido posible. Espero que los resultados nos acerquen, siquiera un poco, a mejorar su calidad de vida.

Gracias a todos. Creo que hemos tirado de algunos cabos sueltos, pero a costa de enmarañar-nos en nuevos y seductores problemas que me animan a seguir en una senda que ha sido y promete seguir siendo apasionante.

II. PRESENTACIÓN

Esta tesis doctoral se estructura según las directrices de la normativa para la presentación de tesis doctorales como compendio de publicaciones aprobada por el Consejo del Departamento de Medicina el 18 de Noviembre de 1994 y ampliada el 17 de Marzo de 1999.

La presente memoria se basa en cinco artículos originales que pertenecen a una misma línea de trabajo: el estudio multimodal del *continuum* de la enfermedad de Alzheimer a través de biomarcadores de imagen y bioquímicos en líquido cefalorraquídeo en la enfermedad de Alzheimer familiar y esporádica con un especial énfasis en la EA preclínica.

Para ello se han analizado fundamentalmente dos cohortes. En primer lugar se ha analizado una cohorte de EA familiar cuyo reclutamiento fue posible gracias a la existencia del programa de información y consejo genético que está en marcha desde hace años en el hospital Clínic (el programa PICOGEN). Posteriormente y en base a los resultados obtenidos en la EA familiar extrapolamos dichos resultados a una cohorte de sujetos cognitivamente indemnes para analizar la EA preclínica esporádica.

Los hallazgos de esta tesis han conducido a una nueva caracterización del estado preclínico al inicio de la fase amiloidogénica (conformada por aquellos sujetos con valores transicionales de A β 1-42 en LCR) que se caracterizaría por un aumento del grosor cortical y del tamaño de las estructuras subcorticales. La interpretación de los hallazgos, que postulamos en base a la literatura científica, es que podrían ser secundarios al efecto tóxico de los oligómeros de A β y/o inflamación. En el trabajo de análisis de estructura cerebral en portadores asintomáticos la resonancia magnética aporta evidencias indirectas de esta interpretación.

El factor de impacto acumulado de los 5 artículos que componen la presente tesis es de 22.345 según ISI-Web of KnowledgeSM - Journal Citation Reports® de 2009.

III. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AB 1-42 *Isoforma de Beta-amiloide de 42 aminoácidos*

AD *Alzheimer's disease*

ADL *Activities of daily living*

ADNI *Alzheimer Disease Neuroimaging Initiative*

AINES *Aintinflamatorios no esteroideos*

ANOVA *Análisis de la varianza*

APOE *Apoliproteina E*

APP *Amyloid precursor protein*

CDR *Clinical Dementia Rating Scale*

CERAD *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*

CTh *Cortical Thickness*

DCL *Deterioro cognitivo leve*

DCLa *Deterioro cognitivo leve amnésico*

DSM IV *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition*

DTI *Diffusion Tensor Imaging*

DWI *Diffusion weighted imaging*

EA *Enfermedad de Alzheimer*

ELISA *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

ERP *Event-related potentials*

FA *Fractional Anisotropy*

FAQ *Functional Activities Questionnaire*

FAS *Test de fluencia verbal fonética*

FCSRT *Free and cued selective reminding test*

FDG-PET *Tomografía por emisión de positrones marcado con fluorodeoxyglucose(18F)*

FDR *False discovery rate multiple comparison error correction*

FSL *FMRIB Software Library*

FWE *Family Wise Error rate multiple comparison error correction*

GDS *Global Deterioration Scale*

HAD *Hospital Anxiety and Depression scale*

LCR *Líquido cefaloraquídeo*

MCI; aMCI *Mild cognitive impairment: amnesic mild cognitive impairment*

MD *Mean Difussivity*

MMSE *Mini Mental State Examination*

MNI *Montreal Neurological Institute*

MPRAGE *Magenetization Prepared Rapid Gradient Echo*

NINCDS ADRDA *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*

PICOGEN *Programa de información y consejo genético del Hospital Clínic de Barcelona*

PET *Positron emission tomography*

PIB *Pittsburg Compound B*

PSEN1 *Presenilina 1*

PSEN2 *Presenilina 2*

p-tau *Proteína Tau fosforilada en el residuo treonina-181*

QSM *Quejas subjetivas de memoria*

RC *Reserva cognitiva*

RM *Resonancia magnética*

ROI *Region of interest*

SPSS *Statistical Package for Social Sciences*

T@M *Test de alteración de memoria*

TMT A *Trail Making Test A*

t-tau *Proteína tau*

VBM *Voxel based morphometry*

VOSP *Visual Object and Space Perception Battery*

WAIS *Wechsler Adult Intelligence Scale*

IV. INTRODUCCIÓN

1. El *continuum* de la enfermedad de Alzheimer: de la demencia a la enfermedad de Alzheimer preclínica

La prevalencia global de demencia se estima que es de hasta 24 millones de personas, con 4,6 millones de casos nuevos de demencia cada año (un caso nuevo cada 7 segundos). El número de personas afectadas se duplicará cada 20 años hasta alcanzar unos 81,1 millones en 2040 lo que incrementará de forma dramática la ya onerosa carga social y económica que comporta. La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia (Ferri, Prince et al. 2005; Reitz, Brayne et al. 2011).

La enfermedad de Alzheimer es una entidad anatomoclínica de naturaleza degenerativa y curso progresivo. Se caracteriza clínicamente por causar una demencia y, morfológicamente, por la presencia de degeneraciones u ovillos neurofibrilares y placas seniles o neuríticas. La enfermedad es rara vez hereditaria, debida a mutaciones de diferentes genes, pero en la mayor parte de las ocasiones su presentación es esporádica, en relación con diversos factores de riesgo, entre los que sobresale la edad (Molinuevo, Peña-Casanova et al. 2009).

El diagnóstico de certeza de la EA se basa, por lo tanto, en una *dualidad clínico-patológica*: la demostración de las lesiones morfológicas características en un paciente que en vida haya presentado una clínica compatible. Ante mortem, sin embargo, el diagnóstico de la EA es de probabilidad basado en unos criterios diagnósticos definidos en 1984, los criterios del *National Institute of Neurologic, Communicative Disorders and Stroke-AD and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) (McKhann, Drachman et al. 1984). La utilidad clínica de estos criterios ha sido contrastada ampliamente en la literatura (Knopman, DeKosky et al. 2001), pero es preciso subrayar sus limitaciones. En primer lugar, presentan limitaciones como “patrón oro” ya que, pese a que la sensibilidad de estos criterios clínicos es relativamente alta (media de en torno al 80%), la especificidad es baja (media de en torno al 70%) (Knopman, DeKosky et al. 2001). En segundo lugar, la evidencia científica acumulada en los últimos años ha desembocado en la concepción de una nueva filosofía con respecto a la patología de la EA, ya que los dos pilares en los que se apoya el diagnóstico de la EA han sido matizados, tanto el grado de deterioro cognitivo necesario para el diagnóstico (o incluso más radicalmente su presencia misma) como incluso el papel patogénico de las lesiones anatomopatológicas han sido cuestionados.

Con respecto al grado de deterioro cognitivo requerido, los criterios vigentes reseñados requieren el diagnóstico clínico de una demencia, habitualmente según los criterios del *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM IV). Sin embargo, hoy está bien establecido que la EA, y en general, todas las enfermedades neurodegenerativas presentan una larga fase asintomática o preclínica que puede durar años. En este tiempo existen disfunciones neuronales e incluso una degeneración neuronal, pero sin que se manifiesten

clínicamente (DeKosky and Marek 2003). En este sentido, numerosos estudios muestran que los cambios patológicos están presentes en la EA décadas antes de que se pueda hacer un diagnóstico clínico de demencia e incluso que ésta sigue un curso predecible en la progresión de las lesiones (Davies, Wolska et al. 1988; Braak and Braak 1991; Braak and Braak 1997; Price, McKeel et al. 2009). Durante esta fase preclínica, la carga de placas neuríticas y ovillos neurofibrilares aumenta hasta el comienzo de los primeros síntomas y el posterior desarrollo de demencia.

Con respecto al papel patogénico de las lesiones es importante señalar que la relación entre el grado de neuropatología en exámenes *postmortem* y la expresión clínica de la demencia en vida de los pacientes dista de ser directa (Katzman, Terry et al. 1988) y está mediatizada por diversos factores como la reserva cognitiva (Snowdon 2003). Más aún, las placas de amiloide y los ovillos neurofibrilares que actualmente definen el proceso patológico, no lo representan de forma completa ya que éste también involucra procesos tales como la inflamación, así como pérdida neuronal, axonal y pérdida y disfunción sináptica (Perrin, Fagan et al. 2009).

Por todo ello, la evolución descrita del proceso neurodegenerativo con una larga fase preclínica constituye a la vez un reto; ¿cómo identificamos a los sujetos con estadios preclínicos y prodrómicos de la EA?; y una oportunidad, ¿podemos iniciar potenciales tratamientos que modifiquen el curso de la enfermedad antes de la aparición de los síntomas? (DeKosky and Marek 2003). En este sentido en los últimos años han surgido propuestas para adelantar el diagnóstico a estadios predemenciales.

Los estudios neuropsicológicos han mostrado que la afectación de la memoria suele ser la manifestación clínica más temprana de la EA. Por ello, los sujetos con una disfunción de la memoria son un gran foco de interés y han servido para conceptualizar varias etapas transicionales previas al diagnóstico clínico de la EA con demencia. En este sentido, el deterioro cognitivo leve amnésico (DCLa) comprende un grupo de pacientes no dementes con quejas de memoria, alteración objetiva de la memoria, pero con la cognición general y las actividades de la vida diaria preservadas (Petersen, Doody et al. 2001). El DCLa se asocia a un mayor riesgo de desarrollar una EA. En torno a un 10-15% de los DCLa progresan a una EA en un año y cerca del 50% de estos pacientes progresan a una EA después de 3 años (Mattsson, Zetterberg et al. 2009). Sin embargo el DCL, incluso en su subtipo amnésico, es heterogéneo y está lejos de ser considerado un estadio prodrómico de la EA, ya que muchos pacientes no progresan a una EA a corto plazo e incluso en un porcentaje significativo vuelve a la normalidad desde el punto de vista cognitivo. Todo ello se explica porque hasta un 30% de los DCL amnésicos presentan una patología no EA en el examen *postmortem* (Jicha, Parisi et al. 2006).

Las limitaciones señaladas de los criterios diagnósticos, tanto para la EA con demencia como para el DCLa, que, en esencia, están basados en la caracterización clínica y neuropsicológica

de los sujetos, ha conducido a un nuevo marco conceptual para el diagnóstico de la EA. Dentro de este nuevo esquema, diferentes biomarcadores que reflejen elementos centrales de la fisiopatología de la enfermedad formarían parte de los criterios diagnósticos de la EA mejorando la capacidad y fiabilidad diagnóstica, especialmente en sus estadios prodrómicos. Este nuevo paradigma queda reflejado en la propuesta de nuevos criterios de investigación para la EA por parte de *the International Working Group for New Research Criteria for the Diagnosis of AD* (Dubois, Feldman et al. 2007). El principal cambio con respecto a los criterios bien establecidos NINDS-ADRDA es que un deterioro significativo en la memoria episódica, independientemente del grado de pérdida funcional y de una evidencia in-vivo de la neuropatología específica de la EA (detectable a través de biomarcadores específicos) es suficiente para el diagnóstico de EA prodrómica, (predemencia) (Dubois, Feldman et al. 2010).

En esta línea de adelantar el diagnóstico y estudiar las fases iniciales de la EA, existe un interés creciente, no sólo en detectar la EA en su fase prodrómica como hemos señalado, sino también en avanzar su detección hacia los estadios preclínicos de la enfermedad. En este sentido los sujetos que consultan por quejas subjetivas de memoria, pero que no presentan un deterioro objetivo de la memoria (quejas subjetivas de memoria; QSM) representan una gran oportunidad para la detección temprana de la EA. Algunos estudios no han encontrado evidencias de alteraciones neuropsicológicas en las QSM, considerando la entidad como secundaria a un trastorno psicoafectivo como la depresión o la ansiedad (Lautenschlager, Flicker et al. 2005). Sin embargo otros estudios han encontrado que las QSM pueden predecir deterioro cognitivo e incluso demencia (Jessen, Wiese et al. 2010). Por lo tanto esto podría significar que un subgrupo de sujetos con QSM estarían en un estadio intermedio entre la EA preclínica y la EA prodrómica, ya que sus quejas cognitivas, pese a no confirmarse objetivamente serían su primer síntoma de EA.

Por último existe un grupo de sujetos cognitivamente indemnes y sin quejas de memoria, pero que tienen un substrato patológico de EA. Este grupo constituiría la EA preclínica propiamente dicha y haría referencia al largo estadio asintomático que va desde los más tempranos cambios patogénicos/lesiones cerebrales de EA y la primera manifestación clínica de los cambios cognitivos específicos. Sin embargo existe mucha controversia sobre la idoneidad de aplicar el término EA preclínica a estos sujetos ya que el porcentaje de sujetos que desarrollarán síntomas en un futuro es desconocido y muchos de ellos fallecerán sin ningún síntoma cognitivo (Dubois, Feldman et al. 2010).

Así, hoy en día sólo existe consenso para aplicar este término a nivel individual a aquellos sujetos portadores de una mutación determinante de EA con penetrancia completa, para los que también se ha sugerido recientemente el término EA monogénicas (Dubois, Feldman et al. 2010). En este mismo trabajo, *Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon*, distinguen dos estadios preclínicos que pueden ser evidenciados en vida:

- *Asintomáticos en riesgo para EA*: aquellos sujetos con una evidencia de una amiloidosis en el cerebro bien sea a través de retención de marcadores de amiloide específicos en PET o bien en el LCR a través de la detección de cambios en β -amiloide, t-tau y p-tau.
- *EA presintomática*: individuos que desarrollarán EA por ser portadores de una mutación monogénicas determinante de EA.

El *continuum* de la EA abarcaría, por lo tanto, una larga secuencia de eventos en la que podemos definir diferentes estadios. En primer lugar, existiría una larga fase preclínica que puede durar décadas; eventualmente, un subgrupo de sujetos presentarían quejas subjetivas de memoria como primera manifestación y, posteriormente, todos desarrollarían una pérdida objetiva de memoria en los test neuropsicológicos y, finalmente el desarrollo de una demencia.

EA preclínica → (QSM) → EA prodrómica → EA con demencia

2. La enfermedad de Alzheimer familiar y el consejo genético

La mayor parte de los casos de demencia que se producen en los países desarrollados se presentan a una edad senil, relacionados con patologías ligadas al envejecimiento y no determinados genéticamente, si bien los factores genéticos pueden jugar un papel predisponente. Es por ello por lo que la planificación sanitaria, de apoyo social y de investigación se ha centrado en este colectivo (Rice, Fillit et al. 2001). Sin embargo, de un 1 a un 5% de los casos de demencias neurodegenerativas se encuentran determinados genéticamente, por la presencia de una mutación en un gen implicado en la patogenia de la enfermedad y se heredan con un patrón autosómico dominante (Llado, Gaig et al. 2006). En torno a un 1% de los casos de enfermedad de Alzheimer (EA) se encuentran determinados por la presencia de mutaciones en los genes de presenilina 1 (*PSEN1*), presenilina 2 (*PSEN2*) o proteína precursora de amiloide (*APP*) (Lleo, Blesa et al. 2002).

Los sujetos portadores de mutaciones causantes de demencia neurodegenerativa, si bien nacen con la alteración genética, presentan un desarrollo psicomotor normal y el inicio de síntomas evidentes se retrasa hasta edades comprendidas entre la 3^o a la 6^o década de la vida. La EA familiar, tanto desde el punto de vista clínico como neuropatológico, presenta una gran similitud con la EA esporádica, si bien están descritas algunas peculiaridades en algunas mutaciones/familias (Lleo, Berezovska et al. 2004). Junto con la edad de inicio presenil, y especialmente para el caso de los portadores de *PSEN1*, otras dos características del Alzheimer familiar son que los portadores de mutaciones de *PSEN1* tienen una penetrancia prácticamente completa a los 65 años y que dentro de una misma familia la edad de comienzo de los síntomas está relativamente preservada (Fox, Kennedy et al. 1997). Este

hecho permite definir un constructo teórico, la edad ajustada, que se define como la edad del sujeto con respecto a la edad de inicio de los síntomas en la familia.

Edad ajustada = Edad del sujeto portador - Edad de presentación en la familia

A pesar de su menor prevalencia, el estudio de los casos genéticos tiene una gran relevancia:

a) Desde un punto de vista clínico, por cuanto al presentarse habitualmente a edades mucho más precoces de la vida que las formas típicas tienen implicaciones personales, sociales, familiares, laborales y legales muy diferentes y con frecuencia dramáticas. Además la detección de una causa genética en un paciente tiene repercusiones inmediatas en sus familiares directos, situándolos en una posición de riesgo de desarrollar ellos mismos la enfermedad en un futuro. Por otra parte, la implicación de los factores genéticos en la patogenia de la enfermedad, bien sea de forma determinante, como en los casos genéticos, bien de forma predisponente, como factores de riesgo genético, genera en la población a riesgo de demencia una demanda de información habitualmente no cubierta por los dispositivos asistenciales habituales.

Por todo ello, con el objetivo de ofrecer asesoramiento genético a pacientes con demencia y a sus familiares y acumular una experiencia en el asesoramiento específico de sujetos a riesgo de demencias genéticamente determinadas, en el año 2001, se puso en marcha en el Hospital Clínic de Barcelona un programa multidisciplinar de Información y Consejo GENético para demencias familiares, el programa PICOGEN (Molinuevo, Pintor et al. 2005), fundamentado en la experiencia disponible y en las guías de práctica clínica sobre asesoramiento genético en la enfermedad de Huntington (Wiggins, Whyte et al. 1992). En el momento actual existen muy pocos programas semejantes y la experiencia publicada de los mismos es muy escasa (Kowalska 2004).

b) Desde un punto de vista de la de la investigación, porque **representan un modelo biológico de enfermedad excepcional**, ya que en estos casos es posible determinar a nivel biológico la causa inicial del proceso degenerativo, ayudando a comprender la patogenia y fisiopatología de estas enfermedades y, por ende, en el desarrollo de nuevas terapias. Es importante subrayar que buena parte del gran desarrollo en el conocimiento de los mecanismos biológicos en los últimos años proviene del estudio de modelos biológicos basados en estos casos.

La hipótesis de la cascada del amiloide (Hardy and Higgins 1992) postula que la el evento inicial y desencadenante tanto de la EA familiar como esporádica es un desequilibrio entre la producción y eliminación de A β en el cerebro, causando un aumento en los niveles del péptido que eventualmente desencadena el resto de mecanismos que conducen a una demencia (Figura 1). Los datos más convincentes que la apoyan provienen precisamente de las familias con mutaciones en el gen PSEN1, PSEN2 o APP (Hardy 2006; Jack, Knopman et al. 2010).

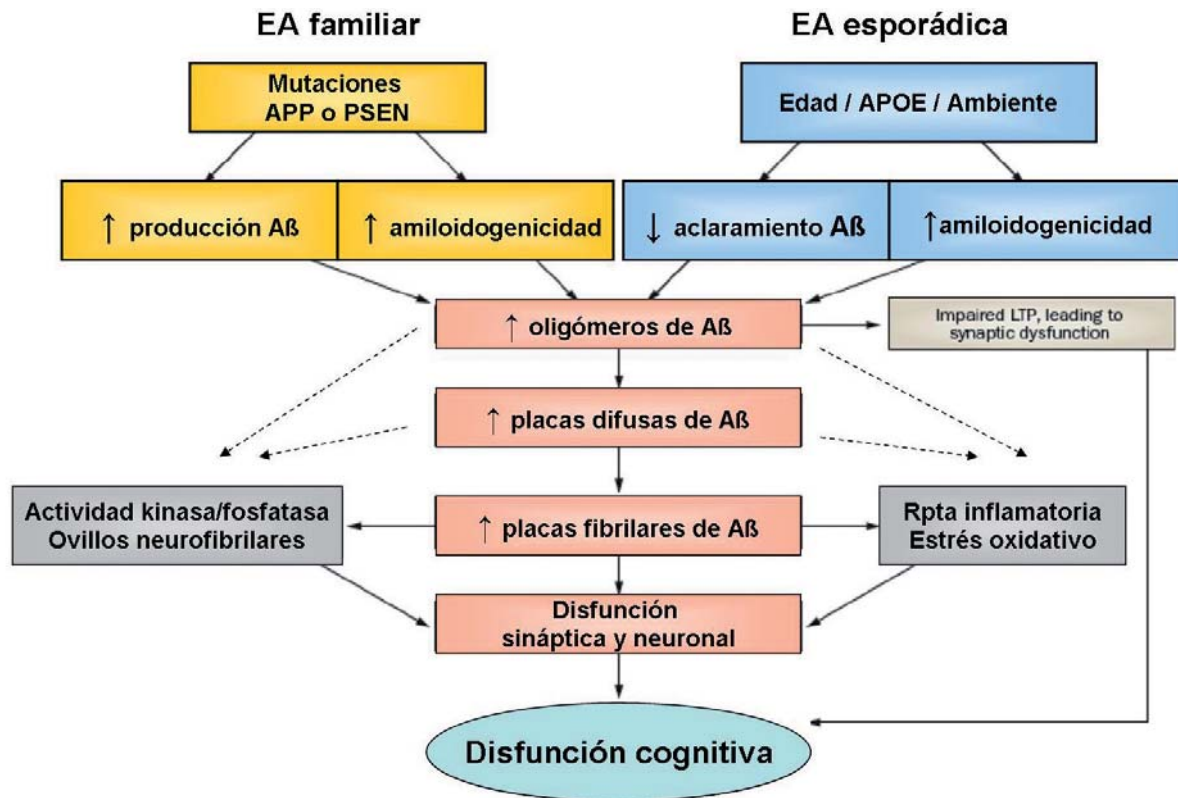


FIGURA 1. La hipótesis de la cascada del amiloide de la enfermedad de Alzheimer. Adaptado de Blennow et al (Blennow, Hampel et al. 2010). Las líneas de puntos no se encontraban en la figura original.

Por todo ello estos sujetos han ayudado, por analogía, a establecer parámetros para diagnóstico precoz, de las formas no genéticas y más frecuentes de demencia, y ofrecen un grupo de sujetos excepcional para la monitorización de terapias modificadoras del curso de la enfermedad, cuyo beneficio máximo, como se ha dicho, es esperable que ocurra cuando se inicien en fases precoces de la enfermedad, antes de que la neurodegeneración esté muy extendida.

3. Biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer

Los marcadores biológicos, o biomarcadores, pueden definirse como aquellas características evaluables y medibles objetivamente que son indicadores de procesos biológicos normales, patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (2001).

En el caso de las enfermedades neurodegenerativas, no obstante, dada la multiplicidad de etiologías y procesos patológicos subsiguientes que subyacen a la enfermedad de Alzheimer

y la heterogenicidad en la expresión y en la progresión de las manifestaciones clínicas se hará necesario el estudio de las mismas con una combinación de biomarcadores (estudios multimodales) para el estudio de las diferentes fases de la enfermedad. Una utilidad añadida de estos biomarcadores podría ser, además, su uso como marcadores “subrogados” de la eficacia de tratamientos modificadores de la enfermedad. En primer lugar, porque, si bien cualquier tratamiento finalmente habrá de demostrar su eficacia en variables de interés clínicas, en las “fases iniciales” dichas variables -normalmente instrumentos cognitivos- no han resultado útiles. En segundo lugar, porque al presentar menos variabilidad que las evaluaciones clínicas, reducirían el número de pacientes necesarios y probablemente acortarían los tiempos de seguimiento de los ensayos clínicos (Dickerson and Sperling 2005).

Los biomarcadores para una detección precoz de una enfermedad neurodegenerativa pueden ser divididos en 4 categorías principales: genéticos, clínicos/neuropsicológicos, bioquímicos y de neuroimagen. Con independencia de la modalidad del biomarcador, los biomarcadores también se han dividido biomarcadores fisiopatológicos porque reflejan los eventos etiológicos de la EA y topográficos que serían su consecuencia y que correlacionarían con la distribución de las lesiones en la EA (Dubois, Feldman et al. 2010).

3.1. Biomarcadores genéticos

Desde el punto de vista genético, además de la identificación las mutaciones en los genes de APP, PSEN1 y PSEN2 causantes del Alzheimer familiar, en la EA esporádica, la presencia del alelo $\epsilon 4$ de apoE es el único marcador genético que se ha demostrado asociado a un mayor riesgo de padecer EA y a una edad más temprana de presentación de forma consistente. Su efecto parece dependiente de la dosis génica siendo el riesgo mucho más elevado en los homocigotos que en los heterocigotos (Corder, Saunders et al. 1993). Otras isoformas de apoE son consideradas neutrales (alelo $\epsilon 3$) o protectoras (alelo $\epsilon 2$).

El efecto del apoE parece estar mediatizado por una disfunción en el metabolismo del amiloide, aunque otros mecanismos como un incremento en la susceptibilidad para la disfunción sináptica/pérdida neuronal y una posible interferencia en los mecanismos compensadores/neuroprotectores puedan estar asimismo involucrados (Cedazo-Minguez 2007). De esta manera existen claras evidencias sobre el efecto del alelo $\epsilon 4$ de apoE sobre el metabolismo del amiloide, pero su relación con tau o p-tau no está tan clara. En este sentido se ha afirmado que el incremento del depósito del amiloide con la edad es el fenotipo patobiológico del ApoE4 y se ha sugerido una secuencia en la que dicho depósito sería detectable primero a través de un descenso en los niveles de A β 1-42 y después mediante un incremento en la captación del PIB (Morris, Roe et al. 2010).

Los estudios de neuroimagen han reforzado el papel del alelo $\epsilon 4$ de apoE como factor de riesgo para la EA. De esta manera, tanto el hipometabolismo cerebral como la atrofia cerebral son más marcados en portadores del alelo $\epsilon 4$ de apoE, tanto en sujetos cognitivamente sanos como en DCL (Reiman, Caselli et al. 1996; Burggren, Zeineh et al. 2008; Drzezga, Grimmer et al. 2009). En cualquier caso, y pese a la gran influencia del apoE, una gran proporción de la heredabilidad de la EA continúa inexplicada por los genes identificados hasta la fecha (Bertram, Lill et al. 2010).

3.2. Biomarcadores clínicos/neuropsicológicos

La enfermedad de Alzheimer típica presenta un patrón de alteraciones neuropsicológicas específico, y como hemos dicho, es un elemento cardinal para el diagnóstico de la EA prodrómica (Dubois, Feldman et al. 2010). Este patrón de alteraciones neuropsicológicas se ha correlacionado con el patrón regional de alteraciones neuropatológicas. De este modo, la propagación topográfica de la patología neurofibrilar iniciada en la corteza entorrinal y el hipocampo y que posteriormente se extiende a las áreas neocorticales de asociación (Braak and Braak 1991), tiene un correlato en el patrón típico de cambios cognitivos que comienzan con un síndrome amnésico de tipo hipocampal (Sarazin, Berr et al. 2007) a menudo asociado a cambios menos específicos en las funciones ejecutivas, de nominación o procesos atencionales (Dubois, Feldman et al. 2010). De hecho la especificidad de las alteraciones neuropsicológicas de la EA está bien documentada y así se han descrito alteraciones en sujetos que progresan a EA con gran sensibilidad (Sarazin, Berr et al. 2007).

Este síndrome se diagnostica basándose en el deterioro de memoria referido en la anamnesis por el paciente y su familia así como en los test neuropsicológicos que evalúan la memoria episódica como el *Free and Cued Selective Reminding Test* (FC-SRT) que evalúa la capacidad de retención de información y de contextualización del hipocampo (Grober, Buschke et al. 1988). Por lo tanto, pese a que existen variantes fenotípicas bien establecidas de la EA que no siguen el patrón descrito, un síndrome amnésico de tipo hipocampal es un elemento cardinal para el diagnóstico de la EA prodrómica y EA típica. Los síndromes corticales focales como la afasia progresiva no fluente, la afasia logopénica (Gorno-Tempini, Brambati et al. 2008; Rabinovici, Jagust et al. 2008), la atrofia cortical posterior (Migliaccio, Agosta et al. 2009) y la variante frontal de la EA (Alladi, Xuereb et al. 2007; Grossman, Libon et al. 2007; Taylor, Probst et al. 2008) pasan a denominarse en la nueva nomenclatura de la EA como enfermedad de Alzheimer atípica siempre que además de los síndromes enumerados se apoyen en la presencia de biomarcadores de EA que pasamos a describir a continuación (Dubois, Feldman et al. 2010).

3.3. Biomarcadores bioquímicos en líquido cefalorraquídeo

El líquido cefalorraquídeo (LCR) está en contacto directo con el espacio extracelular del cerebro por lo que es un candidato perfecto para el estudio de los cambios bioquímicos que se relacionen con la patología de la EA. Los marcadores bioquímicos deberían reflejar aspectos centrales de los procesos patogénicos (depósito de β -amiloide, la fosforilación de tau con la consiguiente formación de ovillos neurofibrilares y la degeneración neural) (Blennow and Hampel 2003). En este sentido biomarcadores del LCR tales como el $A\beta$ 1-42, la proteína tau (t-tau) o la proteína tau fosforilada (p-tau) se han demostrado útiles en el diagnóstico de la EA. Son, por lo tanto, biomarcadores fisiopatológicos de la EA (Dubois, Feldman et al. 2010). Estos marcadores han demostrado en diferentes ensayos una sensibilidad y especificidad de en torno al 80-90% para distinguir entre EA y controles (Blennow and Hampel 2003; Shaw, Vanderstichele et al. 2009).

La isoforma $A\beta$ 1-42 es el mayor componente de las placas de amiloide y ha demostrado tener la mayor tendencia a la agregación y ser la más rápida en la formación de placas en modelos experimentales. Un estudio de base poblacional encontró en el estudio neuropatológico una fuerte asociación entre unos valores bajos de $A\beta$ 1-42 en el LCR y un mayor número de placas en el neocórtex y en el hipocampo (Strozyk, Blennow et al. 2003). La proteína tau se localiza en los axones de las neuronas y su concentración es un reflejo de la intensidad de la degeneración neuronal del proceso neurodegenerativo (Blennow and Hampel 2003). Unos niveles de proteína tau anormalmente altos (en combinación con niveles bajos de $A\beta$ 1-42) en LCR se correlacionan con los hallazgos neuropatológicos de EA (Tapiola, Alafuzoff et al. 2009). La concentración de p-tau en LCR por su parte refleja el estado de fosforilación de tau en el cerebro en los pacientes con EA y añade especificidad ya que sus niveles no se elevan en procesos tales como el ictus o la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Blennow, Hampel et al. 2010; Hampel, Blennow et al. 2010).

Los biomarcadores de LCR no sólo han demostrado ser biomarcadores de estado, sino que han demostrado ser también biomarcadores pronóstico. La capacidad predictiva de los biomarcadores del LCR para detectar la progresión cognitiva en sujetos de alto riesgo para la EA ha sido evaluada mediante estudios longitudinales. Así los biomarcadores en LCR son capaces de discriminar los DCL con alta probabilidad para la conversión a EA aunque las cifras de conversión a EA varían de un estudio a otro por diversos factores entre los que destaca el tiempo de seguimiento (Riemenschneider, Lautenschlager et al. 2002; Hansson, Zetterberg et al. 2006; Parnetti, Lanari et al. 2006; Mattsson, Zetterberg et al. 2009). A la hora de establecer una cronopatología de eventos es importante reseñar que Hansson et al. no encontraron diferencias significativas en los niveles de tau o $A\beta$ 1-42 entre los pacientes con DCL que progresaron a EA al cabo de un año de los que convirtieron a los de 5 años de seguimiento. Los biomarcadores de LCR son, por lo tanto, marcadores pronóstico en pacientes con DCL, y no sólo de estado y su alteración antecede en varios años a la aparición clínica de la demencia.

3.4. Biomarcadores de neuroimagen

3.4.1. Biomarcadores de depósito de amiloide

El depósito de β -amiloide en el cerebro puede detectarse *in vivo* no sólo a través del descenso en los niveles de β -amiloide como se ha señalado, sino que es posible su detección mediante estudios con PET. El compuesto más frecuentemente utilizado, el *Pittsburg Compound B*, PIB (Klunk, Engler et al. 2004), ha demostrado su capacidad para detectar el A β fibrilar (y menos para las placas difusas) en numerosos estudios (Archer, Edison et al. 2006; Morris, Roe et al. 2010) y su correlación con los cambios anatomopatológicos ha sido confirmada. (Ikonomic, Klunk et al. 2008). De esta manera los pacientes con EA suelen presentar una retención marcada de PIB en las áreas corticales de asociación en la corteza frontal, parietal, temporal y occipital (Klunk, Engler et al. 2004), siendo la captación especialmente robusta en las placas de amiloide compactas localizadas en las cortezas prefrontal y temporal.

Los biomarcadores de depósito de amiloide, al igual que los biomarcadores de LCR, entraría dentro de la categoría de biomarcador fisiopatológico (Dubois, Feldman et al. 2010). Asimismo, es importante reseñar que varios estudios transversales han demostrado la relación inversa que existe entre el depósito fibrilar de PIB y los niveles de A β 1-42 en el LCR (Fagan, Mintun et al. 2006; Grimmer, Riemenschneider et al. 2009).

3.4.2 Biomarcadores de neuroimagen estructural

La neuroimagen estructural ha sido una herramienta diagnóstica para el estudio de demencias desde hace décadas, si bien ha sido el importante desarrollo de nuevas técnicas y programas de análisis de imágenes automático en los últimos años lo que ha permitido su introducción definitiva en la investigación en este campo.

La resonancia magnética ha demostrado ser una técnica útil para la caracterización de cambios estructurales precoces asociados a los estadios preclínico y prodrómico de la EA. Así tanto la atrofia hipocampal como unos volúmenes reducidos en la corteza entorrinal predicen la conversión a EA en sujetos con DCL (Devanand, Pradhaban et al. 2007). La *voxel-based morphometry* (VBM), una técnica que detecta la atrofia cerebral regional mediante una comparación a nivel de voxel (voxel-wise comparison) de los volúmenes de sustancia gris o blanca entre grupos de sujetos (Good, Johnsrude et al. 2001), ha probado ser sensible en la detección de cambios de estructurales en las enfermedades neurodegenerativas (Whitwell, Shiung et al. 2008; Jack, Lowe et al. 2009; Sole-Padullés, Bartres-Faz et al. 2009). Los cambios estructurales producidos por los eventos fisiopatológicos primarios son, así, detectables mediante la RM estructural y las alteraciones encontradas correlacionan con los estadios neurofibrilares de Braak (Braak and Braak 1991; Vemuri, Whitwell et al. 2008). Entraría, por lo tanto, dentro de la clasificación de biomarcadores topográficos (Dubois, Feldman et al. 2010).

Más recientemente se han desarrollado métodos que permiten medir el grosor cortical (CTh) en toda la corteza cortical (Fischl and Dale 2000). Estas técnicas han mostrado su utilidad en la detección de un adelgazamiento cortical muy extendido desde las fases iniciales de la EA esporádica (Desikan, Cabral et al. 2009), e incluso es capaz de detectar alteraciones en sujetos sanos asintomáticos en quienes un PET-PIB positivo sugiere un depósito cortical de amiloide (Dickerson, Bakkour et al. 2009). Esta técnica ha demostrado su utilidad en la evaluación de sutiles cambios estructurales longitudinales en portadores de mutaciones de APP y PSEN1, encontrando una disminución del grosor cortical en el cíngulo posterior y en el precuneus antes de la aparición de los síntomas (Knight, Kim et al. 2009).

Las imágenes por tensor de difusión (DTI) permiten la investigación de la integridad de la microestructura del cerebro sobre la base del estudio de la direccionalidad de la difusión de las moléculas de agua. Esta técnica permite el estudio de varios índices como la anisotropía fraccional (FA), que es probablemente la más utilizada y refleja una medida de la direccionalidad preferente de las moléculas de agua o la difusividad media (MD), que proporciona una medida escalar de la difusividad total de las moléculas de agua. En la EA y en el DCL se han demostrado reducciones de la FA con una predominancia en áreas posteriores que en una gran medida eran secundarios a la atrofia cerebral (Bosch, Arenaza-Urquijo et al. 2010). A pesar de que estos índices han sido más ampliamente estudiados en la sustancia blanca, la MD también puede ser utilizada en el estudio de la integridad de la sustancia gris en la EA y el DCL (Muller, Greverus et al. 2007), y es probable que su uso se pueda extender a la EA preclínica.

3.5. Estudios multimodales

La complejidad de los procesos patológicos de la EA no puede ser recogida por un solo biomarcador, por lo que se hace necesario el estudio de la enfermedad con una combinación de biomarcadores (estudios multimodales) para el estudio de las diferentes fases de la enfermedad.

3.5.1. Asociación entre los niveles de biomarcadores en LCR y el rendimiento neuropsicológico

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por una lenta y progresiva disminución de las funciones cognitivas, sobre todo de memoria. Las posibles asociaciones entre los marcadores de LCR y la cognición están siendo estudiadas, habiéndose centrado la mayor parte de la investigación en las asociaciones entre los niveles de líquido cefalorraquídeo y la cognición en DCL o EA sin incluir los pacientes con quejas subjetivas de memoria (SMC) o sujetos sanos cognitivamente indemnes.

Los estudios hasta la fecha sólo han descrito la asociación con pruebas cognitivas generales, como el *minimal state examination* -MMSE- (Mollenhauer, Bibl et al. 2006; Wallin, Blennow et al. 2006), o se han limitado a una descripción cognitiva limitada de los sujetos incluidos, siendo pocos los estudios que han examinado la asociación entre los niveles de biomarcadores en LCR y otros dominios no mnésicos utilizando una amplia batería neuropsicológica (Lin, Cheng et al. 2009).

La investigación hasta la fecha ha encontrado correlaciones significativas entre las medidas generales de cognitivas y los niveles totales de tau, pero correlaciones muy bajas con A β 1-42 (Ivanoiu and Sindic 2005; Mollenhauer, Bibl et al. 2006; Wallin, Blennow et al. 2006; Lin, Cheng et al. 2009). Una excepción reciente es el artículo de Hildebrandt et al., que mostró que la memoria de reconocimiento correlacionaba con A β 1-42, mientras que tau total no se correlacionó con las medidas neuropsicológicas (Hildebrandt, Haldenwanger et al. 2009).

3.5.2. Asociación entre los niveles de biomarcadores en LCR y resonancia magnética estructural

Las asociaciones entre la severidad clínica, y los biomarcadores bioquímicos de LCR y estructurales en RM están siendo investigadas. Como hemos visto, tanto los biomarcadores bioquímicos (Strozyk, Blennow et al. 2003; Tapiola, Alafuzoff et al. 2009) como los de RM (Vemuri, Whitwell et al. 2008), se correlacionan con los hallazgos neuropatológicos de EA; sin embargo, la relación entre los niveles de los biomarcadores bioquímicos y la estructura cerebral parece estar mediatizada por grupo clínico de los sujetos.

Los niveles de t-tau y p-tau en el LCR se correlacionan con la atrofia cerebral e hipocampal en sujetos con DCL y EA con demencia tanto en estudios transversales como longitudinales (de Leon, DeSanti et al. 2004; Herukka, Pennanen et al. 2008). Pero también se ha demostrado que su uso combinado mejora la capacidad diagnóstica de cada uno por separado (de Leon, DeSanti et al. 2004; Brys, Glodzik et al. 2009; Walhovd, Fjell et al. 2010). En este sentido es importante señalar que los niveles de tau en LCR correlacionan positivamente con la severidad clínica (Shaw, Vanderstichele et al. 2009), pero también los niveles de tau alcanzan una meseta o asíntota cuando se alcanza un determinado nivel de severidad clínica. Este hecho puede ayudar a explicar el hallazgo de un mayor poder discriminatorio para la clasificación clínica de la RM y una mejor correlación con la cognición y estado funcional que los niveles de biomarcadores en LCR, pese a su demostrada complementariedad (Vemuri, Wiste et al. 2009).

La relación entre los niveles de A β 1-42 en LCR y la estructura cerebral está también mediatizada por el grupo clínico como demuestran los trabajos de Fagan et al. que encontraron una correlación negativa entre los niveles de A β 1-42 y el volumen cerebral sólo en las fases preclínicas (Fagan, Head et al. 2009). Del mismo modo Chetelat et al. mostró en la cohorte del AIBL aus-

traliano que sólo en los sujetos con QSM existía una relación entre la estructura cerebral y las medidas de atrofia en RM (Chetelat, Villemagne et al. 2010). El amiloide por lo tanto también parece tener una relación con medidas estructurales en las etapas preclínicas que abordaremos con más profundidad más adelante al analizar los biomarcadores en la EA preclínica.

4. Biomarcadores en la EA preclínica familiar y esporádica

4.1. Evolución de la disfunción cognitiva en la EA preclínica

Se acepta que la disfunción cognitiva en la EA comienza varios años antes del diagnóstico de la EA en su fase de demencia; sin embargo el inicio de la disfunción cognitiva en la EA preclínica es un tema controvertido. Recientemente varios trabajos han mostrado que esta disfunción cognitiva puede comenzar más de una década antes del inicio de una demencia. Un estudio muy reciente en Alzheimer familiar con un muy elevado número de portadores (N=449) mostró que la disfunción cognitiva puede ser detectada hasta dos décadas antes del inicio de la demencia en los portadores de la mutación E280A de la presenilina-1 (Acosta-Baena, Sepulveda-Falla et al. 2011). En este mismo sentido en estudios poblacionales de envejecimiento se han detectado alteraciones en el rendimiento cognitivo incluso más de una década antes del inicio del síndrome de demencia tanto en estudio transversales (Snowdon, Kemper et al. 1996; Elias, Beiser et al. 2000; Riley, Snowdon et al. 2005) como longitudinales (Amieva, Jacqmin-Gadda et al. 2005; Amieva, Le Goff et al. 2008). En estos últimos, basados en el estudio *PAQUID* demostraron que existía un proceso dinámico de disminución del rendimiento cognitivo hasta 12 años antes del diagnóstico de demencia en procesos tales como la memoria semántica y la capacidad de abstracción (Amieva, Le Goff et al. 2008). Estos estudios, por lo tanto, muestran que la EA tiene una fase prodrómica particularmente larga y progresiva durante la cual emergen sucesivamente los síntomas cognitivos, depresivos y la alteración en las actividades instrumentales de la vida diaria.

4.2. Biomarcadores en la EA preclínica familiar

4.2.1. Biomarcadores de amiloidopatía

Existen varios trabajos que han estudiado el depósito del β -amiloide en portadores asintomáticos de mutaciones en PSEN1 o APP. Estudios con PET-PIB en portadores de mutaciones de PSEN1 muestran el patrón de captación cortical del PIB descrito en la EA esporádica, pero los portadores asintomáticos parecen mostrar algunas peculiaridades con respecto a dicho patrón al presentar una retención intensa y focal de PIB en el estriado de todos los portadores incluso 10 años antes del teórico inicio de la EA que no parece acompañarse con síntomas clínicos (Klunk, Price et al. 2007; Villemagne, Ataka et al. 2009).

Existen, asimismo, escasos estudios de biomarcadores bioquímicos en el LCR de portadores de mutaciones determinantes de Alzheimer familiar. Los portadores sintomáticos de APP, PSEN1 y PSEN2 presentan la huella en el LCR de la enfermedad de Alzheimer (“AD signature”) (Matsushita, Arai et al. 2002). Sin embargo, hay pocos estudios que hayan analizado los biomarcadores en LCR en portadores de mutaciones asintomáticos y no son totalmente concordantes (Almkvist, Axelman et al. 2003; Moonis, Swearer et al. 2005; Ringman, Younkin et al. 2008).

4.2.2. Biomarcadores de resonancia magnética

La capacidad de la resonancia magnética para detectar cambios muy precoces en la EA preclínica ha quedado demostrada en los estudios realizados en el Alzheimer familiar. Así, la neuroimagen funcional ha mostrado alteraciones funcionales en áreas vulnerables de la EA incluso hasta 30 años antes del inicio teórico de la enfermedad (Mondadori, Buchmann et al. 2006), y la espectroscopia por RM ha sido capaz de detectar alteraciones hasta una década antes del comienzo teórico de los síntomas (Godbolt, Waldman et al. 2006).

Asimismo, se ha demostrado que existen cambios estructurales en los portadores asintomáticos de mutaciones determinantes, como una atrofia del lóbulo temporal medial y atrofia cerebral global (Schott, Fox et al. 2003), un adelgazamiento cortical en el cíngulo posterior y el precuneus que serían detectables hasta 4-5 años antes del inicio de los síntomas (Knight, Kim et al. 2009) y una pérdida acelerada de sustancia gris (Ridha, Barnes et al. 2006). Por lo tanto, si bien los cambios estructurales en portadores de mutaciones son detectables antes del comienzo de los síntomas, la evidencia actual sugiere que la atrofia cerebral comienza más tarde que las alteraciones funcionales (Mosconi, Sorbi et al. 2006) o la espectroscopia (Godbolt, Waldman et al. 2006).

4.3. Biomarcadores en la EA preclínica esporádica

4.3.1. Biomarcadores de amiloidopatía en sujetos sanos cognitivamente indemnes

Estudios poblacionales en envejecimiento han puesto de manifiesto que un porcentaje elevado y creciente con la edad de sujetos cognitivamente indemnes presentan cambios anatomopatológicos compatibles con el diagnóstico de una EA. De manera análoga, al ser los biomarcadores bioquímicos en LCR un reflejo de la neuropatología de la EA, un porcentaje elevado (y similar al descrito en serias anatomopatológicas) presentan una alteración en los niveles de biomarcadores en la EA (Morris, Roe et al. 2010). De todos ellos (A β 1-42, t-tau y p-tau), los marcadores de depósito de amiloide serían los más precoces (Jack, Knopman et al. 2010). Recientemente se ha convenido en denominar a estos sujetos como asintomáticos en riesgo (Dubois, Feldman et al. 2010), debido a la incertidumbre sobre la evolución y pronóstico de los sujetos.

4.3.2. Asociación entre los niveles de biomarcadores en LCR y el rendimiento neuropsicológico en la EA preclínica

Como hemos señalado, tanto las alteraciones bioquímicas como la disminución del rendimiento cognitivo comienzan años antes del inicio de la demencia. Sin embargo las posibles asociaciones entre los marcadores de LCR y la cognición resultan especialmente desconocidas en las fases predemenciales y preclínicas del espectro cognitivo de la EA. La asociación entre los biomarcadores en LCR y el rendimiento neuropsicológico, sin embargo, se demuestra en estudios longitudinales que muestran un mayor riesgo de deterioro cognitivo en el seguimiento en aquellos sujetos con QSM o DCL que presentan un perfil de EA en el LCR (Visser, Verhey et al. 2009) o en aquellos sujetos sanos con un ratio alterado de tau/A β en LCR (Fagan, Roe et al. 2007). De la misma manera, también se ha demostrado en estudios longitudinales de sujetos cognitivamente sanos que los sujetos con una mayor captación en PET-PIB presentan un riesgo de empeoramiento cognitivo y conversión a EA más elevado (Fagan, Roe et al. 2007; Morris, Roe et al. 2009; Chetelat, Villemagne et al. 2011; Villemagne, Pike et al. 2011).

4.3.3. Asociación entre los niveles de biomarcadores en LCR y resonancia magnética estructural en la EA preclínica

Como hemos visto, en las fases sintomáticas de la EA, incluida su fase prodrómica (Dubois, Feldman et al. 2010), el biomarcador de LCR que mejor correlaciona con la atrofia en la RM es t-tau y p-tau. La relación entre los biomarcadores de LCR y la estructura cerebral medida con RM en sus fases preclínicas ha sido poco estudiada. Tal y como ha sido apuntado, el descenso en el A β 1-42 es la anomalía bioquímica más precoz. De esta manera, elucidar la relación entre el depósito de β -amiloide y la estructura cerebral en la EA es esencial para el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad en sus fases preclínicas más tempranas.

La relación entre el depósito de β -amiloide, ya sea medido a través de un PET-PIB o a través de los niveles en LCR de β -amiloide y la estructura cerebral en la EA preclínica, es un tema controvertido. Estudios recientes en pacientes con positividad en el PET-PIB o con descenso de A β 1-42 en el LCR han mostrado un adelgazamiento cortical antes del inicio de los síntomas (Dickerson, Bakkour et al. 2009; Knight, Kim et al. 2009). Esta relación es reforzada por los resultados de estudios longitudinales que han encontrado una relación entre el depósito del β -amiloide y la atrofia cerebral (Fagan, Head et al. 2009; Storandt, Mintun et al. 2009; Fjell, Walhovd et al. 2010; Schott, Bartlett et al. 2010). Sin embargo, esta relación no parece estar tan clara en otros estudios (Josephs, Whitwell et al. 2008) y, en cualquier caso, la cuestión sobre la discrepancia parcial entre los patrones de atrofia y la distribución del depósito de β -amiloide sigue sin estar dilucidada (Jack, Lowe et al. 2008).

5. Modelo integrado de la fisiopatología de la EA. Perfil temporal de la alteración de los diferentes biomarcadores

Los cambios bioquímicos, estructurales y funcionales de la EA, como se ha discutido, empiezan años antes del inicio de los síntomas clínicos y pueden ser detectados, como hemos visto, a través del estudio de biomarcadores. Esto es particularmente importante ya que habilita su uso presente en los ensayos clínicos de terapias modificadoras del curso de la enfermedad. Así, diversos biomarcadores están siendo utilizados a la hora de definir diferentes subpoblaciones a riesgo de desarrollar una EA, para estratificar dicho riesgo o para monitorización de la eficacia a través de su uso como marcadores subrogados de eficacia (Lemere and Masliah 2010).

La noción de que existen diferentes procesos biológicos y fisiopatológicos en la iniciación y progresión de la EA está establecida en la literatura y tiene un correlato en los diferentes biomarcadores que, como hemos visto, estudian diferentes aspectos de la fisiopatología. El documento *Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon* que hemos tomado como referencia para la nomenclatura clasifica los biomarcadores en fisiopatológicos y topográficos (Dubois, Feldman et al. 2010). Los fisiopatológicos reflejarían los dos procesos etiopatogénicos que caracterizan a la EA, la vía amiloidogénica que conduce a la formación de placas y la taupatía que produce los ovillos neurofibrilares. En esta categoría, por lo tanto, se incluyen las reducciones en los niveles de A β 1-42 o el incremento en la captación cortical del PET-PIB o el incremento en los niveles de t-tau o p-tau, respectivamente. Como se ha señalado, estos biomarcadores in vivo correlacionan bien con sus respectivas lesiones neuropatológicas (Strozyk, Blennow et al. 2003; Ikonovic, Klunk et al. 2008; Tapiola, Alafuzoff et al. 2009; Blennow, Hampel et al. 2010). Los biomarcadores topográficos reflejarían los cambios cerebrales menos específicos producidos por los procesos fisiopatológicos mencionados, pero que correlacionan con la distribución de la patología de la EA e incluirían el FDG-PET o la RM estructural. El estudio de la interrelación entre los biomarcadores es, por tanto, crucial a la hora de entender los procesos fisiopatológicos.

El otro aspecto crucial a la hora de abordar un verdadero modelo integrado de la fisiopatología de la EA es la temporalidad de la alteración de cada uno de los diferentes biomarcadores. En la actualidad se acepta que los biomarcadores fisiopatológicos anteceden a los topográficos (Dubois, Feldman et al. 2010). Las complejas relaciones que se establecen entre el estadiaje clínico y los diferentes biomarcadores han sido estudiadas a lo largo de todo el espectro cognitivo de la EA recientemente (Vemuri, Wiste et al. 2010). Este estudio mostró por un lado que los niveles de A β 1-42 son los primeros en verse alterados (con respecto a t-tau y p-tau) tanto en portadores del alelo ϵ 4 de apoE como no portadores. Sin embargo, y como reflejo de la complejidad señalada, también mostró que los niveles bajos de A β 1-42 en el LCR se asociaban más fuertemente a la presencia de un alelo ϵ 4 del apoE que al estadio clínico, a diferencia de lo que ocurría con la atrofia en la RM (marcador subrogado de neurodegeneración) que se asociaba más fuertemente con el estadio clínico.

El conocimiento actual sobre la temporalidad de las alteraciones en los diferentes biomarcadores ha sido resumido recientemente por Jack et al. (Jack, Knopman et al. 2010) en la propuesta de un modelo hipotético de biomarcadores de la EA. Dicho modelo se centra en los 5 biomarcadores más estudiados y validados en la enfermedad de Alzheimer: 2 que reflejan el depósito del β -amiloide en el cerebro, los niveles de A β 1-42 en el LCR o el PET-PIB y 3 que reflejan neurodegeneración, los niveles de tau en el LCR, el FDG-PET y la resonancia magnética estructural.

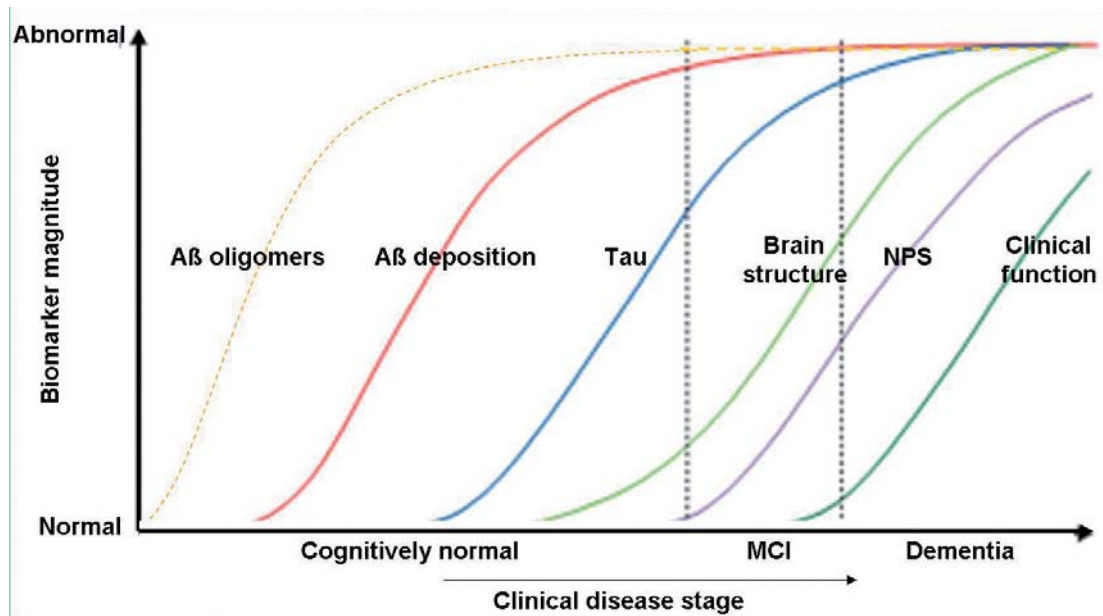


FIGURA 2. Modelo hipotético de la temporalidad de las alteraciones en los biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer (adaptado de Jack et al. (Jack, Knopman et al. 2010)). En dicho modelo los oligómeros de A β son comentados en el texto, pero no son representados en la figura original ya que no se podían determinar in vivo en la fecha de la publicación del modelo.

Este modelo, que adaptamos en la figura 2, parte de la hipótesis de la cascada del amiloide (Hardy and Higgins 1992; Hardy 2006) y es el marco conceptual que tomaremos como referencia a la hora de contextualizar nuestros resultados. En dicho modelo se sitúa como evento inicial de la enfermedad de Alzheimer el procesamiento anómalo del β -amiloide que acaba formando las placas neuríticas en el cerebro. Este proceso ocurre cuando los sujetos se encuentran todavía cognitivamente indemnes y puede ser estudiado a través de reducciones del péptido A β 1-42 en el LCR o mediante PET-PIB. Después de un periodo de tiempo variable, la disfunción neuronal y la neurodegeneración devendrían los eventos patogénicos dominantes. Estos procesos, a su vez, pueden ser estudiados a través de una elevación de los niveles de tau en LCR y en una atrofia cerebral progresiva en la RM. La neurodegeneración también se acompañaría de una disfunción sináptica que se reflejaría en una reducción en la captación de glucosa en el FDG-PET. Finalmente se alterarían los tests neuropsicológicos y, eventualmente, al alcanzar un nivel de daño cerebral se llegaría a una alteración de las escalas clínicas y demencia.

No obstante, los propios autores del modelo realizaban algunas consideraciones y apuntaban algunas limitaciones. De esta manera, subrayaban que el modelo propuesto era precisamente un modelo de las diferentes fases de la enfermedad que podían medirse con los biomarcadores más validados y no un modelo comprensivo de todos los procesos patológicos involucrados en la enfermedad de Alzheimer. El objetivo que se proponían era ofrecer un marco teórico común que sugería una serie de hipótesis contrastables de la que podía derivarse una imagen más clara de las trayectorias tiempo-dependientes de los biomarcadores de la EA.

En este sentido, señalaban algunos aspectos importantes de la enfermedad, entre los que destacan el papel tóxico de los oligómeros de A β o la inflamación, que no quedaban reflejados en el modelo. El motivo es que no existían, en ese momento, biomarcadores fiables, ni para las formas solubles y tóxicas de los oligómeros de A β o para las placas difusas por un lado, ni biomarcadores validados para la activación glial por otro. Incluso señalaban aspectos, como la alteración del metabolismo de la glucosa en portadores asintomáticos del alelo $\epsilon 4$ de apoE en las edades medias de la vida, que no podían ser explicados en ese marco conceptual.

Asimismo apuntaban algunas zonas de controversia, entre las que queremos destacar la relación entre los niveles de A β 1-42 en LCR y la estructura cerebral. Si bien es cierto que en el momento actual existe una insuficiente evidencia clínica sobre la relación, previamente hemos comentado varios estudios transversales y longitudinales que apoyan una relación entre ambas. Elucidar esta relación es de la máxima importancia para la valoración de la respuesta en los ensayos clínicos en marcha en etapas predemenciales (y sobre todo los futuros en etapas preclínicas) con terapias anti-amiloideas (Lemere and Masliah 2010).

Del mismo modo, la precocidad de la alteración cognitiva en la EA preclínica mostrada en los trabajos que hemos comentado encuentra un difícil acomodo dentro del modelo. En concreto, sugieren un progresivo deterioro de los procesos cognitivos aún cuando el rendimiento neuropsicológico se encuentra dentro de los valores normativos de normalidad, lo que sin duda implica una mayor complejidad en la relación de la cognición con los diferentes biomarcadores. Estos hallazgos, en un momento de intenso debate sobre la conceptualización de la EA como una entidad clínico-biológica apoyado en biomarcadores (Dubois, Feldman et al. 2007; Dubois, Feldman et al. 2010), tienen implicaciones muy importantes en el desarrollo futuro de terapias modificadores del curso de la enfermedad.

Por todo ello el objetivo general de la presente tesis fue estudiar el comportamiento de los biomarcadores en la fase preclínica de la enfermedad y específicamente el estudio de los efectos que la alteración del metabolismo del β -amiloide tiene sobre la estructura cerebral y la cognición, aspectos que, como hemos visto, no están resueltos y para los que existe controversia en la literatura.

V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo

Existen evidencias epidemiológicas, anatomopatológicas y estudios con biomarcadores que muestran que la enfermedad de Alzheimer comienza varios años antes de que se manifieste clínicamente. Todos los trabajos de la presente tesis se han centrado en el estudio de esta fase preclínica de la enfermedad mediante el análisis de biomarcadores en LCR, una evaluación neuropsicológica exhaustiva y el análisis de RM estructural. Para ello hemos estudiado dos muestras: una cohorte de portadores de PSEN1 y de una cohorte de sujetos cognitivamente indemnes.

Las hipótesis planteadas son:

1. Los sujetos portadores de una mutación en el gen de PSEN1 presentan un perfil de biomarcadores bioquímicos en LCR alterado ya desde la fase presintomática. Las alteraciones encontradas son diferentes para los diferentes biomarcadores (β -amiloide 1-42, tau y tau-fosforilada) en los distintos estadios o momentos de la enfermedad.
2. Los sujetos portadores de una mutación en el gen de PSEN1 en fases presintomáticas presentan respecto a los no portadores alteraciones en la estructura cerebral en áreas diana de la enfermedad de Alzheimer que se acompañan de alteraciones en la microestructura.
3. Un porcentaje de sujetos cognitivamente indemnes presentan alteraciones en los diferentes biomarcadores ($A\beta$ 1-42, t-tau y p-tau) a partir de las cuales se pueden definir diferentes patrones de alteración.
4. Los distintos biomarcadores en LCR de enfermedad de Alzheimer presentan asociaciones diferentes con las alteraciones neuropsicológicas a lo largo de los distintos estadios del *continuum* de la EA.
5. Los sujetos cognitivamente indemnes con una alteración en el perfil de biomarcadores en LCR presentan alteraciones en la estructura cerebral en áreas diana de la enfermedad de Alzheimer.

Objetivos

En base a las hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Cuantificar los niveles de los biomarcadores (β -amiloide, tau, tau-fosforilada) en LCR en sujetos asintomáticos portadores de mutaciones de PSEN1 y compararlos con controles no portadores y enfermos.
2. Comparar a través de técnicas de RM estructural el grosor cortical en áreas susceptibles de los sujetos presintomáticos portadores de PSEN1, enfermos portadores de PSEN1 y sanos no portadores.
3. Cuantificar los diferentes marcadores bioquímicos (β -amiloide, tau, tau-fosforilada) en LCR encontrados en sujetos cognitivamente sanos y describir perfiles de alteración.
4. Estudiar para cada grupo clínico a lo largo del *continuum* de la EA las asociaciones entre la cuantificación de los diferentes biomarcadores en LCR y los resultados de los test neuropsicológicos.
5. Comparar a través de técnicas de RM estructural el grosor cortical en áreas susceptibles de los sujetos cognitivamente indemnes con y sin alteraciones en el perfil de biomarcadores bioquímicos, así como estudiar la relación entre el β -amiloide medido en LCR y el grosor cortical en dichas áreas.

VI. MÉTODOS

Métodos

Los materiales y métodos utilizados en la presente tesis se explican con detalle en los apartados correspondientes de cada trabajo. Por lo tanto, en este apartado se exponen los criterios de selección utilizados en las dos cohortes analizadas y se enumeran las técnicas utilizadas y comunes. Por último, se discute en un breve apartado algunos aspectos éticos de las investigaciones realizadas.

Diseño:

Todos los estudios son transversales y analíticos.

El marco para todos los estudios fue el mismo: Hospital Universitario, específicamente la Unidad de Alzheimer y otros trastornos cognitivos del Hospital Clínic de Barcelona, y el *Department de Psiquiatria i Psicobiologia Clínica de la Universitat de Barcelona*.

Muestra:

Todos los sujetos provienen de 2 cohortes.

- Cohorte de Alzheimer familiar. Sujetos portadores de mutaciones determinantes de enfermedad de Alzheimer en fase preclínica de la enfermedad, controlado con sujetos apareados sanos no portadores de la mutación y portadores en fases ya sintomáticas de la enfermedad. De esta cohorte derivan dos de los estudios de la tesis.
- Cohorte centrada en el Alzheimer esporádico. Representación de todos los estadios del *continuum* de la EA, pero con especial énfasis en los sujetos con quejas subjetivas de memoria y controles sanos. De esta cohorte derivan tres de los estudios de la tesis.

Cohorte de Alzheimer familiar:

Los sujetos fueron reclutados a través del programa de consejo genético para demencias genéticamente determinadas del Hospital Clínic de Barcelona (PICOGEN).

Portadores asintomáticos: Sujetos conocidos portadores de una mutación causante de demencia neurodegenerativa y que no presenten alteración significativa en ninguna prueba neuropsicológica en una batería que incluye los principales dominios cognitivos, por lo que no cumplirán criterios ni de demencia ni de deterioro cognitivo leve.

Portadores sintomáticos: Sujetos conocidos portadores de una mutación causante de demencia neurodegenerativa y que presentan algún síntoma cognitivo, por lo que cumplirán criterios de demencia o de deterioro cognitivo leve.

Controles: Como controles no portadores se priorizará la inclusión de sujetos pertenecientes a la misma familia del sujeto portador, del mismo sexo y de edad similar (+/- 5 años). En el estudio de RM se añadieron 12 voluntarios sanos apareados por edad, sexo y grado de escolarización para aumentar la potencia de los análisis.

Sujetos de estudio de la cohorte de Alzheimer esporádico:

Los criterios utilizados para definir los diferentes estadios a lo largo del *continuum* de la EA esporádica son los siguientes:

Controles: Se reclutaron entre los cónyuges de los pacientes atendidos en la unidad de Alzheimer y otros trastornos cognitivos. Los criterios de inclusión, basados en los aplicados en el *Alzheimer Disease Neuroimaging Initiative* (ADNI) (Jack, Lowe et al. 2009) incluyeron: Puntuaciones en el *Mini Mental State Examination* (MMSE) entre 24 y 30, ausencia de quejas subjetivas de memoria o déficit objetivo de memoria (medido con el *Free and Cued Selective Reminding Test - FCSRT-* (Grober, Buschke et al. 1988)) en el rango normal y una puntuación en el *clinical dementia rating scale* (CDR) de 0 (Morris 1993).

Sujetos con quejas subjetivas de memoria: Aquellos sujetos que acudieron a la consulta especializada con quejas de memoria, pero sin deterioro cognitivo objetivo, un rendimiento de memoria dentro del rango normal (medido con el FCSRT) y una puntuación en el *clinical dementia rating scale* (CDR) de 0.

Deterioro cognitivo leve: De acuerdo con los criterios de Petersen et al. (Petersen, Doody et al. 2001). Aquellos sujetos con un deterioro de memoria objetivo, medido con el FCSRT, y con las actividades de la vida diaria (ADL) preservadas, medido con el *Functional Activities Questionnaire* (Pfeffer, Kurosaki et al. 1982) (puntuación de FAQ<6).

Enfermedad de Alzheimer: Diagnóstico de EA probable de acuerdo con los criterios NINCDS-ADRDA (McKhann, Drachman et al. 1984). Memoria alterada según test FCRST más otra prueba cognitiva afecta. Interferencia funcional en las actividades de la vida diaria de acuerdo con la escala de deterioro global GDS (*Global Deterioration Scale* (Reisberg, Ferris et al. 1982)) y puntuaciones >6 en el cuestionario FAQ. Sólo se incluyeron pacientes con una afectación clínica leve según una puntuación de 4 en la escala GDS.

Recogida de datos:

Todos los sujetos participaron en la evaluación clínica y neuropsicológica así como en la evaluación mediante resonancia magnética con técnicas de RM estructural y *Diffusion Tensor Imaging* (DTI) en el momento de inclusión. A todos los sujetos de la cohorte de EA esporádica (mayores) y a aquellos sujetos a riesgo de Alzheimer genético que quisieron

participar se les realizó además una punción lumbar con cuantificación de biomarcadores (β -amiloide, tau y tau-fosforilada).

Estudios genéticos:

El protocolo se explica con detalle en los apartados correspondientes de cada trabajo. En resumen, se estudió por secuenciación directa de sangre periférica del gen de PSEN1 en aquellos sujetos a riesgo para una mutación de PSEN1 y se realizó el genotipado de apoE a todos los participantes por medio de digestión enzimática según protocolos estándar.

Evaluación neuropsicológica:

A todos los sujetos se les administró una batería de pruebas neuropsicológicas completa para establecer la presencia y el grado de déficit cognitivo y determinar si estos cumplían los criterios de inclusión para los distintos estudios. Esta batería ha sido referenciada en los trabajos y pasamos a describirla a continuación. La batería incluyó pruebas de memoria, lenguaje, praxias, percepción visual, funciones ejecutivas frontales y atención (referenciados en (Rami, Gomez-Anson et al. 2007)) y además se recogieron datos sociodemográficos. En todos los casos posibles se utilizaron pruebas neuropsicológicas validadas que disponen de una normalización en población sana y que permiten situar al sujeto en relación con su grupo de edad y nivel de escolaridad.

FUNCIONAMIENTO COGNITIVO GLOBAL: I) MMSE para evaluar globalmente las capacidades cognitivas (Folstein, Folstein et al. 1975); II) Subtest de Vocabulario de la escala Weschler de Inteligencia para adultos (WAIS-III) (Wechsler., 1999) para estimar el cociente intelectual premórbido.

MEMORIA: I) Test de alteración de memoria (T@M (Rami, Molinuevo et al. 2007)) para detectar a modo de cribado alteraciones de memoria asociadas a la demencia. II) Test de memoria libre y selectivamente facilitado (FCSRT (Grober, Buschke et al. 1988)) para evaluar la memoria episódica verbal (aprendizaje facilitado y recuerdo demorado); III) Lista de aprendizaje y retención de palabras de la batería *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease* (CERAD) (aprendizaje y reconocimiento de la información) (Morris, Heyman et al. 1989); IV) Test de memoria de dibujos de la batería CERAD; V) Figura compleja de Rey; VI) Fluencia verbal con consigna semántica (animales) para estudiar la memoria semántica verbal; VII) Dígitos directos e inversos (escala de inteligencia de Weschler 2004) para evaluar la memoria de trabajo.

LENGUAJE: I) Prueba de denominación de la batería Boston para afasias (Garcia-Albea JE, Sanchez-Bernardos ML et al., 1986); II) Test de comprensión de la misma batería Boston para afasias para descartar alteraciones de la comprensión de órdenes simples y complejas.

PRAXIAS: I) Copia de dibujos de la batería CERAD; II) Copia de la figura compleja de Rey; III) Imitación de gestos manuales de la batería Western para afasia para la valoración de las praxias ideomotrices por imitación.

FUNCIONES VISUOPERCEPTIVAS Y VISUOESPACIALES: I) Subtest de percepción de letras y localización de números de la batería *Visual Object and Space Perception Battery* (VOSP) para examinar las funciones visuoperceptivas y visuoespaciales (Warrington and James 1991); II) Poppelreuter; III) Test digital de percepción (Rami, Serradell et al. 2007).

FUNCIONES FRONTALES: I) Test de fluencia verbal fonética (FAS) (Borkowski et al., 1967); II) Test de semejanzas (escala de inteligencia de Weschler) para valorar el pensamiento abstracto verbal; III) Clave de números (escala de inteligencia de Weschler); IV) Test del trazo -parte A- (TMT-A; Reitan., 1958) para evaluar la atención y la velocidad visuomotora.

OTRAS VARIABLES: I) FAQ (Pfeffer, Kurosaki et al. 1982): Valoración del grado de dependencia en las actividades instrumentales de la vida diaria ; II) *Hospital Anxiety and Depression scale* (HAD) para valorar ansiedad y depresión; III) Variables de reserva cognitiva (RC) (Rami, Valls-Pedret et al. 2011).

Estudio de marcadores bioquímicos en LCR:

La determinación de biomarcadores se realizó mediante kits comerciales de ELISA (Innogenetics®) para la cuantificación de B42-amiloide, tau-total y tau fosforilada en LCR siguiendo el protocolo del fabricante.

Estudios de neuroimagen:

Todas las imágenes se adquirieron en un único aparato de RM 3.0 Tesla Siemens Magnetom Trio (Erlangen, Germany) del Centro de Diagnóstico por la imagen del Servicio de Radiología del Hospital Clínic de Barcelona. El análisis de los datos se llevó a cabo en el Laboratorio de Neuroimagen del Departamento de Psiquiatría y Psicobiología Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona.

Adquisición de imágenes:

Los parámetros de adquisición son descritos en los diferentes trabajos. Se adquirieron las siguientes secuencias:

- Secuencia T1 en 3D de alta resolución anatómica del cerebro (MPRAGE [*Magnetization Prepared Rapid Gradient Echo*]) para valorar la estructura cerebral.
- Secuencias de RM de difusión para valorar la microestructura y la integridad de la sustancia gris.

Adicionalmente y para descartar la presencia de patología vascular una neurorradióloga certificada puntuó todas las imágenes usando la escala de Fazekas (Fazekas, Chawluk et al. 1987).

Análisis de imagen:

- *Imágenes estructurales:* La reconstrucción cortical y la segmentación volumétrica de las imágenes estructurales se realizó con el FreeSurfer image analysis suite (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>). Esta técnica semiautomática, que calcula el grosor cortical como la distancia más próxima entre el límite entre la interfase sustancia blanca/corteza y la superficie pial, ha sido descrita en los trabajos. Los procedimientos para la medición del grosor cortical se han validado contra análisis histológicos y mediciones manuales.
- *RM basada en la difusión:* Se utilizaron las herramientas implementadas en FSL. Sólo se analizaron los mapas de difusividad media (MD).

Análisis estadístico de los resultados:

El análisis estadístico de los resultados transversales clínicos, cognitivos y de marcadores bioquímicos se llevó a cabo con el paquete *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) para Windows (V.16.0). Las diferencias neuropsicológicas y de biomarcadores entre grupos de participantes y diferentes tipos de demencias se analizaron por medio de un t-test o un análisis de la varianza (ANOVA). Las variables categóricas de los participantes se compararán a través de test de X^2 o el test exacto de Fisher. Las correlaciones se calcularon mediante el coeficiente de correlación de Pearson o en caso de muestras pequeñas con el de Spearman.

Aspectos éticos

Se incluyeron sólo sujetos mayores de edad una vez hubieron firmado el consentimiento informado.

El estudio neuropsicológico, la punción venosa o la RM son procedimientos seguros para los participantes. Se respetaron las contraindicaciones habituales para la realización de una RM cerebral.

La obtención de LCR supone un procedimiento mínimamente invasivo por lo que también constó como un apartado con un consentimiento explícito. La no realización de esta prueba era un criterio de exclusión para la participación en el estudio sólo en la cohorte de Alzheimer esporádico. Los sujetos sin deterioro cognitivo no tuvieron acceso al resultado del análisis de líquido cefalorraquídeo. Se respetaron las contraindicaciones habituales.

Se solicitó consentimiento explícito para el almacenamiento y conservación de estas muestras biológicas una vez finalizado el estudio. Los resultados de las pruebas y la historia clínica de los sujetos asintomáticos se guardaron siguiendo los parámetros habituales para preservar la confidencialidad.

Particularidades de la cohorte de enfermedad de Alzheimer familiar: El estudio genético de los pacientes a riesgo de Alzheimer familiar se realizó dentro del marco del programa PICOGEN (programa de información y consejo genético). En el momento de la inclusión se preguntó explícitamente al sujeto **si deseaba saber el resultado del análisis genético**. Se aceptó la participación de sujetos que desearon permanecer ciegos a su estatus genético pero que aceptaron la realización de la prueba con fines de investigación. A aquellos sujetos que deseaban saber su estatus hubieron de seguir el protocolo PICOGEN (cuya descripción constituye el objeto de uno de los trabajos adicionales de la presente tesis).

VII. RESULTADOS

Trabajo número 1

Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease families with PSEN-1 mutations.

Fortea J,^a Lladó A,^a Bosch B,^a Oliva R,^b Molinuevo JL,^a Sánchez-Valle R.^a

^a Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, and

^b Biochemistry and Molecular Genetics Service, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

Neurodegener Dis. 2011 Jan 5. [Epub ahead of print] PMID: 21212633. IF: 3.496

Objetivos:

- Analizar los niveles de β -amiloide 1-42, tau y fosfotau en LCR en sujetos pertenecientes a familias con mutaciones en el gen de la *PSEN1*.
- Correlacionar los resultados con el estatus genético, edad y estadio clínico.

Resultados:

- Los niveles de β -amiloide 1-42 en LCR correlacionan inversamente con la edad ajustada. Esto sugiere una disminución de β -amiloide en la fase asintomática a medida nos acercamos a la edad de inicio de la sintomatología.
- Los niveles de β -amiloide 1-42 en LCR se encuentran reducidos y estables en los portadores de mutaciones de PSEN-1 desde los primeros síntomas de la enfermedad. Esto sugiere un efecto suelo temprano.
- En nuestra población los niveles de tau total y fosfo-tau en LCR se encontraron elevados sólo en los sujetos sintomáticos y se correlacionaron positivamente con la severidad clínica.

Original Paper

Neuro-
degenerative
Diseases

Neurodegenerative Dis
DOI: 10.1159/000322229

Received: July 7, 2010
Accepted after revision: October 18, 2010
Published online: January 5, 2011

Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Alzheimer's Disease Families with *PSEN1* Mutations

Juan Fortea^a Albert Lladó^a Beatriz Bosch^a Anna Antonell^a Rafael Oliva^b
Jose Luis Molinuevo^a Raquel Sánchez-Valle^a

^aAlzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, and ^bBiochemistry and Molecular Genetics Service, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

© Free Author Copy – for personal use only

ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Written permission to distribute the PDF will be granted against payment of a permission fee, which is based on the number of accesses required. Please contact permission@karger.ch

Key Words

Alzheimer's disease · Presenilin 1 mutation · Cerebrospinal fluid · Amyloid · Biomarker

Abstract

Background/Aims: Familial Alzheimer's disease allows studies in the preclinical phases of the disease. We studied cerebrospinal fluid (CSF) amyloid β 1–42 (A β 1–42), total tau (t-tau) and phospho-tau181 (p-tau) levels in *PSEN1* families and correlated the results with the genetic status, age and clinical stage. **Methods:** Thirteen subjects from 3 families with 2 *PSEN1* mutations (L286P, M139T) were recruited from the genetic counseling program for familial dementia. Eight mutation carriers (MC) and 5 noncarriers (NC) underwent clinical and cognitive evaluations. CSF concentrations were obtained by ELISA methodology. **Results:** Symptomatic MC presented reduced CSF A β 1–42 (mean = 175 pg/ml) and elevated t-tau (mean = 635 pg/ml) compared to controls, but not asymptomatic MC (mean = 684 and 255 pg/ml, respectively) at a median of –12.8 years from the predicted disease onset (adjusted age). A β 1–42 levels presented an inverse correlation with the adjusted age ($r = -1$, $p < 0.01$) in asymp-

tomatic MC, but not in symptomatic MC or NC. t-tau presented a trend towards a negative correlation with Mini Mental State Examination (MMSE; $r = -0.949$, $p = 0.051$) in symptomatic MC but not in asymptomatic MC. In the whole group of MC, t-tau presented a significant positive correlation with Clinical Dementia Rating sum of boxes ($r = 0.913$, $p = 0.002$) and a negative correlation with MMSE ($r = -0.946$, $p < 0.001$). **Conclusions:** CSF A β 1–42 levels correlate with time to disease onset in asymptomatic MC to reach floor levels when symptoms appear. CSF t-tau levels become elevated in symptomatic MC and correlate with clinical severity. These findings may suggest that the changes in A β 1–42 precede t-tau elevation in *PSEN1* MC.

Copyright © 2011 S. Karger AG, Basel

Introduction

A minority of Alzheimer's disease (AD) cases are inherited linked to genetic defects in 3 genes: the amyloid- β protein precursor (*APP*), the presenilin-1 (*PSEN1*) and the presenilin-2 (*PSEN2*) [1]. Familial AD (FAD) has an early age of onset with nearly 100% penetrance and a rel-

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2011 S. Karger AG, Basel
1660-2854/11/0000-0000\$38.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/ndd

Raquel Sánchez-Valle
Neurology Service, Hospital Clínic
Villarroel 170, ES-08036 Barcelona (Spain)
Tel. +34 932 275 785, Fax +34 932 275 783
E-Mail rsanchez@clinic.ub.es

atively predictable age of onset [2]. Therefore these forms constitute an ideal window with few confounding factors into the very early phases of the disease.

Senile plaques and neurofibrillary tangles are thought to begin many years prior to symptoms [3]. Hence cerebrospinal fluid (CSF) amyloid β 1–42 (A β 1–42), total tau (t-tau) and tau phosphorylated at threonine 181 (p-tau) have been among the first and most extensively studied CSF biomarkers. An AD biochemical signature with reduced A β 1–42 and increased t-tau and p-tau concentrations has been described [4, 5]. The combination of CSF tau and A β 1–42 changes predicts the conversion to AD in mild cognitive impairment subjects and even cognitive deterioration in healthy elderly individuals [5–7]. In addition, a good correlation between neuropathological features and CSF biomarkers has been established [8]. In FAD, symptomatic mutation carriers (SMC) present the typical CSF AD signature [9]. However, there are very few studies analyzing CSF biomarkers in asymptomatic mutation carriers (AMC), and they are not completely concordant [10–12].

The aim of the present study was to analyze CSF A β 1–42, t-tau and p-tau levels in subjects from *PSEN1* mutation families and to correlate the results with the genetic status, age and clinical stage.

Subjects and Methods

Subjects

Participants were recruited from the genetic counseling program for familial dementias (PICOGEN) at the Hospital Clínic, Barcelona, Spain. The study received the Hospital Clínic research ethics committee's approval, and all participants gave informed written consent. All the subjects to whom the study was offered were aware of their at-risk position, and those who did not know their genetic status received genetic counseling and were given the option to know their genetic status through the genetic counseling protocol [13].

Thirteen subjects from 3 families with 2 *PSEN1* mutations (L286P, M139T) [1, 14] were enrolled in the project. Neuropathological confirmation was available in 2 families, one of them (L286P) presented cotton wool plaques [14].

Subjects underwent clinical and a comprehensive cognitive evaluation and were classified clinically as asymptomatic if they had normal cognitive evaluation and the Clinical Dementia Rating (CDR) scale score [15] was 0 or symptomatic if cognitive performance was more than 1.5 standard deviations (SD) below the mean with respect to their age and education level in any cognitive test or CDR >0.

Genetic Analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood of probands using the QIAamp DNA blood minikit (Qiagen). Screening

of the mutation was performed by direct sequencing of the particular exon for each *PSEN1* mutation [14].

CSF Analysis

In the morning, 10 ml of CSF were obtained using a 22-gauge Spotte needle and then centrifuged and aliquoted into siliconized polypropylene Eppendorf tubes and frozen to -80°C within 2 h of being obtained. A β 1–42, t-tau and p-tau levels were measured using commercial sandwich ELISA [Innotest β -amyloid(1–42), Innotest hTAU-Ag and Innotest Phospho-Tau(181P); Innogenetics, Ghent, Belgium]. Concentrations were determined from standard curves using the standards provided by Innogenetics. To calculate CSF concentrations, each CSF sample was analyzed in duplicate, and these results were then averaged for further statistical analyses. The analysis was performed in 2 runs for A β 1–42 and t-tau and in 1 run for p-tau. The interassay coefficients of variation were 3.78 and 2.48%, respectively, for A β 1–42 and t-tau. The intraassay coefficients of variation were 3.74 and 4.50% for each A β 1–42 run, 9.1 and 3.84% for each t-tau run and 0.4% for p-tau.

Statistical Analysis

Because of the relatively predictable age of onset within a family [2], we define adjusted age as the subject's age relative to the median familial age of onset. For group comparisons we performed Fisher's exact test or the Mann-Whitney U test. We analyzed the correlation between the levels of biomarkers and age, adjusted age, CDR sum of boxes and Mini Mental State Examination (MMSE) scores with the Spearman correlation coefficient. *p* values of 0.05 or less were considered significant. All statistical analyses were performed using SPSS 16 (SPSS, Chicago, Ill., USA).

Results

CSF Analysis

Five of the participants were noncarriers (NC), with a mean adjusted age of -6.8 years (range -20.9 to $+3.8$ years). Eight were *PSEN1* mutation carriers (MC), 4 were AMC with a mean adjusted age of -14.0 years (range -21.8 to -8.6 years) and 4 were SMC with a mean adjusted age of $+2.2$ years (range -2.7 to $+4.7$ years).

Only 1 SMC and 1 NC in the whole sample carried an *APOE* ϵ 4+ genotype, therefore we did not consider this variable in the further analysis.

Clinical and demographic data are reported in table 1. Age and mutation of each subject are not shown to keep confidentiality.

There were no significant differences between NC and AMC with regard to mean age ($p = 0.286$), adjusted age ($p = 0.190$) or gender distribution ($p = 0.206$). All NC had a CDR of 0 and did not differ from AMC in clinical scales or MMSE. There were no significant differences between NC and SMC with regard to mean age ($p = 0.111$), adjusted age ($p = 0.111$) or gender distribution ($p = 0.524$; table 2).

Table 1. Demographic, clinical and biomarker individual data

	MC	AA	CDR	CDR	MMSE	CSF	CSF	CSF
	years	total	SOB			A β 1-42	t-tau	p-tau
						pg/ml	pg/ml	pg/ml
NC								
Asymptomatic								
FIII-1	no	-20.9	0	0	29	668	348	57
FIII-3	no	-10.6	0	0	29	647	240	47
FI-1	no	-5.2	0	0	30	716	247	56
FI-3	no	-1.2	0	0	29	616	267	49
FI-5	no	3.8	0	0	29	731	323	53
MC								
Asymptomatic								
FII-1	yes	-21.8	0	0	30	823	193	37
FII-2	yes	-13.1	0	0	30	754	271	49
FIII-2	yes	-12.5	0	0	28	656	324	54
FIV-1	yes	-8.6	0	0	29	506	233	62
Nondemented								
FI-2	yes	-2.7	0.5	2	28	166	335	53
FI-4	yes	2.6	0.5	2.5	24	164	429	50
Demented								
FII-4	yes	4.3	2	10	24	206	1,377	120
FI-6	yes	4.7	1	5.5	17	165	401	56

AA = Adjusted age; SOB = sum of boxes.

Amyloid β 1-42

Individually, all SMC had low A β 1-42 (table 1), clearly below threshold levels [16]. As a group, SMC had significantly lower A β 1-42 levels (mean = 175 pg/ml) than NC (mean = 675 pg/ml; $p = 0.016$) or AMC (mean 684 pg/ml; $p = 0.029$; table 2).

All AMC had individual A β 1-42 levels within the normal range [17]. Interestingly the AMC closest to the median familial age of onset, who had an adjusted age of -8.6 years, presented borderline A β 1-42 values (506 pg/ml). In group comparisons, there were no significant differences between AMC and NC with respect to A β 1-42 ($p = 0.730$).

A significant and strong inverse correlation was found between the adjusted age and absolute age and A β 1-42 levels in AMC (Spearman $\rho = -1$, $p < 0.01$ for both analyses; table 3, fig. 1). Of note, in SMC A β 1-42 values reached floor levels (166-206 pg/ml), and they did not show any correlation with the adjusted age (Spearman $\rho = 0$, $p = 1$). No correlation was found between the adjusted age and the A β 1-42 levels in NC ($p = 0.624$). There was no correlation between the absolute age and the A β 1-42 levels neither in NC nor in SMC ($p = 0.873$ and $p = 0.6$, respectively).

Table 2. Group mean demographic and CSF biomarker values

	NC	Carriers		
	(n = 5)	MC	AMC	SMC
		(n = 8)	(N = 4)	(n = 4)
Age, years	35.6 (6.9)	37.9 (8.0)	32.0 (5.6)	43.7 (5.4)
p value		0.833	0.286	0.111
Adjusted age, years	-6.8 (9.5)	-5.9 (9.7)	-14.0 (5.6)	2.2 (3.4)
p value		0.943	0.190	0.111
CSF A β 1-42, pg/ml	675 (48)	430 (287)	684 (137)	175 (20)
p value		0.284	0.730	0.016
CSF t-tau, pg/ml	285 (48)	445 (385)	255 (56)	635 (496)
p value		0.435	0.556	0.032
CSF p-tau (pg/ml)	52 (4)	60 (25)	50 (10)	70 (34)
p value		0.724	0.905	0.556

Results are means, with SD in parentheses; the p value denotes the level of significance in the comparison with NC (Mann-Whitney U test).

No correlations were found between A β 1-42 and clinical measures neither in AMC nor in SMC (table 3).

Total Tau Protein

Individual levels are shown in table 1. Group mean levels and SD are shown in table 2. All AMC had individual t-tau levels within the normal range [17] while 3 SMC presented elevated t-tau levels. SMC presented higher t-tau levels than NC (mean = 635 pg/ml vs. mean = 285 pg/ml; $p = 0.032$) or AMC (mean = 255 pg/ml; $p = 0.029$). AMC did not present significant differences for t-tau ($p = 0.556$) levels with respect to NC.

Neither in SMC nor in AMC did t-tau correlate with the adjusted age or the absolute age.

In AMC there was no correlation between MMSE and t-tau. In SMC the correlation between MMSE almost reached significance ($r = -0.949$, $p = 0.051$) whereas the correlation with the CDR sum of boxes was not significant ($r = 0.8$, $p = 0.2$). When pooling all the MC carriers, however, both the MMSE ($r = -0.946$, $p < 0.001$) and the CDR sum of boxes ($r = 0.913$, $p = 0.002$) showed a significant correlation with t-tau levels.

Phosphorylated Tau Protein

Individual levels are shown in table 1. Group mean levels and SD are shown in table 2. SMC did not present significant differences with respect to p-tau levels with NC

Table 3. Correlations between biomarkers and demographic and clinical data in AMC and SMC: Spearman correlation coefficient and level of significance

	Aβ1-42	t-tau	p-tau	Adjusted age	CDR sum of boxes	MMSE
AMC						
Aβ1-42						
t-tau	-0.400 (p = 0.600)		-1 (p < 0.01)	-1 (p < 0.01)	-	0.738 (p = 0.262)
p-tau	-1 (p < 0.01)	0.400 (p = 0.600)	0.400 (p = 0.600)	0.400 (p = 0.600)	-	-0.632 (p = 0.368)
Adjusted age	-1 (p < 0.01)	0.400 (p = 0.600)	1 (p < 0.01)	1 (p < 0.01)	-	-0.738 (p = 0.262)
CDR sum of boxes	-	-	-	-	-	-0.738 (p = 0.262)
MMSE	0.738 (p = 0.262)	-0.632 (p = 0.368)	-0.738 (p = 0.262)	-0.738 (p = 0.262)	-	-
SMC						
Aβ1-42						
t-tau	0.200 (p = 0.800)		0.800 (p = 0.200)	0 (p = 1)	0.400 (p = 0.600)	-0.316 (p = 0.684)
p-tau	0.800 (p = 0.200)	0.400 (p = 0.600)	0.400 (p = 0.600)	0.400 (p = 0.600)	0.800 (p = 0.200)	-0.949 (p = 0.051)
Adjusted age	0 (p = 1)	0.400 (p = 0.600)	0.600 (p = 0.400)	0.600 (p = 0.400)	0.800 (p = 0.200)	-0.632 (p = 0.368)
CDR sum of boxes	0.400 (p = 0.600)	0.800 (p = 0.200)	0.800 (p = 0.200)	0.800 (p = 0.200)	0.800 (p = 0.200)	-0.632 (p = 0.368)
MMSE	-0.316 (p = 0.684)	-0.949 (p = 0.051)	-0.632 (p = 0.368)	-0.632 (p = 0.368)	-0.949 (p = 0.051)	-0.949 (p = 0.051)

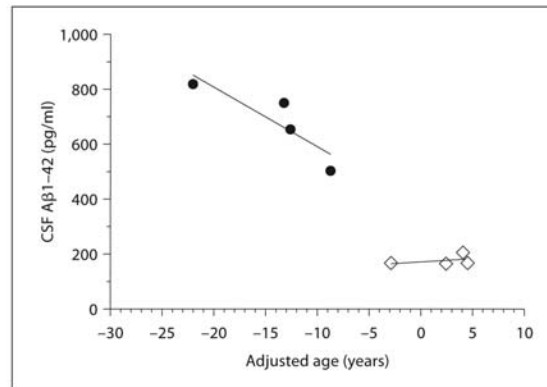


Fig. 1. Correlation between the individual CSF Aβ1-42 levels and the adjusted age in AMC (●; ρ = -1, p < 0.01) and SMC (◇; ρ = 0, p = 1) of the *PSEN1* mutation.

(mean = 70 pg/ml vs. mean = 52 pg/ml; p = 0.556) or AMC (mean = 50 pg/ml; p = 0.486). AMC did not present significant differences with respect to p-tau levels with NC (p = 0.905).

There was no correlation between MMSE and p-tau neither in AMC nor in SMC.

Discussion

In this study, we determined the concentrations of CSF biomarker levels in subjects from families with *PSEN1* mutations.

AMC, as a group, did not present reduced Aβ1-42 values with respect to controls. However, AMC presented a significant strong inverse correlation between Aβ1-42 values and adjusted age and, in fact, the AMC closest to the mean age of disease onset (-8.6 years) presented Aβ1-42 levels just above the threshold level [17]. In contrast, SMC showed abnormally low and similar Aβ1-42 values which were not correlated with the adjusted age.

The pathogenic alterations in *PSEN1* that cause AD are related to an excess in β-amyloid production or a selective increment of Aβ1-42 [18, 19]. Therefore, a higher level of Aβ1-42 could also be expected in AMC. However, we did not find such an increase in AMC. On the contrary, we found a progressive reduction from baseline, which could be related with the progressive deposition of amyloid in plaques in the brain [8, 20, 21]. CSF levels would remain within normal values during very early

phases of the disease to approach pathological values in the last decade of the preclinical stage as had also been previously demonstrated both in sporadic and FAD cases [4, 5, 10, 11]. All these data are in accordance with findings in double *APP/PSEN1* transgenic mice in which levels of A β 1–42 initially reflect the rate of A β 1–42 production, but after reaching a critical concentration stay in equilibrium, until plaque formation leads to decreased A β 1–42 [16]. It is also of interest to underline that A β 1–42 levels were not correlated with age or adjusted age in NC in this study, consistent with previous studies in cognitive preserved subjects [22].

There are only few previous studies in presymptomatic FAD. Thus Moonis et al. [10] found decreased CSF A β 1–42 levels in a group of 6 *PSEN1* AMC (4 C410Y MC and 2 P241H MC) between 4 and 12 years before the mean familial age of onset compared to controls. Ringman et al. [11] found a trend ($p = 0.08$) towards a reduced A β 1–42/A β 1–40 ratio in 7 *PSEN1* and *APP* MC with respect to NC. On the other hand, Almkvist et al. [12] studied nondemented individuals from 2 families with *APP* mutations and 2 with *PSEN1* mutations and found that CSF measurements of A β 1–42 were inconclusive because of large biological variation. The differences observed in the few existing studies could have several explanations. First, A β 1–42 in a given sample of AMC could be critically associated with the adjusted age of the subjects studied, second, there could be mutation-specific differences and third, the variability in the assays employed could account for some of the differences [23].

The idea of a progressive decrease in CSF A β 1–42 in the asymptomatic phase of the disease is, however, further supported by the data published by Moonis et al. [10] in which an inverse correlation with the adjusted age could be inferred from the published data at least in one of the families studied. Furthermore, Ringman et al. [11] also found a trend towards a correlation between the adjusted age and A β 1–42 in 7 *PSEN1* and *APP* MC ($r = -0.673$, $p = 0.098$).

With respect to t-tau and p-tau, we did not find differences between AMC and NC, but we did find an elevation in t-tau values in SMC with respect to NC or AMC. The correlation between t-tau in SMC and clinical measures did not reach significance, but a very suggestive trend ($p = 0.051$ for t-tau and MMSE). However, when pooling all the MC, t-tau strongly correlated with clinical severity. t-tau is a general marker of damage to cortical axons [24] and correlates with neuronal loss in neuroimaging studies [25]. In previous studies in FAD, Ringman et al. [11] found that t-tau and p-tau were elevated in MC, even in

AMC. In contrast, neither Moonis et al. [10] nor Almkvist et al. [12] found significant differences in t-tau between *PSEN1* MC and NC before the clinical onset of dementia. Again, mutation-specific or subtle clinical classification differences may account for the discrepancies. The correlation of t-tau with clinical measures in FAD had not been evaluated in previous studies in *PSEN1* families but is in accordance with numerous studies in sporadic AD that also demonstrate strong correlations between t-tau levels and cognitive decline [24].

In our study, some MC presented reduced A β 1–42 with normal t-tau or/and p-tau (table 1). This finding taken together with the correlation in AMC (but not in SMC) between adjusted age and A β 1–42 (but not with t-tau) supports the idea that significant amyloid deposition precedes neuronal destruction in *PSEN1* MC. This idea is consistent with the hypothetical model of dynamic biomarkers of the AD pathological cascade recently proposed for sporadic AD [25] and is reinforced by findings in transgenic mice [26] as well as with data from longitudinal studies in elderly populations [27, 28].

We acknowledge that the main limitation of this study is the small sample of subjects analyzed although it is inherent to the study of these rare genetic populations and similar to previous studies in FAD. Other limitations are the cross-sectional design and the use of a theoretical construct (adjusted age) in some of the analyses instead of the real age of onset that is currently unknown and the use of established cutoff values for CSF biomarkers for sporadic AD, but with uncertain validity in FAD. Follow-up will answer some of the open questions about the evolution of the biochemical markers in these MC.

In summary, CSF A β 1–42 levels in asymptomatic *PSEN1* MC correlated with the estimated time to disease onset and reach floor levels when symptoms appear. CSF t-tau levels became elevated in SMC and correlated with clinical severity. These findings may suggest that the changes in A β 1–42 precede t-tau elevation in *PSEN1* MC.

Acknowledgements

This study has been funded by a research grant from the Instituto Carlos III, Spain (FIS080036). Juan Fortea is the receptor of a Josep Font grant from the Hospital Clinic.

We thank all the volunteers for their participation in the study. We acknowledge Gloria Tersol for her assistance with lumbar punctures and Sergio Amaro for his assistance with the figure editing.

References

- 1 Alzheimer disease and frontotemporal dementia mutation database. <http://www.molgen.ua.ac.be/admutacions/> (accessed March 31, 2010).
- 2 Fox NC, Kennedy AM, Harvey RJ, Lantos PL, Roques PK, Collinge J, Hardy J, Hutton M, Stevens JM, Warrington EK, Rossor MN: Clinicopathological features of familial Alzheimer's disease associated with the M139V mutation in the presenilin 1 gene: pedigree but not mutation specific age at onset provides evidence for a further genetic factor. *Brain* 1997;120:491–501.
- 3 Bennett DA, Schneider JA, Arvanitakis Z, Kelly JF, Aggarwal NT, Shah RC, Wilson RS: Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology* 2006;66:1837–1844.
- 4 Shaw LM, Vanderstichele H, Knapik-Czajka M, Clark CM, Aisen PS, Petersen RC, Blennow K, Soares H, Simon A, Lewczuk P, Dean R, Siemers E, Potter W, Lee VM, Trojanowski JQ: Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative subjects. *Ann Neurol* 2009; 65:403–13.
- 5 Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, Andreasen N, Parnetti L, Jonsson M, Herukka SK, van der Flier WM, Blankenstein MA, Ewers M, Rich K, Kaiser E, Verbeek M, Tsolaki M, Mulugeta E, Rosén E, Aarsland D, Visser PJ, Schröder J, Marcusson J, de Leon M, Hampel H, Scheltens P, Pirttilä T, Wallin A, Jönhagen ME, Minthon L, Winblad B, Blennow K: CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* 2009;302:385–393.
- 6 Snider BJ, Fagan AM, Roe C, Shah AR, Grant EA, Xiong C, Morris JC, Holtzman DM: Cerebrospinal fluid biomarkers and rate of cognitive decline in very mild dementia of the Alzheimer type. *Arch Neurol* 2009;66:638–645.
- 7 Fagan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun MA, Morris JC, Holtzman DM: Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch Neurol* 2007;64:343–349.
- 8 Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka SK, Parkkinen L, Hartikainen P, Soininen H, Pirttilä T: Cerebrospinal fluid beta-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch Neurol* 2009;66:382–389.
- 9 Matsushita S, Arai H, Okamura N, Ohmori T, Takasugi K, Matsui T, Maruyama M, Iwatsubo T, Higuchi S: Clinical and biomarker investigation of a patient with a novel presenilin-1 mutation (A431V) in the mild cognitive impairment stage of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 2002;52:907–910.
- 10 Moonis M, Swearer JM, Dayaw MP, St George-Hyslop P, Rogaeva E, Kawarai T, Pollen DA: Familial Alzheimer disease: decreases in CSF Abeta42 levels precede cognitive decline. *Neurology* 2005;65:323–325.
- 11 Ringman JM, Younkin SG, Pratico D, Seltzer W, Cole GM, Geschwind DH, Rodriguez-Agudelo Y, Schaffer B, Fein J, Sokolow S, Rosario ER, Glyls KH, Varpertian A, Medina LD, Cummings JL: Biochemical markers in persons with preclinical familial Alzheimer disease. *Neurology* 2008;71:85–92.
- 12 Almkvist O, Axelman K, Basun H, Jensen M, Viitanen M, Wahlund LO, Lannfelt L: Clinical findings in nondemented mutation carriers predisposed to Alzheimer's disease: a model of mild cognitive impairment. *Acta Neurol Scand Suppl* 2003;179:77–82.
- 13 Molinuevo JL, Pintor L, Peri JM, Lleó A, Oliva R, Marcos T, Blesa R: Emotional reactions to predictive testing in Alzheimer's disease and other inherited dementias. *Am J Alzheimer Dis Other Demen* 2005;20:233–238.
- 14 Sánchez-Valle R, Lladó A, Ezquerra M, Rey MJ, Rami L, Molinuevo JL: A novel mutation in the *PSEN1* gene (L286P) associated with familial early-onset dementia of Alzheimer type and lobar haematomas. *Eur J Neurol* 2007;14:1409–1412.
- 15 Morris JC: The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* 1993;43:2412–2414.
- 16 Liu L, Herukka SK, Minkevičienė R, van Groen T, Tanila H: Longitudinal observation on CSF Abeta42 levels in young to middle-aged amyloid precursor protein/presenilin-1 doubly transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2004; 17:516–523.
- 17 Van der Vlies AE, Verwey NA, Bouwman FH, Blankenstein MA, Klein M, Scheltens P, van der Flier WM: CSF biomarkers in relationship to cognitive profiles in Alzheimer disease. *Neurology* 2009;72:1056–1061.
- 18 Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ: Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 1992;360:672–674.
- 19 Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L Jr, Eckman C, Golde TE, Younkin SG: An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 1994;264:1336–1340.
- 20 Grimmer T, Riemenschneider M, Förstl H, Henriksen G, Klunk WE, Mathis CA, Shiga T, Wester HJ, Kurz A, Drzezga A: Beta amyloid in Alzheimer's disease: increased deposition in brain is reflected in reduced concentration in cerebrospinal fluid. *Biol Psychiatry* 2009;65:927–934.
- 21 Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, Lee SY, Dence CS, Shah AR, La Rossa GN, Spinner ML, Klunk WE, Mathis CA, De Kosky ST, Morris JC, Holtzman DM: Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Ann Neurol* 2006;59:512–519.
- 22 Sjögren M, Vanderstichele H, Agren H, Zachrisson O, Edsbacke M, Wikkelso C, Skoog I, Wallin A, Wahlund LO, Marcusson J, Nägga K, Andreasen N, Davidsson P, Vanmechelen E, Blennow K: Tau and Abeta42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21–93 years of age: establishment of reference values. *Clin Chem* 2001;47:1776–1781.
- 23 Verwey NA, van der Flier WM, Blennow K, Clark C, Sokolow S, De Deyn PP, Galasko D, Hampel H, Hartmann T, Kapaki E, Lannfelt L, Mehta PD, Parnetti L, Petzold A, Pirttilä T, Saleh L, Skinningsrud A, Swieten JC, Verbeek MM, Wilfang J, Younkin S, Scheltens P, Blankenstein MA: A worldwide multicentre comparison of assays for cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease. *Ann Clin Biochem* 2009;46:235–240.
- 24 Hampel H, Blennow K, Shaw LM, Hoessler YC, Zetterberg H, Trojanowski JQ: Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 2010;45:30–40.
- 25 Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ: Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* 2010;9:119–128.
- 26 Götz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM: Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 2001;293:1491–1495.
- 27 Gustafson DR, Skoog I, Rosengren L, Zetterberg H, Blennow K: Cerebrospinal fluid beta-amyloid 1–42 concentration may predict cognitive decline in older women. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:461–464.
- 28 Stomrud E, Hansson O, Blennow K, Minthon L, Londo E: Cerebrospinal fluid biomarkers predict decline in subjective cognitive function over 3 years in healthy elderly. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2007;24:118–124.

Trabajo número 2

Increased Cortical Thickness and Caudate Volume Precede Atrophy in PSEN1 Mutation Carriers

Fortea J,^a Sala-Llonch R,^{b,c} Bartrés-Faz D,^{b,c} Bosch B,^a Lladó A,^{a,c} Bargalló N,^{c,d} Molinuevo JL,^{a,c} Sánchez-Valle R.^{a,c}

^a Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.

^b Department de Psiquiatria i Psicobiologia Clínica, Universitat de Barcelona, Spain.

^c Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain.

^d Radiology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Spain.

J Alzheimers Dis. 2010 Jan 1; 22(3):909-22. PMID: 20858974. IF: 3.832.

Objetivos:

- Evaluar mediante resonancia magnética el grosor del manto cortical y los volúmenes de las estructuras subcorticales en sujetos sintomáticos y presintomáticos portadores de mutaciones de PSEN1.
- Medir en estos mismos sujetos la difusividad media en la corteza y en las estructuras subcorticales.

Resultados:

- En estadios preclínicos tempranos (mediana de 10 años antes del inicio teórico de los síntomas), el grosor cortical aumenta en sujetos portadores presintomáticos de PSEN1 en áreas diana de la enfermedad de Alzheimer. Estas mismas áreas son las que se encuentran adelgazadas en los sujetos portadores de mutaciones en PSEN1 sintomáticos.
- La alteración concurrente de la difusividad media en estas mismas áreas sugiere cambios microestructurales subyacentes.
- El análisis de A β 1-42 en el LCR de 3 de los portadores asintomáticos puso de manifiesto niveles normales en 2 y límite en uno de los sujetos.
- Estos hallazgos se podrían justificar por una hipertrofia neuronal reactiva y/o inflamación.

Increased Cortical Thickness and Caudate Volume Precede Atrophy in *PSEN1* Mutation Carriers

Juan Fortea^a, Roser Sala-Lluch^{b,c}, David Bartrés-Faz^{b,c}, Beatriz Bosch^a, Albert Lladó^{a,c}, Nuria Bargalló^{c,d}, José Luis Molinuevo^{a,c} and Raquel Sánchez-Valle^{a,c,*}

^aAlzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

^bDepartment de Psiquiatria i Psicobiologia Clínica, Universitat de Barcelona, Spain

^cInstitut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

^dRadiology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Spain

Accepted 27 July 2010

Abstract. Neuroimaging studies of familial Alzheimer's disease allow investigation of the disease process before clinical onset. We performed semi-automated MRI analysis to evaluate cortical thickness (CTh), grey matter (GM) volumes, and GM diffusivity indexes in *PSEN1* mutation carriers (MC). We recruited 11 MC from 4 families with *PSEN1* mutations (L286P, M139T, K239N) and 6 familial and 12 non-familial healthy controls. MC were classified as either asymptomatic ($n = 6$) or symptomatic ($n = 5$). Subjects underwent structural and diffusion-weighted 3-Tesla MRI scanning. CTh and GM volumes of subcortical structures and diffusivity indexes were calculated and group comparisons were performed. Structural images were reanalyzed with voxel-based morphometry methodology. Cerebrospinal fluid amyloid- β_{1-42} levels ($A\beta$) were measured. We found that symptomatic MC presented widespread cortical thinning, especially in precuneus and parietotemporal areas ($p < 0.01$) and increased mean diffusivity (MD) in these areas compared to controls. Unexpectedly, asymptomatic MC, 9.9 years prior to the predicted age of disease onset, presented increased CTh in the precuneus and parietotemporal areas ($p < 0.01$), increased caudate volumes ($p < 0.01$), and decreased MD ($p < 0.05$) in these areas compared to HC. In MC, CTh correlated with adjusted age. $A\beta$ values were within normal limits in AMC. In conclusion, at early preclinical stages, CTh in the precuneus and parietotemporal regions and caudate volume increase in *PSEN1* MC and decrease thereafter with disease progression. The different trends in MD in asymptomatic and symptomatic MC suggest that different microstructural changes underlie the contrasting morphometric findings. Reactive neuronal hypertrophy or/and inflammation may account for increased CTh and decreased MD in asymptomatic MC.

Keywords: Alzheimer disease, amyloid, cerebrospinal fluid, magnetic resonance imaging, presenilin 1

INTRODUCTION

Most Alzheimer's disease (AD) cases are sporadic, typically occurring in persons over 65 years of age. However, a minority of AD cases are inherit-

ed with an autosomal dominant pattern. Genetic defects in three genes have so far been described in these inherited forms: the amyloid- β protein precursor ($A\beta PP$), the presenilin-1 (*PSEN1*), and the presenilin-2 (*PSEN2*) [1]. These forms have an early age of onset, which is relatively predictable, with nearly 100% penetrance. These forms constitute, therefore, an ideal scenario with few confounding factors to study the preclinical stage of the disease.

Functional neuroimaging has revealed functional al-

*Correspondence to: Raquel Sánchez-Valle, Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932275785; Fax: +34 932275783; E-mail: rsanchez@clinic.ub.es.

terations in the target brain AD areas as long as 30 years prior to the mean familial age of disease onset [2], and MR spectra have shown metabolite abnormalities a decade before the expected onset [3]. Structural changes such as medial temporal or global brain atrophy [4], or accelerated rate of grey matter (GM) loss [5], have also been found in mutation carriers (MC) years before clinical onset, although brain atrophy seems to occur later than functional abnormalities [6].

Recently, new methods have been developed for the measurement of cortical thickness (CTh) across the entire mantle that have proven their usefulness in detecting widespread abnormalities in early phases of sporadic AD [7], even in asymptomatic subjects in whom positive amyloid binding suggests cortical amyloid deposition [8]. This technique has proved useful in assessing subtle structural longitudinal changes in *A β PP* and *PSEN1* MC, finding a decrease in CTh in the posterior cingulate and in the precuneus prior to symptom onset [9].

Diffusion tensor imaging (DTI) is a technique that allows investigation of brain microstructure integrity based on the directionality of the diffusion of water molecules. Mean diffusivity (MD) provides a scalar measure of total diffusivity. Although it has been more widely studied in white matter, MD can also be used in the study of the integrity of grey matter in AD and mild cognitive impairment patients [10]. In this sense, in a recent study in healthy elderly, changes in MD predicted memory performance, whereas volume changes did not [11].

The aim of the present study was to analyze the CTh and subcortical GM structure volumes and GM diffusivity indexes in symptomatic and asymptomatic *PSEN1* MC.

MATERIALS AND METHODS

Participants

Eleven mutation carriers from 4 families with 3 different *PSEN1* mutations (M139T, L286P, K239N) were recruited from the genetic counseling program for familial dementias (PICOGEN) at the Hospital Clinic, Barcelona, Spain. These mutations have been published elsewhere [1,12,13]. All the subjects approached already knew their at-risk status for genetic AD. At-risk subjects received a session of genetic counseling and were given the option of knowing their genetic status through the genetic counseling protocol. Six at

risk individuals who were found to be non carriers and twelve healthy volunteers, age- and gender-matched to the asymptomatic MC (AMC), were also recruited to increase the statistical power of the sample. The study was approved by the local ethics committee and all subjects gave informed written consent.

Clinical and neuropsychological characterization

Subjects underwent clinical and cognitive evaluations. The comprehensive neuropsychological battery included verbal and visual memory (Free and Cued Selective Reminding Test-FCSRT and Rey-Osterrieth Complex Figure), semantic memory (animals fluency), language (Boston Naming Test and language comprehension of the Boston diagnostic Aphasia Battery-), praxis (ideomotor praxis and constructive praxis from the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD), visual perception (incomplete letters and number location subtest from Visual Object and Space Perception Battery-VOSP) and frontal function (Controlled Oral Word Association Test- COWAT, Trail Making Test part A and B, digit span) assessment was used. The Pfeffer Functional Activities Questionnaire (FAQ) was used for assessing patients' functional activities. Subjects were classified clinically as asymptomatic if they had no memory complaints, a normal cognitive evaluation and the Clinical Dementia Rating (CDR) scale performed with an informant was 0; or symptomatic if cognitive performance was more than 1.5 SD below the mean respect their age and education level in any cognitive test or CDR > 0. Symptomatic MC (SMC) were further classified as non-demented (SMC-ND) if CDR = 0.5 or demented (SMC-D) if CDR \geq 1.

This study included four families with three different mutations, with different median ages of onset (46, 40, and 52.5 years respectively). Because *PSEN1* MC have an early age of onset with nearly 100% penetrance and a relatively predictable age of onset within a given family we defined and calculated for each MC the adjusted age as the subject's age relative to the median familial age of onset.

Genetic analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood of probands using the QIAamp DNA blood minikit (Qiagen). Mutation screening was performed as previously described [12].

Apolipoprotein E (*APOE*) genotyping was performed by polymerase chain reaction amplification and *HhaI* restriction enzyme digestion.

CSF analysis

CSF study was offered to at-risk individuals. CSF was obtained and processed according to standard protocols. CSF $A\beta_{1-42}$ concentrations were determined by ELISA, provided by Innogenetics[®], Gent, Belgium (Innotest β -amyloid 1-42).

MRI acquisition

Subjects were examined on a 3T MRI scanner (Magnetom Trio Tim, Siemens Medical Systems, Germany). A high resolution 3D structural dataset (T1-weighted MP-RAGE, TR = 2300 ms, TE = 2.98 ms, 240 slices, FOV = 256 mm; matrix size = 256 × 256; Slice thickness = 1 mm) was acquired for the 29 subjects included. The DWI protocol consisted of an echo-planar imaging (EPI) sequence (30 directions+b0 image, with 2 repeated acquisitions, TR = 7600 ms, TE = 89 ms, 60 slices, slice thickness = 2 mm, distance factor = 0%, FOV = 250 mm, matrix size = 122 × 122, voxel size = 2 × 2 × 2 mm).

Cortical thickness and volumetric segmentation procedures

Cortical reconstruction and volumetric segmentation of the structural images was performed with the FreeSurfer image analysis suite, version 4.3.1 (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu>). The procedures have been fully described elsewhere [14]. In short, reconstructed and registered individual CTh maps were smoothed using a Gaussian kernel of 20 mm Full-Width Half Maximum and introduced in a group analysis, based on general linear modeling (GLM) of the data (age, gender, and family were introduced as covariates). Regions that presented significant differences between groups were used to define regions of interest (ROI) for analysis in further region-specific studies. We also manually drew another ROI in the primary visual cortex to serve as a control structure (VisualROI) [8]. Furthermore, within the FreeSurfer streamline, a parcellation of each individual surface was performed with two different atlases available [15,16]. Mean thickness of the parcellations of interest were used to do between-groups comparisons, and regression analysis with adjusted age.

Subcortical segmentation was performed also as implemented in FreeSurfer. The segmentation procedure allows the obtainment of a measure of the estimated Intracranial Volume (EIV) [17], which is based on the

scale factor used for the atlas registration. Finally, GM volumes for all the subcortical segmented structures were extracted for each subject.

CTh analyses were done with and without a correction for multiple comparisons. The uncorrected results were thresholded at $p < 0.01$ level. We performed two different kinds of multiples comparison correction. First a FDR multiple comparison correction was applied. Moreover a Familywise Error (FWE) permutation testing (500 permutations) was performed, as implemented in FreeSurfer.

Voxel based morphometry (VBM) analysis

Structural MRI data were also processed with FSL-VBM stream protocol, a voxel-based morphometry style analysis included in the FSL suite (<http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl>) [18]. Procedures within this protocol allow an accurate voxelwise comparison of individual grey matter maps, using GLM (age, gender, and family were introduced as covariates) and permutation-based non-parametric testing and correcting for multiple comparisons across space, using family-wise error (FWE) correction.

Analysis of diffusion MRI data

Diffusion MRI was processed using tools implemented in FSL. First, individual MD maps were extracted for each subject. These maps were registered to MNI152 space and introduced into a GLM analysis to perform group comparisons. Appropriate registration tools were applied to extract mean MD values in the different ROIs. MD analyses using a cortical mask are presented corrected for multiple comparisons, using FWE algorithm, and thresholded at $p < 0.05$ level of significance.

Statistical analysis

Group analyses were made using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) v.16 (Chicago, IL, USA). Comparisons between groups (SMC/AMC versus HC) were performed using two-tailed t-tests

RESULTS

Demographic and clinical characteristics and genetic status

Demographic data and *APOE* genotype of all partic-

Table 1
Demographic data of the participants

	Subject	Family	Gender	Age (years)	Relative age (years)	CDR sum of boxes	MMSE	APOE
SMC group	SMC1	1	Female	38	-1.99	2	28	33
	SMC2	1	Female	45	5.36	5.5	24	33
	SMC3	1	Male	43	3.15	2.5	24	33
	SMC4	2	Male	51	4.98	10	17	43
	SMC5	3	Female	60	7.27	14	11	33
AMC group	AMC1	2	Male	33	-12.79	0	30	33
	AMC2	2	Female	32	-14	0	30	23
	AMC3	3	Female	45	-7.4	0	29	33
	AMC4	3	Female	49	-3.58	0	27	33
	AMC5	3	Female	55	2.97	0	29	33
	AMC6	4	Male	33	-12.3	0	28	33
HC group	HC1	1	Female	44	-	0	29	43
	HC2	1	Female	35	-	0	30	33
	HC3	1	Female	39	-	0	29	33
	HC4	3	Female	52	-	0	29	33
	HC5	4	Female	25	-	0	29	33
	HC6	4	Male	35	-	0	29	33
	Non-familiar HC group		Male 4/ Female 8	42.08 ± 11.59	-	0	29.44 ± 0.511	
	N = 12							

ipants is summarized in Table 1. Five MC were SMC (2 SMC-ND and 3 SMC-D) with a median age of 45 years (range 38–60 years), median adjusted age of 5.0 years (range -1.9–7.3 years). Six MC were AMC with a median age of 39 years (range 32–55 years) and median adjusted age of -9.9 (range -14.0 to 3.0 years), and 18 participants were HC (median age 39.4 years; range 25.2 to 59.8 years). Age, education, gender, and MMSE did not differ between HC and AMC. As expected, SMC were older than HC and AMC and presented significant differences on all clinical and functional scales.

Four SMC and 3 AMC consented to participate in the study of CSF Aβ levels. The 4 SMC presented abnormally low values (mean 175 pg/mL), while AMC presented normal values (mean 776 pg/mL).

Structural analysis

The estimated intracranial volume (EIV) did not differ between HC and AMC (1475790 mm³ versus 1488259 mm³, *p* = 0.87) or between HC and SMC (1463620 mm³, *p* = 0.89). EIV was therefore not included in subsequent statistical models.

Cortical thickness analysis in symptomatic and asymptomatic mutation carriers

Analysis of whole brain CTh maps revealed significant thinning (*p* < 0.01 uncorrected) in SMC in many

areas across the entire cortical mantle (*SympROI*). A separate analysis between HC and both SMC-ND and SMC-D was performed (Fig. 1). The difference maps between HC and each subgroup showed that although the pattern of thinning in the SMC-ND was similar to that of SMC-D, its extension and magnitude was clearly lower than in SMC-D. The posterior cingulate and precuneus (PPC) and posterior association areas – the superior temporal gyrus (ST), the banks of the superior temporal sulcus (BSTS), inferior and superior parietal cortex (IP and SP), fusiform gyrus (FG) – presented more severe and widespread cortical thinning than frontal areas where the thinning appeared more restricted to certain specific regions (anterior cingulate, pars triangularis, pars orbitalis, frontal pole, orbitofrontal, and superior frontal). There were minor differences in the spatial location of regional thinning across hemispheres, but the results were quite consistent bilaterally. We also found a region of focal cortical thickening in the anterior right cingulate cortex present in both SMC-ND and SMC-D patients when compared to HC.

Figure 2 shows the difference maps for the AMC group in comparison with the HC group. Only small scattered areas of cortical thinning across the cortex appeared. Unexpectedly, several regions – the PPC, the BSTS, the IP, the SP and the FG – showed cortical thickening. Some of these regions (precuneus, BSTS, supramarginalis and IP areas) survived the FWE multiple comparison correction which are shown in Table 2 and a region in the PPC also survived FDR correction (shown in Fig. 3). Uncorrected differences are repre-

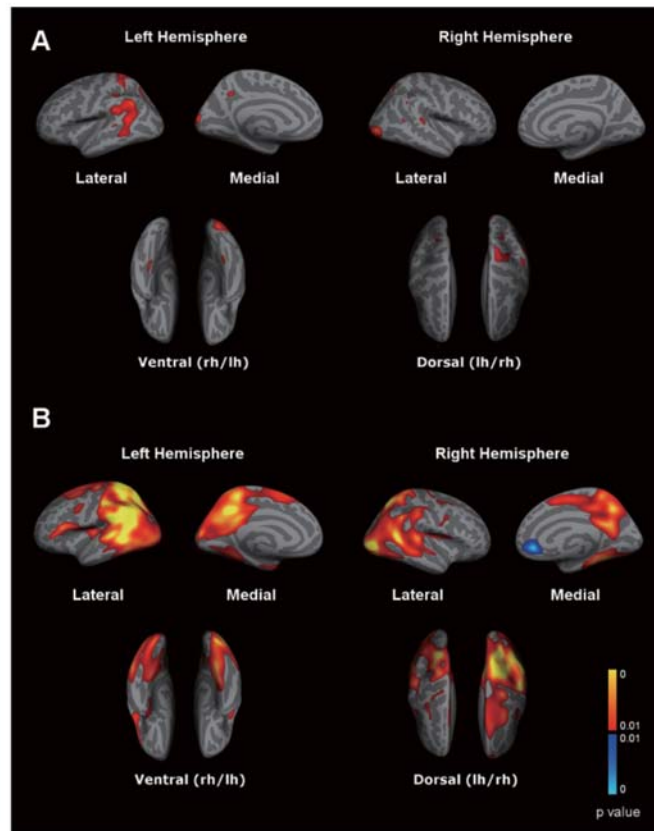


Fig. 1. Cortical thickness (CTh) difference maps in different clinical stages: (A) Non-demented symptomatic mutation carriers, (B) Demented symptomatic mutation carriers. Both compared against the healthy control group ($p < 0.01$ uncorrected). Red-yellow color code means decreased CTh, and blue color code means increased CTh.

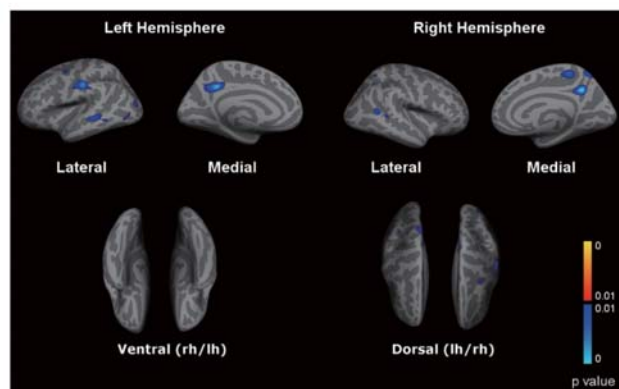


Fig. 2. Cortical thickness (CTh) difference maps for the contrast AMC versus HC. Thresholded at $p < 0.01$, uncorrected. Red-yellow color code means decreased CTh, and blue color code means increased CTh.

Table 2
Familywise Error (FWE) multiple comparisons correction (500 permutations). Cortical areas corresponding to each cluster were assigned using the parcellations from an available atlas [15] BTSS = banks of the temporal superior sulcus

Cluster number	Size (mm ²)	Max p value	Max-p Tairarach coordinates	Cluster-Wise probability	Cluster-Wise confidence interval	Atlas label
1	613.75	10 ^(-5.2)	(-14.3, -46.1, 30.5)	0.05	[0.038-0.062]	precuneus
2	766.89	10 ^(-3.6)	(-49.4, -41.8, 1.3)	0.01	[0.004-0.016]	BTSS
3	876.53	10 ^(-3.6)	(-53.1, -35.8, 29.7)	0.002	[0.000-0.004]	supramarginal
4	1102.14	10 ^(-3.2)	(-29.0, -80.5, 15.3)	0.002	[0.000-0.004]	inferiorparietal

Table 3
Average Cortical Thickness (CTh) and group comparisons within the defined regions of interest. *AsympROI* refers to areas with increased CTh in the AMC group, *SympROI* refers to areas with reduced CTh in the SMC group, and *VisualROI* serves as a control region

Average CTh (mm)		<i>SympROI</i> Mean (SD)	<i>AsympROI</i> Mean (SD)	<i>VisualROI</i> Mean (SD)
HC		2.55 (0.09)	2.38 (0.08)	1.62 (0.15)
AMC		2.66 (0.09)	2.64 (0.18)	1.57 (0.11)
SMC	Non-demented	2.31 (0.05)	2.26 (0.09)	1.46 (0.12)
	Demented	2.04 (0.07)	1.93 (0.06)	1.37 (0.08)
<i>Group Comparisons</i>				
HC vs AMC		$t = 2.5, p = 0.019$	$t = 5.06, p < 0.001$	$t = 0.69, p = 0.5$
HC vs SMC-ND		$t = 3.49, p = 0.003$	$t = 2.04, p = 0.057$	$t = 1.38, p = 0.18$
HC vs SMC-D		$t = 9.06, p < 0.001$	$t = 9.63, p < 0.001$	$t = 2.6, p = 0.015$

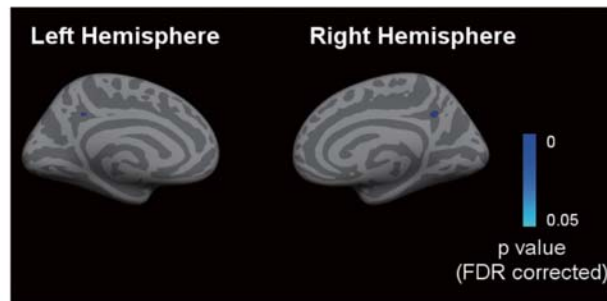


Fig. 3. Cortical thickness (CTh) difference maps for the contrast AMC versus HC. FDR multiple comparison correction thresholded at $p < 0.05$. Blue color code means increased CTh.

sented in Fig. 2 when compared to HC. *AsympROI* was created from the map at $p < 0.01$.

Table 3 shows the mean CTh values for each group in the 3 ROIs (*SympROI*, *AsympROI* and *VisualROI*). SMC-D presented a 20% decrease in *SympROI* and 18.9% in *AsympROI* compared to HC ($p < 0.001$ and $p < 0.01$ respectively), more severe than SMC-ND cortical thinning (5.047% in *AsympROI* and 9.41% in *SympROI*). In AMC, mean CTh presented 10.9% and 4.31% increases in both *AsympROI* and *SympROI* areas when compared to HC ($p < 0.001$ and $p = 0.019$ respectively). These changes were not found in the control region *VisualROI*, where only SMC-D presented differences with HC. We found the same type of changes when

determining CTh in several automatically atlas derived regions (Table 4).

We found an overlap between the *SympROI* and the *AsympROI*, although the extension of cortical thinning in SMC was greater than that of cortical thickening in AMC (Fig. 4).

Figure 5 presents individual mean CTh values in the *AsympROI*. Most MC values fall outside the range of HC values, with higher values for individual mean CTh in AMC and lower values in SMC. We used the individual CTh values extracted from the *AsympROI* to examine the relationship between the adjusted age and CTh. There was no correlation between absolute age and CTh in HC. However, a strong correlation

Table 4
Average Cortical Thickness (CTh) and group comparisons within the atlas-based regions of interest [16]. Regions are represented in Fig. 6

	CTR	AMC	t-test (CTR vs AMC)	SMC	T-test (CTR vs SMC)
right_S_subparietal	2.42(0.16)	2.63(0.14)	T = 2.85, $p = 0.009$	2.09(0.29)	$t = 3.17, p = 0.005$
left_S_subparietal	2.38(0.11)	2.54 (0.19)	T = 2.44, $p = 0.023$	1.83(0.28)	$t = 6.71, p = 0.000$
left_S_occipital_middle_ and_Lunatus	2.10(0.16)	2.30(0.15)	T = 2.51, $p = 0.020$	1.66(0.20)	$t = 4.65, p = 0.000$
left_S_occipital_superior_ and_transversalis	2.15(0.16)	2.32(0.09)	T = 2.57, $p = 0.018$	1.81(0.28)	$t = 3.37, p = 0.003$
left_S_Cingulate_ marginalis	2.21(0.15)	2.36(0.14)	T = 2.1, $p = 0.047$	1.77(0.22)	$t = 4.97, p = 0.000$

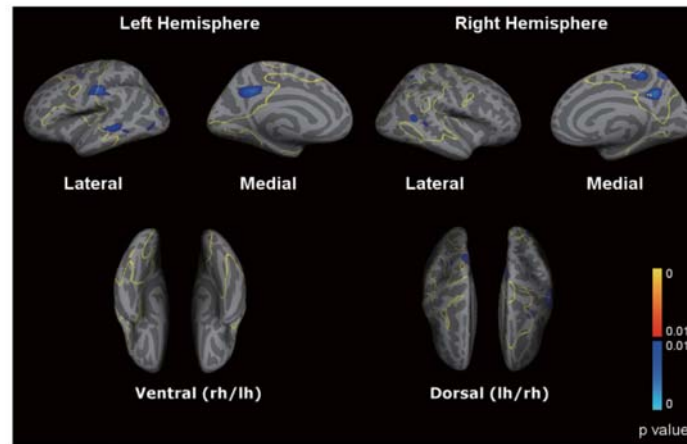


Fig. 4. Overlap of AMC versus HC (dark blue-light blue), and SMC versus HC (yellow lines) difference maps.

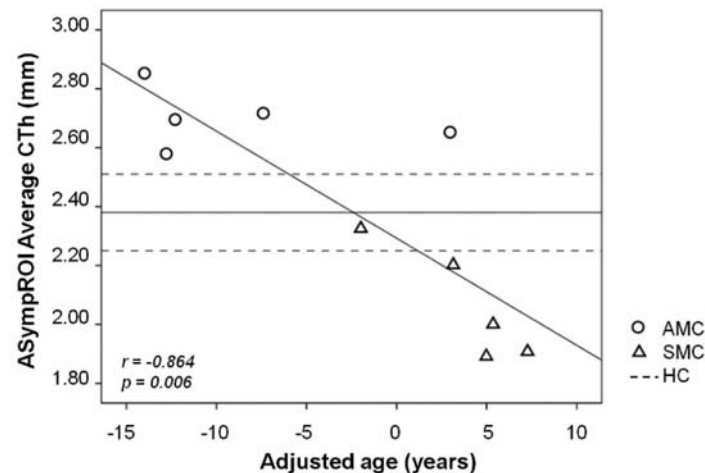


Fig. 5. Correlation between mean cortical thickness (CTh) values measured in the AsympROI and adjusted age of each mutation carrier (asymptomatic carriers in circles, symptomatic carriers in triangles). Solid line is the adjusted regression line. Solid and dashed lines represent mean CTh and its range measured in the same ROI for HC.

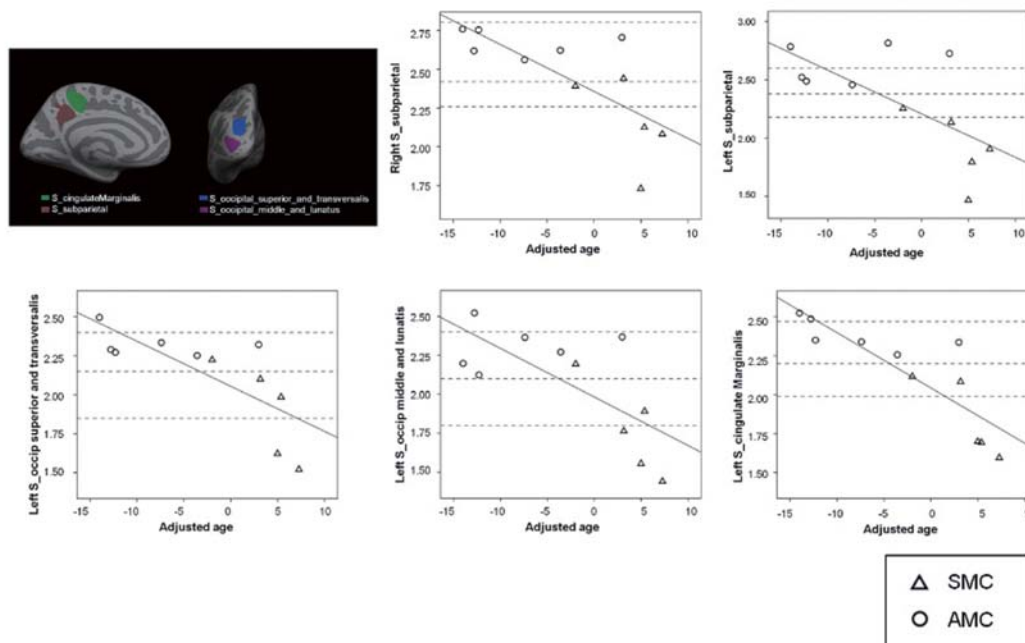


Fig. 6. Correlation between mean cortical thickness (CTh) values measured in several ROI obtained by the automated parcellation of the cortex available in FreeSurfer [16] and the adjusted age of each mutation carrier (asymptomatic carriers in circles and symptomatic carriers in triangles). Dashed lines represent the mean CTh measured in the same ROI for HC.

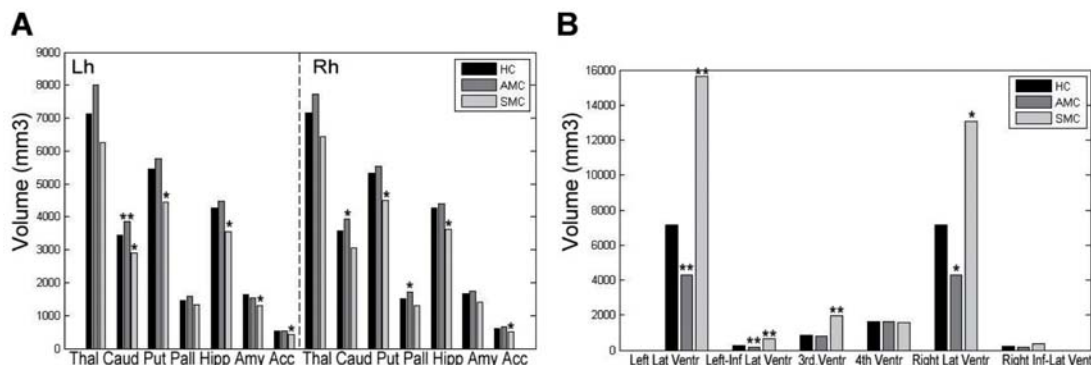


Fig. 7. (A) Volume of the atlas-based subcortical segmentations. Mean values within each group. (B) Volume of the atlas-based segmentation for ventricles and fluid-based segmentations. Mean values within each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (group comparisons versus HC).

between individual CTh values and the adjusted age was found in MC ($r = 0.864, p = 0.006$, see Fig. 5). Only one AMC presented values far from the regression line. Interestingly, this subject was still asymptomatic at +3 years from predicted disease onset, a finding that shows the limitation of adjusted age as prediction of disease onset. The same type of results are obtained when analyzing this correlation in ROIs obtained with

an automated parcellation of the cortex) [16] in areas of interest (Fig. 6).

Subcortical grey matter and ventricular volumes in symptomatic and asymptomatic mutation carriers

Atrophy in the SMC group, measured as a loss of grey matter, was significant in bilateral hippocampi,

Table 5
Average Mean Diffusivity measured in the two defined ROIs (SympROI and AsympROI), in the control ROI (VisualROI), and in subcortical structures. Caud: Caudate, Acc: Accumbens, Amy: Amygdala, Hipp: Hippocampus, Put: Putamen

MD (10^{-4} cm ² /s)	SympROI Mean (SD)	AsympROI Mean (SD)	VisualROI Mean (SD)	Caud Mean (SD)	Acc Mean (SD)	Amy Mean (SD)	Hipp Mean (SD)	Put Mean (SD)
HC	8.40 (0.55)	8.70 (0.56)	4.09 (0.53)	12.67 (1.76)	8.34 (0.46)	8.73 (0.28)	11.7 (0.63)	7.32 (0.36)
AMC	7.74 (0.28)	8.00 (0.56)	3.79 (0.57)	10.23 (1.46)	8.22 (0.56)	8.64 (0.28)	10.9 (0.36)	7.44 (0.27)
SMC	9.90 (0.43)	10.7 (8.77)	4.58 (0.67)	16.34 (0.80)	9.04 (0.75)	9.69 (1.12)	14.4 (1.53)	7.69 (0.31)
<i>Group comparisons (t-test)</i>								
SMC vs HC	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p = 0.11$	$p < 0.001$	$p = 0.02$	$p = 0.13$	$p = 0.016$	$p = 0.054$
HC vs AMC	$p = 0.028$	$p = 0.014$	$p = 0.28$	$p = 0.01$	$p = 0.64$	$p = 0.54$	$p = 0.018$	$p = 0.512$

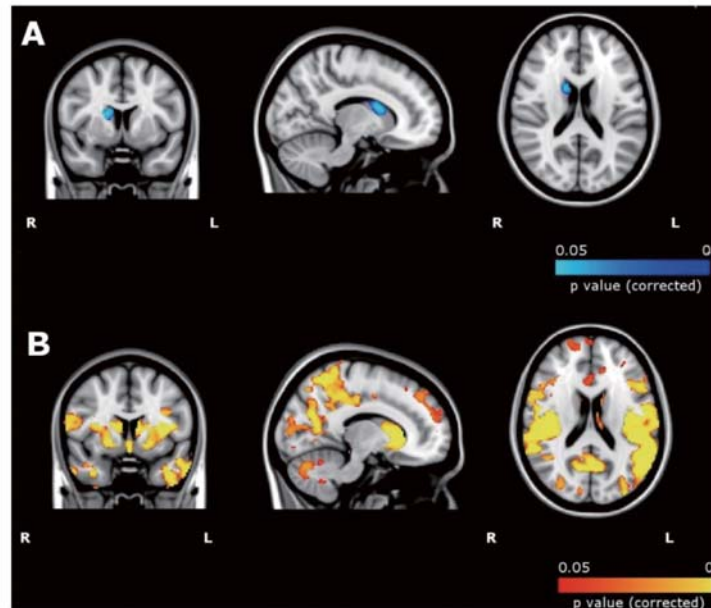


Fig. 8. VBM results. A) AMC versus HC ($p < 0.05$, corrected), (B) HC versus SMC ($p < 0.05$, corrected). Red-yellow color code means decreased volume, and blue color code means increased volume.

accumbens, putamen, and left caudate and amygdala with respect to HC. In contrast, AMC presented significant enlargement of the caudate bilaterally with respect to HC ($p < 0.01$ left caudate, $p < 0.05$ right caudate). Although without reaching statistical significance, many of the other atlas-based structures found to be atrophied in SMC were also enlarged in the AMC group (Fig. 7A).

Ventricular size showed the opposite trend. SMC showed a significant increase in ventricular size compared to HC whereas AMC showed significantly lower volumes. Moreover, these changes were found in the supratentorial compartment (lateral and third ventricles) with preservation of the 4th ventricle (Fig. 7B)

Voxel based morphometry analysis

VBM results are shown in Fig. 8. SMC showed significant widespread GM atrophy, mostly in PPC, parietotemporal association areas, lateral temporal ($p < 0.05$, corrected for multiple comparisons) and both caudates and bilateral putamen. AMC showed increased volume in right caudate. No areas were found enlarged in the SMC compared to HC or in the HC compared to the AMC.

Diffusivity indexes: Mean diffusivity in the cortex and caudate

The general linear model (GLM) analysis restricted to the cortex corrected for multiple comparisons across

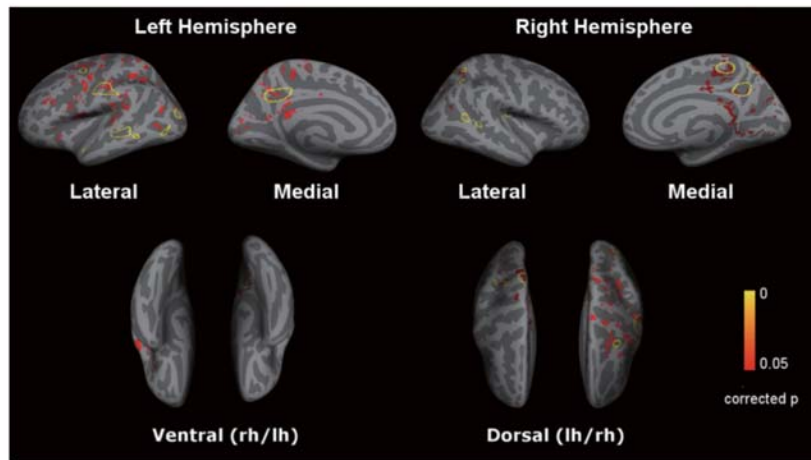


Fig. 10. Overlap of cortical thickness and mean diffusivity difference maps for AMC subjects. Green lines surround regions of cortical thickening ($p < 0.05$), and red-yellow regions are those where MD was found to be decreased in the AMC group. MD maps are mapped from volumetric to surface-based representation.

automatically extracted from FreeSurfer in the areas of interest, suggesting that the same areas found to be thickened suffer from thinning in MC as the disease progresses. Fourth, investigating the “specificity” of the areas involved, we found inverse changes in CTh in SMC and AMC in regions that present substantial visual overlap (*SympROI* and *AsympROI*), but not in the control region (*VisualROI*). Finally, the increase in CTh was accompanied by a significant fall in MD values, suggesting that not only gross structural changes but also microstructural abnormalities may be occurring.

To the best of our knowledge, this is the first report of increased CTh in *PSEN1* MC. Previous structural studies in AMC did not find differences, or suggested a loss of cortical GM in comparison with HC. There are two possible explanations for this discrepancy. First, if the shift from increased CTh towards atrophy is to happen in the asymptomatic phase of the disease, the results in each study would be critically dependent on the closeness to the predicted clinical onset of the AMC included in the sample. Our AMC are more distant from the predicted clinical onset (median adjusted age -9.9 years) than the subjects included in previous series (approximately -4 years) [6,9]. VBM studies have estimated that medial temporal atrophy and global atrophy begin 3 to 3.5 years before mean familial onset [5, 6] and longitudinal measures can identify differences in the rate of hippocampal GM loss in MC up to 5.5 years before diagnosis [5]. CTh decreased in posterior cingulate about 1.8 years and in the precuneus 4.1 years prior to diagnosis [9]. Second, technical differences

may also account for the differences found, at least in part. Most previous studies have been performed with a volume-based registration approach instead of using a surface-based registration. CTh has been shown more accurate [14] and is a potentially more reliable marker than volume, as the cytoarchitectural structure of the grey matter is less variable [9]. Another advantage of CTh studies is that they may provide significant information even in small groups such as ours [20]. In fact, in the present study only CTh demonstrated cortical involvement when applying multiple comparisons correction and in the uncorrected results CTh demonstrated much more cortical involvement than VBM (data not shown).

Subcortical GM structures showed significant differences in the same direction, with significant increases in volume in both caudates in AMC, while SMC presented significant volume loss. The diffusivity analysis in the caudate in AMC showed significantly reduced MD. These results should be treated with caution because of possible CSF artifacts (especially MD results as the FSL VBM streamline already accounts for them in the volumetric analysis). Basal ganglia did not use to be considered among the typical areas affected in genetic AD but this idea changed after the demonstration of significant $A\beta$ deposition in the striatum with much lower cortical deposition a decade before symptomatology onset in *PSEN1* AMC [21,22].

Several lines of evidence in the literature on morphometric studies in humans, pathological data, and studies in animal models support a possible increase in

CTh or subcortical GM volume in very early stages of AD. In a recent paper, *APOE* $\epsilon 4$ carriers showed thicker cortices than non-carriers, but a steeper age-related thinning in areas known to be affected in AD precisely in the life period (48–75 years old) when early morphological changes are beginning to emerge [23]. The authors interpreted the findings as a result of compensation of the underlying pathological processes. We believe that those results are very similar to ours and that the explanation presented there may also be applicable to our case. Moreover the same group has very recently replicated their results of cortical thickening in *APOE* $\epsilon 4$ carriers and reported that *APOE* $\epsilon 4$ related thickening modulates selective attention [24]. In pathological studies of cognitive normal subjects with changes of AD, cortical and hippocampal neurons show nuclear hypertrophy, interpreted as a probable reaction to $A\beta$, long before the onset of clinical symptoms [25,26]. The authors interpreted the results as either a compensatory response to AD pathology that prevents cognitive decline, or as a part of the pathological process. In animal models, a similar phenomenon was observed in transgenic mice, with neural hypertrophy and increased synaptic contacts reported in *A β PP/PS1DeltaE9* animals [27,28]. Morphometric studies with serial MRI found an increase in cerebral and intracranial size in double transgenic mice [29]. The interpretation provided was that the results were a consequence of $A\beta$ load and the associated inflammatory response (astrogliosis and microglial activation). In humans, inflammation has been reported very early in the course of the disease and there is evidence of complement activation on amyloid plaques in non-demented subjects who do not meet pathologic criteria for AD [30]. Immunotherapy trial results in AD also suggested that inflammation and $A\beta$ load could account for GM thickness or volume, where the removal of $A\beta$ (or other plaque-related proteins) and alterations in glial cell density have been suggested as explanations of the volume loss and ventricular enlargement found among antibody responders [31].

Both changes in cell volume or number produce an alteration in the cellular compartment with respect to the total volume within the cortex which may affect the diffusion of water measured with MD [32]. In our study, SMC presented the expected increase in MD in the cortex and caudate, probably as a reflection of neuronal loss [10]. In contrast, AMC showed a significant decrease in MD, which may have reflected the increase in both cell volume and number due to an inflammatory response. Thus, either reactive neuronal hypertrophy or inflammatory response to $A\beta$, or probably both, could

account for the increased CTh or volume and decreased MD found in AMC in our study.

Notwithstanding the absence of previous reports of cortical thickening in genetic AD, in Huntington disease (HD) cortical volume or thickness has been found significantly increased in far-from-onset preclinical HD [33] and YAC128 mice [34]. Paulsen and colleagues [33] underlined the possibility of an abnormal cortical development to explain the increased cortical volume. Lerch et al. [34] also suggested the possibility of a compensatory response to striatal degeneration or some type of inflammatory response preceding cell death in accordance with neuropathological data on preclinical HD [35], which coincides with the interpretation we give to our findings. Whatever the interpretation both the findings in HD and our present results expand the ability of structural neuroimaging from detecting atrophy to actually detecting gray matter increases at earlier stages of neurodegenerative disorders.

On the other hand, while SMC presented abnormal $A\beta$ mean values, AMC $A\beta$ values were normal, suggesting that in these subjects $A\beta$ fibrillar deposition was not severe or extensive enough to produce a reduction in CSF $A\beta$ levels [36]. Nevertheless, morphometric and microstructural changes in AMC could be mediated by the toxic effect of $A\beta$ oligomers or diffuse plaques previous to $A\beta$ fibrillar deposition. However, the small number of subjects studied and the lack of amyloid imaging data to evaluate focal fibrillar $A\beta$ deposition requires us to be extremely cautious with this interpretation.

Recently, Jack and colleagues summarized the currently available evidence on sporadic AD and proposed a model that related disease stage to AD biomarkers [37]. In their model, a preclinical phase of the disease corresponds to the deposition of fibrillar $A\beta$ marked by reductions in CSF $A\beta$ and increased amyloid PET tracer retention. Neurodegeneration appeared later marked with functional abnormalities, increased CSF tau and atrophy in MRI. The finding of increased CTh and caudate volume with normal values of $A\beta$ does not fit either of the stages described in Jack's model. Although we should bear in mind that the model was proposed for sporadic AD and the sequence of events in these two populations may differ, our findings could in fact fit the model if we place our AMC subjects at the very beginning of the β -amyloidosis phase or in a previous one, driven by soluble $A\beta$. As the designers of this model acknowledged, features such as the role of toxic $A\beta$ oligomeric species or diffuse plaques and the timing of their appearance were not included, as there are currently no reliable biomarkers for them.

Our study has several limitations. As mentioned above the first and most important is the small number of subjects studied, although in rare genetic populations this is practically inevitable. Therefore we should emphasize that it will be essential to replicate our findings in other cohorts to confirm our results. Another limitation in the interpretation of these results is the use of adjusted age as theoretical construct to substitute currently unknown real age of onset. We acknowledge that the absence of $A\beta$ imaging, which is not currently available, is another limitation in the interpretation of the results. As discussed above, the study of CSF $A\beta$ levels was performed to overcome, at least in part, this problem [37]. In spite of these limitations, we believe that our findings are robust and can be interpreted in accordance with previous data. There is a great research effort devoted to finding imaging biomarkers of early pathological changes in AD and the present work may have important implications in this area. However, the degree to which they can be extrapolated to sporadic AD remains unknown.

In conclusion, CTh appears to be increased in the precuneus and parietotemporal association areas in PSEN1 MC during early preclinical stages of the disease. Subcortical GM structures, especially the caudate nucleus, are also enlarged. With disease progression, these areas suffer GM loss and become thinner or atrophied. The increase in mean CTh and caudate volumes in AMC is associated with a decrease in MD, whereas atrophy in SMC is associated with increased MD. The inverse changes in diffusion indices in SMC and AMC suggest different microstructure abnormalities underlying the contrasting morphometric findings. Reactive neuronal hypertrophy or inflammatory response to $A\beta$, or both, may account for the increased CTh and decreased MD found in AMC whereas decreased CTh and increased MD in SMC may reflect predominant neuronal loss.

ACKNOWLEDGMENTS

This study has been funded by research grants from the *Instituto Carlos III* (FIS080036) and from the Spanish *Ministerio de Ciencia e Innovación* (SAF2009-07489), Spain. Juan Fortea is the receptor of a Josep Font grant from Hospital Clinic. We thank Michael Maudsley for help with the English and thank all the volunteers for their participation in this study.

Sources of support: Dr Juan Fortea reports having received a Josep Font grant from Hospital Clinic. Dr

Raquel Sanchez-Valle has received a grant (FIS080036) from the Spanish *Ministerio de Ciencia e Innovación*.

Authors' disclosures available online (<http://www.jalz.com/disclosures/view.php?id=558>).

REFERENCES

- [1] Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database, <http://www.molgen.ua.ac.be/admutations/>, Accessed on February 2, 2010.
- [2] Mondadori CR, Buchmann A, Mustovic H, Schmidt CF, Boesiger P, Nitsch RM, Hock C, Streffer J, Henke K (2006). Enhanced brain activity may precede the diagnosis of Alzheimer's disease by 30 years. *Brain* **129**, 2908-2922.
- [3] Godbolt AK, Waldman AD, MacManus DG, Schott JM, Frost C, Cipolotti L, Fox NC, Rossor MN (2006) MRS shows abnormalities before symptoms in familial Alzheimer disease. *Neurology* **66**, 718-722.
- [4] Schott JM, Fox NC, Frost C, Scallan RI, Janssen JC, Chan D, Jenkins R, Rossor MN (2003) Assessing the onset of structural change in familial Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **53**, 181-188.
- [5] Ridha BH, Barnes J, Bartlett JW, Godbolt A, Pepple T, Rossor MN, Fox NC (2006) Tracking atrophy progression in familial Alzheimer's disease: a serial MRI study. *Lancet Neurol* **5**, 828-834.
- [6] Mosconi L, Sorbi S, de Leon MJ, Li Y, Nacmias B, Myoung PS, Tsui W, Ginestroni A, Bessi V, Fayyazz M, Caffarra P, Pupi A (2006) Hypometabolism exceeds atrophy in presymptomatic early-onset familial Alzheimer's disease. *J Nucl Med* **47**, 1778-1786.
- [7] Desikan RS, Cabral HJ, Hess CP, Dillon WP, Glastonbury CM, Weiner MW, Schmansky NJ, Greve DN, Salat DH, Buckner RL, Fischl B; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2009) Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Automated MRI measures identify individuals with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain* **132**, 2048-2057.
- [8] Dickerson BC, Bakkour A, Salat DH, Feczko E, Pacheco J, Greve DN, Grodstein F, Wright CI, Blacker D, Rosas HD, Sperling RA, Atri A, Growdon JH, Hyman BT, Morris JC, Fischl B, Buckner RL (2009) The cortical signature of Alzheimer's disease: regionally specific cortical thinning relates to symptom severity in very mild to mild AD dementia and is detectable in asymptomatic amyloid-positive individuals. *Cereb Cortex* **19**, 497-510.
- [9] Knight WD, Kim LG, Douiri A, Frost C, Rossor MN, Fox NC (2010) Acceleration of cortical thinning in familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, in press.
- [10] Müller MJ, Greverus D, Weibrich C, Dellani PR, Scheurich A, Stoeter P, Fellgiebel A (2007) Diagnostic utility of hippocampal size and mean diffusivity in amnesic MCI. *Neurobiol Aging* **28**, 398-403.
- [11] Carlesimo GA, Cherubini A, Caltagirone C, Spalletta G (2010) Hippocampal mean diffusivity and memory in healthy elderly individuals: a cross-sectional study. *Neurology* **74**, 194-200.
- [12] Sánchez-Valle R, Lladó A, Ezquerro M, Rey MJ, Rami L, Molinuevo JL (2007) A novel mutation in the PSEN1 gene (L286P) associated with familial early-onset dementia of Alzheimer type and lobar haematomas. *Eur J Neurol* **14**, 1409-1412.
- [13] Lladó A, Fortea J, Ojea T, Bosch B, Sanz P, Valls-Solé J, Clarimon J, Molinuevo JL, Sánchez-Valle R (Epub ahead of print) A

- novel PSEN1 mutation (K239N) associated with Alzheimer's disease with wide range age of onset and slow progression. *Eur J Neurol* **17**, 994-996
- [14] Fischl B, Dale AM (2000) Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11050-11055.
- [15] Desikan RS, Ségonne F, Fischl B, Quinn BT, Dickerson BC, Blacker D, Buckner RL, Dale AM, Maguire RP, Hyman BT, Albert MS, Killiany RJ (2006). An automated labelling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. *Neuroimage* **31**, 968-980.
- [16] Fischl B, van der Kouwe A, Destrieux C, Halgren E, Ségonne F, Salat DH, Busa E, Seidman LJ, Goldstein J, Kennedy D, Caviness V, Makris N, Rosen B, Dale AM (2004). Automatically parcellating the human cerebral cortex. *Cereb Cortex* **14**, 11-22.
- [17] Buckner RL, Head D, Parker J, Fotenos AF, Marcus D, Morris JC, Snyder AZ (2004). A unified approach for morphometric and functional data analysis in young, old, and demented adults using automated atlas-based head size normalization: reliability and validation against manual measurement of total intracranial volume. *Neuroimage* **23**, 724-738.
- [18] Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, Beckmann CF, Behrens TE, Johansen-Berg H, Bannister PR, De Luca M, Drobnjak I, Flitney DE, Niazy RK, Saunders J, Vickers J, Zhang Y, De Stefano N, Brady JM, Matthews PM (2004) Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *Neuroimage* **23**, S208-S219.
- [19] Whitwell JL, Shiung MM, Przybelski SA, Weigand SD, Knopman DS, Boeve BF, Petersen RC, Jack CR Jr (2008) MRI patterns of atrophy associated with progression to AD in amnesic mild cognitive impairment. *Neurology* **70**, 512-520.
- [20] Eskildsen SF, Østergaard LR, Rodell AB, Østergaard L, Nielsen JE, Isaacs AM, Johannsen P (2009) Cortical volumes and atrophy rates in FTD-3 CHMP2B mutation carriers and related non-carriers. *Neuroimage* **45**, 713-721.
- [21] Klunk WE, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, Lopresti BJ, Ziolko SK, Bi W, Hoge JA, Cohen AD, Ikonomic MD, Saxton JA, Snitz BE, Pollen DA, Moonis M, Lippa CF, Swearer JM, Johnson KA, Rentz DM, Fischman AJ, Aizenstein HJ, DeKosky ST (2007) Amyloid deposition begins in the striatum of presenilin-1 mutation carriers from two unrelated pedigrees. *J Neurosci* **27**, 6174-6184.
- [22] Villemagne VL, Ataka S, Mizuno T, Brooks WS, Wada Y, Kondo M, Jones G, Watanabe Y, Mulligan R, Nakagawa M, Miki T, Shimada H, O'Keefe GJ, Masters CL, Mori H, Rowe CC (2009) High striatal amyloid beta-peptide deposition across different autosomal Alzheimer disease mutation types. *Arch Neurol* **66**, 1537-1544.
- [23] Espeseth T, Westlye LT, Fjell AM, Walhovd KB, Rootwelt H, Reinvang I (2008) Accelerated age-related cortical thinning in healthy carriers of apolipoprotein E epsilon 4. *Neurobiol Aging* **29**, 329-340.
- [24] Espeseth T, Westlye LT, Walhovd KB, Fjell AM, Endestad T, Rootwelt H, Reinvang I (2010) Apolipoprotein E epsilon4-related thickening of the cerebral cortex modulates selective attention. *Neurobiol Aging*, in press.
- [25] Riudavets MA, Iacono D, Resnick SM, O'Brien R, Zonderman AB, Martin LJ, Rudow G, Pletnikova O, Troncoso JC (2007) Resistance to Alzheimer's pathology is associated with nuclear hypertrophy in neurons. *Neurobiol Aging* **28**, 1484-1492.
- [26] Iacono D, Markesbery WR, Gross M, Pletnikova O, Rudow G, Zandi P, Troncoso JC (2009) The Nun study: clinically silent AD, neuronal hypertrophy, and linguistic skills in early life. *Neurology* **73**, 665-673.
- [27] West MJ, Bach G, Søderman A, Jensen JL (2009) Synaptic contact number and size in stratum radiatum CA1 of APP/PS1DeltaE9 transgenic mice. *Neurobiol Aging* **30**, 1756-1776.
- [28] Oh ES, Savonenko AV, King JF, Fangmark Tucker SM, Rudow GL, Xu G, Borchelt DR, Troncoso JC (2009) Amyloid precursor protein increases cortical neuron size in transgenic mice. *Neurobiol Aging* **30**, 1238-1244.
- [29] Maheswaran S, Barjat H, Rueckert D, Bate ST, Howlett DR, Tilling L, Smart SC, Pohlmann A, Richardson JC, Hartkens T, Hill DL, Upton N, Hajnal JV, James MF (2009) Longitudinal regional brain volume changes quantified in normal aging and Alzheimer's APP x PS1 mice using MRI. *Brain Res* **1270**, 19-32.
- [30] Zanjani H, Finch CE, Kemper C, Atkinson J, McKeel D, Morris JC, Price JL (2005) Complement activation in very early Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **19**, 55-66.
- [31] Fox NC, Black RS, Gilman S, Rossor MN, Griffith SG, Jenkins L, Koller M; AN1792(QS-21)-201 Study (2005) Effects of Abeta immunization (AN1792) on MRI measures of cerebral volume in Alzheimer disease. *Neurology* **64**, 1563-1572.
- [32] Sotak CH. Nuclear magnetic resonance (NMR) measurement of the apparent diffusion coefficient (ADC) of tissue water and its relationship to cell volume changes in pathological states. *Neurochem Int* **45**, 569-582.
- [33] Paulsen JS, Magnotta VA, Mikos AE, Paulson HL, Penziner E, Andreasen NC, Nopoulos PC (2006) Brain structure in preclinical Huntington's disease. *Biol Psychiatry* **59**, 57-63.
- [34] Lerch JP, Carroll JB, Dorr A, Spring S, Evans AC, Hayden MR, Sled JG, Henkelman RM (2008) Cortical thickness measured from MRI in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *Neuroimage* **41**, 243-251.
- [35] Gómez-Tortosa E, MacDonald ME, Friend JC, Taylor SA, Weiler LJ, Cupples LA, Srinidhi J, Gusella JF, Bird ED, Vonsattel JP, Myers RH (2001) Quantitative neuropathological changes in presymptomatic Huntington's disease. *Ann Neurol* **49**, 29-34.
- [36] Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, Lee SY, Dence CS, Shah AR, LaRossa GN, Spinner ML, Klunk WE, Mathis CA, DeKosky ST, Morris JC, Holtzman DM (2006) Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Ann Neurol* **59**, 512-59.
- [37] Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ (2010) Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* **9**, 119-128.

Trabajo número 3

Different profiles of Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers in controls and subjects with subjective memory complaints.

Antonell A,^a Fortea J,^a Rami L,^a Bosch B,^a Balasa M,^a Sánchez-Valle R,^{a,c} Iranzo A,^{b,c} Moli-nuevo JL,^{a,c} Lladó A.^{a,c}

^a Alzheimer's disease and other cognitive disorders unit, Neurology Service, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

^b Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain.

^c Multidisciplinary sleep unit, Neurology Service, Hospital Clínic, Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), CIBERNED, Barcelona, Spain.

J Neural Transm. 2010 Dec 16. [Epub ahead of print] PMID: 21161712. IF: 2.259.

Objetivos:

- Describir los diferentes perfiles de biomarcadores de LCR para la EA en una cohorte de controles sanos y sujetos con quejas subjetivas de memoria, pero con cognición normal.

Resultados:

- Un 44.2% de los sujetos de la cohorte presentaban niveles patológicos de al menos uno de los biomarcadores para la EA en LCR. Este porcentaje era significativamente más alto en el grupo de más edad.
- Distinguimos 4 perfiles de LCR:
 - (a) Grupo 1 (55.8%) con todos los biomarcadores con valores dentro del rango de la normalidad.
 - (b) Grupo 2 (27,9%) niveles patológicos de A β 1-42, pero con t-tau y p-tau dentro del rango de la normalidad.
 - (b) Grupo 3 (7%) niveles patológicos tanto de A β 1-42 como t-tau y/o p-tau.
 - (d) Grupo 4 (9,3%) niveles patológicos de t-tau y p-tau, pero con niveles de A β 1-42 dentro del rango de la normalidad.
- No hubo diferencias entre los niveles de biomarcadores en LCR entre los sujetos controles y aquellos con quejas subjetivas de memoria.
- Los 2 únicos sujetos que en el seguimiento desarrollaron un déficit objetivo en memoria episódica pertenecían al grupo 3 (todos los biomarcadores en niveles patológicos) y presentaban además quejas de memoria.

Different profiles of Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers in controls and subjects with subjective memory complaints

Anna Antonell · Juan Fortea · Lorena Rami · Beatriz Bosch · Mircea Balasa · Raquel Sánchez-Valle · Alex Iranzo · José Luis Molinuevo · Albert Lladó

Received: 20 August 2010 / Accepted: 8 November 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers, such as $A\beta_{42}$, total-tau and phosphorylated-tau₁₈₁ reflect neuropathological changes of Alzheimer's disease (AD). We studied these biomarkers in 24 controls and 19 subjects with subjective memory complaints, and we distinguished different CSF profiles: normal (group 1, 55.8%), only pathologic $A\beta_{42}$ (group 2, 27.9%), pathologic $A\beta_{42}$ plus pathologic total-tau and/or phosphorylated-tau₁₈₁ (group 3, 7%), and only pathologic total-tau and phosphorylated-tau₁₈₁ (group 4, 9.3%). Group 2 could represent an earlier phase of preclinical AD than group 3, and group 4 an unknown etiology.

Keywords Alzheimer's disease · CSF · Biomarker · Cognitively normal subjects · Subjective memory complaint

Introduction

Biochemical and pathological studies have evidenced that the process leading to Alzheimer's disease (AD) likely

begins several years prior to the onset of cognitive impairment (Aizenstein et al. 2008; Jack et al. 2010; Morris et al. 2010; Price et al. 2009; Stomrud et al. 2007; Braak et al. 1996). The main pathological hallmarks of AD are senile plaques, formed by extracellular deposits of amyloid fibrils, and neurofibrillary tangles, produced by intraneuronal accumulations of abnormal tau filaments. Neuropathologic studies have shown that neurofibrillary pathology could precede senile plaques, although in several clinical series of AD patients and controls, the first CSF biomarker altered is the beta-amyloid peptide ($A\beta_{42}$) (Jack et al. 2010; Morris et al. 2010; Braak et al. 1996; Fortea et al. 2010). Thus, biomarkers of brain amyloid deposition such as the reduction of $A\beta_{42}$ in cerebrospinal fluid (CSF) or increase in Pittsburgh Compound B positron emission tomography (PiB-PET) would be useful for the detection of preclinical AD. Other CSF biomarkers as total tau (t-tau) and phosphorylated tau at threonine 181 (p-tau₁₈₁) are altered later in the progression of the disease and indicate neuronal injury (Jack et al. 2010).

In the present study, we describe the different profiles of CSF biomarkers for AD in a well characterised cohort of controls and subjects with subjective memory complaints (SMC) but normal cognition.

Materials and methods

Participants were cognitively normal relatives of patients followed up at the Alzheimer's disease and other cognitive disorders unit from Hospital Clínic of Barcelona and subjects with subjective complaints but normal cognition. All participants signed a written informed consent approved by the Ethics Committee from Hospital Clínic of Barcelona and underwent a complete clinical and neuropsychological

A. Antonell · J. Fortea · L. Rami · B. Bosch · M. Balasa · R. Sánchez-Valle · J. L. Molinuevo · A. Lladó (✉)
Alzheimer's disease and other cognitive disorders unit,
Neurology Service, Hospital Clínic, Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), C/Villarroel, 170,
08036 Barcelona, Spain
e-mail: allado@clinic.ub.es

A. Iranzo
Multidisciplinary sleep unit, Neurology Service, Hospital Clínic,
Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer
(IDIBAPS), CIBERNED, Barcelona, Spain

Table 1 Demographic and biological characteristics of 43 studied subjects

Characteristics	Total (N = 43)	Controls (N = 24)	Patients with SMC (N = 19)	Young (≤65 years, N = 17)	Old (>65 years, N = 26)
Sex (M/F)	16/27	11/13	5/14	3/14	13/13
Age [years; mean ± SD (range)]	64.3 ± 12.3 (35–81)	61.2 ± 14.1 (35–80)	68.3 ± 8.4 (45–81)	51.8 ± 9.7 (35–65)	72.5 ± 4.5 (66–81)
APOE (N = 42)					
3/2	4 (9.5%)	0 (0%)	4 (22.3%)	2 (12.5%)	2 (7.6%)
3/3	28 (66.7%)	20 (83.3%)	8 (44.4%)	12 (75.0%)	16 (61.5%)
4/3	10 (23.8%)	4 (16.7%)	6 (33.3%)	2 (12.5%)	8 (30.8%)
Aβ ₄₂ [pg/mL; mean ± SD (range)]	586.6 ± 207.1 (228.5–966.0)	602.6 ± 189.0 (262.5–881.0)	566.3 ± 231.7 (228.5–966.0)	639.4 ± 159.4 (262.5–851.1)	552.0 ± 229.5 (228.5–966.0)
t-tau [pg/mL; mean ± SD (range)]	355.8 ± 332.1 (103.0–2,092.5)	266.9 ± 122.3 (103–580)	468.1 ± 463.1 (127.0–2,092.5)	211.9 ± 60.1 (103–311)	449.9 ± 399.7 (120–2,092.5)
p-tau ₁₈₁ [pg/mL; mean ± SD (range)]	63.0 ± 35.0 (25.9–213)	54.3 ± 17.4 (26.5–89.5)	74.0 ± 47.4 (25.9–213.0)	47.6 ± 9.7 (26.5–62.9)	73.1 ± 41.7 (25.9–213.0)
Groups					
1	24 (55.8%)	15 (62.5%)	9 (47.4%)	14 (82.4%)	10 (38.5%)
2	12 (27.9%)	7 (29.2%)	5 (26.3%)	3 (17.6%)	9 (34.6%)
3	3 (7%)	1 (4.2%)	2 (10.5%)	0	3 (11.5%)
4	4 (9.3%)	1 (4.2%)	3 (15.8%)	0	4 (15.4%)

Group 1: normal CSF, Group 2: pathologic Aβ₄₂ but normal t-tau and p-tau₁₈₁, Group 3: pathologic Aβ₄₂ plus pathologic t-tau and/or p-tau₁₈₁, Group 4: pathologic t-tau and p-tau₁₈₁ but normal Aβ₄₂

assessment and cranial Magnetic Resonance Imaging (MRI). Exclusion criteria were the presence of any neuropsychological alteration >1.5 SD in comparison to normative data and age <30 years. To compare the prevalence of alteration of CSF biomarkers according to the age, subjects were divided into two groups: young (<65 years) and old (≥65 years).

Ten millilitre of CSF was obtained in the morning (9–12 AM), and the samples were centrifuged and stored in polypropylene tubes at –80°C. Aβ₄₂, t-tau and p-tau₁₈₁ in CSF were measured by ELISA (Innogenetics, Ghent, Belgium). We are participants of the QC program, and Aβ₄₂, t-tau and p-tau₁₈₁ levels obtained in our lab for the Alzheimer’s Association QC samples were within mean ± 2 SD (Mattsson et al. 2010). The following pathologic cut-off values were used: Aβ₄₂ <500 pg/mL, t-tau >300 pg/mL in ≤50 years, >450 pg/mL in 51–70 years and >500 pg/mL in >70 years and p-tau₁₈₁ >75 pg/mL (Sjogren et al. 2001; and own unpublished data).

All statistical analysis were performed using the SPSS program version 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). For continuous variables, a two tailed *t* test was performed. A χ² test was used for categorical variables. The level of significance was defined as *P* values ≤ 0.05. Although an effect of APOE genotype into the Aβ₄₂ levels has been reported (Morris et al. 2010), we did not perform sub-analysis taking into account APOE genotype because of the small sample size.

Results

Forty-three participants were included, 19 of them with SMC. Their demographic and biological characteristics are presented in Table 1. We found a significantly higher proportion of subjects with pathological levels of at least one of the studied CSF biomarkers in the older group (17.6 vs. 61.5%; *P* = 0.005). There were no statistically significant differences in the three CSF biomarkers between subjects with and without SMC.

In this cohort, four CSF profiles were distinguished: (a) normal values (group 1, 55.8%), (b) pathologic Aβ₄₂ values but normal t-tau and p-tau₁₈₁ (group 2, 27.9%), (c) pathologic Aβ₄₂ plus pathologic t-tau and/or p-tau₁₈₁ values (group 3, 7%) and (d) pathologic t-tau and p-tau₁₈₁ but normal Aβ₄₂ values (group 4, 9.3%) (Table 2). Group 1 was significantly younger than groups 2, 3 and 4 (*P* = 0.024, 0.019 and 0.000, respectively). Aβ₄₂ was significantly different between group 1 and groups 2 and 3 (*P* = 0.000, 0.000), but not between groups 2 and 3. On the other hand, t-tau and p-tau₁₈₁ were significantly different between groups 1 and 4 (*P* = 0.013, 0.046), but not between groups 3 and 4.

A subgroup of 20 subjects (12 from group 1, 3 from group 2, 2 from group 3 and 3 from group 4) has already completed a 1-year follow-up. Only two subjects from group 3 (initially with SMC) presented an alteration of episodic memory in the follow-up, thereby fulfilling the

Different profiles of Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers

Table 2 Demographic and biological characteristics of different CSF profiles

Characteristics	Group 1 (N = 24)	Group 2 (N = 12)	Group 3 (N = 3)	Group 4 (N = 4)
Sex (M/F)	9/15	5/7	2/1	0/4
Age [years; mean \pm SD (range)]	58.9 \pm 12.5 (35–80)	68.5 \pm 9.1 (52–80)	77.3 \pm 4.0 (73–81)	74.2 \pm 4.1 (69–78)
<i>APOE</i> (N = 42)				
3/2	4 (17.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3/3	16 (69.6%)	9 (75%)	1 (33.3%)	2 (50%)
4/3	3 (13%)	3 (25%)	2 (66.7%)	2 (50%)
$A\beta_{42}$ [pg/mL; mean \pm SD (range)]	710.1 \pm 107.6 (526–881)	357.8 \pm 95.1 (228.5–482.8)	299.7 \pm 49.2 (243.0–331.0)	746.7 \pm 170.4 (597.0–966.0)
t-tau [pg/mL; mean \pm SD (range)]	257.3 \pm 75.5 (139.9–429)	234.0 \pm 129.1 (103.0–482)	1,110.2 \pm 861.3 (484.0–2,092.5)	746.3 \pm 188.9 (580.0–964.6)
p-tau ₁₈₁ [pg/mL; mean \pm SD (range)]	52.6 \pm 10.8 (38.5–74)	48.4 \pm 18.8 (25.9–75.2)	141.9 \pm 64.5 (87.1–213)	110.5 \pm 35.6 (81.5–160.7)

Group 1: normal CSF, Group 2: pathologic $A\beta_{42}$ but normal t-tau and p-tau₁₈₁, Group 3: pathologic $A\beta_{42}$ plus pathologic t-tau and/or p-tau₁₈₁, Group 4: pathologic t-tau and p-tau₁₈₁ but normal $A\beta_{42}$

recently proposed research criteria for AD diagnosis (Dubois et al. 2007).

Discussion

A 44.2% of subjects in our cohort presented an alteration in at least one of the AD CSF biomarkers, which is comparable to the percentages reported in other studies and to the prevalence of AD pathological changes described in post-mortem series (Morris et al. 2010; Price et al. 2009). The fact that the frequency of subjects with pathological levels was significantly higher in the older group is also in concordance with epidemiology of AD (Bouwman et al. 2009).

We have detected four CSF profiles in controls and subjects with SMC. Previously, Iqbal et al. (2005) reported five subgroups of AD based on three CSF biomarkers ($A\beta_{42}$, t-tau and conjugated ubiquitin). Cluster 4 of this study, with low levels of all biomarkers, is similar to our group 2. Several studies have reported an alteration in $A\beta_{42}$ before t-tau and p-tau₁₈₁ and in the case of presymptomatic AD mutation carriers in *PSEN1* gene, CSF $A\beta_{42}$ levels correlate with adjusted time to disease onset to reach floor levels when symptoms appear (Jack et al. 2010; Fortea et al. 2010). On the other hand, our group 3 with both $A\beta_{42}$, and t-tau altered is similar to clusters 1, 3 and 6 from Iqbal's study (Iqbal et al. 2005). It's known that the vast majority of AD patients present this CSF profile, and it has been reported that higher levels of CSF tau biomarkers in AD patients would lead to a more malignant outcome (Wallin et al. 2010), as tau biomarkers reflect neuronal injury. Moreover, the low frequency of subjects with this CSF profile in our and other studies suggests that when all these biomarkers are altered, it is less probable to remain

asymptomatic. Recently, the terminology of asymptomatic at-risk state for AD for subjects with biomarker evidence for AD pathology, but free of cognitive/behavioural symptoms, has been described (Dubois et al. 2010). If we took under consideration all these data together, we could hypothesise that controls with only $A\beta_{42}$ altered (group 2), could represent an earlier and longer phase than group with $A\beta_{42}$ plus t-tau and/or p-tau₁₈₁ altered (group 3) of pre-clinical stage of AD (Jack et al. 2010; Stomrud et al. 2007; Fagan et al. 2009; Fagan et al. 2007; Li et al. 2007).

We have observed the same four CSF profiles in subjects with SMC, and the levels of the three biomarkers analysed did not differ statistically between controls and SMC subjects. This fact suggests a heterogeneous cause for SMC, only some of them being attributable to subjacent AD (Visser et al. 2009). However, it is worth noting that the two only patients who developed episodic memory impairment within the first year of follow-up belonged to group 3 and presented SMC. In this context, SMC of subjects with no alteration of usual neuropsychological exploration but biomarker evidence for AD pathology could represent the first symptoms of AD, although these subjects could not still be referred as prodromal AD, because they do not present objective evidence of a specific memory deficit (Dubois et al. 2010).

Finally, the subjects with only pathologic t-tau and p-tau₁₈₁, similar to cluster 5 reported by Iqbal et al. (2005), represent a group relatively infrequent and of uncertain etiology. We hypothesise that etiologies in this group could include an infrequent subtype of AD, other neurodegenerative diseases or vascular pathology (Tapiola et al. 2009).

In conclusion, although our findings are based on a relatively small number of subjects with a short longitudinal follow-up, this study shows that different CSF

profiles for AD biomarkers can be identified among cognitively normal subjects. Although, nowadays, these subjects are considered to be asymptomatic at risk-state for AD, their follow-up will be very important to know if they progress to AD. The better knowledge of different CSF profiles in asymptomatic subjects at risk for AD may be useful to test new preventive drugs in cognitively normal subjects.

Acknowledgements Dr. Lorena Rami is a recipient of a Miguel Servet grant (CP08/00147) and Dr. Juan Fortea and Dr. Mircea Balasa of a Josep Font grant. Work was supported by a grant to Dr. Raquel Sánchez-Valle (FIS080036) and Grünenthal Pharma. Authors thank Dr. Cristina Solé-Padullés, Magda Castellví, Jaume Olives and Mónica Serradell for the neuropsychological assessments and Glòria Tersol and Rosa Álvarez for her assistance during lumbar punctures.

References

- Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, Ziolkowski SK, James JA, Snitz BE, Houck PR, Bi W, Cohen AD, Lopresti BJ, DeKosky ST, Halligan EM, Klunk WE (2008) Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch Neurol* 65:1509–1517. doi:10.1001/archneur.65.11.1509
- Bouwman FH, Schoonenboom NS, Verwey NA, van Elk EJ, Kok A, Blankenstein MA, Scheltens P, van der Flier WM (2009) CSF biomarker levels in early and late onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 30:1895–1901. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.02.007
- Braak H, Braak E, Bohl J, Reintjes R (1996) Age, neurofibrillary changes, A beta-amyloid and the onset of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 210:87–90
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, 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 PJ, Scheltens P (2007) Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 6:734–746. doi:10.1016/S1474-4422(07)70178-3
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Delacourte A, Frisoni G, Fox NC, Galasko D, Gauthier S, Hampel H, Jicha GA, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Sarazin M, de Souza LC, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P (2010) Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol* 9:1118–1127. doi:10.1016/S1474-4422(10)70223-4
- Fagan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun MA, Morris JC, Holtzman DM (2007) Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a predictor of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch Neurol* 64:343–349. doi:10.1001/archneur.64.3.noc60123
- Fagan AM, Head D, Shah AR, Marcus D, Mintun M, Morris JC, Holtzman DM (2009) Decreased cerebrospinal fluid Abeta(42) correlates with brain atrophy in cognitively normal elderly. *Ann Neurol* 65:176–183. doi:10.1002/ana.21559
- Fortea J, Lladó A, Bosch B, Antonell A, Oliva R, Molinuevo JL, Sánchez-Valle R (2010) Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease families with *PSEN1* mutations. *Neurodegenerative Dis* (in press)
- Iqbal K, Flory M, Khatoon S, Soininen H, Pirttila T, Lehtovirta M, Alafuzoff I, Blennow K, Andreasen N, Vanmechelen E, Grundke-Iqbal I (2005) Subgroups of Alzheimer's disease based on cerebrospinal fluid molecular markers. *Ann Neurol* 58:748–757. doi:10.1002/ana.20639
- Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ (2010) Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* 9:119–128. doi:10.1016/S1474-4422(09)70299-6
- Li G, Sokal I, Quinn JF, Leverenz JB, Brodey M, Schellenberg GD, Kaye JA, Raskind MA, Zhang J, Peskind ER, Montine TJ (2007) CSF tau/Abeta42 ratio for increased risk of mild cognitive impairment: a follow-up study. *Neurology* 69:631–639. doi:10.1212/01.wnl.0000267428.62582.aa
- Mattsson N, Blennow K, Zetterberg H (2010) Interlaboratory variation in cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease: united we stand, divided we fall. *Clin Chem Lab Med* 48:603–607. doi:10.1515/CCLM.2010.131
- Morris JC, Roe CM, Xiong C, Fagan AM, Goate AM, Holtzman DM, Mintun MA (2010) APOE predicts amyloid-beta but not tau Alzheimer pathology in cognitively normal aging. *Ann Neurol* 67:122–131. doi:10.1002/ana.21843
- Price JL, McKeel DW Jr, Buckles VD, Roe CM, Xiong C, Grundman M, Hansen LA, Petersen RC, Parisi JE, Dickson DW, Smith CD, Davis DG, Schmitt FA, Markesbery WR, Kaye J, Kurlan R, Hulette C, Kurland BF, Higdon R, Kukull W, Morris JC (2009) Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 30:1026–1036. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.04.002
- Sjogren M, Vanderstichele H, Agren H, Zachrisson O, Edsbacke M, Wikkelso C, Skoog I, Wallin A, Wahlund LO, Marcusson J, Nagga K, Andreasen N, Davidsson P, Vanmechelen E, Blennow K (2001) Tau and Abeta42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21–93 years of age: establishment of reference values. *Clin Chem* 47:1776–1781
- Stomrud E, Hansson O, Blennow K, Minthon L, Londo E (2007) Cerebrospinal fluid biomarkers predict decline in subjective cognitive function over 3 years in healthy elderly. *Dement Geriatr Cogn Disord* 24:118–124. doi:10.1159/000105017
- Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka SK, Parkkinen L, Hartikainen P, Soininen H, Pirttila T (2009) Cerebrospinal fluid [beta]-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch Neurol* 66:382–389. doi:10.1001/archneur.2008.596
- Visser PJ, Verhey F, Knol DL, Scheltens P, Wahlund LO, Freund-Levi Y, Tsolaki M, Minthon L, Wallin AK, Hampel H, Burger K, Pirttila T, Soininen H, Rikkert MO, Verbeek MM, Spira L, Blennow K (2009) Prevalence and prognostic value of CSF markers of Alzheimer's disease pathology in patients with subjective cognitive impairment or mild cognitive impairment in the DESCRIPA study: a prospective cohort study. *Lancet Neurol* 8:619–627. doi:10.1016/S1474-4422(09)70139-5
- Wallin AK, Blennow K, Zetterberg H, Londo E, Minthon L, Hansson O (2010) CSF biomarkers predict a more malignant outcome in Alzheimer disease. *Neurology* 74:1531–1537. doi:10.1212/WNL.0b013e3181dd4dd8

Trabajo número 4

Cerebrospinal fluid biomarkers and memory present distinct associations along the *continuum* from healthy subjects to AD patients.

Rami L,^a Fortea J,^a Bosch B,^a Solé-Padullés C,^a Lladó A,^{a,b} Iranzo A,^{a,b} Sánchez-Valle R,^{a,b} Molinuevo JL.^{a,b}

^a Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.

^b Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain.

J Alzheimers Dis. 2011 Jan 1;23(2):319-26. PMID: 21098971. IF: 3.832.

Objetivos:

- Estudiar la relación entre los niveles de A β 1-42, t-tau y p-tau en LCR y el rendimiento neuropsicológico a lo largo del *continuum* de la EA y específicamente entre sujetos en estadios predemenciales.

Resultados:

- Los niveles de biomarcadores en LCR se asocian con el rendimiento de memoria episódica a lo largo del *continuum* de la enfermedad de Alzheimer, lo que indicaría que alteraciones de niveles de A β 1-42, t-tau y p-tau se asocian a una disfunción de áreas temporales mediales bilaterales en fases precoces de la enfermedad, previamente a la aparición de demencia.
- El análisis de subgrupos mostró:
 - (a) Ninguna correlación entre los diferentes biomarcadores y ningún test neuropsicológico en el subgrupo de controles sanos.
 - (b) Una correlación positiva entre los niveles de A β 1-42 y varios test neuropsicológicos en los sujetos con quejas subjetivas de memoria: recuerdo total del *Free and Cued Selective Reminding Test (FCRST)*, *Digit Span*, y el *CERAD world list learning test*.
 - (c) Una correlación positiva entre los niveles de t-tau y p-tau y varios test neuropsicológicos en los sujetos con deterioro cognitivo leve: *word list recall score from the CERAD* así como entre el recuerdo total de *FCRST* tanto para t-tau como para p-tau.
 - (d) Ninguna correlación entre los diferentes biomarcadores y ningún test neuropsicológico en el subgrupo de pacientes con una demencia tipo EA.

Cerebrospinal Fluid Biomarkers and Memory Present Distinct Associations along the Continuum from Healthy Subjects to AD Patients

Lorena Rami^a, Juan Fortea^a, Beatriz Bosch^a, Cristina Solé-Padullés^a, Albert Lladó^{a,b}, Alex Iranzo^{a,b}, Raquel Sánchez-Valle^{a,b} and Jose Luis Molinuevo^{a,b,*}

^a*Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic, Barcelona, Spain*

^b*Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain*

Accepted 24 September 2010

Abstract. The objective was to study the association between cerebrospinal fluid (CSF) levels of amyloid- β ($A\beta$)₁₋₄₂, t -tau, and p -tau and cognitive performance along the Alzheimer's disease (AD) continuum from healthy subjects to AD patients and, specifically, among patients in the pre-dementia stage of the disease. A total of 101 subjects were studied: 19 healthy controls (CTR), 17 subjects with subjective memory complaints (SMC), 47 with mild cognitive impairment (MCI), and 18 AD patients. Only memory performance significantly correlated with CSF levels of $A\beta$ ₁₋₄₂, t -tau, and p -tau along the AD continuum. Subgroup analyses revealed that in SMC patients $A\beta$ ₁₋₄₂ levels positively correlated with the total recall score of the Free and Cued Selective Reminding Test (FCRST) ($r=0.666$; $p<0.005$), Digit Span ($r=0.752$; $p<0.005$), and CERAD world list learning ($r=0.697$; $p<0.005$). In MCI patients, a significant inverse correlation was found between the word list recall score from the CERAD and t -tau ($r=-0.483$; $p<0.005$) and p -tau levels ($r=-0.495$; $p<0.005$), as well as between the total recall subtest score from the FCRST and both t -tau ($r=-0.420$; $p<0.005$) and p -tau levels ($r=-0.422$; $p<0.005$). No significant correlations were found between other aspects of cognition and CSF levels in CTR or AD patients. These results indicate that memory performance is related to $A\beta$ ₁₋₄₂ levels in SMC, while it is associated with tau in the prodromal stage of the disease. This suggests that in the continuum from healthy aging to AD, memory performance is first related with $A\beta$ ₁₋₄₂ levels and then with t -tau or p -tau, before becoming independent of biomarker levels in the dementia stage.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid, cerebrospinal fluid, cognition, neuropsychological tests

INTRODUCTION

The main pathological hallmarks of Alzheimer's disease (AD) are senile plaques, formed by extracellular deposits of amyloid- β ($A\beta$)₁₋₄₂ fibrils, and neurofibrillary tangles (NFT), produced by neuronal accu-

mulations of abnormal tau filaments. Cerebrospinal fluid (CSF) studies in patients with confirmed pathology have demonstrated that abnormal levels of both biomarkers constitute a specific signature of the underlying AD-related pathology [1]. In addition, some studies have found that biomarker levels can predict the rate of cognitive decline across time in individuals with very mild dementia [2]. As a result, the study of CSF biomarkers has become a rapidly growing research field and several CSF biomarkers have been studied in both healthy individuals and along the AD contin-

*Correspondence to: Jose Luis Molinuevo, Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 227 5785; Fax: +34 93 227 5783; E-mail: jlmoli@clinic.ub.es.

uum. In this context, CSF studies, measuring $A\beta_{1-42}$ and tau protein levels, show an acceptable sensitivity and specificity as regards the diagnosis of AD [3–5]. In a recent study, individuals diagnosed as having mild cognitive impairment (MCI) and who had “pathologic” concentrations of CSF tau or $A\beta_{1-42}$ had a 17.7-fold increased risk of progressing to AD during a 5-year period [6]. This cumulative evidence is reflected in the new AD diagnostic research criteria, in which CSF is one of the supportive criteria (along with MRI, PET, and genetics) for diagnosing AD in the presence of objective memory impairment, but without requiring the presence of dementia [7].

The notion that there are distinct biological and pathological processes in the initiation and progression of AD has been established for several years now [8], and has recently been summarized by Jack et al. [9] in a hypothetical model of AD biomarkers. In this model, the alteration of CSF biomarkers precedes cognitive impairment and the markers themselves are temporally ordered, with the change in $A\beta_{1-42}$ levels preceding the appearance of other neurodegenerative biomarkers, such as *t*-tau and *p*-tau, and with ceiling effects therefore being reached at different points. As such, one of the potential uses of CSF biomarkers could be in terms of a better understanding of the relationship between biomarker levels and a patient’s neuropsychological performance and disease progression. However, the association between neuropsychological performance and CSF levels has not been extensively studied. Research to date has only described the association with general cognitive tests, such as the Mini-Mental State Examination (MMSE) [10, 11], or presents a limited cognitive description of the subjects included. Likewise, few studies have examined the association between CSF levels and non-memory cognitive domains using an extensive neuropsychological battery [12, 13]. The research that has been conducted has mainly found significant correlations between general cognitive measures and total tau levels, but very low correlations with $A\beta_{1-42}$ [10–12, 14]. One recent exception is the paper by Hildebrandt et al. [13], who reported that recognition memory correlated with $A\beta_{1-42}$, while total tau did not correlate with any neuropsychological measures.

It should be noted that AD is a neurodegenerative disorder characterized by a long progressive decline of cognitive functions, mainly memory. The putative associations between CSF biomarkers and the cognitive spectrum of preclinical and pre-dementia stages of AD are currently being considered. Research to date has generally studied associations between CSF levels

and cognition in AD or MCI patients, without including patients with subjective memory complaints but no objective memory impairment. However, some studies have determined that the decline in certain cognitive functions, such as memory, may begin years before a diagnosis is made [15, 16]. It therefore seems of interest to study the association between cognitive performance and AD biomarkers years before the onset of dementia.

The main aim of this study was to examine the association between CSF levels of $A\beta_{1-42}$, *t*-tau and *p*-tau and cognitive performance along the AD continuum from healthy subjects to AD dementia patients, especially in the pre-dementia stage of AD.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

A total of 101 subjects (19 controls (CTR), 17 patients with subjective memory complaints (SMC), 30 amnesic patients with MCI (aMCI), 17 non-amnesic patients with MCI (naMCI), and 18 mild AD patients) were recruited consecutively at the Alzheimer’s Disease and Other Cognitive Disorders Unit of the Hospital Clinic in Barcelona. All subjects underwent clinical, neuropsychological assessment and a lumbar puncture. The study was approved by the local ethics committee and all subjects gave written informed consent to participate.

Diagnoses were established by an interdisciplinary clinical committee formed by two neurologists and one neuropsychologist. Cognitive cut-off scores were defined by taking into account the age and education of the patients, and were considered abnormal if they were more than 1.5 standard deviations below the mean. Controls presented no cognitive complaints and no evidence of cognitive impairment on any of the neuropsychological tests administered. Patients with SMC presented memory complaints but a completely normal neuropsychological evaluation. In accordance with the criteria of Petersen et al. [17], aMCI patients had an objective memory deficit, defined as an abnormal score on the total recall measure of the Free and Cued Selective Reminding Test (FCRST) [18], and preserved activities of daily living, as measured by the Functional Activities Questionnaire (FAQ score <6), [19]. The naMCI patients had normal memory but showed impairment on one or more of the other cognitive tests. The criteria of the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer’s Disease and Related Disor-

ders Association (NINCDS-ADRDA) were applied for probable AD diagnosis, taking into account clinical information and objective measures derived from the FAQ and neuropsychological results. All AD patients included were in the mild stages of the disease (Global Deterioration Scale = 4).

Neuropsychological assessment

Subjects were administered a two-hour extensive neuropsychological battery by a trained neuropsychologist that included memory, language, praxis, visual perception, and frontal functions assessment. All neuropsychological scores were adjusted for age and educational level. Normative neuropsychological data were collected previously from a sample of healthy elders from Spain [20–22].

MMSE [23] was used as a global test of cognition. Episodic verbal memory was assessed by means of the Free and Cued Selective Reminding Test (FCSRT) [18] and by the word list learning and word list recall scores from the CERAD battery [24]. Semantic memory was assessed with a semantic fluency test (animals) [25] and one subtest of the Memory Alteration Test (MAT). The Boston Naming Test (BNT) was used to assess language (confrontation naming) [25]. Praxis were assessed by the constructive praxis test (Cons.Px) from the CERAD battery [24]. Visuo-perceptual functions were assessed by the Perceptual Digital Test (PDT) [22]. Frontal functions were assessed by phonetic fluency COWAT (FAS) [26] and by the Trail Making Test – parts A and B (TMT-A, TMT-B) [27]. Short-term memory and working memory were assessed by Digit Span from the WAIS battery [28]. Global clinical and cognitive severity was also assessed through the Clinical Dementia Rating (CDR) scale performed with an informant and scored as a sum of boxes (CDR-SOB).

Determination of CSF biomarkers

Subjects underwent lumbar puncture between 9 a.m. and 12 p.m., with 10 mL of CSF being collected. The samples were centrifuged and stored in polypropylene tubes at -80°C within the first hour after extraction. Levels of $\text{A}\beta_{1-42}$, total tau (t -tau), and phosphorylated tau at threonine-181 (p -tau) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay kits (Innogenetics, Ghent, Belgium). A positive CSF profile was considered when $\text{A}\beta_{42} < 495$ pg/mL, t -tau > 356 and p -tau₁₈₁ > 54 pg/mL [29, 30]. These cut off scores are in agreement with the internal unpublished values of our laboratory.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the SPSS package for Windows (V.17.0). Differences between groups in baseline measures, including age, years of education, CSF levels, and certain screening and functional tests were analyzed using Mann-Whitney test. Non-parametric correlation coefficients (Spearman test) were used to assess the relationships between neuropsychological test scores and CSF biomarkers in three study groups. Scatter plots were generated for all significant correlations in order to detect outliers. Correlations were also calculated separately for each study group. In order to avoid Type I error, correlations were considered significant when $p < 0.005$.

RESULTS

Demographic characteristics, clinical features and CSF levels of CTR, SMC, MCI, and AD subjects (Table 1)

There were no differences between the groups in terms of age and years of education. However, MCI and AD patients, compared to CTR and SMC subjects, differed in their MMSE and CDR-SOB results ($p < 0.005$). Means and standard deviations for all CSF levels ($\text{A}\beta_{1-42}$, t -tau, and p -tau) are shown in Table 1. The results show that $\text{A}\beta_{1-42}$, t -tau, and p -tau levels were significantly different in AD patients compared to both CTR and SMC subjects ($p < 0.005$).

A high percentage of CTR, SMC, MCI, and AD subjects presented an AD CSF profile (see Table 1), with biomarker levels in the range that characterizes AD patients. APOE results, determined in 80 subjects, are also shown in Table 1.

Association between CSF levels and cognition along the AD continuum

Some significant correlations were found between CSF levels and certain neuropsychological tests along the AD continuum. All these associations were between CSF levels and verbal and visual memory tests (see Table 2). No significant correlations (after statistical correction) were found with any other cognitive domain.

In APOE- $\epsilon 4$ allele subjects, including controls, SMC, MCI, and AD patients ($n = 25$), $\text{A}\beta_{1-42}$ levels were significantly correlated ($p < 0.005$) with scores on the CERAD word list recall ($r = 0.615$), and three

Table 1
Demographic, clinical and CSF characteristics for CTR, SMC, MCI, and AD

N (101)	CTR	SMC	naMCI	aMCI	AD	
	19	17	17	30	18	
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	
Age (years)	69.4 (9.1)	68.7 (6.8)	72.2 (7.1)	72.2 (7.8)	71.5 (8.6)	n.s.
Education (years)	10.0 (5.59)	9.3 (4.0)	8.8 (4.0)	7.6 (3.5)	9.1 (3.3)	n.s.
Aβ ₁₋₄₂ * (pg/ml)	548.9 (202.3)	542.5 (210.1)	494.8 (188.5)	453.4 (203.3)	346.4 (167.8)	AD < CTR** AD < SMC** AD > naMCI* AD > MCI*
Aβ ₁₋₄₂ + (% <495 pg/ml)	47.4	35.3	52.9	73.3	83.3	
t-tau (pg/ml)	346.7 (170.3)	458.5 (484.5)	355.1 (231.7)	637.7 (347.3)	707.1 (435.5)	AD > CTR** AD > SMC* AD > naMCI* MCI > CTR*
t-tau + (% >356 pg/ml)	42.1	35.3	29.4	73.3	88.2	
p-tau (pg/ml)	66.3 (25.9)	70.5 (50.4)	56.4 (19.6)	97.6 (43.1)	106.5 (60.6)	AD > CTR* AD > SMC* MCI > CTR*
p-tau + (% >54 pg/ml)	72.2	50	50	82.8	83.3	
CDR-SOB	0.4 (0.1)	0.1 (0.2)	2.0 (0.6)	2.1 (1.1)	4.8 (2.2)	AD > CTR, SMC, aMCI, naMCI** CTR < aMCI, naMCI** SMC < aMCI, naMCI**
MMSE	28.0 (2.8)	27.6 (1.6)	26.0 (3.2)	24.3 (3.1)	23.1 (3.2)	AD < CTR** AD < SMC** aMCI < CTR** aMCI < SMC**
APOE-ε4 (%)	25 (4/16)	18.7 (3/16)	18.8 (2/11)	45.4 (10/22)	63.6 (7/11)	AD > SMC* AD > naMCI*

*p < 0.05; **p < 0.005; CDR-SOB: clinical dementia rating scale (sum of boxes); MMSE: Mini mental state examination; N: number of subjects.

Table 2
Significant correlations (p < 0.005) between CSF levels and cognitive performance in the AD continuum

	Aβ ₁₋₄₂	t-tau	p-tau
CERAD_WLL	0.310		
CERAD_WLR	0.328	-0.430	-0.412
CERAD_Recog	0.294		
FCSRT - L	0.296	-0.352	-0.394
FCSRT - TL		-0.362	-0.362
FCSRT - R	0.294	-0.436	-0.438
FCSRT - TR	0.309	-0.348	-0.351
CERAD_vis_mem	0.341	-0.332	-0.312

Free and Cued Selective Reminding Test (FCSRT); WLL: word list learning; WLR: word list recall; L: learning; Recog: recognition; TL: total learning; R: recall; TR: total recall; vis_mem: visual memory.

subtests of the FCSRT: learning (r = 0.656), recall (r = 0.618), and total recall (r = 0.552). No significant correlations were found between t-tau or p-tau levels and cognition.

Association between CSF levels and cognition in each subgroup of the study

In SMC subjects, lower Aβ₁₋₄₂ levels significantly correlated with a worse total recall score on the

FCRST (r = 0.666; p < 0.005) (See Fig. 1), Digit Span (r = 0.752; p < 0.005), and CERAD world list learning (r = 0.697; p < 0.005). No other significant correlations (after statistical correction) were found in SMC patients. In MCI subjects, significant inverse correlations were found between the word list recall score on the CERAD and both t-tau (r = -0.483; p < 0.005) and p-tau levels (r = -0.495; p < 0.005), as well as between the total recall subtest score from the FCRST and both tau (r = -0.420; p < 0.005) and p-tau levels (r = -0.422; p < 0.005). Analysis of the MCI subgroups revealed no significant correlations in either naMCI or aMCI subjects. Neither were there any significant correlations between cognition and CSF levels in CTR or AD patients.

Neuropsychological differences between patients as regards their CSF profile

In order to further explore and understand the meaning of the association between CSF biomarkers and cognition in the different subgroups, we dichotomized each subgroup according to the presence of a positive biomarker profile. When the groups were analyzed

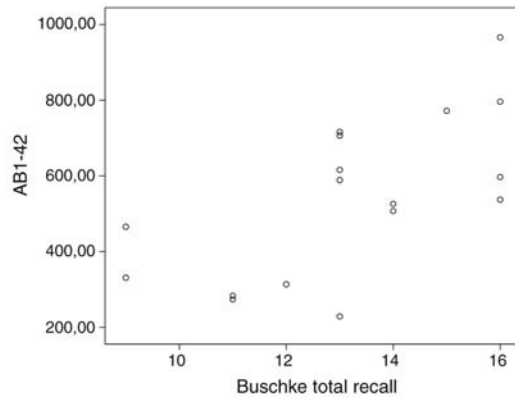


Fig. 1. Scatter plot showing CSF $A\beta_{1-42}$ levels and total recall from the FCSRT in SMC subjects.

separately according to their $A\beta_{1-42}$ levels, we found that SMC patients with positive CSF $A\beta_{1-42}$ levels had a significantly poorer performance on several subtests of the FCRST ($p < 0.005$), as compared with the performance of SMC subjects with negative $A\beta_{1-42}$ levels. These results were not significantly influenced by age. No other differences were found among these two groups (see Table 3). We found no differences in the SMC patients when they were dichotomized as a function of positive or negative t -tau or p -tau levels. We also found no differences in the controls, MCI, and AD patients when they were dichotomized as a function of positive or negative $A\beta_{1-42}$, t -tau, or p -tau levels.

DISCUSSION

This study shows that CSF biomarker levels are related to memory performance along the AD continuum (from controls to mild AD dementia). Specifically, worse episodic memory performance is related to lower $A\beta_{1-42}$ levels in SMC patients, but to higher t -tau and p -tau levels in MCI patients. These cognitive differences were also found in SMC patients as a function of their $A\beta_{1-42}$ levels.

Previous research has mainly used short global tests, such as the MMSE [10, 11], to determine the relationship between CSF and cognition, and few studies have used an extensive neuropsychological battery [12, 13]. Although such a battery was used here, we only found significant correlations along the continuum between CSF levels and episodic memory tests. The fact that this cohort included controls, SMC, MCI, and AD patients in a mild stage of the disease may explain the lack of association with the other cognitive mea-

Table 3
Neuropsychological differences between SMC patients with positive and negative $A\beta_{1-42}$

n	SMC	
	$A\beta_{1-42} > 495$ pg/ml 11	$A\beta_{1-42} < 495$ pg/ml 6
Age (years)	66.0 (6.4)	73.6 (6.28)
$A\beta_{1-42}$	680.2 (139.6)	315.8 (81.3)**
t -tau	401.1 (294.3)	585.3 (750.1)
p -tau	67.3 (40.2)	82.7 (74.2)
MMSE	28.2 (1.3)	26.5 (1.8)
FCSRT – L	26.1 (7.4)	15.0 (4.8)
FCSRT – TL	42 (5.4)	33.1 (4.4)**
FCSRT – R	10.4 (1.6)	5.5 (1.3)**
FCSRT – TR	14.4 (1.3)	10.8 (1.6)**
CERAD.WLL	19.8 (2.3)	14.8 (4.4)
CERAD.WLR	5.5 (1.8)	3.6 (1.5)
CERAD.Recog	19.3 (0.6)	18.3 (1.5)
CERAD.vis_mem	9.4 (2.1)	6.8 (2.2)
BNT	51.3 (4.6)	50.0 (2.8)
Semantic fluency	17.8 (5.0)	14.1 (2.4)
PDT	14.0 (1.0)	13.6 (1.7)
Digit Span	14.0 (5.3)	9.6 (1.3)
FAS	35.6 (17.1)	18.20 (6.4)
TMT-A	57.7 (19.8)	66.6 (28.1)
TMT-B	185.2 (89.8)	198.4 (107.4)

** $p < 0.005$; Free and Cued Selective Reminding Test (FCSRT); WLL: word list learning; WLR: word list recall; L: learning; Recog: recognition; TL: total learning; R: recall; TR: total recall; vis_mem: visual memory; BNT: Boston naming test; PDT: perceptual digital test; TMT-A: trail making test A; TMT-B: trail making test B; MMSE: mini mental state examination.

asures, since variability in their scores is less than that observed in memory performance during the initial stages of the disease. In addition, if patients would have been classified according to their MMSE scores, the group correlations between CSF biomarkers and the neuropsychological scores would have probably been slightly different.

Memory performance along the continuum from healthy subjects to AD patients showed more extensive correlations with tau biomarkers, with the exception of APOE- $\epsilon 4$ subjects. Interestingly, the analysis of APOE- $\epsilon 4$ allele subjects revealed more substantial correlations regarding $A\beta_{1-42}$ levels, while no significant correlations were found for t -tau or p -tau levels. Other studies have also reported that the associations between memory performance and $A\beta_{1-42}$ levels were significant among APOE- $\epsilon 4$ carriers but not among non-carriers [31]. This may be related to the fact that the variability of $A\beta_{1-42}$ levels is closely linked to the presence of the APOE- $\epsilon 4$ allele [32]. Stomrud et al. [33] also found that the presence of the APOE- $\epsilon 4$ allele was associated with a greater longitudinal decrease in CSF $A\beta_{1-42}$ levels and with a higher CSF total level

at follow-up in normal controls. However, since they only studied normal controls, no data were available about how APOE- $\epsilon 4$ may influence the relationship between CSF biomarker levels and cognition along the AD continuum.

In order to study further how CSF levels were related to cognition, correlations were performed in all subgroups of the present cohort. This revealed a selective relationship between cognitive performance and CSF biomarkers, specifically as regards $A\beta_{1-42}$ levels in SMC subjects. This suggests that early in the disease course, in this pre-dementia stage, memory performance is $A\beta_{1-42}$ driven. Stomrud et al. [34] previously reported that memory complaints in normal subjects were related to $A\beta_{1-42}$ levels in elderly people, but they did not study the correlation between cognitive performance and CSF levels. Interestingly, our SMC patients with positive $A\beta_{1-42}$ levels also presented a significantly worse memory performance than did those with normal levels. Although cognitive performance is, by definition, within the normal range in SMC, the significant decrement in memory observed in subjects with a positive biomarker may indicate that these people may already be starting their cognitive decline. In AD, the pathological changes are believed to begin several years before diagnosis [16], and cognitive decline has been described several years before AD criteria are fulfilled [15, 16]. Hence, SMC individuals with lower $A\beta_{1-42}$ levels could represent the first step in the clinical stage of the disease. If this is so, then memory complaints in individuals with lower $A\beta_{1-42}$ levels may be indicative of the first symptoms of AD, and although no objective signs can yet be detected these people should be monitored so as to target care as soon as their memory deficit emerges.

In this context, Chetelat et al. [35] found that global and regional atrophy were strongly related to PIB amyloid load in subjects with subjective cognitive impairment, but not in patients with MCI or AD. Voxel-based analyses only revealed significant negative correlations between global neocortical PIB increase and grey matter atrophy in the group with subjective complaints, leading the authors to conclude that amyloid deposition was related to atrophy only at a very early stage of the AD continuum. The highest correlations were found in the hippocampus, posterior cingulate and frontal regions, which are related to memory, i.e., the function which we found to be associated with $A\beta_{1-42}$ levels in our SMC patients.

The associations between CSF biomarkers and cognitive impairment in patients with MCI seem to differ from those observed in SMC, since in the former,

memory performance correlated with t -tau and p -tau levels, and not with $A\beta_{1-42}$. Together with the correlation observed in SMC, this could suggest that tau and p -tau levels change later along the AD continuum than do CSF $A\beta_{1-42}$ levels. These results in MCI patients are in agreement with previous studies which found a correlation between CSF tau levels [14] and memory performance, but no correlation between CSF $A\beta_{1-42}$ level and the scores of other cognitive domains [12]. In a population of 28 MCI patients, Ivanoiu and Sindic [14] reported that CSF tau correlated with memory performance, whereas low CSF $A\beta_{1-42}$ levels predicted fast progression to dementia. Furthermore, according to Nordlund et al. [36], MCI subjects with abnormal CSF concentrations performed clearly worse on episodic memory and speed/attention tests in comparison to MCI subjects with normal concentrations of t -tau and $A\beta_{1-42}$. However, the analysis of the two MCI subgroups, i.e., naMCI and aMCI, revealed no correlations between CSF levels and cognition according to this sub-classification.

Overall, our results in SMC and MCI patients may indicate that lower $A\beta_{1-42}$ is related to memory performance when subjects are still in the normal range of cognition, while higher t -tau and p -tau levels are associated with memory when mild cognitive deficits, prior to dementia, become observable. These results are consistent with the notion that $A\beta_{1-42}$ abnormalities appear prior to t -tau and p -tau changes along the cognitive and pathology continuum of AD. Low CSF $A\beta_{1-42}$ is a marker of $A\beta$ deposition in the brain and can occur early in the AD process, thereby preceding clinical symptoms [37–39], while higher CSF tau concentration may be related to neuronal loss and clinical severity [1]. Hence, CSF t -tau levels correlate with the amount and density of NFT in pathological studies, which were also more closely associated with clinical and cognitive outcomes than were amyloid plaques [40, 41]. Our data are therefore consistent with the notion that distinct biological processes take place in the initiation and progression of AD [8] and fit very well with the temporality of events that has been proposed to occur along the AD continuum [9].

In regards to the correlation analyses performed in CTR and AD patients, we found no significant association between cognition and CSF levels in these two groups of subjects, despite using a large number of cognitive tests. Other studies have also failed to find associations between CSF levels and normal controls [33]. By contrast, an association between CSF $A\beta_{1-42}$ and whole brain volume has been previously described in controls. Fagan et al. [39] reported a correlation

between CSF A β ₁₋₄₂ and whole-brain atrophy in non-demented subjects but not in AD, where atrophy was related to levels of CSF tau.

To conclude, we believe that this preliminary study provides interesting data on the relationship between CSF biomarker levels and cognition along the continuum from healthy subjects to AD patients, especially when it comes to the associations observed in the pre-dementia stages of the disease. However, a number of limitations should be noted. First, these data were obtained from a cross-sectional study in pre-dementia subjects without a longitudinal confirmation of AD diagnosis. Longitudinal assessment is therefore needed in order to assess the ability of CSF biomarkers to predict the progression of cognitive impairment, primarily in SMC patients. In addition, follow up of this cohort would help to elucidate how the relationship between CSF biomarkers and cognition changes as the disease evolves.

In summary, our results suggest distinct and dynamic associations between CSF and cognition along the continuum from healthy subjects to AD patients. An early stage, in which memory correlates with A β ₁₋₄₂ but not tau, is then followed by a stage of prodromal AD, in which the association with A β ₁₋₄₂ is lost and a correlation with tau emerges. Finally, both these associations are lost as the patient enters the dementia stage of the disease.

ACKNOWLEDGMENTS

This project has been supported by the Ministry of Science, Spain. Dr Lorena Rami is a recipient of a Miguel Servet grant as a senior investigator of the Ministry of Science, Spain (CP08/00147). The authors would like to thank Alan Nance of the Language Advisory Service of the University of Barcelona for revising the English.

Authors' disclosures available online (<http://www.j-alz.com/disclosures/view.php?id=631>).

REFERENCES

- [1] Shaw LM, Vanderstichele H, Knapiak-Czajka M, Clark CM, Aisen PS, Petersen RC, Blennow K, Soares H, Simon A, Lewczuk P, Dean R, Siemers E, Potter W, Lee VM, Trojanowski JQ (2009) Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Ann Neurol* **65**, 403-413.
- [2] Snider BJ, Fagan AM, Roe C, Shah AR, Grant EA, Xiong C, Morris JC, Holtzman DM (2009) Cerebrospinal fluid biomarkers and rate of cognitive decline in very mild dementia of the Alzheimer type. *Arch Neurol* **66**, 638-645.
- [3] Blennow K, Soares H, Simon A, Lewczuk P, Dean R, Siemers E, Potter W, Lee VM, Trojanowski JQ; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2009) Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Ann Neurol* **65**, 403-413.
- [4] Andreasen N, Blennow K (2005) CSF biomarkers for mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Clin Neurol Neurosurg* **107**, 65-73.
- [5] Sunderland T, Linker G, Mirza N, Putnam KT, Friedman DL, Kimmel LH, Bergeson J, Manetti GJ, Zimmermann M, Tang B, Bartko JJ, Cohen RM (2003) Decreased β -amyloid₁₋₄₂ and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *J Am Med Assoc* **289**, 2094-2103.
- [6] Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londo E, Blennow K, Minthon L (2006) Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol* **5**, 228-234.
- [7] Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, 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 PJ, Scheltens P (2007) Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet* **6**, 734-746.
- [8] Ingelsson M, Fukumoto H, Newell KL, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Frosch MP, Albert MS, Hyman BT, Irizarry MC (2004) Early A β accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* **62**, 925-931.
- [9] Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Leslie MS, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ (2010) Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* **9**, 119-128.
- [10] Wallin AK, Blennow K, Andreasen N, Minthon L (2006) CSF biomarkers for Alzheimer's disease: levels of beta-amyloid, tau, phosphorylated tau relate to clinical symptoms and survival. *Dement Geriatr Cogn Disord* **21**, 131-138.
- [11] Mollenhauer B, Bibl M, Wiltfang J, Steinacker P, Ciesielczyk B, Neubert K, Trenkwalder C, Otto M (2006) Total tau protein, phosphorylated tau (181p) protein, Beta-amyloid₁₋₄₂, and beta-amyloid₁₋₄₀ in cerebrospinal fluid of patients with dementia with Lewy bodies. *Clin Chem Lab Med* **44**, 192-195.
- [12] Lin YT, Cheng JT, Yao YC, Juo, Lo YK, Lin CH, Ger LP, Lu PJ (2009) Increased total TAU but not amyloid-beta (42) in cerebrospinal fluid correlates with short-term memory impairment in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **18**, 907-918.
- [13] Hildebrandt H, Haldenwanger A, Eling P (2009) False recognition correlates with amyloid- β ₁₋₄₂ but not with total tau in cerebrospinal fluid of patients with dementia and mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis* **16**, 157-165.
- [14] Ivanoiu A, Sindic CJ (2005) Cerebrospinal fluid TAU protein and amyloid beta₄₂ in mild cognitive impairment: prediction of progression to Alzheimer's disease and correlation with the neuropsychological examination. *Neurocase* **11**, 32-39.
- [15] Amieva H, Jacqmin-Gadda H, Orgogozo M, Le Carret N, Helmer C, Letenneur L, Barberger-Gateau P, Fabrigoule C, Dartigues JF (2005) The 9 year cognitive decline before dementia of Alzheimer type: a prospective population-based study. *Brain* **128**(pt 5), 1093-1101.
- [16] Nestor PJ, Scheltens P, Hodges JR (2004) Advances in the early detection of Alzheimer's disease. *Nat Med* **10**(suppl), S34-S41.

- [17] Petersen RC, Doody R, Kurz A, Mohs RC, Morris JC, Rabins PV, Ritchie K, Rosser M, Thal L, Winblad B (2001) Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch Neurol* **58**, 1985-1992.
- [18] Grober E, Buschke H (1987) Genuine memory deficits in dementia. *Dev Neuropsychol* **3**, 13-36.
- [19] Pfeffer RI, Kurosaki TT, Harrah CH, Chance JM, Filos S (1982) Measurement of functional activities in older adults in the community. *J Gerontol* **37**, 323-329.
- [20] Rami L, Serradell B, Bosch B, Villar A, Molinuevo JL (2007) Valores normativos de test de función cognitiva frontal para la población mayor de 60 años. *Rev Neurol* **45**, 268-271.
- [21] Rami L, Serradell M, Bosch B, Caprile C, Sekler A, Villar A, Canal R, Molinuevo JL (2008) Semantic memory tests in the Spanish Elderly. Normative data for the Boston Naming Test and for the Pyramids and Palm trees test. *J Clin Exp Neuropsychol* **30**, 1-6.
- [22] Rami L, Serradell M, Bosch B, Villar A, Molinuevo JL (2007) Test digital de percepción (TDP) para la valoración de trastornos perceptivos incipientes en la Enfermedad de Alzheimer inicial. *Neurología* **22**, 342-347.
- [23] Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR; Mini-mental state (1975) A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* **12**, 189-198.
- [24] Morris JC, Heyman A, Mohs RC, Hughes JP, van Belle G, Fillenbaum G, Mellits ED, Clark C (1989) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part I. Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* **39**, 1159-1165.
- [25] Garcia-Albea JE, Sanchez-Bernardos ML, del Viso-Pabon S (1986) Test de Boston para el diagnóstico de la afasia: Adaptación española. In *La evaluación de la afasia y de trastornos relacionados*, Goodglass H, Kaplan E, eds. 2nd ed. Translated by Carlos Wernicke. Editorial Medica Panamericana, Madrid. pp. 129-198.
- [26] Borkowski JG, Benton AL, Spreen O (1967) Word fluency and brain damage. *Neuropsychologia* **5**, 135-140.
- [27] Reitan RM (1958) Validity of the Trail Making test as an indicator of organic brain damage. *Percept Mot Skills* **8**, 271-276.
- [28] Wechsler D (1999) Escala de inteligencia de Wechsler para adultos-III (WAIS III), TEA. Madrid.
- [29] Schoonenboom NS, Pijnenburg YA, Mulder C, Rosso SM, Van Elk EJ, Van Kamp GJ, Van Swieten JC, Scheltens P (2004) Amyloid beta(1-42) and phosphorylated tau in CSF as markers for early-onset Alzheimer disease. *Neurology* **62**, 1580-1584.
- [30] Schoonenboom SN, Visser PJ, Mulder C, Lindeboom J, Van Elk EJ, Van Kamp GJ, Scheltens PH (2005) Biomarker profiles and their relation to clinical variables in mild cognitive impairment. *Neurocase* **11**, 8-13.
- [31] Thorvaldsson V, Nordlund A, Reinvang I, Blennow K, Zetterberg H, Wallin A, Johansson B (2010) Memory in individuals with mild cognitive impairment in relation to APOE and CSF Abeta₄₂. *Int Psychogeriatr* **22**, 598-606.
- [32] Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, Knopman DS, Shaw LM, Trojanowski JQ, Aisen PS, Weiner M, Petersen RC, Jack CR Jr (2010) Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Effect of apolipoprotein E on biomarkers of amyloid load and neuronal pathology in Alzheimer disease. *Ann Neurol* **67**, 308-316.
- [33] Stomrud E, Hansson O, Zetterberg H, Blennow K, Minthon L, Londo E (2010) Correlation of longitudinal cerebrospinal fluid biomarkers with cognitive decline in healthy older adults. *Arch Neurol* **67**, 217-223.
- [34] Stomrud E, Hansson O, Blennow K, Minthon L, Londo E (2007) Cerebrospinal fluid biomarkers predict decline in subjective cognitive function over 3 years in healthy elderly. *Dement Geriatr Cogn Disord* **24**, 118-124.
- [35] Chetelat G, Villemagne VL, Bourgeat P, Pike KE, Jones G, Ames D, Ellis KA, Szoek C, Martins RN, O'Keefe GJ, Salvado O, Masters CL, Rowe CC (2010) Australian Imaging Biomarkers and Lifestyle Research Group. Relationship between atrophy and beta-amyloid deposition in Alzheimer disease. *Ann Neurol* **67**, 317-324.
- [36] Nordlund A, Rolstad S, Klang O, Lind K, Pedersen M, Blennow K, Edman A, Hansen S, Wallin A (2008) Episodic memory and speed/attention deficits are associated with Alzheimer-typical CSF abnormalities in MCI. *J Int Neuropsychol Soc* **14**, 582-590.
- [37] Ringman JM, Younkin SG, Pratico D, Seltzer W, Cole GM, Geschwind DH, Rodriguez-Agudelo Y, Schaffer B, Fein J, Sokolow S, Rosario ER, Gyls KH, Varpetian A, Medina LD, Cummings JL (2008) Biochemical markers in persons with preclinical familial Alzheimer disease. *Neurology* **71**, 85-92.
- [38] Moonis M, Swearer JM, Dayaw MP, St George-Hyslop P, Rogaeva E, Kawarai T, Pollen DA (2005) Familial Alzheimer disease: decreases in CSF Abeta₄₂ levels precede cognitive decline. *Neurology* **65**, 323-325.
- [39] Fagan AM, Head D, Shah AR, Marcus D, Mintun M, Morris JC, Holtzman DM (2009) Decreased cerebrospinal fluid Abeta(42) correlates with brain atrophy in cognitively normal elderly. *Ann Neurol* **65**, 176-183.
- [40] Guillozet AL, Weintraub S, Mash DC, Mesulam MM (2003) Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Arch Neurol* **60**, 729-736.
- [41] Mitchell TW, Mufson EJ, Schneider JA, Cochran EJ, Nissano J, Han LY, Bienias JL, Lee VM, Trojanowski JQ, Bennett DA, Arnold SE (2002) Parahippocampal tau pathology in healthy aging, mild cognitive impairment, and early Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **51**, 182-189.

Trabajo número 5

Cognitively preserved subjects with transitional CSF β -amyloid 1-42 values have thicker cortex in AD vulnerable areas.

Fortea J,¹ Sala-Llonch R,² Bartrés-Faz D,^{2,3} Lladó A,^{1,3} Solé-Padullés C,^{1,3} Bosch B,¹ Antonell A,¹ Olives J,¹ Sanchez-Valle R,^{1,3} Molinuevo JL, Rami L.¹

1. Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.

2. Department de Psiquiatria i Psicobiologia Clínica, Universitat de Barcelona, Spain.

3. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).

Biological Psychiatry. Aceptado. En prensa. IF: 8.926.

Objetivos:

Estudiar la relación entre los niveles de A β 1-42 en líquido cefalorraquídeo y el grosor cortical en diferentes áreas diana de la enfermedad e Alzheimer en un grupo de sujetos sanos y sujetos con quejas subjetivas de memoria, pero con una función cognitiva preservada.

Resultados:

La dicotomización de la muestra en función de los niveles de A β 1-42 en LCR muestra una adelgazamiento cortical en áreas temporo-parietales.

El análisis de la relación entre los valores de A β 1-42 y el grosor cortical en varias áreas temporoparietales definidas a priori mostró que la relación no es lineal sino cuadrática.

En base a este resultado dividimos la muestra en tertiles y analizamos los niveles transicionales de A β 1-42 (entre las fases de “líquido normal a líquido patológico”) y comparamos el grosor cortical de este grupo con el tercil con valores de A β 1-42 más alto y encontramos un incremento del grosor cortical en áreas temporoparietales y en el precuneus esta fase transicional.

ARTICLE IN PRESS

ARCHIVAL REPORT

Cognitively Preserved Subjects with Transitional Cerebrospinal Fluid β -Amyloid 1-42 Values Have Thicker Cortex in Alzheimer Disease Vulnerable Areas

Juan Fortea, Roser Sala-Llonch, David Bartrés-Faz, Albert Lladó, Cristina Solé-Padullés, Beatriz Bosch, Anna Antonell, Jaume Olives, Raquel Sanchez-Valle, Jose L. Molinuevo, and Lorena Rami

Background: Establishing the relationship between cerebrospinal fluid (CSF) β -amyloid 1-42 (A β) and cortical thickness (CTH) would represent a major step forward in the understanding of the Alzheimer disease (AD) process. We studied this relationship in a group of healthy control subjects and subjects with subjective memory complaints with preserved cognitive function at neuropsychological testing.

Methods: In this cross-sectional study, 33 individuals (17 healthy control subjects and 16 subjects with subjective memory complaints) underwent structural 3-Tesla magnetic resonance image scanning and a spinal tap. Cerebrospinal fluid A β was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The relationship between CSF A β values and CTH in several regions of interest, both susceptible and unrelated to AD pathology, was analyzed with a curve fit analysis and CTH difference maps were derived from group comparisons.

Results: Dichotomizing the whole sample according to A β values (cutoff 500 pg/mL), we found the expected cortical thinning in A β positive subjects in temporoparietal areas ($p < .05$ corrected). When analyzing the relationship between CSF A β and CTH in AD-susceptible regions, we found a significant inverted U-shaped relationship (quadratic). Therefore, the sample was further divided into tertiles (according to CSF A β values) to perform subsequent subgroup comparisons. Increased CTH in temporoparietal areas and precuneus ($p < .05$ corrected) was found in the middle A β tertile (CSF A β between 416 and 597 pg/mL) when compared with the high A β tertile (616–881 pg/mL).

Conclusions: The relationship between A β and CTH in preclinical stages may not be linear. Cortical thickness in temporoparietal and precuneus regions is greater in subjects with transitional CSF A β values.

Key Words: Alzheimer disease/physiopathology, amyloid/toxicity, cerebrospinal fluid, magnetic resonance imaging

E lucidating the relationship between brain β -amyloid and cortical gray matter in Alzheimer's disease (AD) is essential to the understanding of the pathological mechanisms of the disease and is a key aim of current clinical trials with anti-amyloid drugs (1).

Alzheimer's disease pathology begins a decade before the appearance of symptoms or in some cases even earlier (2–5). In the literature, this phase is usually defined as preclinical AD (6). One of the core features, the amyloid load, may be detected in vivo by means of cerebrospinal fluid (CSF) analyses measuring β -amyloid 1-42 (A β) (7) or carbon 11-labeled Pittsburgh Compound B (PIB) (8). Recent studies combining the use of PIB and A β CSF values have shown a good correlation between the two (9).

Cortical thinning or atrophy is believed to begin before clinical onset both in sporadic and in familial AD (6,10,11). However, the relationship between the amyloid load (either in individuals who are PIB positive or who have low CSF A β values) and brain structure remains controversial, especially in preclinical AD. Some studies have shown whole brain, hippocampal atrophy or regional cortical thinning (10,12–14), while others have not (15), and the issue of the

discrepancy between the distribution of amyloid and atrophy remains unresolved (16).

Our recent finding of increased cortical thickness (CTH) in presenilin-1 (PSEN1) mutation carriers (17,18), together with the recent finding of increased cortical thickness in middle-aged apolipoprotein E (ApoE) ϵ 4 carriers (19,20) and the report of larger temporal volume in high versus low β -amyloid deposition in healthy elderly subjects (21), may further impact our understanding of this relationship. This unexpected increase may suggest that this relationship may not be linear in AD-susceptible regions. The evolution of the cortical thickness in the preclinical and early phases of AD appears to present an inverted-U shape model that is similar to, and consistent with, pathological studies in humans in which a phase of neuronal and nuclear hypertrophy in preclinical AD, without neuronal loss, precedes the atrophy of the neuronal cell body in symptomatic AD (2–4).

Our objective was therefore to assess the relationship between CSF A β values and cortical thickness in AD-vulnerable and unrelated regions in a group of healthy elderly subjects and subjects with subjective memory complaints.

Methods and Materials

Participants

Thirty-three subjects were prospectively recruited from the Alzheimer Disease and Other Cognitive Disorders Unit at the Hospital Clinic, Barcelona, Spain. Seventeen were healthy elderly subjects without cognitive complaints and 16 were subjects with subjective memory complaints. The study was approved by the Hospital Clinic Ethics Committee and all subjects gave informed written consent.

Healthy control subjects (HC) were recruited among the spouses of the patients attended in the Alzheimer Disease and Other Cognitive Disorders Unit. They had to fulfill the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative criteria for cognitively normal subjects (22): Mini-Mental State Examination scores between 24 and 30, no mem-

From the Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit (JF, DB-F, AL, CS-P, BB, AA, JO, RS-V, JLM, LR), Neurology Service, Hospital Clinic; Department de Psiquiatria i Psicobiologia Clínica (RS-L), Universitat de Barcelona; and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (DB-F, AL, CS-P, AA, RS-V, JLM), Barcelona, Spain.

Address correspondence to Lorena Rami, Ph.D., Hospital Clinic, Barcelona, Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain; E-mail: lrami@clinic.ub.es. Received Sep 27, 2010; revised Feb 15, 2011; accepted Feb 15, 2011.

0006-3223/\$36.00
doi:10.1016/j.biopsych.2011.02.017

BIOL PSYCHIATRY 2011;xx:xxx
© 2011 Published by Elsevier Inc on behalf of Society of Biological Psychiatry

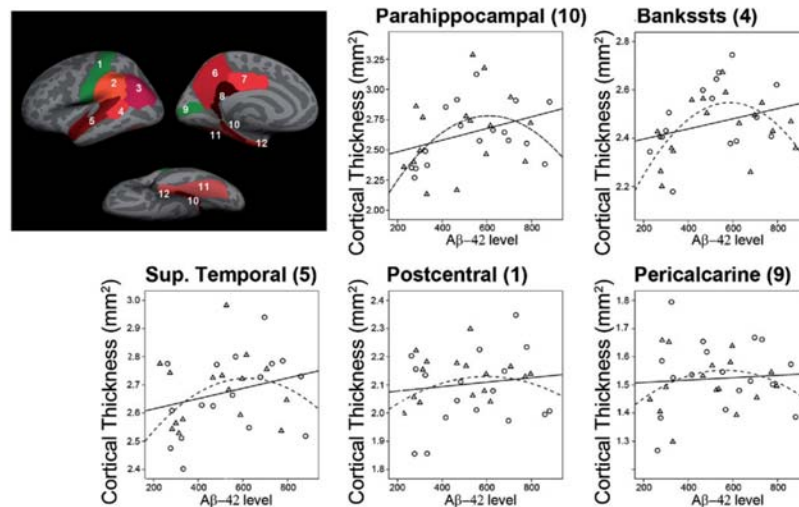


Figure 1. The relationship between β -amyloid 1-42 and cortical thickness in the chosen regions of interest showing the linear and quadratic curve fit analyses (when the quadratic fit reaches significance). Three Alzheimer disease vulnerable areas and two unrelated or control areas are shown. Healthy control subjects are represented by circles ($n = 17$) and subjective memory complaints by triangles ($n = 16$). In the left superior corner of the figure, a panel with all the regions of interest used and extracted from the automated labeling system (27) is also facilitated: 1) Postcentral; 2) Supramarginal; 3) Inferior parietal; 4) Banks of the superior temporal sulcus; 5) Superior temporal; 6) Precuneus; 7) Posterior cingulate; 8) Isthmus; 9) Pericalcarine; 10) Parahippocampal; 11) Fusiform; 12) Entorhinal. A β -42, β -amyloid 1-42; Bankssts, Banks of the superior temporal sulcus; Sup., superior.

ory complaints, objective memory performance (as measured by the Free and Cued Selective Reminding Test [FCSRT]) (23) in the normal range, and a Clinical Dementia Rating Scale score of 0.

Subjective memory complaint (SMC) subjects were those who had presented with a memory complaint but without objective cognitive impairment and had a memory performance in the normal range with the FCSRT and a Clinical Dementia Rating Scale score of 0. The mean duration of the cognitive complaints was 3.5 years (range 1–8 years).

Neuropsychological Assessment

Participants received a 1-hour comprehensive neuropsychological battery, described elsewhere (24), by a trained neuropsychologist. Scores were adjusted for age and educational level.

Apolipoprotein E Analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood of probands using the QIAamp DNA blood minikit (Qiagen). Apolipoprotein E genotyping was performed by polymerase chain reaction amplification and HhaI restriction enzyme digestion.

CSF Analysis

Ten milliliters of CSF were obtained during the morning (9:00 to 12:00 AM) and samples were centrifuged and stored in polypropylene tubes at -80°C . The A β , total tau, and tau phosphorylated at threonine 181 in CSF were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (Innogenetics, Ghent, Belgium). Patients were not fasted. As participants of the quality control program, determinations in our laboratory of A β , total tau, and tau phosphorylated at threonine 181 values have been within mean ± 2 SD (25).

A cutoff of 500 pg/mL was used to dichotomize the sample into A β positive (< 500 pg/mL) and A β negative subjects (≥ 500 pg/mL) (13).

Magnetic Resonance Imaging Acquisition

Subjects were examined on a 3T magnetic resonance imaging (MRI) scanner (Magnetom Trio Tim, Siemens Medical Systems, Germany). A high-resolution three-dimensional structural dataset (T1-weighted magnetization-prepared rapid gradient-echo, repetition time = 2300 msec, echo time = 2.98 msec, 240 slices, field of view = 256 mm; matrix size = 256×256 ; slice thickness = 1 mm) was acquired for the 33 subjects. The mean time interval between the lumbar puncture and the MRI was 41 days and ranged between 1 and 134 days.

Cortical Thickness Procedure

Cortical reconstruction of the structural images was performed with the FreeSurfer image analysis suite, version 4.5 (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu>). The procedures have been fully described elsewhere (26). In short, reconstructed and registered individual CTh maps were smoothed using a Gaussian kernel of 15 mm full-width at half maximum and introduced in a group analysis, based on general linear modeling of the data to obtain spatial maps showing the differences between groups.

Moreover, the FreeSurfer streamline provided a cortical parcellation based on a predefined atlas (27). Mean thickness of the areas of interest was extracted from each subject based on these parcellations, and between-groups comparisons and regression analyses with A β were further performed using SPSS v.16 (Chicago, Illinois). We focused both on regions known to be typically affected in AD (10), aiming at temporoparietal association cortices, medial temporal areas, and retrosplenial, posterior cingulate, and precuneus regions. These regions were analyzed by an automated labeling system (27). Target areas in this atlas would correspond to the entorhinal, parahippocampal, fusiform, supramarginal, inferior parietal, banks of the superior temporal sulcus, and superior temporal cortices. Furthermore, two control regions (pericalcarine and post-

ARTICLE IN PRESS

J. Fortea *et al.*

BIOL PSYCHIATRY 2011;xx:xxx 3

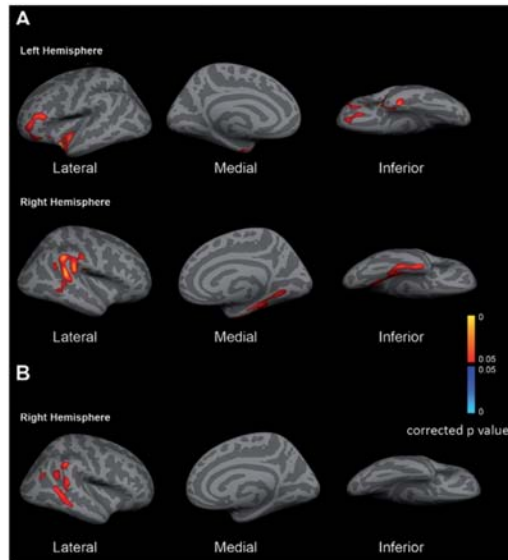


Figure 2. Cortical thickness difference maps in the cerebrospinal fluid (CSF) β -amyloid 1-42 ($A\beta$) positive versus CSF $A\beta$ negative individuals. Only regions that survive familywise error correction for multiple comparisons ($p < .05$) are shown. Red-yellow indicates decreased cortical thickness in the CSF $A\beta$ positive individuals with respect to CSF $A\beta$ negative individuals. **(A)** Results from the whole sample ($n = 33$). **(B)** Results from subjective memory complaint subjects ($n = 16$). (No regions in the left hemisphere in subjective memory complaint subjects and no regions in either hemisphere in healthy control subjects survived familywise error correction; therefore, they are not shown.)

central), which are not affected in more advanced stages of the disease (5), were selected.

The segmentation procedure, also performed as implemented in FreeSurfer, enabled us to obtain a measure of the estimated intracranial volume (EIV) (28), which is based on the scale factor used for the atlas registration.

Statistical Analysis

Group analyses were made using SPSS. Comparisons between groups were performed using two-tailed Student *t* test or analysis of variance for continuous variables with a chi-square test for categorical variables.

Difference maps for the CTh analyses were obtained using linear modeling of the thickness maps as implemented in FreeSurfer with age and gender as covariates. The resulting maps were corrected familywise for multiple comparisons using a Monte Carlo Null-Z simulation performing 10,000 iterations (familywise error [FWE]). Only corrected clusters with a final clusterwise probability $< .05$ were considered for discussion (Figures 2 and 3). The uncorrected maps have been included in Figures S1, S2, and S3 (Supplement 1).

To assess the relationship between the CTh values in the regions of interest (ROIs) and the overall CSF $A\beta$ values, we used the curve fit analysis as implemented in SPSS. Consistent with our hypothesis, we represent the model summary only for linear, quadratic, and cubic relationships.

Therefore, group comparisons were first performed dichotomizing the sample into CSF amyloid positive/negative groups, but

because of the quadratic relationship between $A\beta$ values and CTh (see Results), the sample was also analyzed after division into tertiles.

Results

Demographic and Clinical Characteristics

Clinical, demographic, and neuropsychological data are reported in Table 1.

All subjects from both groups presented neuropsychological scores within 1.5 SD of our normative values. Healthy control subjects performed better on the Mini-Mental State Examination and in the Trail Making Test-A ($p < .05$) than SMC subjects. No other differences were found in neuropsychological scores between SMC and HC.

No significant differences were found among groups in the clinical, demographic, and neuropsychological data, when dividing the studied population according to their CSF $A\beta$ levels (when dichotomized or when comparing the middle vs. high $A\beta$ tertiles or between the low vs. high tertiles). However, there was a trend toward a lower educational level in the intermediate $A\beta$ tertile with respect to the high $A\beta$ tertile (8.6 vs. 12.1 years of education, respectively; Student *t* test $p = .062$).

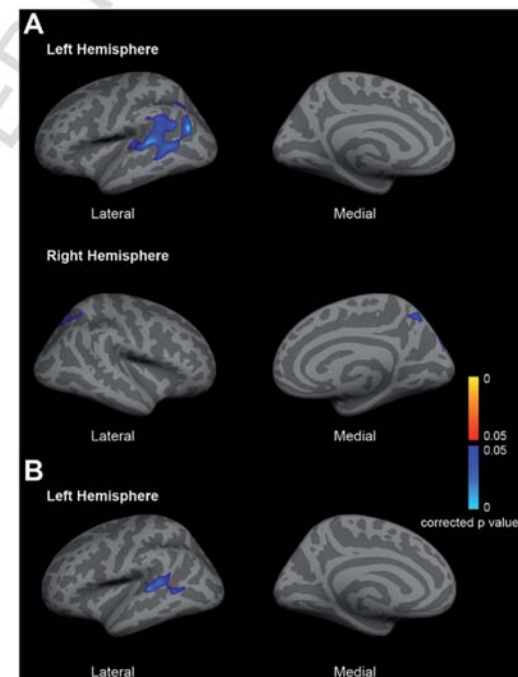


Figure 3. Cortical thickness difference maps for the contrast between the middle versus high cerebrospinal fluid β -amyloid 1-42 tertiles. Only regions that survive familywise error correction for multiple comparisons ($p < .05$) are shown. Blue indicates increased cortical thickness in the middle tertile with respect to the high tertile. **(A)** Results from the whole sample ($n = 22$). **(B)** Results from healthy elderly ($n = 12$). (No regions in the right hemisphere in healthy control subjects and no regions in either hemisphere in subjective memory complaint subjects survived familywise error correction; therefore, they are not shown.)

Table 1. Demographic Data, CSF Aβ Values, and Neuropsychological Test Results for the Different Subgroups

	Pooled Sample			Pooled Sample (Aβ Tertiles)			
	HC	SMC	Aβ Positive	Aβ Negative	Low	Middle	High
Number of Subjects	17	16	15	18	11	11	11
Age at MRI, Mean (SD), Years [Range]	70.8 (7.6) [55.5–81.9]	69.7 (7.1) [55.9–81.0]	72.7 (7.9) [55.9–80.0]	68.3 (6.4) [55.5–81.9]	73.6 (7.3) [55.5–81.9]	67.4 (7.5) [55.9–80.3]	69.8 (6.2) [58.6–80.2]
Gender, No. (%), Male	59	31	47	44	55	36	45
Education, Mean (SD), Years	11.1 (4.4)	9.1 (4.0)	9.7 (3.9)	10.4 (4.6)	10.0 (4.4)	8.6 (3.7)	12.1 (4.3)
ApoE ε4 Carriers (%)	24	20	26.7	17.7	27.3	20	18.2
Aβ Values: Mean (SD) [range]	542 (208) [263–881]	490 (185) [229–796]	336 (82) [229–483]	668 (116) [507–881]	292 (32) [229–333]	519 (57) [416–597]	740 (86) [616–881]
MMSE, Mean (SD)	28.5 ^a (1.0)	27.4 ^a (1.6)	27.8 (1.7)	28.1 (1.2)	27.4 (1.8)	28.3 (1.0)	28.3 (1.3)
FCSRT-L, Mean (SD)	24.6 (6.1)	23.0 (8.1)	20.1 (7.6)	26.2 (6.4)	18.5 (6.8)	25.3 (8.1)	26.4 (5.0)
FCSRT-TL, Mean (SD)	40.7 (8.3)	38.5 (6.6)	37.7 (7.6)	40.9 (7.3)	36.7 (6.9)	40.6 (7.3)	41.1 (8.2)
FCSRT-R, Mean (SD)	10.1 (2.2)	8.9 (2.6)	8.3 (3.1)	10.2 (1.6)	7.8 (3.1)	10.1 (2.3)	10.1 (1.7)
FCSRT-TR, Mean (SD)	14.2 (2.1)	13.1 (2.2)	12.7 (2.7)	14.4 (1.4)	12.1 (2.4)	14.3 (2.1)	14.3 (1.6)
BNT, Mean (SD)	51.8 (5.9)	50.3 (4.0)	50.4 (5.9)	50.9 (4.9)	49.6 (6.7)	50.5 (3.6)	51.9 (5.3)
PDT, Mean (SD)	14.2 (8)	14.1 (11.0)	13.9 (12)	13.8 (1.9)	13.1 (1.3)	14.1 (9)	13.6 (1.6)
Digit Span, Mean (SD)	13.7 (2.4)	11.7 (4.5)	12.3 (3.2)	12.7 (4.3)	12.2 (3.5)	11.2 (2.1)	13.8 (4.8)
FAS, Mean (SD)	32.5 (9.1)	27.1 (12.9)	28.2 (11.5)	29.1 (12.8)	27.9 (13.1)	27.7 (8.9)	30.5 (14.5)
TMT-A, Mean (SD)	45.8 (12.9)	60.2 (20.9) ^a	55.4 (21.8)	58.1 (27.6)	57.7 (24.7)	50.3 (20.3)	63.0 (29.5)

The comparisons (t tests) have been performed for each subdivision of the sample: HC versus SMC; Aβ positive versus CSF Aβ negative; Aβ, β-amyloid 1–42; ApoE, Apolipoprotein E; BNT, Boston Naming Test; CSF, cerebrospinal fluid; FAS, phonemic verbal fluency; FCSRT, Free and Cued Selective Reminding Test; FCSRT-L, Free and Cued Selective Reminding Test-Left; FCSRT-TL, Free and Cued Selective Reminding Test-Total Learning; FCSRT-TR, Free and Cued Selective Reminding Test-Trail Making; HC, healthy control subjects; MMSE, Mini-Mental State Examination; MRI, magnetic resonance imaging; PDT, Perceptual Digital Test; SD, standard deviation; SMC, subjective memory complaints; TMT-A, Trail Making Test A.
^ap < .05.

CSF Results

Baseline CSF data are reported in Table 1. Taking a cutoff score of 500 pg/mL for CSF Aβ values (as a value below indicating Aβ positivity), 8 (47.1%) of 17 HC and 7 (43.8%) of 16 SMC subjects were Aβ positive. Although Aβ mean values were lower in the ApoE ε4 carriers group than in noncarriers, the difference did not reach statistical significance (487 vs. 525; Student t test p = .665).

Structural Analysis

The EIV did not differ between the different groups (HC vs. SMC; Aβ positive vs. Aβ negative or among Aβ tertiles). The mean (and SD) EIV values for the three Aβ tertiles were 1472 (170) mL, 1473 (150) mL, and 1480 (150) mL for the high, intermediate, and low Aβ tertiles, respectively. Statistical values of the two-tailed t test performed between the low and intermediate Aβ tertiles against the high Aβ tertile were t = .12 (p = .91) and t = .12 (p = .98), respectively. As a result, EIV was not included in subsequent statistical models.

Relationship Between Aβ Values and Cortical Thickness

Table 2 presents the curve fit analysis of the individual mean CTH values and CSF Aβ values for the whole sample in the 10 predetermined ROIs known to be affected early in the disease process and in 2 unrelated or control ROIs (pericalcarine and postcentral). Moreover, Table S1 in Supplement 1 presents the mean CTH values (and SD) for all the ROIs and the group differences that reach significance.

Figure 1 presents the scattered plot of the individual mean CTH values and Aβ values for the whole sample in three ROIs that reach significance for the quadratic fit in the curve fit analysis and in the two unrelated or control ROIs (pericalcarine and postcentral). In the parahippocampal, banks of the superior temporal sulcus, and superior temporal ROIs, the linear relationship did not reach significance in the curve fit analysis. On the contrary, a significant quadratic relationship (Table 2) and a significant cubic relationship were found between Aβ and CTH values. Neither linear nor quadratic relationships were found in control regions.

Cortical Thickness Analysis Between the Aβ Positive and Aβ Negative Groups

There were no significant differences in the HC versus SMC comparison. Therefore, we first analyzed all group comparisons (Aβ positive vs. Aβ negative and among the Aβ tertiles) in the whole sample. We also performed subanalyses in HC and SMC separately.

When dichotomizing the whole sample into pathological Aβ values versus normal (cutoff 500 pg/mL), the difference maps from the comparison (Figure 2) revealed regions of cortical thinning in Aβ positive subjects (p < .05 FWE corrected), which included the lingual, parahippocampal, fusiform, entorhinal, supramarginal, banks of the superior temporal sulcus, inferior parietal, and the superior and middle temporal in the right hemisphere (see the areas defined in [27]). The left hemisphere included areas in the superior temporal, insula, inferior temporal, fusiform, entorhinal, middle frontal, and lateral orbitofrontal. The subgroup analysis confirmed this result in the SMC subgroup in the right hemisphere (no regions survived the FWE correction in the left hemisphere) (Figure 2, panel B). The subgroup analysis in HC did not survive FWE correction, but the direction of changes at the uncorrected level (Figure S1 in Supplement 1) was as described above for SMC.

Cortical Thickness Analysis When Dividing the Sample in Tertiles

Due to the fact that we found a quadratic relationship between Aβ and CTH values, we divided the sample into tertiles. In the low

ARTICLE IN PRESS

J. Fortea *et al.*

BIOL PSYCHIATRY 2011;xx:xxx 5

Table 2. The Relationship Between CSF A β Values and Cortical Thickness Showing the Linear, Quadratic, and Cubic Curve Fit Analyses

Area	Left						Area	Right					
	Linear		Quadratic		Cubic			Linear		Quadratic		Cubic	
	R ²	p	R ²	p	R ²	p		R ²	p	R ²	p	R ²	p
Postcentral (1)	.019	.439	.054	.436	.087	.443	Postcentral (1)	.018	.458	.047	.483	.054	.650
Supramarginal (2)	.010	.578	.117	.155	.118	.297	Supramarginal (2)	.183	.013	.287	.006	.288	.018
Inferior Parietal (3)	.000	1.00	.109	.178	.139	.219	Inferior Parietal (3)	.007	.648	.013	.817	.014	.936
Banks of the Superior Temporal Sulcus (4)	.089	.091	.336	.002	.343	.005	Banks of the Superior Temporal Sulcus (4)	.173	.016	.175	.056	.195	.093
Superior Temporal (5)	.074	.125	.150	.088	.268	.027	Superior Temporal (5)	.104	.607	.266	.010	.266	.028
Precuneus (6)	.000	.962	.049	.468	.081	.476	Precuneus (6)	.013	.532	.117	.155	.123	.276
Posterior Cingulate (7)	.038	.275	.041	.534	.056	.637	Posterior Cingulate (7)	.071	.133	.079	.292	.091	.422
Isthmus (8)	.068	.142	.121	.144	.171	.136	Isthmus (8)	.000	.960	.081	.283	.130	.251
Pericalcarine (9)	.005	.688	.057	.414	.068	.559	Pericalcarine (9)	.065	.152	.099	.211	.143	.209
Parahippocampal (10)	.110	.060	.252	.013	.257	.033	Parahippocampal (10)	.153	.024	.238	.017	.251	.037
Fusiform (11)	.001	.866	.111	.172	.112	.322	Fusiform (11)	.131	.038	.173	.058	.183	.114
Entorhinal (12)	.092	.086	.097	.216	.124	.273	Entorhinal (12)	.005	.685	.007	.897	.046	.707

Included are the 10 AD vulnerable areas automatically extracted ROIs (27) and 2 control areas (not typically affected in AD).

All the areas are represented in Figure 1 (the numbering in the figure and in the table is the same).

A β , β -amyloid 1-42; AD, Alzheimer disease; CSF, cerebrospinal fluid; ROI, region of interest.

tertile, the CSF A β values ranged from 229 to 333 pg/mL; the middle tertile values ranged from 416 to 597 pg/mL; and the high tertile values ranged from 616 to 881 pg/mL.

Subjects in the intermediate A β tertile showed significant thickening compared with subjects in the high A β tertile (Table 1), in a pattern that almost overlapped with the one found in the dichotomous comparison (Figure 3; $p < .05$ FWE corrected). The regions included the superior parietal and precuneus in the right hemisphere. In the left hemisphere, affected areas were the superior temporal, the banks of the superior temporal sulcus, the supramarginal, the inferior parietal, and the middle temporal. The subgroup analysis confirmed this result in HC in the left hemisphere (no regions survived the FWE correction in the right hemisphere) (Figure 3, panel B). The subgroup analysis in SMC did not survive FWE correction, but the direction of changes at the uncorrected level (Figure S2 in Supplement 1) was as described above for HC.

Compared with the high A β tertile, the low A β tertile showed several regions of cortical thinning (Figure S3 in Supplement 1), which included (FWE corrected) the parahippocampal, the fusiform, the entorhinal, the supramarginal, the banks of the superior temporal sulcus, and the inferior parietal in the right hemisphere. In the left hemisphere, no areas survived the FWE correction.

Discussion

In this study, we investigated the relationship between CSF A β values and CTh in a group of cognitively preserved subjects. Our results show that this relationship may be more complex than previously thought; some regions presented a nonlinear or inverted-U shaped relationship, because of an increase in CTh associated with intermediate CSF A β values that may precede cortical thinning. This increment in CTh preceding cortical thinning might be related to reactive neuronal hypertrophy and/or inflammation driven by amyloid in very early stages of the disease, as has been shown in PSEN1 mutation carriers (17).

When analyzing the relationship between amyloid and atrophy, subjects are usually dichotomized into A β positive and A β negative groups, a "biologically sensible" approach (16) that is in keeping with "the clinical notion of a normal versus abnormal test result" (22). When we performed this division, we found that A β positive

subjects presented regions of cortical thinning in temporoparietal association areas in a pattern that resembled the "AD signature" of sporadic AD (10,29). This cortical thinning found in A β positive versus A β negative groups thus corroborates and expands on previous findings in PIB positive individuals (10,12,30) in whom regional cortical thinning was found in A β positive healthy control subjects. However, some discrepancies remain in the relationship, because certain studies have shown significant correlations only in subjects with subjective memory complaints and not in healthy control subjects (31).

Moreover, some studies have found a relationship between annual atrophy rate and PIB status in cognitively normal subjects (30), whereas others have not (22). Brain atrophy rates have also been studied in relation to CSF biomarkers (32,33). Tosun *et al.* (32) showed that lower CSF A β and higher tau concentrations were associated with increased rates of regional brain tissue loss in healthy control subjects with the characteristic patterns that resemble the pathology seen in AD. Fjell *et al.* (33) showed that CSF A β correlated with brain atrophy and ventricular expansion in a subgroup of cognitively normal elderly individuals. These longitudinal results support the idea that the structural changes analyzed are indeed related to an AD pathology, although further research over several years is needed to test whether degenerative pathology will eventually develop in the group of cognitively normal elderly individuals (33).

As we stated in the introduction, previous studies in PSEN1 mutation carriers and ApoE ϵ 4 carriers found an unexpected increase in cortical thickness (17,19,20), suggesting that the relationship between CTh and CSF A β values may not be linear. To address this issue, we extracted the mean individual CTh values from the various ROIs and studied their relationship with individual CSF A β values (Figure 1). The curve fit analysis showed a significant quadratic (but not linear) relationship between CSF A β values and CTh in temporoparietal association areas but not in control regions. The cubic relationship explained an even greater proportion of the variance (Table 2), suggesting an asymptote in the higher A β tertile. Although we recognize that the relationship may be even more complex with an asymptote in the higher A β tertile (true nonpathological), our sample size does not allow us to study this possibility. Therefore, our main focus of interest, the transitional A β values,

might be well represented in an intermediate A β tertile derived from this quadratic relationship.

This mathematical relationship led us to divide the sample into tertiles and to study the comparison between the high A β tertiles and intermediate or low A β tertiles. We believe that this has a biological significance that is even greater than the mathematical one. The A β values (and PIB binding) are assumed to be bimodal; however, even though some of the transitional values in our sample may, indeed, not be transitional but within the normal distribution of pathology versus normality (34), it is clear that there must be a transitional phase with intermediate A β values. In agreement with this notion, it has been reported that PIB rate of change may be linear with age and does not differ according to stage severity (clinical group) (22), an idea that is further supported by the finding of a linear relationship between the adjusted age and CSF A β values in asymptomatic PSEN1 mutation carriers (35).

When comparing the intermediate A β tertile (the transitional tertile) with the high A β tertile, we found thickening rather than thinning. The pattern was the same as the one described above for cortical thinning, that is, the cortical AD signature that includes temporoparietal association areas and precuneus (10,29). We stress that some areas survived multiple comparisons correction despite the relatively small number of subjects in the sample and the specificity of the areas involved.

To the best of our knowledge, this is the first report of increased CTh in relation to CSF amyloid values in sporadic AD. However, the finding is supported by previous morphometric studies in humans, pathological data, and animal model studies. In humans, cortical thickening has recently been found by our group in PSEN1 mutation carriers who were around 10 years younger than the theoretical age (adjusted age) of disease onset (17,18). Moreover, two recent studies by Espeseth *et al.* (19,20) have shown that healthy ApoE ϵ 4 carriers have thicker cortices than noncarriers (but a steeper age-related thinning in areas known to be affected in AD) precisely in the life period (48–75 years old) when early morphological changes are beginning to emerge (19) and have related their finding to a modulation of selective attention (20). The finding of larger temporal gray matter volume in high PIB-binding healthy control subjects (21) lends further support to the unintuitive finding of thicker cortex early in the disease process. In pathological studies using cognitively normal subjects who fulfilled pathological criteria for AD, cortical and hippocampal neuron size seemed to present a similar nonlinear relationship with AD pathology. A phase of nuclear/cellular hypertrophy before clinical onset has been described (2–4), followed by cellular atrophy. In animal models, a similar phenomenon was observed in transgenic mice: neural hypertrophy and increased synaptic contacts were reported in A β PP/PS1DeltaE9 animals, and serial morphometric studies with MRI showed an increase in cerebral and intracranial size in double transgenic mice (36–38).

“Brain reserve or other compensatory/protective processes” have been proposed as alternative hypotheses to explain the finding of larger temporal volume in high versus low β -amyloid healthy control subjects (21) and to explain the hypertrophy of the neuronal nuclei, cell bodies, and nucleoli in pathological studies (2–4). Our results, however, do not support the brain reserve hypothesis for the increase in CTh, because the intermediate A β tertile showed a trend toward a lower educational level than the high A β tertile (8.6 vs. 12.1 years of education, respectively) and the curve fit analyses suggested a direct relationship between CTh and A β values. Similarly, the modulation of selective attention in ApoE ϵ 4 carriers found by Espeseth *et al.* (20) indicates that “cortical thickening cannot be explained solely as a compensatory response.” More-

over, the results in familial AD (17,18) and transgenic mice (36–38) mentioned above provide further support for this direct relationship.

We stress that our results do not question previous findings of brain atrophy in A β positive individuals, because when we dichotomized the sample contrasting abnormal versus normal A β values (13), we found the expected cortical thinning. It is only when analyzing the sample in tertiles that the thickening emerges. Recently, Jack *et al.* (6) summarized the currently available evidence on sporadic AD and proposed a model that related disease stage to AD biomarkers. In that model, the preclinical phase of the disease corresponds to the deposition of fibrillar A β marked by reductions in CSF A β and by increased amyloid positron-emission tomography tracer retention. Neurodegeneration appears later and is marked by functional abnormalities, increased CSF tau, and atrophy in MRI. The finding of increased CTh with intermediate A β values does not fit either of the stages described. Our data, nonetheless, may fit the model if we situate our results earlier in the disease process. In fact, as the designers of this model acknowledged, features such as the role of toxic A β oligomeric species or diffuse plaques (6,39) and the timing of their appearance were not included, as “there are currently no reliable biomarkers for them.”

The explanations given for the increased CTh in asymptomatic mutation carriers (17)—reactive neuronal hypertrophy or inflammatory response to A β (toxic effect of A β oligomers or diffuse plaques) previous to A β fibrillar deposition (6,39)—may also be applicable in sporadic AD. One potential interpretation is that cortical thickening occurs before the β -amyloidosis phase (defined as low A β values or PIB positivity) in subjects who will progress along the AD continuum. This pathochronology is supported by the findings in PSEN1 mutation carriers (17) in which thickening was found with normal A β values and the presence of a linear relationship between CTh and adjusted age over 20 years before theoretical disease onset, an age at which no deposition is believed to occur (22). Furthermore, in middle-aged ApoE ϵ 4 carriers (19,20), cortical thickening was found when A β deposition was not expected, as recent studies show that ApoE ϵ 4 carriers begin to increase PIB binding over the age of 55 (40). This suggests that the timing in the disease process and the time interval in sporadic and familial AD are surprisingly similar.

This study has several limitations. The most important is the relatively small number of subjects studied, although the fact that our results survive multiple comparison correction reassures us of their consistency. Another important limitation is the absence of longitudinal follow-up of the subjects, because while cross-sectional studies such as this one provide useful information, ultimately more powerful evidence for what happens throughout the course of AD with respect to thickness and A β relationships will be obtained from serial longitudinal assessments of A β and thickness. Only then can one show whether thickness increases initially and then decreases in relation to changing A β values. The last important limitation is the absence of a positron-emission tomography-PIB study of these subjects. It would be extremely valuable in the interpretation of the analysis of local changes of CTh and to correlate them with local amyloid deposition. Therefore, replication in other cohorts will be essential to confirm our findings. However, two considerations should be borne in mind in the replication of the results. First, the decrease in A β values in the CSF may precede PIB positivity (41), making PIB potentially less suitable for the study at this stage of the disease. The second is the importance of the sampling age, because it has been demonstrated that the fitting of

ARTICLE IN PRESS

J. Fortea *et al.*

BIOL PSYCHIATRY 2011;xx:xxx 7

quadratic models is substantially affected by the age range sampled (30).

This work has some potential implications. First, these preliminary results present novel information regarding A β toxicity and may thus help to clarify some contradictory findings in the literature (10,13,14,22,30,31,42,43). Second, if the results are replicated, they would have implications for the changes that may be expected with the use of anti-amyloid drugs (1,44,45). Finally, these results might have important implications for the large-scale ongoing research to find imaging biomarkers of early pathological changes in AD (6).

In conclusion, the relationship between CSF A β values and CTH in preclinical stages is not linear but quadratic. Cortical thickening in AD-susceptible brain regions increases early in the transition from normal to pathological A β values.

This study was funded by research grants from the Instituto Carlos III (FIS080036) and from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009-07489), Spain. Dr. Lorena Rami is the recipient of a Miguel Servet Grant as a senior investigator from the Ministry of Science, Spain (CP08/00147). Dr. Juan Fortea has received a Josep Font Grant from Hospital Clinic.

We thank all the volunteers for their participation in this study.

All authors reported no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

Supplementary material cited in this article is available online.

1. Lemere CA, Masliah E (2010): Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-beta immunotherapy? *Nat Rev Neurol* 6:108–119.
2. Iacono D, Markesbery WR, Gross M, Pletnikova O, Rudow G, Zandi P, Troncoso JC (2009): The Nun study: Clinically silent AD, neuronal hypertrophy, and linguistic skills in early life. *Neurology* 73:665–673.
3. Iacono D, O'Brien R, Resnick SM, Zonderman AB, Pletnikova O, Rudow G, *et al.* (2008): Neuronal hypertrophy in asymptomatic Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:578–589.
4. Riudavets MA, Iacono D, Resnick SM, O'Brien R, Zonderman AB, Martin LJ, *et al.* (2007): Resistance to Alzheimer's pathology is associated with nuclear hypertrophy in neurons. *Neurobiol Aging* 28:1484–1492.
5. Braak H, Braak E (1991): Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239–259.
6. Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, *et al.* (2010): Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* 9:119–128.
7. Shaw LM, Vanderstichele H, Knapik-Czajka M, Clark CM, Aisen PS, Petersen RC, *et al.* (2009): Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Ann Neurol* 65:403–413.
8. Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, *et al.* (2004): Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh compound-B. *Ann Neurol* 55:306–319.
9. Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, Lee SY, Dence CS, Shah AR, *et al.* (2006): Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Ann Neurol* 59:512–519.
10. Dickerson BC, Bakkour A, Salat DH, Feczko E, Pacheco J, Greve DN, *et al.* (2009): The cortical signature of Alzheimer's disease: Regionally specific cortical thinning relates to symptom severity in very mild to mild AD dementia and is detectable in asymptomatic amyloid-positive individuals. *Cereb Cortex* 19:497–510.
11. Knight WD, Kim LG, Douiri A, Frost C, Rossor MN, Fox NC (in press): Acceleration of cortical thinning in familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*.
12. Storandt M, Mintun MA, Head D, Morris JC (2009): Cognitive decline and brain volume loss as signatures of cerebral amyloid-beta peptide deposition identified with Pittsburgh compound B: Cognitive decline associated with Abeta deposition. *Arch Neurol* 66:1476–1481.
13. Fagan AM, Head D, Shah AR, Marcus D, Mintun M, Morris JC, Holtzman DM (2009): Decreased cerebrospinal fluid Abeta(42) correlates with brain atrophy in cognitively normal elderly. *Ann Neurol* 65:176–183.
14. Mormino EC, Kluth JT, Madison CM, Rabinovici GD, Baker SL, Miller BL, *et al.* (2009): Episodic memory loss is related to hippocampal-mediated beta-amyloid deposition in elderly subjects. *Brain* 132:1310–1323.
15. Bourgeat P, Chetelat G, Villemagne VL, Fripp J, Raniga P, Pike K, *et al.* (2010): Beta-amyloid burden in the temporal neocortex is related to hippocampal atrophy in elderly subjects without dementia. *Neurology* 74:121–127.
16. Jack CR Jr, Lowe VJ, Senjem ML, Weigand SD, Kemp BJ, Shiung MM, *et al.* (2008): 11C PiB and structural MRI provide complementary information in imaging of Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Brain* 131:665–680.
17. Fortea J, Sala-Llonch R, Bartres-Faz D, Bosch B, Llado A, Bargallo N, *et al.* (2010): Increased cortical thickness and caudate volume precede atrophy in PSEN1 mutation carriers. *J Alzheimers Dis* 22:909–922.
18. Lu P, Lee GJ, Thompson PM, Medina LD, Leow A, Coppola G, *et al.* (2010): A tensor-based morphometry study of brain volume changes in symptomatic and pre-symptomatic patients with familial Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 6:S428.
19. Espeseth T, Westlye LT, Fjell AM, Walhovd KB, Rootwelt H, Reinvang I (2008): Accelerated age-related cortical thinning in healthy carriers of apolipoprotein E epsilon 4. *Neurobiol Aging* 29:329–340.
20. Espeseth T, Westlye LT, Walhovd KB, Fjell AM, Endestad T, Rootwelt H, Reinvang I (2010): Apolipoprotein E epsilon4-related thickening of the cerebral cortex modulates selective attention [published online ahead of print April 9]. *Neurobiol Aging*.
21. Chetelat G, Villemagne VL, Pike KE, Baron JC, Bourgeat P, Jones G, *et al.* (2010): Larger temporal volume in elderly with high versus low beta-amyloid deposition. *Brain* 133:3349–3358.
22. Jack CR Jr, Lowe VJ, Weigand SD, Wiste HJ, Senjem ML, Knopman DS, *et al.* (2009): Serial PiB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. *Brain* 132:1355–1365.
23. Grober E, Buschke H, Crystal H, Bang S, Dresner R (1988): Screening for dementia by memory testing. *Neurology* 38:900–903.
24. Rami L, Fortea J, Bosch B, Sole-Padullés C, Llado A, Iranzo A, *et al.* (2011): Cerebrospinal fluid biomarkers and memory present distinct associations along the continuum from healthy subjects to AD patients. *J Alzheimers Dis* 23:319–326.
25. Mattsson N, Blennow K, Zetterberg H (2010): Inter-laboratory variation in cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease: United we stand, divided we fall. *Clin Chem Lab Med* 48:603–607.
26. Fischl B, Dale AM (2000): Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11050–11055.
27. Desikan RS, Segonne F, Fischl B, Quinn BT, Dickerson BC, Blacker D, *et al.* (2006): An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. *Neuroimage* 31:968–980.
28. Buckner RL, Head D, Parker J, Fotenos AF, Marcus D, Morris JC, Snyder AZ (2004): A unified approach for morphometric and functional data analysis in young, old, and demented adults using automated atlas-based head size normalization: Reliability and validation against manual measurement of total intracranial volume. *Neuroimage* 23:724–738.
29. Desikan RS, Cabral HJ, Hess CP, Dillon WP, Glastonbury CM, Weiner MW, *et al.* (2009): Automated MRI measures identify individuals with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain* 132:2048–2057.
30. Fjell AM, Walhovd KB, Westlye LT, Ostby Y, Tamnes CK, Jernigan TL, *et al.* (2010): When does brain aging accelerate? Dangers of quadratic fits in cross-sectional studies. *Neuroimage* 50:1376–1383.
31. Chetelat G, Villemagne VL, Bourgeat P, Pike KE, Jones G, Ames D, *et al.* (2010): Relationship between atrophy and beta-amyloid deposition in Alzheimer disease. *Ann Neurol* 67:317–324.
32. Tosun D, Mojabi P, Weiner MW, Schuff N (2010): Joint analysis of structural and perfusion MRI for cognitive assessment and classification of Alzheimer's disease and normal aging. *Neuroimage* 52:186–197.
33. Fjell AM, Walhovd KB, Fennema-Notestine C, McEvoy LK, Hagler DJ, Holland D, *et al.* (2010): Brain atrophy in healthy aging is related to CSF levels of Abeta1-42. *Cereb Cortex* 20:2069–2079.

ARTICLE IN PRESS

8 BIOL PSYCHIATRY 2011;xx:xxx

J. Fortea *et al.*

34. De Meyer G, Shapiro F, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Engelborghs S, De Deyn PP, *et al.* (2010): Diagnosis-independent Alzheimer disease biomarker signature in cognitively normal elderly people. *Arch Neurol* 67:949–956.
35. Fortea J, Lladó A, Bosch B, Antonell A, Oliva R, Molinuevo JL, Sánchez-Valle R (2011): Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease families with PSEN1 mutations [published online ahead of print January 5]. *Neurodegenerative Dis*.
36. West MJ, Bach G, Soderman A, Jensen JL (2009): Synaptic contact number and size in stratum radiatum CA1 of APP/PS1DeltaE9 transgenic mice. *Neurobiol Aging* 30:1756–1776.
37. Oh ES, Savonenko AV, King JF, Fangmark Tucker SM, Rudow GL, Xu G, *et al.* (2009): Amyloid precursor protein increases cortical neuron size in transgenic mice. *Neurobiol Aging* 30:1238–1244.
38. Maheswaran S, Barjat H, Rueckert D, Bate ST, Howlett DR, Tilling L, *et al.* (2009): Longitudinal regional brain volume changes quantified in normal aging and Alzheimer's APP x PS1 mice using MRI. *Brain Res* 1270:19–32.
39. Zetterberg H, Blennow K, Hanse E (2010): Amyloid beta and APP as biomarkers for Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 45:23–29.
40. Morris JC, Roe CM, Xiong C, Fagan AM, Goate AM, Holtzman DM, Mintun MA (2010): APOE predicts amyloid-beta but not tau Alzheimer pathology in cognitively normal aging. *Ann Neurol* 67:122–131.
41. Fagan AM, Mintun MA, Shah AR, Aldea P, Roe CM, Mach RH, *et al.* (2009): Cerebrospinal fluid tau and ptau(181) increase with cortical amyloid deposition in cognitively normal individuals: Implications for future clinical trials of Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 1:371–380.
42. Archer HA, Edison P, Brooks DJ, Barnes J, Frost C, Yeatman T, *et al.* (2006): Amyloid load and cerebral atrophy in Alzheimer's disease: An 11C-PIB positron emission tomography study. *Ann Neurol* 60:145–147.
43. Josephs KA, Whitwell JL, Ahmed Z, Shiung MM, Weigand SD, Knopman DS, *et al.* (2008): Beta-amyloid burden is not associated with rates of brain atrophy. *Ann Neurol* 63:204–212.
44. Fox NC, Black RS, Gilman S, Rossor MN, Griffith SG, Jenkins L, *et al.* (2005): Effects of Abeta immunization (AN1792) on MRI measures of cerebral volume in Alzheimer disease. *Neurology* 64:1563–1572.
45. Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, Bayer A, *et al.* (2008): Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: Follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* 372:216–223.

VIII. DISCUSIÓN

Esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio de la fase preclínica de la enfermedad de Alzheimer. Para ello hemos utilizado biomarcadores en líquido cefalorraquídeo (A β 1-42, tau y p-tau), una exhaustiva valoración neuropsicológica y análisis de resonancia magnética estructural en una cohorte de de Alzheimer familiar y en una cohorte de sujetos sanos cognitivamente indemnes. Los resultados obtenidos han conducido a una nueva caracterización del estado preclínico al inicio de la fase amiloidogénica (conformada por aquellos sujetos con valores transicionales de A β 1-42 en LCR) que se caracterizaría por un aumento del grosor cortical y del tamaño de las estructuras subcorticales. La interpretación de los hallazgos, que postulamos en base a la literatura científica, es que podrían ser secundarios al efecto tóxico de los oligómeros de A β y/o inflamación. En el trabajo de análisis de estructura cerebral en portadores asintomáticos la resonancia magnética aporta evidencias indirectas de esta interpretación.

Los resultados de la presente tesis, especialmente los más novedosos e inesperados corroboran la importancia de la enfermedad de Alzheimer familiar, pese a su rareza, como un magnífico modelo biológico para la enfermedad de Alzheimer esporádica. Como hipotetizamos en la introducción los resultados hallados en estos sujetos condicionaron de manera radical nuestra aproximación al estudio de los efectos que la alteración del β -amiloide tiene sobre la estructura cerebral y la cognición en el Alzheimer esporádico. Debido a este papel central que tienen los hallazgos encontrados en la cohorte de Alzheimer familiar es importante resaltar algunos aspectos de la propia muestra que ayudan a interpretar alguno de los resultados. En primer lugar, estos estudios se enmarcan dentro de un campo en el que existe muy poca literatura científica y que en ocasiones no es completamente concordante. Esta controversia podría deberse a las diferencias que pueden existir entre las diferentes mutaciones/familias o técnicas de estudio aplicadas. No obstante, el elemento más crucial a la hora de interpretar todos los resultados en el Alzheimer familiar estriba en la distancia con respecto al inicio de los síntomas, o lo que es lo mismo (o más bien aproximado), con la edad ajustada de los sujetos estudiados. Nuestra muestra de sujetos portadores asintomáticos estaba mucho más lejos del inicio teórico de los síntomas que las escasas series publicadas de análisis de biomarcadores en LCR o de estructura cerebral. En este sentido y en un contexto de cambios dinámicos en los biomarcadores durante la fase asintomática, los hallazgos dependerán dramáticamente de la edad ajustada y, por lo tanto, es posible que parte de los resultados no sean contradictorios con la literatura sino que puedan incluso complementarse.

I. Análisis de biomarcadores de LCR en la enfermedad de Alzheimer preclínica

El análisis de los biomarcadores de LCR constituye el objetivo principal de dos de los trabajos de la presente tesis, uno en la cohorte de Alzheimer familiar y otro en la cohorte de sujetos cognitivamente indemnes. El trabajo de marcadores bioquímicos en Alzheimer familiar estudió las concentraciones de los marcadores en LCR de los sujetos pertenecientes a familias

con mutaciones en el gen de PSEN1. Los resultados más importantes de este trabajo fueron el hallazgo de una correlación negativa entre los niveles de A β 1-42 en LCR y la edad ajustada hasta alcanzar niveles suelo en los sujetos ya sintomáticos y la observación de que los niveles de t-tau sólo se encontraron elevados en portadores sintomáticos y correlacionaban con la severidad clínica. El trabajo de marcadores bioquímicos en sujetos cognitivamente indemnes mostró que en torno a un 45% de los sujetos de la cohorte presentaban niveles patológicos de al menos uno de los biomarcadores para la EA en LCR, se pudieron distinguir diferentes patrones de alteración de biomarcadores en LCR y se vio que el porcentaje de personas con alguna alteración se incrementaba con la edad.

Estos trabajos globalmente considerados concuerdan con los hallazgos descritos y predichos por el modelo de Jack et al. (Jack, Knopman et al. 2010) en el sentido de que la alteración de los biomarcadores bioquímicos antecede el deterioro cognitivo y que, a su vez, están también temporalmente ordenados, con los cambios en los niveles de A β 1-42 precediendo los cambios en tau y p-tau. La idea de que el efecto techo para los diferentes biomarcadores se alcanza en tiempos diferentes también es apoyada por nuestros datos. Los niveles de A β 1-42 alcanzarían una fase asintótica o suelo en los portadores sintomáticos mientras que tau sigue aumentando sus niveles en la fase sintomática. La correlación t-tau con las escalas clínicas globales que ha sido señalada, no había sido estudiada en los estudios previos de portadores de mutaciones de PSEN1, pero es congruente con la evidencia publicada en EA esporádica que también demuestra fuertes correlaciones entre t-tau y el deterioro cognitivo (Hampel, Blennow et al. 2010).

Los 4 perfiles de LCR encontrados en los sujetos cognitivamente indemnes apoyan esta misma idea. La alteración aislada de A β 1-42 constituye la mayor proporción de las alteraciones en nuestra muestra a diferencia de la “huella bioquímica” definida para la EA con demencia y que se caracteriza por alteraciones tanto en A β 1-42 como t-tau y p-tau. Esto sugiere que cuando los 2 biomarcadores están alterados es menos probable permanecer asintomático. La misma aproximación con la definición de los 4 perfiles de LCR ha sido recientemente aplicada para predecir la conversión a demencia en una muestra de DCL. En este trabajo encontraron que las alteraciones en A β 1-42, pero no en tau, eran las que predecían una progresión de la enfermedad (Okonkwo, Mielke et al. 2011).

El resultado más novedoso e importante del análisis de biomarcadores en LCR, no obstante, se deriva fundamentalmente del análisis del comportamiento de los niveles de A β 1-42 con respecto a la edad ajustada en portadores asintomáticos. Aunque nuestros datos apoyan que los niveles de A β 1-42 permanecen dentro del rango de normalidad hasta la última década de la fase asintomática, la correlación encontrada entre la edad ajustada y los niveles de A β 1-42 sugiere un depósito progresivo en el cerebro en forma de placas de amiloide (Fagan, Mintun et al. 2006; Grimmer, Riemenschneider et al. 2009; Tapiola, Alafuzoff et al. 2009) que podría incluso comenzar antes de que se alcancen niveles patológicos en LCR.

La existencia de un descenso lento y progresivo de los niveles de A β 1-42 en la fase asintomática de la enfermedad es apoyada por los hallazgos en animales transgénicos (Gotz, Chen et al. 2001), estudios longitudinales de envejecimiento (Gustafson, Skoog et al. 2007; Stomrud, Hansson et al. 2007; Visser, Verhey et al. 2009) y, como ha sido discutido en el trabajo de análisis de LCR en portadores de mutaciones de PSEN1, por los datos de Moonis et al. (Moonis, Swearer et al. 2005) y Ringman et al. (Ringman, Younkin et al. 2008). La duración de esta fase es un tema que no está establecido y que es objeto de controversia. Las alteraciones de A β 1-42 pueden anteceder al diagnóstico clínico hasta dos décadas (Jack, Lowe et al. 2009). La correlación de los niveles de A β 1-42 y la edad ajustada en portadores asintomáticos encontrada con sujetos con valores considerados normales (>500pg/ml) junto con los resultados de un engrosamiento cortical encontrado en los sujetos con valores transicionales de A β 1-42 aumentaría más si cabe la ventana terapéutica en la que se podrían ensayar fármacos/estrategias antiamiloidogénicas antes de que la cascada patológica de la EA involucre otras vías patológicas de la EA como tau, lo que, asimismo, favorece la idea de distinguir perfiles en las alteraciones encontradas en el LCR.

Desde un punto de vista mecanístico los hallazgos de una relación lineal en portadores asintomáticos y el efecto suelo encontrado en portadores sintomáticos para A β 1-42 subraya la complejidad del comportamiento de los biomarcadores (y la relación entre ellos) a lo largo del *continuum* de la enfermedad. Aspecto éste en el que abundaremos más adelante.

II. Asociación de las alteraciones en biomarcadores bioquímicos en LCR y los resultados de los test neuropsicológicos

Pese a que todos los trabajos de la presente tesis son transversales y por lo tanto, las implicaciones sobre el pronóstico de los pacientes han de interpretarse con suma cautela, la idea de que la larga fase asintomática en la que los niveles de A β 1-42 descienden lentamente es en sí misma deletérea para la función cognitiva y preludia el deterioro cognitivo y la demencia es apoyada por nuestros datos. La evidencia más importante de este efecto deletéreo proviene del estudio de las asociaciones entre los biomarcadores en LCR y la memoria en el *continuum* de la EA. En dicho estudio se encontró que el rendimiento en la memoria episódica se relaciona primero con los niveles de A β 1-42 y después con t-tau o p-tau para devenir independiente de los niveles de los biomarcadores en la fase de demencia.

La asociación encontrada entre la memoria episódica y los niveles de A β 1-42 en la fase asintomática tiene como veremos importantes implicaciones en el modelo dinámico de biomarcadores de la EA ya que supondría un comienzo de las alteraciones neuropsicológicas mucho más precoz que el postulado por Jack et al. (Jack, Knopman et al. 2010). Esta disfunción muy precoz de la cognición en la EA, como vimos en la introducción, es apoyada por grandes cohortes longitudinales en Alzheimer familiar (Acosta-Baena, Sepulveda-Falla et al. 2011) y

esporádico (Amieva, Le Goff et al. 2008) que mostraron alteraciones neuropsicológicas más de una década antes de un diagnóstico clínico de demencia.

Como se señaló en la introducción la relación entre la cognición y el amiloide está poco estudiada, pero es sustentada por los estudios longitudinales que muestran que los sujetos con un descenso en los niveles de A β 1-42 o incremento en PET-PIB presentan una progresión cognitiva y mayor riesgo de conversión a demencia (Fagan, Roe et al. 2007; Morris, Roe et al. 2009; Chetelat, Villemagne et al. 2011; Villemagne, Pike et al. 2011). En este mismo sentido de encontrar una relación entre la cognición y biomarcadores muy tempranos en la EA queremos subrayar dos trabajos con resonancia magnética (uno con un análisis de grosor cortical y otro con un análisis de la difusividad media en el hipocampo) que abundan en la temporalidad sugerida y que enlazan con alguno de los hallazgos más novedosos y contraintuitivos presentados en la presente tesis. En el primero de ellos Espeseth et al. mostraron que los portadores del alelo ϵ 4 del ApoE presentaban un engrosamiento cortical en diversas áreas que incluían nodos críticos de sistemas atencionales y que dicho engrosamiento modulaba la atención selectiva ya que los portadores presentaban menores amplitudes en los *event-related potentials* (ERPs) y menor grado de acierto en la tarea (Espeseth, Westlye et al. 2010). En el segundo trabajo realizado en ancianos sanos se mostró que los cambios en la MD en el hipocampo, pero no la FA hipocampal ni el volumen hipocampal o cerebral total correlacionaba con el rendimiento de la memoria verbal y visuoespacial (Carlesimo, Cherubini et al. 2010).

El hecho de que la referida correlación entre la memoria episódica y los niveles de A β 1-42 se encontrara fundamentalmente en el grupo con quejas subjetivas de memoria convierte a este subgrupo de sujetos en un foco de interés creciente para el estudio de la fase asintomática. En este sentido, aunque el estudio que analizaba los perfiles de biomarcadores en LCR no estaba diseñado ni potenciado para ello, es significativo señalar que los 2 únicos sujetos que presentaron déficits objetivos en la memoria episódica en el seguimiento tenían ambos tanto quejas subjetivas de memoria como todos los biomarcadores alterados en el trabajo que analizaba. Ambos resultados, por otra parte concuerdan perfectamente con los referidos resultados en el ADNI australiano que mostraron una relación entre el amiloide y la estructura cerebral sólo en los sujetos con QSM (Chetelat, Villemagne et al. 2010).

III. Análisis de la estructura cerebral en la fase asintomática de la enfermedad de Alzheimer preclínica

El análisis de la estructura cerebral en la fase asintomática de la EA constituye el objetivo principal de otros dos de los trabajos de la presente tesis. Uno en la cohorte de Alzheimer familiar y otro en la cohorte de sujetos cognitivamente indemnes. Estos estudios abordan

un aspecto controvertido de la EA preclínica: la propia existencia de una relación entre los niveles de A β 1-42 y las estructura cerebral. De hecho, las alteraciones estructurales en el modelo de Jack et al. se sitúan más avanzado el proceso fisiopatológico (Jack, Knopman et al. 2010), pese a que los autores del modelo ya apuntaban una posible relación entre la atrofia y el descenso de A β 1-42, relación que como hemos apuntado en la introducción.

El trabajo de estructura en Alzheimer familiar mostró como hallazgo más importante e inesperado la descripción de un incremento del grosor cortical y del tamaño de las estructuras subcorticales en los portadores asintomáticos que se encontraban de mediana a unos 10 años del inicio teórico de los síntomas. Dicho incremento del grosor cortical se encontró en el precuneus y áreas de asociación temporoparietales, áreas que conforman la “huella de la EA” y que en el mismo trabajo demostramos que estaban adelgazadas en los portadores sintomáticos. El trabajo de estructura en sujetos cognitivamente indemnes estudió la relación entre los niveles bioquímicos de A β 1-42 en LCR y el grosor del manto cortical. El hallazgo más importante de este trabajo lo constituyó la evidencia de una relación cuadrática entre los valores de A β 1-42 y el grosor cortical de áreas susceptibles de la enfermedad de Alzheimer debida a una fase transicional en cuanto a los niveles de A β 1-42 que se acompaña de un incremento de grosor cortical.

Pese a la novedad y carácter aparentemente contraintuitivo de estos hallazgos, existen datos en la literatura que los sustentan. En concreto existen estudios morfométricos en humanos, datos anatomopatológicos y estudios en modelos animales que han sido extensamente discutidos en los trabajos de la presente tesis. Sin embargo queremos subrayar algunos hallazgos y algunas interpretaciones divergentes entre nuestros trabajos y los reseñados.

En primer lugar y con respecto a los estudios morfométricos en humanos, creemos que el hallazgo de un aumento de grosor cortical de portadores del alelo ϵ 4 de apoE (Espeseth, Westlye et al. 2008; Espeseth, Westlye et al. 2010), así como en sujetos asintomáticos con una positividad en el PET-PIB (Chetelat, Villemagne et al. 2010) apoya y da plausibilidad a nuestros datos. Sin embargo la interpretación fue diferente y subrayaban el papel de la reserva cognitiva u otros procesos compensadores/protectores. Nuestra interpretación, sin embargo, es que dicho incremento del grosor cortical es una consecuencia directa e inicial de las alteraciones en el metabolismo del β -amiloide. Para ello nos basamos en 3 observaciones. Por un lado, la relación cuadrática encontrada entre los niveles de A β 1-42 y los valores de grosor cortical sugieren una relación directa entre los valores de grosor cortical y de A β 1-42. Por otro lado, el hecho de que los sujetos con valores transicionales de A β 1-42 (con el grosor cortical aumentado) tuvieran una menor reserva cognitiva (al contrario de lo que sucedía en el trabajo de Chetelat et al. (Chetelat, Villemagne et al. 2010)) tampoco favorece dicha interpretación. Por último, los resultados en Alzheimer familiar (con la demostración de anomalías microestructurales) y en animales transgénicos sugieren que la teoría de la

reserva cognitiva no puede ser la única explicación, si bien aquí no se puede descartar que los hallazgos sean congénitos.

En segundo lugar, los estudios anatomopatológicos en sujetos cognitivamente indemnes y los modelos de animales transgénicos discutidos son cruciales tanto para entender los resultados como en la dinámica de evolución de biomarcadores propuesta en la presente tesis. Así los hallazgos anatomopatológicos muestran que los sujetos cognitivamente indemnes, pero con anatomía patológica de EA, se encuentra una hipertrofia de las neuronas corticales e hipocámpales mucho antes del inicio teórico de los síntomas (Riudavets, Iacono et al. 2007; Iacono, O'Brien et al. 2008). Los modelos animales han mostrado un fenómeno similar: hipertrofia neuronal y aumento de los contactos sinápticos en ratones transgénicos ABPP/PS1DeltaE9 (Oh, Savonenko et al. 2009; West, Bach et al. 2009). Por otra parte, es interesante señalar que estudios seriados con resonancia magnética encontraron un aumento en el tamaño de estructuras cerebrales en animales transgénicos con respecto a los *wild type* (Zanjani, Finch et al. 2005). Estos hallazgos se interpretaron como consecuencia de la carga de A β y la respuesta inflamatoria asociada (astrogliosis y la activación de la microglía). En este sentido, en seres humanos, la inflamación también está presente desde fases muy tempranas de la enfermedad y hay evidencia de una activación del complemento en las placas de amiloide de sujetos no dementes que cumplen criterios patológicos para la EA (Zanjani, Finch et al. 2005).

El trabajo en portadores de PSEN1 aporta una evidencia indirecta de todos estos procesos subyacentes. En concreto, tal y como ha sido discutido en el trabajo, realizamos un análisis de la difusividad media (MD) en el córtex, que es uno de los índices que se pueden obtener en el análisis de las secuencias potenciadas en difusión. La dirección bifásica de los cambios en la MD (con reducciones en portadores asintomáticos y aumentos en los portadores sintomáticos) es la que sería esperable en función de los cambios predichos en el peso relativo del componente intracelular (vs extracelular) debido a los mencionados cambios anatomopatológicos e inflamatorios. En esencia, un aumento de barreras (membranas y organelas) en AMC que restringiría la difusión y una destrucción de las mismas en SMC que facilitaría la difusión de las moléculas de agua.

Por todo ello, y pese a que el análisis de la difusividad media (MD) restringido al análisis de la estructura de la corteza cerebral no ha sido muy aplicado en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas, nuestro trabajo profundiza en un reciente resurgir del interés en su aplicación en el estudio de las mismas (Carlesimo, Cherubini et al. 2010; Whitwell, Avula et al. 2010). La MD, de este modo, podría ser una herramienta muy sensible para detectar alteraciones que podrían incluso anteceder a los cambios estructurales volumétricos (Carlesimo, Cherubini et al. 2010). Por lo tanto otra de las conclusiones de nuestro trabajo es el sustentar el uso de la MD como un biomarcador sensible en la EA preclínica, aunque es probable que sea altamente inespecífico.

IV. Contextualización de los hallazgos dentro del modelo dinámico de biomarcadores de la EA

Como apuntamos en la introducción, el marco conceptual del que partimos a la hora de contextualizar nuestros resultados es el derivado de la nomenclatura que utilizamos en la presente tesis es la propuesta por Dubois et al. en su nuevo léxico para la EA (Dubois, Feldman et al. 2010) y el modelo sobre el que analizamos nuestros resultados es el propuesto por Jack et al. (Jack, Knopman et al. 2010) y que fue adaptado en la figura 1 de la introducción. Nuestros trabajos centrados en la EA preclínica han analizado los biomarcadores en LCR, la estructura cerebral mediante RM y el rendimiento neuropsicológico. El modelo del que partimos defiende que las alteraciones en el metabolismo del β -amiloide (descenso de $A\beta$ 1-42 o positividad en el PET-PIB) constituyen el fenómeno inicial que antecede (y posiblemente desencadena) todos los eventos subsiguientes. Posteriormente se alterarían los marcadores de neurodegeneración como un incremento de los niveles de t-tau y p-tau así como atrofia en la RM. Finalmente se alterarían los marcadores de test neuropsicológicos y, eventualmente, al alcanzar un nivel de daño cerebral, se llegaría a una alteración de las escalas clínicas y demencia.

Como se ha discutido, una parte de los resultados, como el papel inicial (y probablemente desencadenante) de la alteración en el metabolismo del β -amiloide, encaja perfectamente con el modelo propuesto. Otra parte de los resultados como la relación entre los niveles de $A\beta$ 1-42 y el rendimiento neuropsicológico (cuando el rendimiento se sitúa dentro del rango de la normalidad) se podrían situar en una zona en la que no hay un consenso claro o evidencia firmemente establecida y que el modelo de Jack no aborda directamente. Por último, otra parte de los mismos, como el aumento del grosor cortical en etapas preclínicas tempranas, no encaja fácilmente en el modelo. Sin embargo, tal y como hemos señalado en las respectivas discusiones de los trabajos, creemos que incluso los hallazgos aparentemente más inesperados podrían encontrar acomodo en el modelo.

Los propios autores del modelo realizaban algunas consideraciones y apuntaban algunas limitaciones que resultan cruciales a la hora de interpretar nuestros resultados. En primer lugar, subrayaban que el modelo propuesto era precisamente un modelo de las diferentes fases de la enfermedad que podían medirse con los biomarcadores más validados en el momento actual y no un modelo comprehensivo de todos los procesos patológicos involucrados en la enfermedad de Alzheimer. El objetivo que se marcaban era ofrecer un marco teórico común que sugiriera una serie de hipótesis contrastables de la que podía derivarse una imagen más clara de las trayectorias tiempo-dependientes de los biomarcadores de la EA. En segundo lugar, la representación de la evolución tem-

poral de los diferentes biomarcadores es representada mediante una curva sigmoidea, no porque haya evidencia de que ese sea su curso temporal sino porque hay evidencia de que el curso de los biomarcadores no es lineal a lo largo de la enfermedad, pero este no se puede definir de forma concluyente en el momento actual. En tercer lugar, el modelo no contempla algunos aspectos importantes de la enfermedad entre los que destacan el papel tóxico de los oligómeros de A β o la inflamación. Esto se debe a que no existen biomarcadores para las formas solubles y tóxicas de los oligómeros de A β ni biomarcadores de imagen para los mismos ni para las placas difusas por un lado ni tampoco biomarcadores validados para la activación glial. Asimismo señalaban zonas de controversia como la relación entre la estructura cerebral y el β -amiloide y apuntaban algunos aspectos que no eran explicables, como la captación de glucosa anómala en portadores asintomáticos del alelo ϵ 4 de apoE en las edades medias de la vida.

El modelo que proponemos en la presente tesis presenta algunas modificaciones con respecto al modelo descrito. Para ello, a la hora de integrar nuestros datos dentro de un modelo general dinámico de eventos partimos, en primer lugar, de la distinción entre biomarcadores fisiopatológicos, que reflejarían los eventos etiológicos de la EA, y topográficos, que serían su consecuencia (Dubois, Feldman et al. 2010). Como biomarcadores fisiopatológicos hemos utilizado los niveles de A β 1-42 por una parte y de t-tau y p-tau por otra. Como hemos señalado, nuestros resultados, en los que las alteraciones en A β 1-42 anteceden a los cambios de t-tau y p-tau, encajan perfectamente con el modelo de Jack et al. Por lo tanto, y en base a ello, distinguimos inicialmente 2 fases en la EA preclínica en función del proceso fisiopatológico dominante: una de depósito de β -amiloide (*β -deposition*) y otra en la que el evento central sería el aumento de tau (*tau-driven*). Posteriormente analizamos el comportamiento de los biomarcadores topográficos y el rendimiento neuropsicológico (“la consecuencia”) en función de la etapas fisiopatológica en que nos encontremos. No obstante, el hallazgo de un aumento del grosor cortical al inicio de la fase amiloidogénica (valores transicionales de A β 1-42) o incluso antes (los portadores asintomáticos de mutaciones de PSEN1 más lejanos del inicio teórico), nos condujeron a postular una fase fisiopatológica previa (ya predicha en el modelo de Jack et al.) que estaría dominada por el efecto tóxico de los oligómeros de A β y/o procesos inflamatorios y que hemos venido en denominar *β -inflamatoria (β -inflammatory)*.

Todos los resultados se pueden analizar, por tanto, desde la perspectiva de cómo se comportan los biomarcadores topográficos (el rendimiento neuropsicológico y la estructura cerebral) en función de las diferentes fases fisiopatológicas definidas a partir de los biomarcadores fisiopatológicos. El modelo resultante se sintetiza en la figura 2.

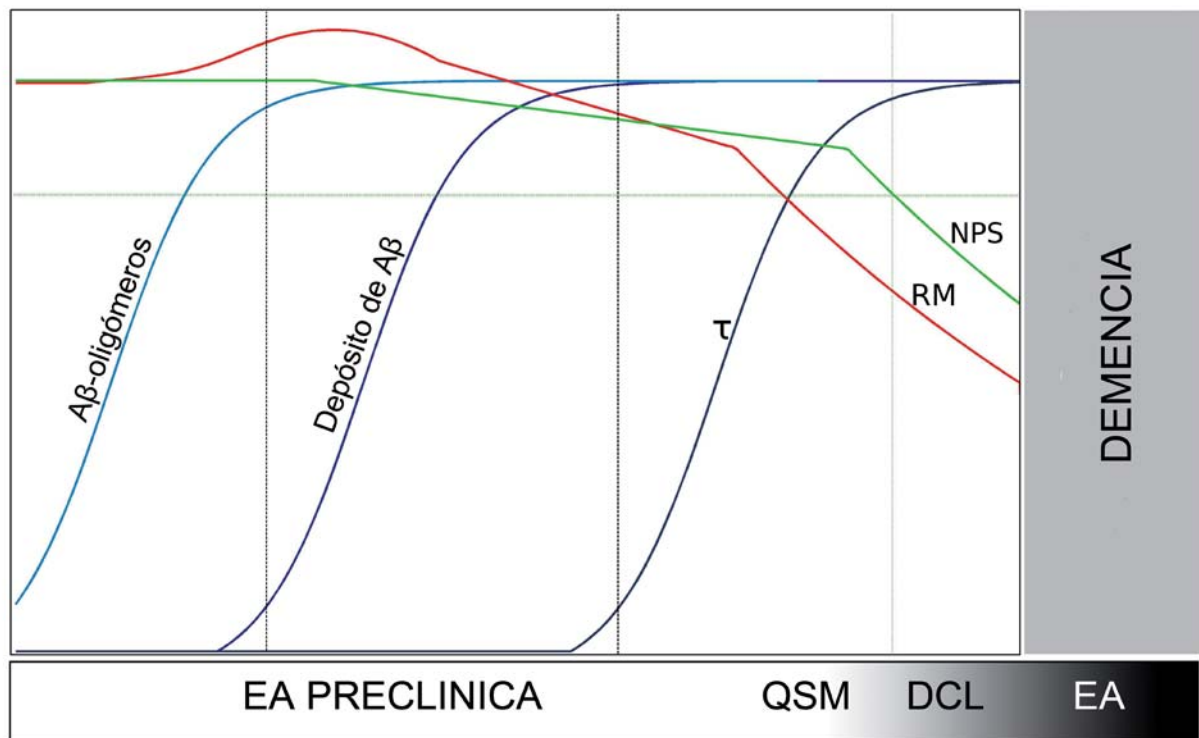


FIGURA 1. Modelo hipotético de la temporalidad de las alteraciones en los biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer (adaptado de Jack et al. (Jack, Knopman et al. 2010)).

La relación entre el rendimiento neuropsicológico y las diferentes fases fisiopatológicas queda reflejada en las diferentes asociaciones entre los biomarcadores de LCR y los test de memoria episódica a lo largo del *continuum* de la EA. El descenso de Aβ 1-42 que antecede a la alteración en t-tau o p-tau tiene efectos deletéreos en rendimiento cognitivo (al menos en el subgrupo de sujetos con quejas subjetivas de memoria y en portadores asintomáticos de PSEN1), como demuestra la correlación entre los niveles de Aβ y los sujetos con quejas subjetivas de memoria. El descenso que se observa en el rendimiento neuropsicológico en la gráfica al final de la fase de depósito de β-amiloide pretende reflejar este hecho. No obstante, la alteración de tau es el evento dominante en las fases sintomáticas tempranas y queda reflejado en un punto de inflexión y descenso más marcado de los test de memoria episódica como reflejo de la correlación encontrada en los sujetos con DCL en el mismo trabajo. De forma congruente con un modelo en el que las relaciones no son lineales, incluso la correlación entre tau y la memoria episódica se acaba perdiendo en las fases demenciales de la enfermedad. En nuestro modelo, por lo tanto, los cambios en el rendimiento neuropsicológico (pero todavía dentro de los “límites de la normalidad”) comenzarían muy precozmente y desde luego mucho antes del inicio de las alteraciones neuropsicológicas (ya fuera de los “límites de la normalidad”) postulado en el modelo de Jack et al. La evidencia científica

que apoya esta conclusión ha sido previamente comentada (Amieva, Le Goff et al. 2008; Storandt, Mintun et al. 2009; Carlesimo, Cherubini et al. 2010; Espeseth, Westlye et al. 2010; Acosta-Baena, Sepulveda-Falla et al. 2011).

La relación entre la estructura cerebral y las diferentes fases fisiopatológicas, y en concreto y sobre todo, el hallazgo de un engrosamiento cortical en la fase presintomática de la EA son los más problemáticos de encajar en el modelo. Sin embargo, como hemos discutido en los trabajos, pensamos que nuestros resultados no son contradictorios sino que complementan la literatura existente. En primer lugar, porque los análisis habituales de asociación entre la estructura cerebral y los niveles de A β 1-42 (dicotomizando la muestra en sujetos A β positivos o como A β negativos) muestran una atrofia cerebral en los sujetos con niveles patológicos de A β 1-42 (<500 pg/ml), especialmente en los sujetos con quejas subjetivas de memoria. Este último resultado sugiere que la atrofia se encuentra sobre todo en las postrimerías de la fase de depósito de β -amiloide y encaja perfectamente con los hallazgos del Alzheimer Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) australiano que encontraron una relación entre la captación cortical en el PET-PIB y la estructura cerebral sólo en los sujetos con QSM (Chetelat, Villemagne et al. 2010).

El hallazgo de un engrosamiento cortical (y aumento de tamaño de las estructuras subcorticales) sólo emerge con una nueva aproximación, con la definición de niveles transicionales de A β 1-42. De esta manera, nuestros hallazgos no se deben a particularidades de la muestra (como atestiguan los resultados obtenidos de la dicotomización de la muestra) y podrían enmarcarse en dicho modelo dinámico si los situamos en una etapa previa a las descritas, en el comienzo mismo de la fase amiloidogénica, o incluso, en una anterior producida por los efectos tóxicos de los oligómeros de β -amiloide o placas difusas. Pensamos que esta aproximación tiene sentido ya que ha de haber necesariamente una etapa transicional en el descenso de los valores de A β 1-42. Nuestros hallazgos en el análisis de LCR en el Alzheimer familiar sugieren que esta fase asintomática de descenso puede ser larga y como vemos tener muchas implicaciones biológicas.

Por lo tanto, subrayamos una vez más que nuestro trabajo no contradice el modelo ni los hallazgos de atrofia cerebral en portadores de mutaciones de PSEN1 o líquido patológico descritos hasta la fecha. De hecho resulta atractivo pensar que nuestra aproximación pueda incluso explicar parte de los resultados contradictorios en la literatura. Al postular que el inicio de la fase de depósito de β -amiloide se acompaña de un incremento en el grosor cortical, pero que el final de esa misma fase estaría ya marcado por la atrofia, nuestra hipótesis es que ambos efectos se pueden anular y el resultado encontrado en un análisis que no tenga esto en cuenta será muestra dependiente como sucedió con nuestro inesperado resultado en Alzheimer familiar o el incremento de grosor cortical encontrado por Chetelat et al. (Chetelat, Villemagne et al. 2010).

Nuestro grupo demostró que ya desde el inicio de la fase sintomática, en la fase de DCL, la estructura cerebral no muestra una asociación con los niveles de A β 1-42 y se correlaciona con los niveles de t-tau y p-tau. De esta manera se refuerza la idea de que los síntomas cognitivos se asocian a las alteraciones estructurales que expusimos en la introducción. Como hemos visto tanto la estructura cerebral como el rendimiento neuropsicológico tienen diferentes asociaciones con los biomarcadores fisiopatológicos en los diferentes estadios, lo que refuerza la idea de separar etapas fisiopatológicas y analizar el comportamiento de los biomarcadores topográficos/clínicos en función de ellas.

V. Implicaciones y limitaciones de los hallazgos dentro del campo de la EA preclínica

Esta tesis tiene varias implicaciones potenciales. En primer lugar apoyan la idea de que la alteración del metabolismo del amiloide desde fases muy iniciales se acompaña de cambios estructurales y cognitivos, sugiriendo un efecto deletéreo desde fases tempranas. Todo ello apoyaría que estos sujetos (o al menos un porcentaje significativo), definidos como “asintomáticos a riesgo” en la nueva nomenclatura (Dubois, Feldman et al. 2010), están realmente en una fase preclínica de la enfermedad. Esta idea es apoyada tanto por los estudios epidemiológicos que muestran una anticipación de unos 10 años entre la prevalencia de EA en las series anatomo-patológicas de sujetos sanos y la propia prevalencia de la EA clínica (Perrin, Fagan et al. 2009). Esta temporalidad es sorprendentemente similar al inicio de las alteraciones neuropsicológicas descritas en las series longitudinales (Amieva, Le Goff et al. 2008). La patogenicidad de las alteraciones bioquímicas en los sujetos cognitivamente indemnes es también apoyada por trabajos longitudinales prospectivos. Por una parte, se ha visto que los sujetos asintomáticos a riesgo progresan cognitivamente (Fagan, Roe et al. 2007; Morris, Roe et al. 2009; Visser, Verhey et al. 2009; Villemagne, Pike et al. 2011). Por otra, también se ha visto que los sujetos con alteraciones bioquímicas en el LCR presentan una atrofia cerebral en los estudios longitudinales (Fjell, Walhovd et al. 2010; Schott, Bartlett et al. 2010). No obstante, hemos de señalar una vez más que esta cuestión sólo podrá dilucidarse completamente con estudios prospectivos longitudinales de larga duración.

Una segunda implicación importante concierne el importante esfuerzo existente de investigación en biomarcadores de imagen de los cambios patológicos tempranos en la EA. Nuestros datos sugieren que el comportamiento de los biomarcadores durante la EA preclínica podría ser más complejo de lo inicialmente previsto debido al comportamiento bifásico que presentan. Como se ha comentado, este hecho podría ayudar a clarificar algunos de los datos contradictorios de la literatura durante la EA preclínica. Hemos encontrado un comportamiento bifásico en dos de los biomarcadores estudiados, el grosor cortical y la disfusividad media. No obstante, pensamos que podría ser un comportamiento que pudiera ser encontrado en otros biomarcadores. En este sentido, y dado que las alteraciones patogénicas de PSEN1 que

conducen a la EA se relacionan con un exceso de producción de β -amiloide o un incremento selectivo de A β 1-42 (Citron, Oltersdorf et al. 1992; Suzuki, Cheung et al. 1994), un incremento en los niveles de A β 1-42 también podría ser esperado y ha sido encontrado en ratones transgénicos (Liu, Herukka et al. 2004). Este hecho sin duda aumentaría la complejidad de la relación estudiada. Si embargo, en nuestra población de portadores asintomáticos no encontramos dicho aumento, pese a que si ha sido encontrado en modelos animales y celulares (Citron, Westaway et al. 1997).

Una tercera implicación deriva de la larga fase de descenso de A β 1-42 hasta alcanzar los valores patológicos, ya que abriría una prolongada ventana terapéutica para la intervención antes no sólo de que se produzcan los síntomas cognitivos sino potencialmente incluso antes de que se desencadenen otras vías patogénicas de la enfermedad. Otro aspecto relevante de los trabajos relacionado con la anterior es la precocidad con la que se pueden encontrar alteraciones estructurales. Los sujetos asintomáticos portadores de mutaciones de PSEN1 presentaban un engrosamiento cortical hasta 20 años antes del inicio de los síntomas y este mismo engrosamiento es encontrado en sujetos con niveles transicionales de A β 1-42, biomarcador considerado hasta la fecha como el que sufre las alteraciones más precozmente. La sorprendente similitud entre la temporalidad de los cambios descritos en la enfermedad de Alzheimer familiar y esporádica es reforzada por el hallazgo de un engrosamiento cortical, descrito en la literatura, en portadores del alelo ϵ 4 del ApoE en la quinta década de la vida, una edad en la que no es esperable un depósito significativo de β -amiloide fibrilar (Morris, Roe et al. 2010). Pese a que la presente tesis no aporta evidencia experimental alguna, esta precocidad acerca la secuencia de cambios esperables a la observación explícitamente señalada por Jack et al. como no explicable en su modelo, esto es una alteración en el metabolismo de la glucosa en portadores del alelo ϵ 4 del ApoE en edades medias de la vida.

Otro aspecto sobre el que es tentador especular es el origen de las discrepancias que existen entre el efecto protector para el desarrollo de una EA observado en estudios epidemiológicos entre los consumidores de AINES en edades medias de la vida, por un lado (Vlad, Miller et al. 2008), y la falta de eficacia en todos los ensayos clínicos con AINEs en sujetos con EA llevados a cabo hasta la fecha por otro (Szekely and Zandi 2010). Si bien no tenemos evidencia experimental alguna, esto podría deberse a que es en las edades medias de la vida (quinta década) donde podría estar más activa esta fase β -inflamatoria, con los consiguientes reducciones en el metabolismo de glucosa detectables en el FDG-PET y aumentos de grosor cortical (Espeseth, Westlye et al. 2010). Posteriormente otros mecanismos fisiopatológicos vendrían centrales y perderíamos la ventana terapéutica para las terapias antiinflamatorias. La analogía con las explicaciones dadas para justificar el fracaso de algunos ensayos clínicos antiamiloidogénicos en sujetos con EA es evidente. Todo ello, por lo tanto, subraya la importancia de establecer el momento de la cronopatología en que nos encontremos a la hora de

analizar los resultados de las diferentes terapias modificadoras del curso de la enfermedad (Fox, Black et al. 2005; Holmes, Boche et al. 2008; Lemere and Masliah 2010).

El perfil temporal, y en concreto la precocidad de las alteraciones en el metabolismo del amiloide y sus repercusiones en la estructura cerebral, que proponemos es sin duda sorprendente (y preocupante). Sin embargo, en la conceptualización de la EA preclínica que nace de los estudios anatomopatológicos, la temporalidad de los cambios es similar. En este sentido, en series autópsicas con sujetos sanos de todas las edades, se ha sugerido que los cambios neurofibrilares en fases de Braak I-II (entorrinales) podrían incluso empezar antes, en la cuarta década de la vida (Braak and Braak 1997), y anteceder el depósito isocortical de β -amiloide. Sin embargo, hemos de señalar que, nuestro modelo, basado en el de Jack et al., también parte de la hipótesis de la cascada del β -amiloide, y, por tanto, defiende que la alteración en el metabolismo del β -amiloide es el mecanismo inicial y desencadenante.

Las limitaciones de los trabajos han sido expuestas detalladamente en cada uno de ellos. Sin embargo queremos dejar constancia de nuevo de las dos principales limitaciones que son comunes a todos los estudios de la presente tesis: el relativamente pequeño tamaño muestral (especialmente en los trabajos de Alzheimer familiar) y la ausencia de un seguimiento longitudinal de los sujetos que será esencial para establecer las relaciones descritas. Otra limitación reseñada a la hora de interpretar nuestros resultados es la ausencia de estudios con PET-PIB que permitirían no sólo relacionar los cambios estructurales con medidas escalares como son la edad relativa o los valores de A β 1-42 en LCR, sino que permitiría estudiar los cambios locales de grosor cortical con el depósito local de amiloide. Si bien hay que tener en cuenta que, como ha sido discutido, el descenso de A β 1-42 puede anteceder a la positividad en el PET-PIB (Fagan, Mintun et al. 2009).

Nuestro modelo está basado en el de Jack et al. (Jack, Knopman et al. 2010), por lo que todas las consideraciones que sobre la inexactitud de la representación de la evolución temporal de los procesos fisiopatológicos primarios (el descenso de A β 1-42, el aumento de tau y de los oligómeros de A β) hicieran Jack et al. son aplicables al nuestro, al no haber sido modificados. Por otra parte, al igual que el modelo de referencia, nuestro modelo obvia la probable interacción entre las dos vías fisiopatológicas, la amiloidogénica y tau. En este sentido se ha propuesto un modelo alternativo de causalidad de doble vía, “dual pathway”, que modificaría la hipótesis de la cascada del amiloide, y en el que el amiloide y tau estarían unidos por un mecanismo desencadenante previo anterior (Small and Duff 2008). De confirmarse, tendría importantes implicaciones en la secuencia de eventos que concurren en la fase preclínica de la EA.

IX. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES:

1. En portadores de una mutación en PSEN1 los niveles de A β 1-42 en LCR disminuyen durante la fase asintomática a medida que nos acercamos a la edad de inicio teórica de la sintomatología y se encuentran reducidos y estables desde la aparición de los primeros síntomas lo que sugiere un efecto suelo temprano. Los niveles de t-tau y p-tau en LCR, por el contrario, se encuentran elevados sólo en los sujetos sintomáticos y se correlacionan positivamente con la severidad clínica.
2. En estadios preclínicos tempranos el grosor cortical aumenta en sujetos portadores de una mutación en PSEN1 en áreas diana de la enfermedad de Alzheimer y se encuentra disminuido desde los primeros síntomas de la enfermedad. La alteración concurrente de la difusividad media en estas mismas áreas sugiere cambios microestructurales subyacentes. Estos hallazgos se podrían justificar por una hipertrofia neuronal reactiva y/o inflamación.
3. La presencia de al menos un biomarcador alterado en LCR afecta a un 45% de sujetos cognitivamente indemnes sobre todo debido a una alteración en A β 1-42 y al subgrupo de sujetos de más edad. La alteración de t-tau o p-tau concurrentemente al descenso de A β 1-42 preluiría una progresión cognitiva más precoz.
4. Los niveles de biomarcadores en LCR se asocian con el rendimiento de memoria episódica a lo largo del *continuum* de la EA. Dicha asociación es diferente para cada biomarcador según el estadio clínico: la memoria episódica correlaciona con A β 1-42 en los sujetos con QSM y con t-tau y p-tau en los sujetos con DCL. Globalmente indicaría que alteraciones de niveles de A β 1-42, t-tau y p-tau se asocian a una disfunción de áreas temporales mediales bilaterales en fases precoces de la enfermedad, previamente a la aparición de demencia.
5. Los niveles patológicos de A β 1-42 se asocian a un adelgazamiento cortical en las áreas vulnerables de la EA, el precuneus y áreas temporo-parietales de asociación. Sin embargo, la relación entre los niveles de A β 1-42 y el grosor cortical en estas mismas áreas podría no ser lineal sino cuadrática debido a un engrosamiento cortical en aquellos sujetos cognitivamente indemnes que tienen niveles transicionales de A β 1-42.

CONCLUSIÓN GLOBAL:

Nuestros datos corroboran que el descenso del A β 1-42 es la alteración bioquímica más precoz y aportan como novedad más importante la definición de una fase preclínica temprana que probablemente anteceda a un depósito de β -amiloide fibrilar significativo y que se caracteriza por un incremento del grosor cortical y aumento del tamaño de las estructuras subcorticales que podría traducir la presencia de una hipertrofia neuronal reactiva y/o inflamación.

X. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

(2001). "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework." Clin Pharmacol Ther **69**(3): 89-95.

Acosta-Baena, N., D. Sepulveda-Falla, et al. (2011). "Pre-dementia clinical stages in pre-senilin 1 E280A familial early-onset Alzheimer's disease: a retrospective cohort study." Lancet Neurol **10**(3): 213-220.

Almkvist, O., K. Axelman, et al. (2003). "Clinical findings in nondemented mutation carriers predisposed to Alzheimer's disease: a model of mild cognitive impairment." Acta Neurol Scand Suppl **179**: 77-82.

Alladi, S., J. Xuereb, et al. (2007). "Focal cortical presentations of Alzheimer's disease." Brain **130**(Pt 10): 2636-2645.

Amieva, H., H. Jacqmin-Gadda, et al. (2005). "The 9 year cognitive decline before dementia of the Alzheimer type: a prospective population-based study." Brain **128**(Pt 5): 1093-1101.

Amieva, H., M. Le Goff, et al. (2008). "Prodromal Alzheimer's disease: successive emergence of the clinical symptoms." Ann Neurol **64**(5): 492-498.

Archer, H. A., P. Edison, et al. (2006). "Amyloid load and cerebral atrophy in Alzheimer's disease: an 11C-PIB positron emission tomography study." Ann Neurol **60**(1): 145-147.

Bertram, L., C. M. Lill, et al. (2010). "The genetics of Alzheimer disease: back to the future." Neuron **68**(2): 270-281.

Blennow, K. and H. Hampel (2003). "CSF markers for incipient Alzheimer's disease." Lancet Neurol **2**(10): 605-613.

Blennow, K., H. Hampel, et al. (2010). "Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease." Nat Rev Neurol **6**(3): 131-144.

Bosch, B., E. M. Arenaza-Urquijo, et al. (2010). "Multiple DTI index analysis in normal aging, amnesic MCI and AD. Relationship with neuropsychological performance." Neurobiol Aging.

Braak, H. and E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." Acta Neuropathol **82**(4): 239-259.

- Braak, H. and E. Braak (1997). "Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories." Neurobiol Aging **18**(4): 351-357.
- Brys, M., L. Glodzik, et al. (2009). "Magnetic resonance imaging improves cerebrospinal fluid biomarkers in the early detection of Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **16**(2): 351-362.
- Burggren, A. C., M. M. Zeineh, et al. (2008). "Reduced cortical thickness in hippocampal subregions among cognitively normal apolipoprotein E e4 carriers." Neuroimage **41**(4): 1177-1183.
- Carlesimo, G. A., A. Cherubini, et al. (2010). "Hippocampal mean diffusivity and memory in healthy elderly individuals: a cross-sectional study." Neurology **74**(3): 194-200.
- Cedazo-Minguez, A. (2007). "Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: molecular mechanisms and therapeutic opportunities." J Cell Mol Med **11**(6): 1227-1238.
- Citron, M., T. Oltersdorf, et al. (1992). "Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production." Nature **360**(6405): 672-674.
- Citron, M., D. Westaway, et al. (1997). "Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice." Nat Med **3**(1): 67-72.
- Corder, E. H., A. M. Saunders, et al. (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." Science **261**(5123): 921-923.
- Chetelat, G., V. L. Villemagne, et al. (2010). "Relationship between atrophy and beta-amyloid deposition in Alzheimer disease." Ann Neurol **67**(3): 317-324.
- Chetelat, G., V. L. Villemagne, et al. (2010). "Larger temporal volume in elderly with high versus low beta-amyloid deposition." Brain.
- Chetelat, G., V. L. Villemagne, et al. (2011). "Independent contribution of temporal {beta}-amyloid deposition to memory decline in the pre-dementia phase of Alzheimer's disease." Brain **134**(Pt 3): 798-807.
- Davies, L., B. Wolska, et al. (1988). "A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques." Neurology **38**(11): 1688-1693.

de Leon, M. J., S. DeSanti, et al. (2004). "MRI and CSF studies in the early diagnosis of Alzheimer's disease." J Intern Med **256**(3): 205-223.

DeKosky, S. T. and K. Marek (2003). "Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders." Science **302**(5646): 830-834.

Desikan, R. S., H. J. Cabral, et al. (2009). "Automated MRI measures identify individuals with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." Brain **132**(Pt 8): 2048-2057.

Devanand, D. P., G. Pradhaban, et al. (2007). "Hippocampal and entorhinal atrophy in mild cognitive impairment: prediction of Alzheimer disease." Neurology **68**(11): 828-836.

Dickerson, B. C., A. Bakkour, et al. (2009). "The cortical signature of Alzheimer's disease: regionally specific cortical thinning relates to symptom severity in very mild to mild AD dementia and is detectable in asymptomatic amyloid-positive individuals." Cereb Cortex **19**(3): 497-510.

Dickerson, B. C. and R. A. Sperling (2005). "Neuroimaging biomarkers for clinical trials of disease-modifying therapies in Alzheimer's disease." NeuroRx **2**(2): 348-360.

Drzezga, A., T. Grimmer, et al. (2009). "Effect of APOE genotype on amyloid plaque load and gray matter volume in Alzheimer disease." Neurology **72**(17): 1487-1494.

Dubois, B., H. H. Feldman, et al. (2010). "Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon." Lancet Neurol **9**(11): 1118-1127.

Dubois, B., H. H. Feldman, et al. (2007). "Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria." Lancet Neurol **6**(8): 734-746.

Elias, M. F., A. Beiser, et al. (2000). "The preclinical phase of alzheimer disease: A 22-year prospective study of the Framingham Cohort." Arch Neurol **57**(6): 808-813.

Espeseth, T., L. T. Westlye, et al. (2008). "Accelerated age-related cortical thinning in healthy carriers of apolipoprotein E epsilon 4." Neurobiol Aging **29**(3): 329-340.

Espeseth, T., L. T. Westlye, et al. (2010). "Apolipoprotein E epsilon4-related thickening of the cerebral cortex modulates selective attention." Neurobiol Aging.

Fagan, A. M., D. Head, et al. (2009). "Decreased cerebrospinal fluid Abeta(42) correlates with brain atrophy in cognitively normal elderly." Ann Neurol **65**(2): 176-183.

Fagan, A. M., M. A. Mintun, et al. (2006). "Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans." Ann Neurol **59**(3): 512-519.

Fagan, A. M., M. A. Mintun, et al. (2009). "Cerebrospinal fluid tau and ptau(181) increase with cortical amyloid deposition in cognitively normal individuals: implications for future clinical trials of Alzheimer's disease." EMBO Mol Med **1**(8-9): 371-380.

Fagan, A. M., C. M. Roe, et al. (2007). "Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults." Arch Neurol **64**(3): 343-349.

Fazekas, F., J. B. Chawluk, et al. (1987). "MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging." AJR Am J Roentgenol **149**(2): 351-356.

Ferri, C. P., M. Prince, et al. (2005). "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study." Lancet **366**(9503): 2112-2117.

Fischl, B. and A. M. Dale (2000). "Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 11050-11055.

Fjell, A. M., K. B. Walhovd, et al. (2010). "Brain atrophy in healthy aging is related to CSF levels of Abeta1-42." Cereb Cortex **20**(9): 2069-2079.

Folstein, M. F., S. E. Folstein, et al. (1975). "'Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician." J Psychiatr Res **12**(3): 189-198.

Fox, N. C., R. S. Black, et al. (2005). "Effects of Abeta immunization (AN1792) on MRI measures of cerebral volume in Alzheimer disease." Neurology **64**(9): 1563-1572.

Fox, N. C., A. M. Kennedy, et al. (1997). "Clinicopathological features of familial Alzheimer's disease associated with the M139V mutation in the presenilin 1 gene. Pedigree but not mutation specific age at onset provides evidence for a further genetic factor." Brain **120** (Pt 3): 491-501.

Garcia-Albea JE, Sanchez-Bernardos ML, del Viso-Pabon S: Test de Boston para el diagnóstico de la afasia: adaptación española; in Goodglass H, Kaplan E: La evaluación de la afasia y de trastornos relacionados, ed 2 (translated by C Wernicke). Madrid, Editorial Medica Panamericana, 1986, pp 129- 198.

Godbolt, A. K., A. D. Waldman, et al. (2006). "MRS shows abnormalities before symptoms in familial Alzheimer disease." Neurology **66**(5): 718-722.

Good, C. D., I. S. Johnsruide, et al. (2001). "A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains." Neuroimage **14**(1 Pt 1): 21-36.

Gorno-Tempini, M. L., S. M. Brambati, et al. (2008). "The logopenic/phonological variant of primary progressive aphasia." Neurology **71**(16): 1227-1234.

Gotz, J., F. Chen, et al. (2001). "Formation of neurofibrillary tangles in P301l tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils." Science **293**(5534): 1491-1495.

Grimmer, T., M. Riemenschneider, et al. (2009). "Beta amyloid in Alzheimer's disease: increased deposition in brain is reflected in reduced concentration in cerebrospinal fluid." Biol Psychiatry **65**(11): 927-934.

Grober, E., H. Buschke, et al. (1988). "Screening for dementia by memory testing." Neurology **38**(6): 900-903.

Grossman, M., D. J. Libon, et al. (2007). "Distinct antemortem profiles in patients with pathologically defined frontotemporal dementia." Arch Neurol **64**(11): 1601-1609.

Gustafson, D. R., I. Skoog, et al. (2007). "Cerebrospinal fluid beta-amyloid 1-42 concentration may predict cognitive decline in older women." J Neurol Neurosurg Psychiatry **78**(5): 461-464.

Hempel, H., K. Blennow, et al. (2010). "Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease." Exp Gerontol **45**(1): 30-40.

Hansson, O., H. Zetterberg, et al. (2006). "Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study." Lancet Neurol **5**(3): 228-234.

Hardy, J. (2006). "Has the amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease been proved?" Curr Alzheimer Res **3**(1): 71-73.

Hardy, J. A. and G. A. Higgins (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." Science **256**(5054): 184-185.

Herukka, S. K., C. Pennanen, et al. (2008). "CSF Abeta42, tau and phosphorylated tau correlate with medial temporal lobe atrophy." J Alzheimers Dis **14**(1): 51-57.

Hildebrandt, H., A. Haldenwanger, et al. (2009). "False recognition correlates with amyloid-beta (1-42) but not with total tau in cerebrospinal fluid of patients with dementia and mild cognitive impairment." J Alzheimers Dis **16**(1): 157-165.

Holmes, C., D. Boche, et al. (2008). "Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial." Lancet **372**(9634): 216-223.

Iacono, D., R. O'Brien, et al. (2008). "Neuronal hypertrophy in asymptomatic Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol **67**(6): 578-589.

Ikonomovic, M. D., W. E. Klunk, et al. (2008). "Post-mortem correlates of in vivo PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer's disease." Brain **131**(Pt 6): 1630-1645.

Ivanou, A. and C. J. Sindic (2005). "Cerebrospinal fluid TAU protein and amyloid beta42 in mild cognitive impairment: prediction of progression to Alzheimer's disease and correlation with the neuropsychological examination." Neurocase **11**(1): 32-39.

Jack, C. R., Jr., D. S. Knopman, et al. (2010). "Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade." Lancet Neurol **9**(1): 119-128.

Jack, C. R., Jr., V. J. Lowe, et al. (2008). "11C PiB and structural MRI provide complementary information in imaging of Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment." Brain **131**(Pt 3): 665-680.

Jack, C. R., Jr., V. J. Lowe, et al. (2009). "Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease." Brain **132**(Pt 5): 1355-1365.

Jessen, F., B. Wiese, et al. (2010). "Prediction of dementia by subjective memory impairment: effects of severity and temporal association with cognitive impairment." Arch Gen Psychiatry **67**(4): 414-422.

Jicha, G. A., J. E. Parisi, et al. (2006). "Neuropathologic outcome of mild cognitive impairment following progression to clinical dementia." Arch Neurol **63**(5): 674-681.

Josephs, K. A., J. L. Whitwell, et al. (2008). "Beta-amyloid burden is not associated with rates of brain atrophy." Ann Neurol **63**(2): 204-212.

Katzman, R., R. Terry, et al. (1988). "Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques." Ann Neurol **23**(2): 138-144.

Klunk, W. E., H. Engler, et al. (2004). "Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B." Ann Neurol **55**(3): 306-319.

Klunk, W. E., J. C. Price, et al. (2007). "Amyloid deposition begins in the striatum of pre-senilin-1 mutation carriers from two unrelated pedigrees." J Neurosci **27**(23): 6174-6184.

Knight, W. D., L. G. Kim, et al. (2009). "Acceleration of cortical thinning in familial Alzheimer's disease." Neurobiol Aging.

Knopman, D. S., S. T. DeKosky, et al. (2001). "Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology." Neurology **56**(9): 1143-1153.

Kowalska, A. (2004). "[Genetic counseling and testing for families with Alzheimer's disease]." Neurol Neurochir Pol **38**(6): 495-501.

Lautenschlager, N. T., L. Flicker, et al. (2005). "Subjective memory complaints with and without objective memory impairment: relationship with risk factors for dementia." Am J Geriatr Psychiatry **13**(8): 731-734.

Lemere, C. A. and E. Masliah (2010). "Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-beta immunotherapy?" Nat Rev Neurol **6**(2): 108-119.

Lin, Y. T., J. T. Cheng, et al. (2009). "Increased total TAU but not amyloid-beta(42) in cerebrospinal fluid correlates with short-term memory impairment in Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **18**(4): 907-918.

Liu, L., S. K. Herukka, et al. (2004). "Longitudinal observation on CSF Aβ42 levels in young to middle-aged amyloid precursor protein/presenilin-1 doubly transgenic mice." Neurobiol Dis **17**(3): 516-523.

Llado, A., C. Gaig, et al. (2006). "[Genetics of prevalent neurodegenerative disorders]." Med Clin (Barc) **126**(17): 662-670.

Lleo, A., O. Berezovska, et al. (2004). "Clinical, pathological, and biochemical spectrum of Alzheimer disease associated with PS-1 mutations." Am J Geriatr Psychiatry **12**(2): 146-156.

Lleo, A., R. Blesa, et al. (2002). "Frequency of mutations in the presenilin and amyloid precursor protein genes in early-onset Alzheimer disease in Spain." Arch Neurol **59**(11): 1759-1763.

Matsushita, S., H. Arai, et al. (2002). "Clinical and biomarker investigation of a patient with a novel presenilin-1 mutation (A431V) in the mild cognitive impairment stage of Alzheimer's disease." Biol Psychiatry **52**(9): 907-910.

Mattsson, N., H. Zetterberg, et al. (2009). "CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment." JAMA **302**(4): 385-393.

McKhann, G., D. Drachman, et al. (1984). "Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease." Neurology **34**(7): 939-944.

Migliaccio, R., F. Agosta, et al. (2009). "Clinical syndromes associated with posterior atrophy: early age at onset AD spectrum." Neurology **73**(19): 1571-1578.

Molinuevo, J. L., L. Pintor, et al. (2005). "Emotional reactions to predictive testing in Alzheimer's disease and other inherited dementias." Am J Alzheimers Dis Other Demen **20**(4): 233-238.

Molinuevo, J. L., Peña-Casanova J. et al. (2009). "Guía oficial para la práctica clínica en demencias: conceptos, criterios y recomendaciones 2009. Barcelona. Thomson Reuters.

Mollenhauer, B., M. Bibl, et al. (2006). "Total tau protein, phosphorylated tau (181p) protein, beta-amyloid(1-42), and beta-amyloid(1-40) in cerebrospinal fluid of patients with dementia with Lewy bodies." Clin Chem Lab Med **44**(2): 192-195.

Mondadori, C. R., A. Buchmann, et al. (2006). "Enhanced brain activity may precede the diagnosis of Alzheimer's disease by 30 years." Brain **129**(Pt 11): 2908-2922.

Moonis, M., J. M. Swearer, et al. (2005). "Familial Alzheimer disease: decreases in CSF Abeta42 levels precede cognitive decline." Neurology **65**(2): 323-325.

Morris, J. C. (1993). "The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules." Neurology **43**(11): 2412-2414.

Morris, J. C., A. Heyman, et al. (1989). "The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part I. Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease." Neurology **39**(9): 1159-1165.

- Morris, J. C., C. M. Roe, et al. (2009). "Pittsburgh compound B imaging and prediction of progression from cognitive normality to symptomatic Alzheimer disease." Arch Neurol **66**(12): 1469-1475.
- Morris, J. C., C. M. Roe, et al. (2010). "APOE predicts amyloid-beta but not tau Alzheimer pathology in cognitively normal aging." Ann Neurol **67**(1): 122-131.
- Mosconi, L., S. Sorbi, et al. (2006). "Hypometabolism exceeds atrophy in presymptomatic early-onset familial Alzheimer's disease." J Nucl Med **47**(11): 1778-1786.
- Muller, M. J., D. Greverus, et al. (2007). "Diagnostic utility of hippocampal size and mean diffusivity in amnesic MCI." Neurobiol Aging **28**(3): 398-403.
- Oh, E. S., A. V. Savonenko, et al. (2009). "Amyloid precursor protein increases cortical neuron size in transgenic mice." Neurobiol Aging **30**(8): 1238-1244.
- Okonkwo, O. C., M. M. Mielke, et al. (2011). "Cerebrospinal fluid profiles and prospective course and outcome in patients with amnesic mild cognitive impairment." Arch Neurol **68**(1): 113-119.
- Parnetti, L., A. Lanari, et al. (2006). "Diagnosing prodromal Alzheimer's disease: role of CSF biochemical markers." Mech Ageing Dev **127**(2): 129-132.
- Perrin, R. J., A. M. Fagan, et al. (2009). "Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease." Nature **461**(7266): 916-922.
- Petersen, R. C., R. Doody, et al. (2001). "Current concepts in mild cognitive impairment." Arch Neurol **58**(12): 1985-1992.
- Pfeffer, R. I., T. T. Kurosaki, et al. (1982). "Measurement of functional activities in older adults in the community." J Gerontol **37**(3): 323-329.
- Price, J. L., D. W. McKeel, Jr., et al. (2009). "Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease." Neurobiol Aging **30**(7): 1026-1036.
- Rabinovici, G. D., W. J. Jagust, et al. (2008). "Abeta amyloid and glucose metabolism in three variants of primary progressive aphasia." Ann Neurol **64**(4): 388-401.
- Rami, L., B. Gomez-Anson, et al. (2007). "Longitudinal study of amnesic patients at high risk for Alzheimer's disease: clinical, neuropsychological and magnetic resonance spectroscopy features." Dement Geriatr Cogn Disord **24**(5): 402-410.

Rami, L., J. L. Molinuevo, et al. (2007). "Screening for amnesic mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease with M@T (Memory Alteration Test) in the primary care population." Int J Geriatr Psychiatry **22**(4): 294-304.

Rami, L., M. Serradell, et al. (2007). "[Perception Digital Test (PDT) for the assessment of incipient visual disorder in initial Alzheimer's disease]." Neurologia **22**(6): 342-347.

Rami, L., C. Valls-Pedret, et al. (2011). "[Cognitive reserve questionnaire. Scores obtained in a healthy elderly population and in one with Alzheimer's disease]." Rev Neurol **52**(4): 195-201.

Reiman, E. M., R. J. Caselli, et al. (1996). "Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the epsilon 4 allele for apolipoprotein E." N Engl J Med **334**(12): 752-758.

Reisberg, B., S. H. Ferris, et al. (1982). "The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia." Am J Psychiatry **139**(9): 1136-1139.

Reitz, C., C. Brayne, et al. (2011). "Epidemiology of Alzheimer disease." Nat Rev Neurol **7**(3): 137-152.

Rice, D. P., H. M. Fillit, et al. (2001). "Prevalence, costs, and treatment of Alzheimer's disease and related dementia: a managed care perspective." Am J Manag Care **7**(8): 809-818.

Ridha, B. H., J. Barnes, et al. (2006). "Tracking atrophy progression in familial Alzheimer's disease: a serial MRI study." Lancet Neurol **5**(10): 828-834.

Riemenschneider, M., N. Lautenschlager, et al. (2002). "Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid 42 proteins identify Alzheimer disease in subjects with mild cognitive impairment." Arch Neurol **59**(11): 1729-1734.

Riley, K. P., D. A. Snowdon, et al. (2005). "Early life linguistic ability, late life cognitive function, and neuropathology: findings from the Nun Study." Neurobiol Aging **26**(3): 341-347.

Ringman, J. M., S. G. Younkin, et al. (2008). "Biochemical markers in persons with pre-clinical familial Alzheimer disease." Neurology **71**(2): 85-92.

Riudavets, M. A., D. Iacono, et al. (2007). "Resistance to Alzheimer's pathology is associated with nuclear hypertrophy in neurons." Neurobiol Aging **28**(10): 1484-1492.

- Sarazin, M., C. Berr, et al. (2007). "Amnesic syndrome of the medial temporal type identifies prodromal AD: a longitudinal study." Neurology **69**(19): 1859-1867.
- Schott, J. M., J. W. Bartlett, et al. (2010). "Increased brain atrophy rates in cognitively normal older adults with low cerebrospinal fluid Abeta1-42." Ann Neurol **68**(6): 825-834.
- Schott, J. M., N. C. Fox, et al. (2003). "Assessing the onset of structural change in familial Alzheimer's disease." Ann Neurol **53**(2): 181-188.
- Shaw, L. M., H. Vanderstichele, et al. (2009). "Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects." Ann Neurol **65**(4): 403-413.
- Small, S. A. and K. Duff (2008). "Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis." Neuron **60**(4): 534-542.
- Snowdon, D. A. (2003). "Healthy aging and dementia: findings from the Nun Study." Ann Intern Med **139**(5 Pt 2): 450-454.
- Snowdon, D. A., S. J. Kemper, et al. (1996). "Linguistic ability in early life and cognitive function and Alzheimer's disease in late life. Findings from the Nun Study." JAMA **275**(7): 528-532.
- Sole-Padulles, C., D. Bartres-Faz, et al. (2009). "Brain structure and function related to cognitive reserve variables in normal aging, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **30**(7): 1114-1124.
- Stomrud, E., O. Hansson, et al. (2007). "Cerebrospinal fluid biomarkers predict decline in subjective cognitive function over 3 years in healthy elderly." Dement Geriatr Cogn Disord **24**(2): 118-124.
- Storandt, M., M. A. Mintun, et al. (2009). "Cognitive decline and brain volume loss as signatures of cerebral amyloid-beta peptide deposition identified with Pittsburgh compound B: cognitive decline associated with Abeta deposition." Arch Neurol **66**(12): 1476-1481.
- Strozyk, D., K. Blennow, et al. (2003). "CSF Abeta 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study." Neurology **60**(4): 652-656.
- Suzuki, N., T. T. Cheung, et al. (1994). "An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants." Science **264**(5163): 1336-1340.

Szekely, C. A. and P. P. Zandi (2010). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs and Alzheimer's disease: the epidemiological evidence." CNS Neurol Disord Drug Targets **9**(2): 132-139.

Tapiola, T., I. Alafuzoff, et al. (2009). "Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain." Arch Neurol **66**(3): 382-389.

Taylor, K. I., A. Probst, et al. (2008). "Clinical course of neuropathologically confirmed frontal-variant Alzheimer's disease." Nat Clin Pract Neurol **4**(4): 226-232.

Vemuri, P., J. L. Whitwell, et al. (2008). "Antemortem MRI based SStructural Abnormality iNDex (STAND)-scores correlate with postmortem Braak neurofibrillary tangle stage." Neuroimage **42**(2): 559-567.

Vemuri, P., H. J. Wiste, et al. (2010). "Effect of apolipoprotein E on biomarkers of amyloid load and neuronal pathology in Alzheimer disease." Ann Neurol **67**(3): 308-316.

Vemuri, P., H. J. Wiste, et al. (2009). "MRI and CSF biomarkers in normal, MCI, and AD subjects: diagnostic discrimination and cognitive correlations." Neurology **73**(4): 287-293.

Villemagne, V. L., S. Ataka, et al. (2009). "High striatal amyloid beta-peptide deposition across different autosomal Alzheimer disease mutation types." Arch Neurol **66**(12): 1537-1544.

Villemagne, V. L., K. E. Pike, et al. (2011). "Longitudinal assessment of Abeta and cognition in aging and Alzheimer disease." Ann Neurol **69**(1): 181-192.

Visser, P. J., F. Verhey, et al. (2009). "Prevalence and prognostic value of CSF markers of Alzheimer's disease pathology in patients with subjective cognitive impairment or mild cognitive impairment in the DESCRIPA study: a prospective cohort study." Lancet Neurol **8**(7): 619-627.

Vlad, S. C., D. R. Miller, et al. (2008). "Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease." Neurology **70**(19): 1672-1677.

Walhovd, K. B., A. M. Fjell, et al. (2010). "Combining MR imaging, positron-emission tomography, and CSF biomarkers in the diagnosis and prognosis of Alzheimer disease." AJNR Am J Neuroradiol **31**(2): 347-354.

Wallin, A. K., K. Blennow, et al. (2006). "CSF biomarkers for Alzheimer's Disease: levels of

beta-amyloid, tau, phosphorylated tau relate to clinical symptoms and survival.” Dement Geriatr Cogn Disord **21**(3): 131-138.

Warrington, E. K. and M. James (1991). “A new test of object decision: 2D silhouettes featuring a minimal view.” Cortex **27**(3): 370-383.

Wechsler D: Escala de inteligencia de Wechsler para adultos-III (WAIS III). Madrid, TEA, 1999.

West, M. J., G. Bach, et al. (2009). “Synaptic contact number and size in stratum radiatum CA1 of APP/PS1DeltaE9 transgenic mice.” Neurobiol Aging **30**(11): 1756-1776.

Whitwell, J. L., R. Avula, et al. (2010). “Gray and white matter water diffusion in the syndromic variants of frontotemporal dementia.” Neurology **74**(16): 1279-1287.

Whitwell, J. L., M. M. Shiung, et al. (2008). “MRI patterns of atrophy associated with progression to AD in amnesic mild cognitive impairment.” Neurology **70**(7): 512-520.

Wiggins, S., P. Whyte, et al. (1992). “The psychological consequences of predictive testing for Huntington’s disease. Canadian Collaborative Study of Predictive Testing.” N Engl J Med **327**(20): 1401-1405.

Zanjani, H., C. E. Finch, et al. (2005). “Complement activation in very early Alzheimer disease.” Alzheimer Dis Assoc Disord **19**(2): 55-66.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Programa de Doctorado de Medicina
Departament de Medicina
Universitat de Barcelona
Mayo de 2011

**Estudios multimodales de resonancia magnética
y de líquido cefalorraquídeo en la enfermedad de Alzheimer
preclínica familiar y esporádica**

Juan Fortea
Ormaechea