



TESIS DOCTORAL

Nuevos abordajes neuroquímicos del líquido cefalorraquídeo orientados a la detección precoz de la Enfermedad de Alzheimer

Memoria de Tesis Doctoral por la graduada
Fátima Concepción Mesa Herrera
para optar al título de Doctora en Química e Ingeniería Química

Programa de doctorado en Química e Ingeniería Química
2020

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

1 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

1 / 179



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

2 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Agradecimientos

Decidí agradecer a todas esas personas que, de una forma u otra, han caminado conmigo a lo largo de estos cinco años de una forma especial y por ello:

Han de saber que decidí no decir nombres
Por si alguno se quedaba en el tintero
Así que va por las mujeres y los hombres
Por todos aquellos que me quieren y que quiero.

A mi director y co-directora de tesis –

Quisiera dedicarles unos versos
que valieran lo que vale vuestra luz.
Pero no cabe en un folio el universo
tampoco en una frase cabe mi gratitud.

A mi familia –

A mi familia, por ser calor y abrigo
Aconsejarme cuando busco un buen amigo
Por perdonarme cuando no sé lo que digo
Y por estar siempre conmigo, como el sol está en el trigo.

A mi segunda familia, mis amigas, amigos y a él –

Y ésta va por la amistad, que nunca falla
la que dice la verdad hasta cuando calla
la que es ejemplo de humildad y de constancia
por encima del tiempo y la distancia.

Y esta va por la infancia que se despiden
por el amor que no me mide
por el amigo noble que da siempre el doble de lo que pide
el corazón nunca deja que me olvide.¹

1. Poemas de Sharif Fernández.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

3 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ	
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

4 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh	
Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27

ABREVIATURAS	9
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. Generalidades de la Enfermedad de Alzheimer	13
1.2. Aspectos genéticos de la Enfermedad de Alzheimer	16
1.2.1. Riesgo genético para la Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano.	16
1.2.2. Riesgo genético para la Enfermedad de Alzheimer esporádica	17
1.3. Fisiopatología y neuropatología de la Enfermedad de Alzheimer esporádica	18
1.3.1. Hipótesis de la cascada amiloide	18
1.3.2. Proteína Tau.....	20
1.3.3. Estrés oxidativo y la defensa antioxidante en la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer.....	22
1.3.4. Electrolitos y elementos traza metálicos en la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer.....	26
1.3.5. Procesos inflamatorios en la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer	27
1.3.6. Deterioro sináptico en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer.	28
1.3.7. Moléculas de señalización neuronal y de las balsas lipídicas en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer.	29
1.4. Biomarcadores y Enfermedad de Alzheimer	31
1.4.1. Marcadores para la enfermedad de Alzheimer.....	32
2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	39
2.1. Justificación	39
2.2. Hipótesis	39
2.3. Objetivos principales.....	40
2.4. Objetivos específicos	40
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
3.1. Pacientes.....	43
3.2. Obtención y tratamiento de las muestras.....	44
3.3. Determinación de la composición iónica del líquido cefalorraquídeo	45
3.3.1. Determinación de la concentración de cationes divalentes.	45
3.3.2. Determinación de elementos traza (cobalto, manganeso, hierro, zinc, selenio y aluminio) por ICP-MS.....	45
3.4. Determinación de actividades enzimáticas.....	46
3.4.1. Determinación de la actividad superóxido dismutasa	46
3.4.2. Determinación de la actividad glutatión-S-transferasa (GST).....	47
3.4.3. Determinación de la actividad butirilcolinesterasa (BuCh)	47
3.5. Análisis de peroxidación lipídica	48
3.5.1. Determinación de la concentración total de malondialdehído (MDA).....	48
3.5.2. Determinación de 8-iso-prostaglandina F2α (8-Iso-F2α).....	49
3.6. Determinación de la proteína total	49
3.7. Inmunoensayos	50
3.7.1. Determinación del péptido β-amiloide.....	50
3.7.2. Determinación de la proteína tau total	50
3.7.3. Determinación de la proteína tau fosforilada	51
3.7.4. Ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas	51
3.8. Análisis estadístico.....	53

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
4.1. Evaluación de los marcadores clínicos en el espectro de la Enfermedad de Alzheimer	57
4.2. Alteraciones de las concentraciones de cationes divalentes, metales traza y metales neurotóxicos como marcadores en el espectro de Enfermedad de Alzheimer.....	72
4.2.1. Cationes divalentes	72
4.2.2. Metales traza	76
4.2.3. Metales neurotóxicos: el caso del aluminio	80
4.2.4. Relaciones con biomarcadores clásicos y entre metales y elementos trazas	81
4.2.5. Relaciones multivariantes y validación de los cationes divalentes, metales y elementos traza como marcadores	87
4.3. Marcadores del estado oxidativo e inflamatorio en el espectro de la Enfermedad de Alzheimer.....	92
4.3.2. Relación de los marcadores de peroxidación lipídica con los metales	97
4.3.3. Marcadores de la actividad antioxidante y detoxificante	100
4.3.4. Relaciones entre metabolitos de estrés oxidativo, actividades enzimáticas y marcadores clásicos.....	103
4.4. Proteínas del signalosoma y otras proteínas implicadas en procesos degenerativos..	108
4.4.1. Proteínas del signalosoma y de las balsas lipídicas.....	108
4.4.2. Proteínas sinápticas y de función neuronal.	113
4.4.3. Relación entre las proteínas del signalosoma, proteínas sinápticas y de función neuronal y marcadores clásicos.....	116
4.4.4. Relaciones multivariantes y validación de los marcadores.	118
5. CONCLUSIONES.....	127
6. REFERENCIAS	133
7. ANEXOS	155
Anexo I: criterios diagnósticos para la Enfermedad de Alzheimer.....	155
Anexo II: genes implicados en la patología de Alzheimer.	161
Anexo III: metaloenzimas y funciones de los metales en el cerebro.....	162
Anexo IV: matrices de correlaciones para los marcadores clásicos y los test neurocognitivos.....	164
Anexo V: matrices de correlaciones para los cationes divalentes con los metales trazas y los marcadores clásicos.....	166
Anexo VII: matrices de correlaciones para los marcadores de estrés oxidativo con los metales trazas y los marcadores clásicos.....	171
Anexo VIII: Matrices de correlaciones para las proteínas del signalosoma y otras de función neuronal, los marcadores clásicos.....	175

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

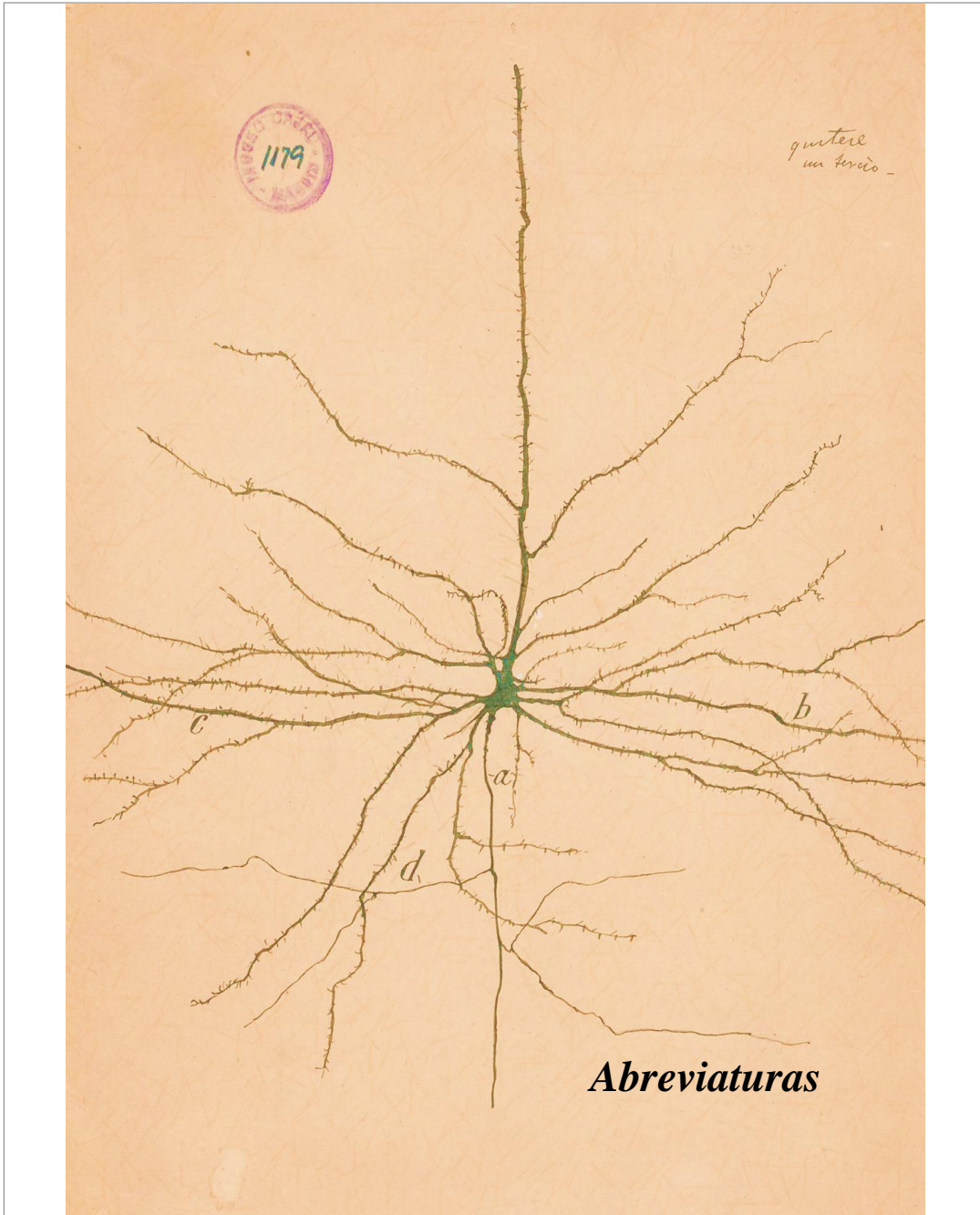
Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

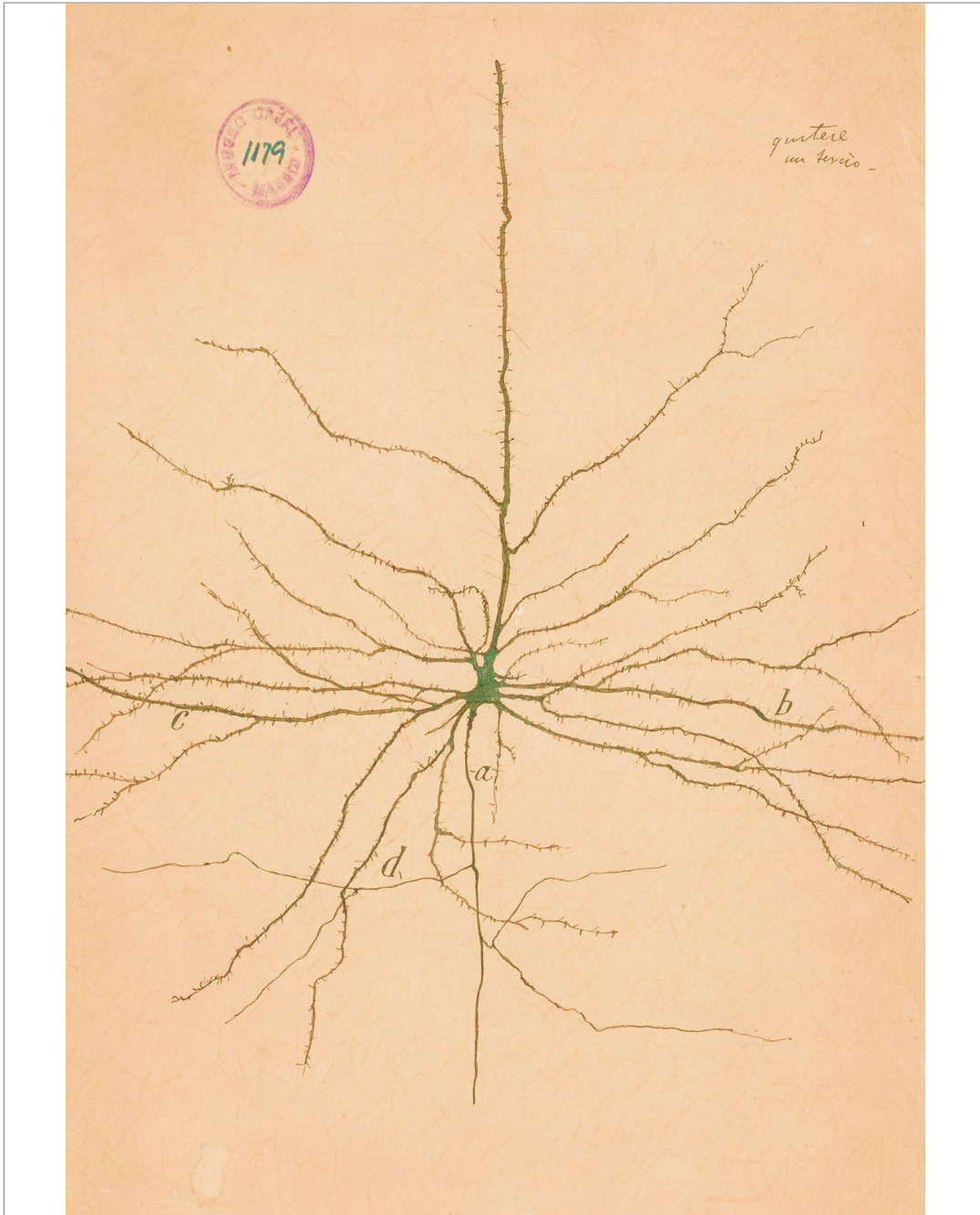
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

7 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

8 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolinesterasa
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora del amiloide
BACE	β -secretasa
BuCh	Butirilcolinesterasa
Cav	Caveolina-1
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzono
CTRL	Controles
DCL	Deterioro cognitivo leve
DCLa	Deterioro cognitivo leve amnésico
DSM	Manual de Diagnóstico Estadístico de Desórdenes Mentales
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-nitrobenzoico
EA	Enfermedad de Alzheimer
ER	Reticulo endoplasmático
ERN	Especies reactivas del nitrógeno
EROS	Especies reactivas del oxígeno
ERα	Receptor de estrógeno
Flo	Flotilina
GDS	Escala de deterioro global
GSH	Glutatión reducido
GST	Glutatión-s-trasferasa
HRP	Peroxidase de rábano
IDE	Enzima insulino degradante
IGF-1Rβ	Factor de crecimiento insulínico
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MDA	Malondialdehído
NEP	Neprelisina
NFT	Ovillos neurofibrilares
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Proteína C reactiva
PL	Punción lumbar
PrP	Proteína priónica
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
QSM	Queja subjetiva de memoria
RMN	resonancia magnética funcional
RMNf	Resonancia magnética funcional
SOD	Superóxido dismutasa
Tau-f	Tau fosforilada
Tau-t	Tau total
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TEP	tomografía de emisión de positrones
TMB	Bencidina de tetrametilo
TMP	1,1,3,3-tetramethoxypropane
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje
βA	β -amiloide

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

9 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

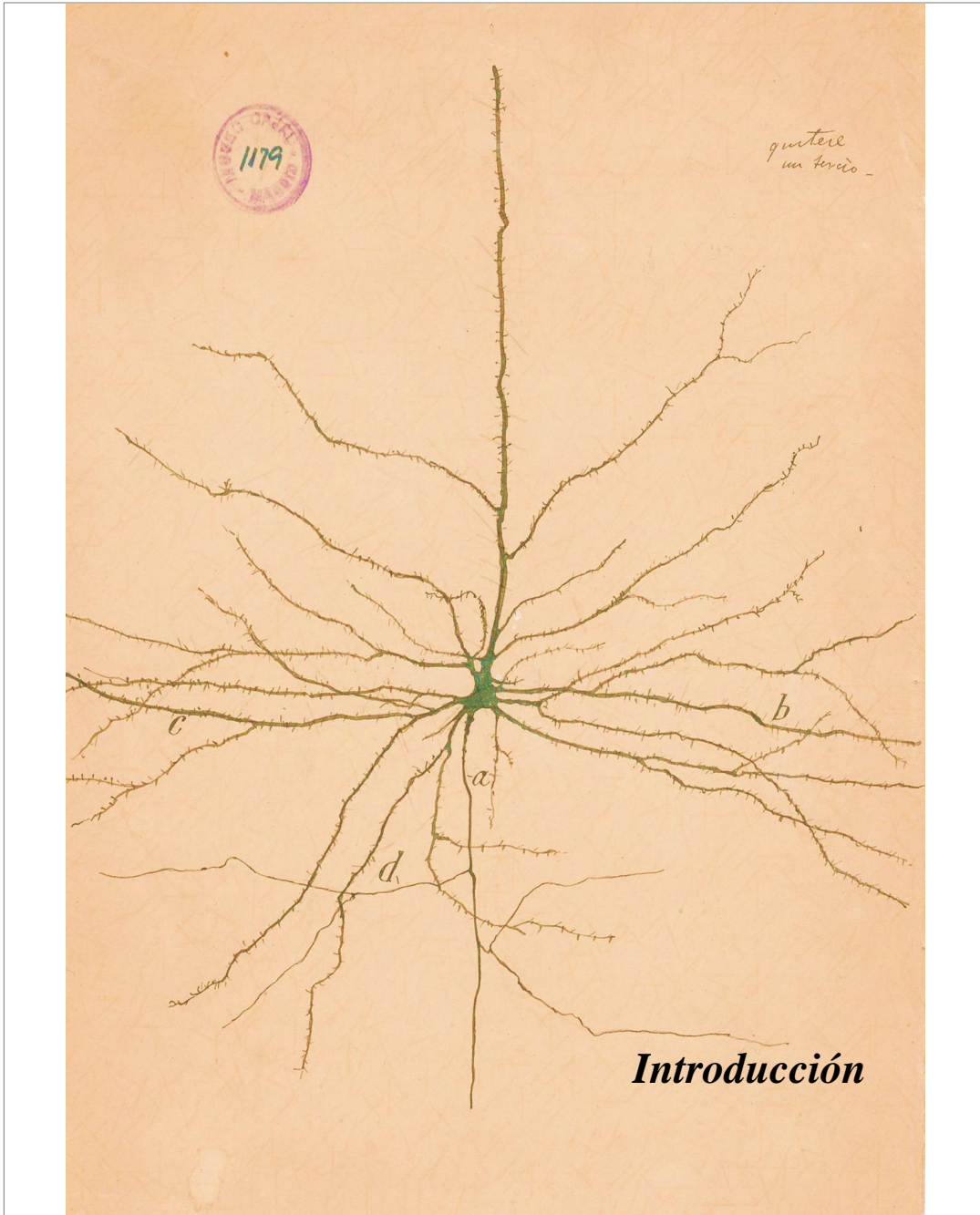
9 / 179



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sZ
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

10 / 179

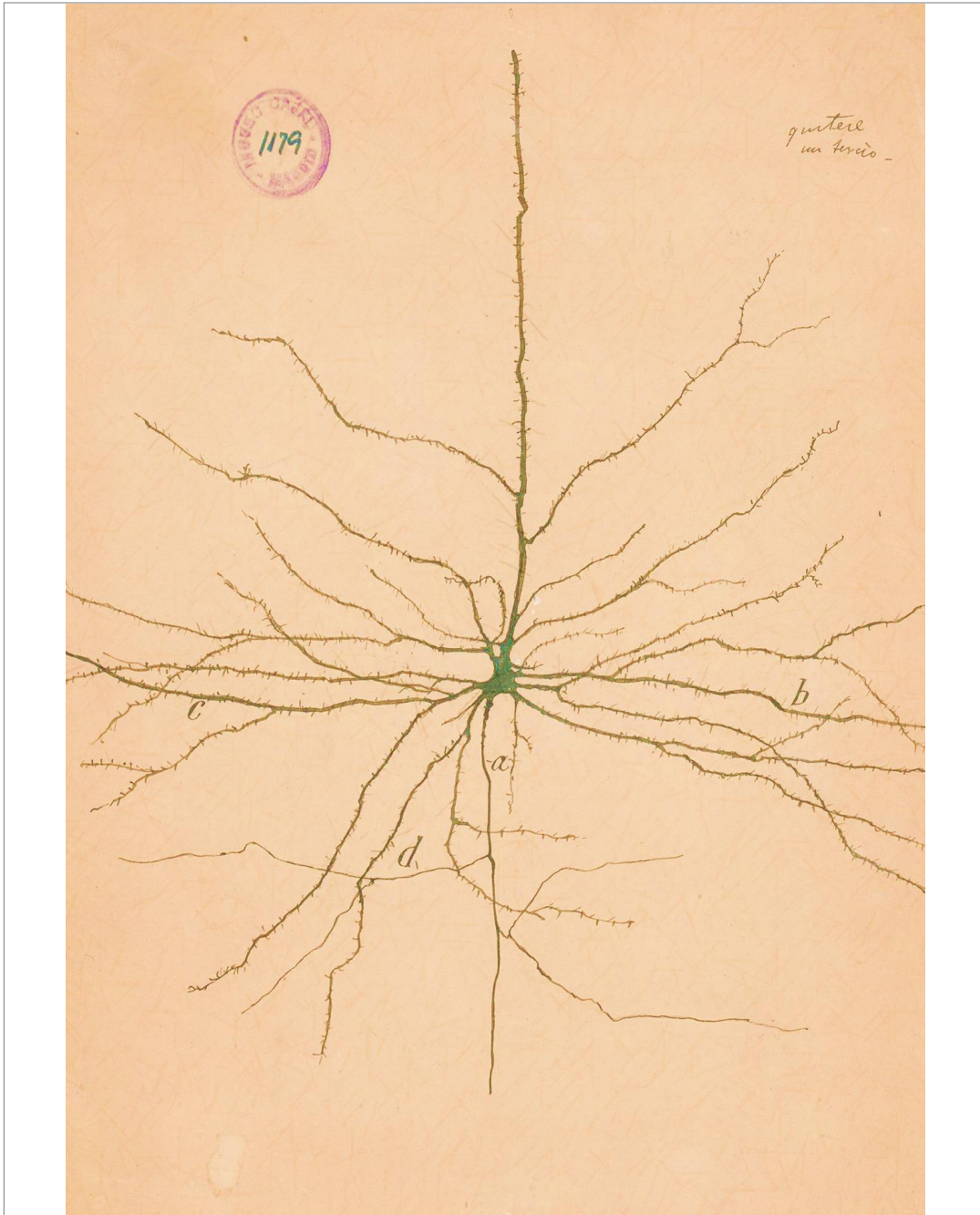
Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2914873	Código de verificación: yguD1Khh
Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sZ
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

11 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2914873	Código de verificación: yguD1Khh
Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

12 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de la Enfermedad de Alzheimer

La **Enfermedad de Alzheimer (EA)** es una enfermedad neurodegenerativa progresiva, irreversible y es la forma más común de demencia. Este trastorno se manifiesta gradualmente en los afectados y durante su curso aparecen cambios en el comportamiento y la personalidad. Además, se produce una disminución de las funciones motoras y de las capacidades cognitivas (como la toma de decisiones, el lenguaje, y la capacidad de reconocimiento de las personas). Estos cambios producen en los individuos afectados una pérdida de autonomía provocando una incapacidad para desarrollar actividades de la vida cotidiana (Castellani, Rolston, y Smith 2011).

La EA constituye aproximadamente el 75% de todos los casos de demencia diagnosticados en el mundo (Duthey 2013). Según el Informe Mundial sobre el Alzheimer, en 2015, 46,8 millones de personas padecían demencia en todo el mundo y se espera que esta cifra se duplique cada 20 años (Patterson 2018). Aproximadamente entre el 5-8% de los individuos mayores de 65 años están afectados por demencia tipo Alzheimer, y los porcentajes van aumentando con la edad, afectando entre el 15-20% en mayores de 75 años y al 25-50% de los mayores de 85 años. En la actualidad se considera a la edad el principal factor de riesgo para desarrollar EA (Castellani, Rolston, y Smith 2011).

Según Duthey y colaboradores (2013), la mayor prevalencia de la enfermedad se da en Asia, afectando a 22,9 millones de personas, mientras que las cifras de afectados en Europa y las Américas (norte y sur) son de 10,5 y 9,4 millones de personas, respectivamente (Duthey 2013). Dentro del género poblacional, las mujeres son más susceptibles que los hombres a padecer este trastorno (16% en mujeres frente al 11% en hombres) (Alzheimer's Association Committee, 2019). Aunque no se ha esclarecido con exactitud los motivos de este hecho, diferentes estudios han apuntado como factor de riesgo para desarrollar EA la mayor esperanza de vida así como a la disminución de los niveles de estrógenos durante la menopausia que sufren las mujeres (Janicki y Schupf 2010).

La Enfermedad de Alzheimer esporádica representa un 95% de los casos y se caracteriza por presentar los primeros síntomas de la a partir de los 65 años, aunque en diferentes estudios longitudinales se ha observado que existe un desfase temporal entre la

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

13 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

neurodegeneración cerebral y la aparición de los síntomas, apareciendo los signos patológicos décadas antes de que se manifieste clínicamente la enfermedad (Weller y Budson 2018). Por otro lado, la EA de inicio temprano representa aproximadamente entre el 1% y el 6% de todos los casos y la edad de inicio varía entre los 30 y 65 años.

El espectro de la enfermedad de Alzheimer esporádica se ha dividido en tres fases que se presentan como un *continuum*, existiendo una *etapa prodrómica*, una etapa de *deterioro cognitivo leve (DCL)* debido a la EA y la etapa de *demencia* propia de la Enfermedad de Alzheimer (McKhann et al. 2011; Jack et al. 2011). Los criterios diagnósticos para cada uno de los estadios se encuentran recogidos en el anexo I.

La *etapa prodrómica* precede a las etapas de la demencia que presentan manifestaciones clínicas. Esta etapa se caracteriza por ser asintomática, por lo que distinguir esta afección de la presente de los ancianos cognitivamente normales representa un reto. Esta etapa refleja el período durante el cual se inician los procesos neurodegenerativos que desencadenan la patología de la EA. Esta etapa aparece en personas que no cumplen los criterios para el deterioro cognitivo leve, y que pueden o no presentar signos clínicos de déficits cognitivos sutiles (Bennett et al. 2012).

El *deterioro cognitivo leve (DCL)* hace referencia a aquellos pacientes que presentan una función anormal de la memoria, es decir, presentan deterioro cognitivo objetivo relativo a la edad o a la educación, pero preservan las funciones cognitivas y pueden llevar a cabo las funciones de su vida diaria de forma normal (Petersen et al. 1999). El deterioro cognitivo leve representa un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, pudiendo representar una fase intermedia en el desarrollo de la EA o de otros desórdenes neurodegenerativos (Slot et al. 2019). Se ha aceptado que hay varios tipos de DCL, y entre ellos que la forma amnésica (DCL-a) es la que mayor probabilidad tiene para evolucionar a EA. Aproximadamente el 35% de los pacientes que presentan un cuadro de deterioro cognitivo amnésico evolucionan a enfermedad de Alzheimer en un plazo de 3 años, con una tasa de conversión anual de entre el 5-10% (Slot et al. 2019). Sin embargo, existen muchas otras causas que pueden provocar el deterioro cognitivo y no todas están relacionadas con trastornos neurodegenerativos progresivos, por ejemplo, el sufrimiento de accidentes cerebrovasculares o el consumo de drogas o de alcohol (Campbell et al. 2011).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

14 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

La detección de factores de riesgo que muestren la conversión de DCL, sobre todo de la forma amnésica, a enfermedad de Alzheimer ha sido ampliamente estudiada y generalmente se han basado en la búsqueda de marcadores séricos, en líquido cefalorraquídeo, marcadores de imagen y tests neurosicológicos (Albert et al. 2011). Según el criterio diagnóstico para el deterioro cognitivo leve amnésico (DCL-a) desarrollado por el Instituto Nacional de Envejecimiento y por la Asociación de Alzheimer, el DCL-a puede evolucionar a EA cuando es positivo un marcador de lesión neuronal, como la atrofia del lóbulo temporal o la presencia de niveles elevados de proteína tau total o fosforilada y niveles positivos de β -amiloide, tanto si son detectados por tomografía por emisión de positrones como detectados en el líquido cefalorraquídeo. Los niveles de β -amiloide por debajo de los niveles establecidos, sugieren que es poco probable que el DCL se deba a la EA (Jack et al. 2018). Por otra parte, según otro criterio desarrollado por un grupo de trabajo internacional de Dubois y colaboradores se establecen para la EA prodrómica dos características: la disminución de la memoria episódica como síntoma clínico principal y la presencia de biomarcadores positivos en líquido cefalorraquídeo o por imagen para el apoyo del diagnóstico (Dubois et al. 2016).

El estadio que corresponde a la fase de *demencia por Enfermedad de Alzheimer*, se caracteriza por la aparición paulatina de los procesos propios de la enfermedad, como son el deterioro cognitivo profundo y, por tanto, un declive funcional intenso y progresivo. Además, aparecen los marcadores neuropatológicos de la enfermedad: las placas seniles, los ovillos neurofibrilares y la pérdida de sinapsis. Al principio, el daño se produce en las partes del cerebro implicadas en la memoria, como la corteza entorrinal y el hipocampo. Más tarde, afecta a las áreas de la corteza cerebral responsables del lenguaje, el razonamiento y el comportamiento social y eventualmente, se dañan otras muchas otras áreas del cerebro. El cerebro de un individuo que padece EA presenta atrofia, siendo entre un 8 y 15% más pequeños que el cerebro de un individuo sano. Presenta los surcos ensanchados y los giros estrechos, debido a la pérdida masiva de neuronas (Castellani, Rolston, y Smith 2011). Así mismo, la enfermedad afecta más a unas regiones cerebrales que a otras, observándose con mayor deterioro en las regiones del hipocampo, corteza entorrinal y la amígdala, las cuales juegan un papel clave en el desarrollo de la formación de nuevos recuerdos (Rauk 2009). En estadios avanzados, el daño neuronal también puede afectar a la corteza frontal y al lóbulo parietal (Paine y Lowe 2011).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

15 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

1.2. Aspectos genéticos de la Enfermedad de Alzheimer

Aunque la edad es el principal factor de riesgo para desarrollar la enfermedad, existe un consenso general en destacar la susceptibilidad genética para el desarrollo de la enfermedad, mostrándose una heredabilidad estimada entre el 59-79% (Gatz et al. 2006). La mayoría de los genes relacionados con la susceptibilidad al desarrollo de la EA juegan un papel importante en el procesamiento de los lípidos, en el sistema inmune, la endocitosis o en la integración sináptica. En el anexo II se encuentra una relación de genes implicados en la enfermedad.

1.2.1. Riesgo genético para la Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano.

La *Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano* se caracteriza por aparecer antes de los 65 años. Representa entre el 1-5% de los casos de EA y puede heredarse como un trastorno autosómico dominante con una penetración casi completa. La forma autosómica dominante de la enfermedad está ligada a mutaciones en al menos uno de tres genes: el gen APP, el gen *presenilina 1* (PSEN1) y el gen *presenilina 2* (PSEN2). Las mutaciones en estos tres genes representan aproximadamente la mitad de las formas familiares de la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano (Reitz y Mayeux 2014).

El gen APP se encuentra en el cromosoma 21 y las mutaciones que afectan a este gen están relacionadas con mayores depósitos del péptido β -amiloide, una proteína implicada en la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer y cuya implicación en la enfermedad se explicará más adelante. En relación con este aspecto, se ha observado que las personas con síndrome de Down presentan depósitos cerebrales de β -amiloide a partir de los 35 años. Este fenómeno estaría relacionado con la trisomía en el cromosoma 21 que presentan estos pacientes, lo que conllevaría una mayor expresión de la proteína precursora del amiloide.

Los genes *presenilina 1* y *presenilina 2*, situados en los cromosomas 14 y 1, respectivamente, codifican para la proteína presenilina, la cual forman parte del complejo catalítico que da lugar al péptido β -amiloide. Hasta la fecha, se han identificado más de 160 mutaciones que afectan a estos genes y alteran la actividad de esta enzima de tal manera que provocan un incremento en la producción del péptido β -amiloide,

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

16 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

16 / 179

favoreciendo la fibrilógenesis y la acumulación de este péptido en forma de placas (Dubois et al. 2016).

1.2.2. Riesgo genético para la Enfermedad de Alzheimer esporádica

La *Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío* se manifiesta a partir de los 65 años y representa entre 95-99% de todos los casos de Alzheimer y actualmente se desconoce la causa que la produce. Las causas probablemente incluyen una combinación de factores genéticos, ambientales y del estilo de vida, aunque se ha observado que ninguno de estos factores por sí solo sea la causa determinante para su inicio. Estudios epidemiológicos han sugerido que las personas que desarrollan EA presentan mutaciones en el gen de la apolipoproteína E (APOE). En humanos se conocen tres alelos de APOE ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, y $\epsilon 4$) que sólo difieren en secuencia por un aminoácido ya sea en la posición 112 o en la posición 158 de la proteína. Diferentes estudios han mostrado que ser portador del alelo $\epsilon 4$ es un factor de riesgo genético para el desarrollo de la EA esporádica, mientras que el alelo $\epsilon 2$ es preventivo (Corder et al. 1993). Además se ha observado que el número de alelos $\epsilon 4$ es significativo ya que una copia de aumenta el riesgo de EA en aproximadamente 3 veces y 2 copias en aproximadamente 12 veces (Morishima-Kawashima et al. 2000; Zhou et al. 2011). También se ha observado que los familiares de primer grado de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer tienen el doble del riesgo de padecer la enfermedad que las personas que no tienen un familiar de primer grado afectado por la enfermedad. De esta forma, la EA ocurre con más frecuencia en gemelos monocigóticos que en gemelos dicigóticos, lo que sugiere una contribución genética sustancial de 60-80% a este trastorno (Reitz y Mayeux 2014).

Además de la componente genética, existen otros factores de riesgo, siendo la EA esporádica reconocida como una enfermedad multifactorial compleja. En este sentido, se han descrito la relación entre el la patología y las afecciones vasculares como las cardiopatías, los accidentes cerebrovasculares y la hipertensión arterial (Kalaria 2010) así como las afecciones metabólicas como la diabetes (Li, Wang, y Xiao 2016), la obesidad (Alford et al. 2018) o la dieta (Yusufov, Weyandt, y Piryatinsky 2016).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

17 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

1.3. Fisiopatología y neuropatología de la Enfermedad de Alzheimer esporádica

1.3.1. Hipótesis de la cascada amiloide

Entre las hipótesis más aceptadas para explicar la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer, se encuentra la **hipótesis de la cascada amiloide**. Desarrollada por Hardy y Higgins en 1992, afirma que el aumento de los niveles del péptido β -amiloide (1-42), ya sea por un incremento en su producción o por un descenso de su aclaramiento, es el evento clave en el proceso de la enfermedad que finalmente resulta en la degeneración neuronal y demencia (Jonh Hardy y Higgins 1992).

El péptido β -amiloide se origina a partir de la proteína precursora del amiloide (APP, del inglés *Amyloid Precursor Protein*) y se libera tras la acción enzimática de la β -secretasa y γ -secretasa. Las mutaciones en el gen de la APP, así como en los genes de la *presenilina 1 y 2*, que son componentes del complejo catalítico de corte de la γ -secretasa, producen niveles alterados del péptido β -amiloide. Esta producción anormal del péptido β -amiloide se observó en la variante familiar de EA (Selkoe 2001; Mullan et al. 1992; McDonnell y Korsmeyer 1991). Este hecho, junto con los hallazgos de la presencia placas de β -amiloide en el cerebro de pacientes con síndrome de Down, los cuales presentan una copia extra del gen de la APP, llevó a la hipótesis de que la acumulación del péptido β -amiloide en las placas seniles, tanto por un aumento en su producción como por una disminución en su eliminación, es la fuerza motriz en el proceso de la enfermedad (John Hardy y Higgins 2009).

La formación extracelular de **placas seniles** en el tejido cerebral (figura 1.1) se debe a la acumulación de las formas insolubles del péptido β -amiloide, el cual es resultado del procesamiento proteolítico de la proteína precursora del amiloide.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

18 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

18 / 179

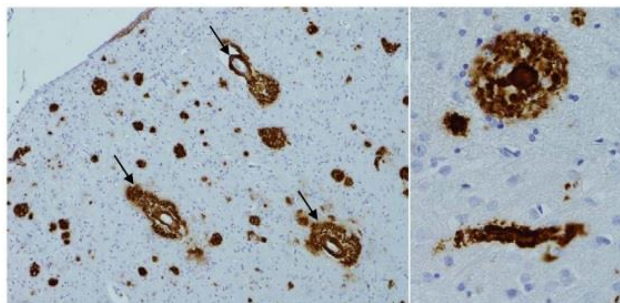


Figura 1.1: Cortes histológicos de cerebro de un paciente con Enfermedad de Alzheimer. inmunohistoquímica de corteza frontal donde se detectan las placas seniles. Las flechas indican la acumulación de las placas dentro de los vasos sanguíneos. A la derecha placa senil vista con mayor aumento. (Tomado de Serrano-Pozo, 2011)

En condiciones normales, para la formación de la proteína amiloide, la proteína precursora del amiloide es cortada por acción de las enzimas α -secretasa y γ -secretasa liberando un fragmento soluble de APP de gran tamaño (sAPP α) dejando unido en la membrana la región C-terminal de la misma. Posteriormente, este fragmento es cortado por la γ -secretasa en un extremo de la secuencia de β -amiloide, dejando libre un fragmento más pequeño (p3) el cual es degradado (Murphy y Lii, 2010) (figura 1.2).

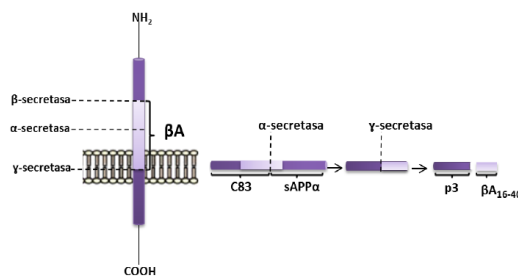


Figura 1.2: Procesamiento no amiloidogénico del péptido β -amiloide (Adaptado de Casañas 2015).

Sin embargo, durante la enfermedad de Alzheimer, por motivos desconocidos, la división proteolítica de la proteína precursora del amiloide es llevada a cabo por las enzimas β -secretasa y γ -secretasa. En este caso, la enzima β -secretasa corta en un extremo

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sZ
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2914873	Código de verificación: yguD1Khh
Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27

del péptido β -amiloide, liberando un fragmento N-terminal soluble (sAPP β) y un fragmento unido a la membrana que contiene la secuencia completa de aminoácidos del β -amiloide neurotóxico. El posterior corte de la γ -secretasa en el otro extremo del sAPP β , hace que se forme el péptido p3 y el péptido β -amiloide completo. El tamaño de éste quedará entre 39-43 aminoácidos ya que el punto de corte de la γ -secretasa varía (Murphy y Iii 2010) (figura 1.3).

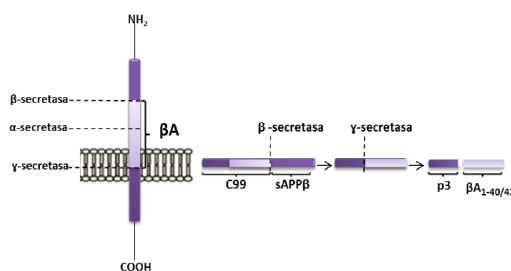


Figura 1.3: Procesamiento amilodogénico del péptido β -amiloide (Adaptado de Casañas 2015)

Aunque durante muchos años esta hipótesis ha sido ampliamente aceptada para explicar la enfermedad de Alzheimer, actualmente existen evidencias que la debilitan. Entre ellas destacan los estudios que han observado una gran concentración de placas seniles en personas mayores que han fallecido sin presentar ningún signo de declive cognitivo asociados a la Enfermedad de Alzheimer. Igualmente, ensayos clínicos basados en terapias anti-amiloide utilizando anticuerpos monoclonales han resultado fallidos, presentándose efectos secundarios o incluso empeorando la demencia (Lippa y Morris 2006; Karran y Hardy 2014).

1.3.2. Proteína Tau

La importancia del papel de la proteína Tau en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer, permaneció oculta hasta la década de los años 90 debido al auge de la hipótesis de la cascada amiloide. Sin embargo, dado que ésta resultó ser de importancia limitada para la progresión de la EA, se comenzó a investigar en otras posibles explicaciones para la etiología de la Enfermedad de Alzheimer. Braak y Braak

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sz
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Kh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

propusieron una hipótesis basada en la correlación entre el grado de deterioro cognitivo en la EA y la distribución y estatificación de la deposición gradual de la proteína tau fosforilada en ovillos neurofibrilares dentro de las neuronas (Braak y Braak 1991). Más tarde, el hallazgo del papel de los ovillos neurofibrilares en los procesos de deterioro cognitivo fue confirmado por otros investigadores, apoyando un papel significativo de la proteína tau en la enfermedad (Bierer et al. 1995).

El sistema de estratificación descrito por Braak y Braak clasificó la progresión de la formación de los ovillos neurofibrilares en la EA en seis estadios (figura 1.4).

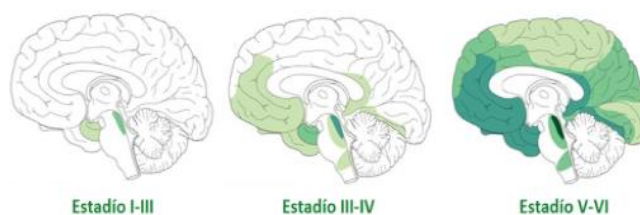


Figura 1.4: Progresión de la enfermedad de Alzheimer según los criterios de clasificación de Braak y Braak (1991). (Adaptada de Goedert, 2015)

En las primeras etapas (I-III), la enfermedad se extiende desde la corteza entorrinal hasta la formación del hipocampo, luego continúa en la región temporal, neocórtex frontal y parietal (estadios intermedios III y IV) y, por último, a las áreas sensoriales y motoras unimodales y primarias del neocórtex (estadios tardíos V y VII) (Braak y Braak 1991).

Los **ovillos neurofibrilares** están compuestos de proteína *tau* anormalmente fosforilada. La proteína *tau* es una proteína axonal que en su estado no fosforilado proporciona funciones estabilizadoras para los microtúbulos mediante la asociación con la proteína tubulina. También interviene en el transporte de componentes celulares mediante la interacción con proteínas motoras de los microtúbulos, resultando fundamental tanto para el transporte de vesículas y orgánulos en la célula como para el mantenimiento de la estructura neuronal en general. Sin embargo, esta capacidad se interrumpe cuando se fosforila, lo que conduce a la agregación de la misma y consecuentemente a la formación de los ovillos neurofibrilares (figura 1.5). La

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sz
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

acumulación de la proteína tau en los ovillos tiene como consecuencia última el deterioro del transporte axonal y, finalmente, a la muerte de la neurona (Spires-Jones et al. 2009).

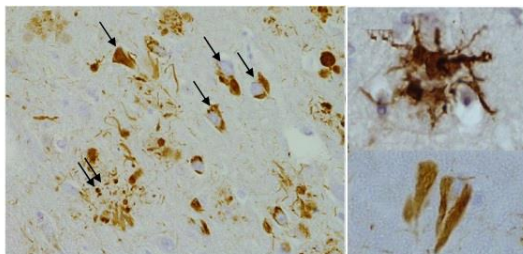


Figura 1.5: La inmunohistoquímica para la proteína *tau* muestra tanto los ovillos neurofibrilares como las placas neuríticas. (Tomado de Serrano-Pozo, 2011)

A pesar de la correlación existente entre los ovillos neurofibrilares y el deterioro cognitivo, el proceso por el cual se produce la hiperfosforilación de la proteína no se ha esclarecido.

1.3.3. Estrés oxidativo y la defensa antioxidante en la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer.

El estrés oxidativo es un proceso inducido por un desequilibrio en el estado redox celular, e implica tanto la generación en exceso de especies reactivas, bien del oxígeno o del nitrógeno, como la disfunción del sistema antioxidante (Wojsiat et al. 2018). De forma general, las especies reactivas se generan en todas las células aerobias debido al consumo de oxígeno durante la respiración celular. El cerebro, consume aproximadamente un 20% de energía del cuerpo humano, por lo que presenta una tasa elevada de consumo de oxígeno. Además posee una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados, propensos al ataque oxidativo, altas concentraciones de iones de transición redox, como el hierro o el cobre y una baja defensa antioxidante lo que hace que este órgano sea especialmente vulnerable al daño oxidativo.

Aunque el metabolismo energético y la respiración mitocondrial son las principales fuentes de producción de especies reactivas en las células, éstas pueden ser generadas también a través de otras vías enzimáticas como la glicación, donde las proteínas son modificadas por azúcares reductores (Reeg y Grune 2014).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

En general, las moléculas oxidantes o pro-oxidantes pueden ser de dos tipos: especies reactivas del oxígeno (EROS) o especies reactivas del nitrógeno (ERN). Estas a su vez pueden ser especies radicales o no radicales. Las especies radicales son aquellas que tienen existencia independiente y contienen al menos un electrón desapareado que tienden a donar, lo que le genera su alta reactividad. Por otra parte, las especies no radicales no son radicales libres *per se*, pero son moléculas que en diferentes tipos de reacciones pueden conducir indirectamente a la generación de especies radicales.

Especies radicales		Especies no radicales			
Superóxido	O ₂ ⁻	Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂	Catión nitrosil	NO ⁺
Hidroxilo	OH [·]	Oxígeno singlete	¹ O ₂	Anión nitrosil	NO [·]
Alcoxi radical	RO [·]	Ozono	O ₃	Trióxido de dinitrógeno	N ₂ O ₃
Radical Peroxilo	ROO [·]	Peroxidos orgánicos	ROOH	Tetraóxido de dinitrógeno	N ₂ O ₄
Óxido nítrico	NO [·]	Ácido hipocloroso	HOCl	Ácido nitroso	HNO ₂
Dióxido nítrico	NO ₂ [·]	Peroxinitrito	ONOOO [·]	Ácido peroxinitroso	ONOO ⁻

Tabla 1.1 especies radicales y no radicales de oxígeno y de nitrógeno

Algunas especies no radicales muy presentes en las células, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), son propensas a generar especies radicales en presencia de iones de transición redox a través de la reacción de Fenton (figura 1.6) o de Haber-Weiss (figura 1.7).

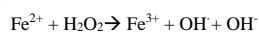


Figura 1.6: Reacción de Fenton. El peróxido de hidrógeno reacciona con el catión ferroso para formar un radical hidroxilo.

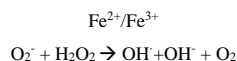


Figura 1.7: Reacción de Haber-Weiss. La presencia del catión ferroso favorece la formación del OH[·] en una interacción con O₂⁻ y H₂O₂.

Tanto las especies radicales como las no radicales, intervienen en diferentes procesos celulares en condiciones fisiológicas. Actúan en procesos de señalización, de proliferación celular y en procesos de supervivencia y senescencia celular. Sin embargo,

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

estas funciones se dan a concentraciones moderadas, por lo que la producción de EROS y ERN requiere una regulación minuciosa. De hecho cuando se produce una alteración, ya sea por un aumento de la producción de especies reactivas, como por una disminución de las defensas antioxidante, éstas dan lugar a reacciones en cadena que producen daño oxidativo que afecta indiscriminadamente a los lípidos, proteínas, polisacáridos e incluso al ADN produciendo en última instancia la muerte celular (Droge 2002).

Para evitar el ataque oxidativo, las células están provistas de defensas antioxidantes, que son moléculas enzimáticas y no enzimáticas cuya función es la de contrarrestar los efectos nocivos de las especies reactivas. En las células nos encontramos numerosos tipos moléculas antioxidantes que se engloban en tres grandes sistemas antioxidantes: el sistema clásico, el sistema del glutatión y el sistema de la tioredoxina (Wojsiat et al. 2018).

El sistema clásico se basa en la acción consecutiva de dos enzimas, mientras que los sistemas del glutatión y de la tioredoxina actúan tanto moléculas enzimáticas como no enzimáticas que fundamentalmente aprovechan la nucleofilia¹ del átomo de azufre de los grupos tiol de las cisteínas (Cys) de las proteínas. El azufre del grupo grupo tiol (-SH), al ser muy nucleofílico, es fácilmente oxidado a disulfuro (S-S) permitiendo así una serie de reacciones de reducción-oxidación (redox), reversibles en muchos casos. Aunque cada uno de estos sistemas posee sus propias características y funciones, los componentes de los mismos pueden interactuar entre sí, existiendo solapamiento a diferentes niveles (Mieyal et al. 2008) (figura 1.8).

¹ En química un nucleófilo es una especie que reacciona cediendo un par de electrones libres a otra especie (el electrófilo), combinándose y enlazándose covalentemente con ella.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

24 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

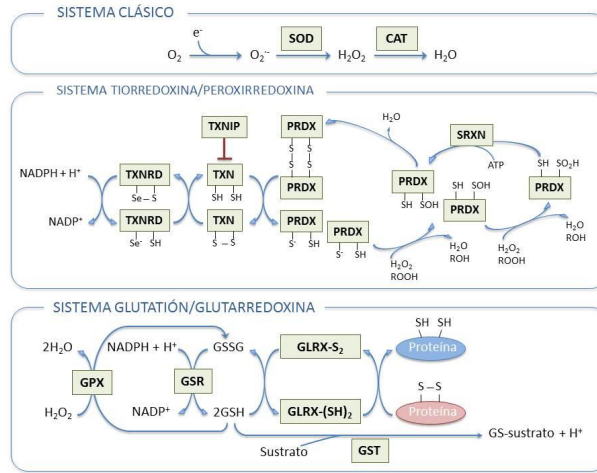


Figura 1.8: esquemas de los sistemas antioxidantes celulares. Adaptado de Díaz et al. 2019).

En las células sanas, existe un equilibrio entre los radicales generados y los que son neutralizados. Esta homeostasis se va perdiendo a medida que la célula envejece y en diferentes patologías neurodegenerativas como Enfermedad de Parkinson, Esclerosis Múltiple y Esclerosis Lateral Amiotrófica (Liu et al. 2017).

Los datos crecientes de modelos experimentales y estudios en el cerebro humano sugieren que el estrés oxidativo también juega un papel importante en la degeneración neuronal presente en la enfermedad de Alzheimer. La oxidación de las biomoléculas en el contexto de la EA está relacionada principalmente con las biomoléculas de las membranas neuronales y con una alteración de la integridad de las membranas. Implica la oxidación de lípidos (entre ellos, los ácidos grasos poliinsaturados y el colesterol), proteínas y ácidos nucleicos, y la disminución del aclaramiento del péptido β-amiloide (Cheignon et al. 2018). De hecho, la acumulación del péptido β-amiloide parece estar fuertemente asociada con el estrés oxidativo ya que se ha observado un incremento de los productos de oxidación en el hipocampo y el córtex cerebral, regiones principalmente afectadas en el curso de la enfermedad, mientras que en regiones poco afectadas como el cerebelo no aparecen estos marcadores de estrés oxidativo (Hensley et al. 1995; Sultana et al. 2006).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sZ
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

La alteración de la integridad funcional de las membranas neuronales en la EA podría ser el resultado de interacciones del péptido β -amiloide ($A\beta$) con éstas, lo que conduciría a la permeabilización de las membranas a través de varios mecanismos hipotéticos, como pueden ser la formación de poros oligoméricos de transmembrana (Butterfield and Lashuel 2010). Además de este proceso, el estrés oxidativo por sí mismo podría ser responsable de una interrupción de la integridad de la membrana. La peroxidación de lípidos podría estar implicada en una pérdida de asimetría de fosfolípidos en las membranas sinaptosomales. De hecho, esta asimetría es mantenida por la enzima flipasa, la cual es dependiente de ATP, y cuya actividad depende de al menos un residuo crítico de cisteína, oxidado por los productos de peroxidación lipídica. Este producto de peroxidación de lípidos puede conjugarse con varias proteínas de la membrana, resultando en alteraciones de su estructura y función, con la consiguiente neurotoxicidad en el cerebro de la EA (Castegna et al. 2004).

Los iones metálicos, en particular Cu^{2+} , $Fe^{2+/3+}$ y Mn^{2+} , también desempeñan un papel central en el estrés oxidativo. Están implicados en la producción y defensa de estrés oxidativo. El Cu y el Fe libres son muy eficientes catalizadores de la producción de EROS. Pueden reducirse a Cu (I) o Fe (II) mediante agentes reductores fisiológicos relevantes (como el glutatión o el ascorbato) y luego puede reaccionar con oxígeno o peróxido de hidrógeno para formar radicales superóxidos e hidroxilos, respectivamente. Por otra parte, los mismos iones están presentes en el centro catalítico de enzimas de los sistemas antioxidantes, como el Cu en el enzima superóxido dismutasa o el Fe en la catalasa. Por lo tanto, dependiendo de la coordinación, éstos pueden funcionar como pro-oxidantes o antioxidantes (Greenough, Camakaris, y Bush 2013).

1.3.4. Electrolitos y elementos traza metálicos en la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer.

En el cerebro, los electrolitos y los elementos de transición redox son requeridos a bajas concentración ya que son elementos esenciales para su desarrollo y correcto funcionamiento (anexo III). A pesar de la necesidad de los oligoelementos para el buen funcionamiento cerebral, diferentes investigaciones han propuesto como explicación a los procesos fisiopatológicos de la EA una alteración de la homeostasis de los electrolitos y metales en el cerebro (Bush y Tanzi 2008; Ayton, Lei, y Bush 2015; Chin-Chan, Navarro-Yepes, y Quintanilla-Vega 2015; Z. Zhang et al. 2016). De hecho, se han observado

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

26 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

desequilibrios iónicos significativos de Na^+ y K^+ en muestras de tejido cerebral *post-mortem* cortical de pacientes con EA, cuyos niveles disminuía en el tejido cerebral de pacientes con EA (Yu et al. 2010). Así mismo, se ha observado que la desregulación del Ca^{2+} por el retículo endoplásmico (ER) en modelos de ratones para la EA dan como resultado niveles aumentados de Ca^{2+} citosólico (Supnet y Bezprozvanny 2010).

Existe una gran cantidad de pruebas de la desregulación de iones metálicos en la EA, en particular para el Cu, el Zn y el Fe (Bonda et al. 2011; Bush 2003). Sin embargo aún queda por esclarecer si la pérdida de homeostasis metálica es un evento temprano y causal o tardío y consecuente en la EA. Un hecho bien establecido es la acumulación de Cu, Zn y Fe en las placas amiloideas, como sello distintivo de la EA (Miller et al. 2006). Diferentes estudios han observado un descenso en los niveles de Cu y Zn y un aumento de la concentración de Fe en tejido hipocampal de pacientes con EA (Deibel, Ehmann, y Markesbery 1996; Panayi et al. 2002; Akatsu et al. 2012).

La desregulación de los metales puede no sólo afectar al curso de la enfermedad mediante la interacción con una vía amiloidogénica, sino también con anomalías relacionadas con la proteína *tau* e interviniendo en procesos de estrés oxidativo. Estudios llevados a cabo por Maynard y colaboradores (2005), han demostrado que el Zn, Cu, Fe son críticos en los procesos de agregación y toxicidad del péptido β -amiloide ($\text{A}\beta$) (Maynard et al. 2005). Estudios posteriores sobre la acción de los metales en la EA han abierto amplias áreas de investigación, en las que se incluye el papel de los metales en el metabolismo y el procesamiento llevado a cabo por la proteína precursora del amiloide (APP), la escisión y la degradación de $\text{A}\beta$, y la generación de estrés oxidativo (Bandyopadhyay et al. 2013; Nakamura et al. 2007; D. G. Smith, Cappai, y Barnham 2007). Además de actuar como mediadores en la formación de las placas seniles, los metales modulan la degradación del péptido $\text{A}\beta$, interviniendo en la acción de las proteínas encargadas del aclaramiento del β -amiloide: la enzima degradante de insulina (IDE, del inglés insulin-degrading enzyme) y la neprelisina (NEP) (Duce y Bush 2010).

1.3.5. Procesos inflamatorios en la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer

La neuroinflamación es uno de los procesos ligados al desarrollo de la EA (Calsolaro y Edison 2016). La primera hipótesis que se formuló referente a la relación entre los procesos inflamatorios y la enfermedad de Alzheimer fue la llevada a cabo por

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

27 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

27 / 179

Ishii y colaboradores (1975) y más tarde contrastada por Roger y colaboradores (1988). En estos estudios se observó que los marcadores de procesos inflamatorios se encontraban regulados al alza muestras de cerebro post-mortem de enfermos de Alzheimer (Ishii y Haga 1975; Rogers et al. 1988). Investigaciones posteriores han identificado una asociación entre la demencia y los marcadores de inflamación sistémica. En análisis transversales de poblaciones clínicas, un hallazgo razonablemente coherente ha sido una asociación entre la demencia y niveles más altos de interleucina (IL)-1 β , IL-6, proteína C reactiva (PCR) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Bermejo et al. 2008; Bruunsgaard et al. 1999; Dimopoulos et al. 2006; Engelhart et al. 2004; Licastro et al. 2000; Zuliani et al. 2007; Álvarez et al. 2007). Las investigaciones recientes han ampliado recientemente la labor sobre la inflamación sistémica a los síndromes de pre-demencia como el deterioro cognitivo leve (DCL). Por ejemplo, los estudios han demostrado que se encuentran mayores niveles de TNF- α en los pacientes con DCL en comparación con los controles normales (Álvarez et al. 2007; Bermejo et al. 2008), lo que sugiere que el aumento de los procesos inflamación sistémicos están vinculados al deterioro cognitivo. Más recientemente se han utilizado métodos proteómicos en muestras de líquido cefalorraquídeo, plasma y suero para identificar las moléculas que difieren entre pacientes sanos y con Enfermedad de Alzheimer. En esos estudios se ha identificado sistemáticamente una plétora de marcadores inflamatorios que difieren en abundancia entre los grupos clínicos (Castaño et al. 2006; Finehout et al. 2007).

1.3.6. Deterioro sináptico en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer.

La degeneración sináptica es un evento temprano en la patogénesis de Alzheimer y se ha visto detectado durante el estadio de deterioro cognitivo leve (DCL). Este evento, progresa durante el curso de la EA y en la mayoría de las etapas tempranas involucra mecanismos de compensación antes de alcanzar una etapa de pérdida funcional. Las muestras de la autopsia *post-mortem* revelaron un 18% de pérdida de sinapsis en corteza e hipocampo (Scheff et al. 2007). Se ha observado que con la progresión de la enfermedad se produce una disminución constante de la población sináptica, con una pérdida de alrededor del 10-20% de las neuronas corticales (Reddy et al. 2005). Estudios recientes sugieren que los procesos de degeneración neuronal se producen de manera bifásica, produciéndose un aumento de las sinapsis en las primeras etapas de la enfermedad y posteriormente una pérdida marcada de las mismas. Este aumento transitorio inicial, fue

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

28 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

observado analizando el incremento de la concentración de la proteína sinaptosina y otras proteínas presinápticas en las zonas de asociación cortical en la fase III de Braak, antes de la patología neurofibrilar (Mukaetova-Ladinska et al. 2000). También se ha observado alteración de la proteína neurogranina, cuyas concentraciones se encuentran disminuidas en la corteza frontal (Davidson et al. 1998; Reddy et al. 2005), corteza parietal (Reddy et al. 2005) e hipocampo (Davidsson y Blennow 1998) de pacientes que han padecido la EA. Otros estudios han observado un aumento de la proteína presináptica drebrina en la corteza frontal de los pacientes con DCL seguido de una disminución del 40% al 60% en la EA severa (Counts et al. 2006), así como un aumento en la expresión de la proteína post-sináptica PSD-95 en el cerebro con EA (Leuba et al. 2008). También se ha documentado una elevación en la densidad del botones glutamatérgicos presinápticos en el giro medio frontal de los pacientes con deterioro cognitivo leve (Bell, Bennett, y Cuello 2007). La resonancia magnética funcional (RMN_f) en pacientes con DCL sugiere de manera similar que podría haber una fase de activación paradójicamente aumentada al principio del curso de la EA prodrómica (Sperling et al., 2007). También se ha descubierto que se produce una alteración de las proteínas acetilcolinesterasa (AChE) y butilcolinesterasa (BuCh), implicadas en la degradación de la acetilcolina y en otros procesos como la sinaptogénesis (Lane, Kivipelto, y Greig 2004). Las pérdidas marcadas de neuronas colinérgicas, principalmente de la base del cerebro, están asociadas con una deficiencia en la actividad colinérgica, que afecta no sólo a las subunidades de receptores de acetilcolina, sino también a la síntesis acetilcolina (Ferreira-Vieira et al. 2016).

1.3.7. Moléculas de señalización neuronal y de las balsas lipídicas en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer.

Las balsas lipídicas, o *lipid rafts*, son microdominios de membrana que se caracterizan por presentar una composición rica en colesterol, esfingolípidos, ácidos grasos saturados, lo que les hace insolubles en detergentes no iónicos. Su función es actuar como plataformas de anclaje para la interacción entre proteínas y lípido-proteínas, siendo lugares en los que se localizan procesos esenciales de comunicación celular, tráfico de membranas y transducción de señales (Hicks, Nalivaeva, y Turner 2012) (figura 1.9).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

29 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

29 / 179

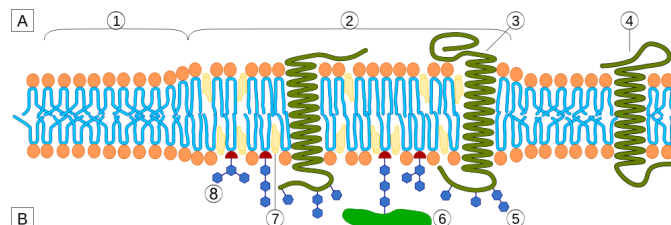


Figura 1.9: Esquema de la composición de una balsa lipídica. A: espacio intracelular o citosol; B: espacio extracelular; 1.membrana celular; 2: balsa lipídica; 3: proteína transmembrana asociada a la balsa lipídica; 4: proteína de membrana 5: modificaciones de glicosilación (sobre glicoproteínas y glicolípidos); 6: proteína anclada en el GPI; 7: colesterol; 8: glicolípidos.

En estas regiones se encuentran incluidas las plataformas de señalización (signalosomas) formadas por un subconjuntos de proteínas que se organizan en clústers multimoleculares implicados en diferentes respuestas celulares (Levental, Grzybek, y Simons 2010). En los *lipid rafts*, las moléculas pueden moverse e interactuar con diferentes cinéticas en respuesta a una variedad de ligandos intra y/o extracelulares que en última instancia pueden favorecer interacciones de proteínas específicas y la activación de cascadas de señalización.

Durante el proceso patogénico de la Enfermedad de Alzheimer se ha observado una alteración de la composición lipídica y proteica de las membranas neuronales, en concreto en los *lipid rafts*. Dado que la estructura y la actividad de la balsa lipídica requieren una proporción particular de distintas clases de lípidos, las alteraciones en el contenido de lípidos en estos microdominios pueden conducir a un funcionamiento anormal que puede contribuir a eventos neuropatológicos. Algunos resultados han reportado que la pérdida de la integridad de la balsa de lípidos se correlaciona en general con la progresión del envejecimiento cerebral (Fabelo et al. 2014). Además una consecuencia de la inestabilidad lipídica de los microdominios de membrana es la alteración de la funcionalidad, que produce un cambio en las interacciones moleculares y en el tráfico de proteínas integradas en las plataformas de señalización, afectando así a las interacciones entre lípidos y proteínas (Molander-melin et al. 2005; Díaz et al. 2014). Además, las proteínas pueden adoptar plegamientos aberrantes y adoptar configuraciones anormales que pueden conducir a agregados tóxicos y a una señalización intra-extracelular disfuncional. De hecho, se ha observado que la acumulación e interacción de las proteínas clave involucradas en el procesamiento de β -amiloide: la APP y β -

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguilár UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
---	----------------------------

secretasa (BACE) es promovida por alteraciones lipídicas en estos microdominios (Parsons y Austen 2007; Vetrivel et al. 2009). De igual forma, se ha observado que el complejo molecular formado por el receptor de estrógeno (RE α), el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) y la caveolina-1 (Cav1) parece estar alterado en los *lipid rafts* en las últimas etapas de la EA. Así, en balsas lipídicas de distintas áreas corticales de los cerebros con EA, el VDAC mantiene, e incluso aumenta, su asociación con la caveolina-1, mientras que el RE α se enriquece principalmente en astrocitos, en particular, alrededor de las placas amiloides (Ramírez et al. 2009).

Por otra parte, diferentes estudios han indicado que la dinámica de movimiento dentro y fuera de los *lipid rafts* de la proteína precursora de amiloide (APP) puede modular la formación de A β (Vetrivel et al. 2009). Así mismo, se ha observado que la exclusión de la proteína α -secretasa de los *lipid rafts*, favorece la generación de A β ya que la proteína α -secretasa en estas balsas compete con BACE, aumentando la proteólisis no amiloidogénica del APP (Hicks, Nalivaeva, y Turner 2012).

1.4. Biomarcadores y Enfermedad de Alzheimer

Se estima que en 2050, aproximadamente 80 millones de personas sufrirán de EA en todo el mundo. Por lo tanto, es un gran desafío actual el establecimiento de marcadores eficientes y específicos para diagnosticar y monitorizar el progreso de la enfermedad en sus estadios más tempranos. Por otro lado, el diagnóstico basado en criterios clínicos, que incluyen la historia clínica y el examen físico, pruebas de laboratorio (análisis sanguíneos), neuroimagen y la evaluación neuropsicológica presentan una sensibilidad del 90-95% mientras que la especificidad es tan solo del 50-60%. Este hecho dificulta el poder discernir entre la comorbilidad con otras enfermedades neurodegenerativas, ya que la EA presenta síntomas que son compartidos con una variedad de desórdenes neurológicos.

Un marcador biológico, o biomarcador, se puede definir como cualquier entidad que puede ser medida y evaluada objetivamente y sea indicador de un proceso biológico normal, de un proceso patológico o de una intervención terapéutica (Group 2001). La sensibilidad, la especificidad y la facilidad de uso son los factores más importantes que, en última instancia, definen la utilidad diagnóstica de un biomarcador. Para que un biomarcador de diagnóstico sea útil, deben cumplirse los siguientes criterios (Hampel, Lista, y Khachaturian 2012):

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

31 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

- Reflejar procesos fisiopatológicos básicos de la enfermedad.
- Presentar alta sensibilidad y una alta especificidad para la enfermedad en comparación con las afecciones.
- Permitir mediciones repetidamente a lo largo del tiempo.
- Permitir la reproducibilidad en laboratorios de todo el mundo.
- Ser medible en pruebas no invasivas y fáciles de realizar.
- Las pruebas deben ser económicas y rápidas.
- Definir buenos valores de corte para distinguir enfermedades.

1.4.1. Marcadores para la enfermedad de Alzheimer.

1.4.1.1. Marcadores de imagen.

En las últimas décadas los marcadores de imagen han cobrado una especial relevancia debido a su carácter no invasivo y por tener la capacidad de detectar cambios patológicos con el tiempo. Los marcadores de imagen más utilizados actualmente para la EA son los siguientes: resonancia magnética estructural (RMN) y funcional (RMN_f), tomografía de emisión de positrones (TEP) y la tomografía computarizada por emisión de un solo fotón (del inglés SPECT, *single-photon emission computed tomography*) (Henriques et al. 2018).

La RMN estructural es el biomarcador más comúnmente utilizado para ayudar en el diagnóstico de la EA. La RMN a menudo muestra atrofia en áreas de la corteza y en áreas prototípicas del cerebro afectadas por esta enfermedad (generalmente lóbulos temporales mediales simétricos y los lóbulos biparietales en la EA). Sin embargo, es necesario complementar esta técnica con otras adicionales de patrones espaciales de neurodegeneración (como pueden ser el TEP o SPECT) para confirmar un diagnóstico de EA (Sheikh-Bahaei et al. 2017).

A pesar de los esfuerzos por desarrollar marcadores de imagen, éstos no son capaces de discriminar entre patologías que cursan con demencias. Estas técnicas no permiten diferenciar las demencia de inicio temprano, las demencias atípicas que no cumplen con los criterios clínicos clásicos, o aquellos casos con fuertes factores de confusión por antecedentes (demencia vascular, depresión, abuso de alcohol) pero con una sospecha de una patología subyacente de EA, por lo que este tipo de técnicas solo contribuyen a incrementar la especificidad del diagnóstico (McKhann et al. 2011).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

32 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

1.4.1.2. Marcadores bioquímicos

a) El líquido cefalorraquídeo

El líquido cefalorraquídeo (LCR) es un fluido incoloro con varias funciones dentro del sistema nervioso que involucran aspectos estructurales, hidrodinámicos, metabólicos e inmunológicos. El LCR influye en la homeostasis metabólica del sistema nervioso central (SNC) manteniendo el ambiente electrolítico y el equilibrio ácido-básico, sirviendo como medio para el suministro y transporte de nutrientes, hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos a las células neuronales y gliales y funcionando como un sistema de filtrado para la eliminación de los productos de degradación del metabolismo celular. De este modo, el LCR ha sido considerado como un "sumidero" por el cual las diversas sustancias de desecho que se forman en el tejido del SNC durante su actividad metabólica difunden rápidamente en el LCR, y desde allí, se reabsorben hacia el sistema vascular (Davson, Domer, y Holungsworth 1973).

El LCR es producido principalmente por el plexo coroideo en los ventrículos. El resto del LCR está formado por el intersticio y las meninges. Mientras que el plexo coroideo y el parénquima cerebral dan lugar a la mayor parte del LCR ventricular, las meninges y raíces dorsales contribuyen significativamente a la formación del LCR lumbar (Davson, Domer, y Holungsworth 1973; Cserr, Harling-Berg, y Knopf 1992). La cantidad de LCR producida a una tasa de 0.3-0.4 mL min⁻¹ es de aproximadamente 450-550 mL en 24 horas, y la rotación total del mismo oscila aproximadamente entre 3 y 5 veces por día (Davson, Domer, y Holungsworth 1973; Nakada y Kwee 2019). De acuerdo con el concepto clásico, el LCR circula a través de los ventrículos, las cisternas y el espacio subaracnoideo para finalmente ser absorbido por la sangre a nivel de las vellosidades aracnoides. Entre el 10-15% del LCR se drena en los vasos linfáticos que fluyen a través de los espacios perineurales de los nervios craneales y espinales (Davson, Domer, y Holungsworth 1973; Cserr, Harling-Berg, y Knopf 1992).

Los compartimentos que se encuentran en el SNC están separados por un sistema de barreras, la barrera hematoencefálica (BBB del inglés *blood-brain barrier*) y barrera de sangre-LCR (BCB del inglés *blood-cerebrospinal fluid-barrier*). Ambas son importantes para el mantenimiento del entorno cerebral y la protección del cerebro de la circulación sistémica. Aunque difieren tanto morfológicamente como en sus propiedades físicas, ambas barreras no son completamente impermeables entre sí, y permiten el intercambio entre el tejido cerebral y la sangre. Todas las moléculas que provienen de la

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

33 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

33 / 179

sangre y que atraviesan la barrera hematoencefálica del LCR lo hacen por difusión (por ejemplo, transporte pasivo o facilitado de proteínas) o por transporte activo (como es el caso de la glucosa). El LCR contiene aproximadamente 150-450 mg/L de proteínas plasmáticas dependiendo de la edad y el sitio de muestreo (LCR ventricular vs. lumbar). La mayor parte del contenido proteico del LCR lumbar es derivado de la sangre (80%), y el resto (20%) consiste en proteínas derivadas del cerebro o producidas intratecalmente². En condiciones fisiológicas, las proteínas derivadas de la sangre entran en el compartimento del LCR por difusión en función de su tamaño molecular y de su concentración sanguínea. Cuanto mayor sea el tamaño de la proteína, mayor será el gradiente de concentración entre la sangre y el LCR (por ejemplo, IgM > IgA > IgG > albúmina) (tablas 1.2 y 1.3) (Felgenhauer, Schliep, y Raptic 1976).

Tabla 1.2: Principales proteínas derivadas de la sangre en el LCR (80% de proteínas totales del LCR)

Proteína	LCR	Sangre	Ratio LCR-sangre
Proteína total	200-500 mg/L	60-80 g/L	-
Albúmina	150-350 mg/L	35-55 g/L	<8 × 10 ⁻³
IgG	<40 mg/L	7-16 g/L	<6 × 10 ⁻³
IgA	<6 mg/L	0.7-4.0 g/L	<4 × 10 ⁻³
IgM	<1 mg/L	0.4-2.3 g/L	<1.8 × 10 ⁻³

Tabla 1.3: Composición proteica del líquido cefalorraquídeo y de la sangre

Proteína	LCR	Sangre	Síntesis intratecal (%)
Transtiretina	17 mg/L	250 mg/L	93
Prostaglandina-D-sintasa	15 mg/L	0.5 mg/L	>99
Cistatina-C	3 mg/L	0.5 mg/L	>99
Apolipoproteína E	6 mg/L	93.5 mg/L	90
Neopterina	4.2 mg/L	5.3 nmol/L	98
Enolasa específica de neurona (EEN)	5 mg/L	6 µg/L	99
Proteína ácida fibrilar glial	0.12 mg/L	0	100
Ferritina	6 mg/L	120 µg/L	97
Proteína S-100	2.9 mg/L	0.12 µg/L	>99
Proteína básica de mielina	0.5 mg/L	0	100
Proteína tau	0.2 mg/L	0	100
Neurofilamentos	0.1 mg/L	0	100

Debido a las restricciones existentes entre el paso de moléculas a través de la barrera hematoencefálica y de la barrera-LCR-sangre, el LCR ha sido la fuente más exitosa para encontrar biomarcadores para la patología de la enfermedad de Alzheimer. El LCR está en contacto directo con el espacio extracelular en el cerebro, por lo que se considera que

² Intratecal: Que se produce en el espacio subaracnoideo.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

los biomarcadores del LCR reflejan los cambios bioquímicos en el cerebro mejor que otros fluidos biológicos como el plasma, suero o la orina (Hampel, Lista, y Khachaturian 2012). En este sentido, son tres los biomarcadores aceptados que reflejan el núcleo la patología de la EA (Jack et al. 2018), y que se describen a continuación:

- **Péptido β -amiloide**

El péptido β -amiloide se produce durante el metabolismo celular normal y se secreta en el LCR (Seubert et al. 1992). Mediante diferentes métodos de ensayo inmunoenzimático (ELISA del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), se ha observado que los niveles del péptido β -amiloide de 42 aminoácidos ($A\beta_{42}$) presentes en el líquido cefalorraquídeo son aproximadamente un 50% más bajos en los pacientes con EA en comparación con pacientes sanos. La explicación más frecuente de la reducción de los niveles de $A\beta_{42}$ es que se produce su deposición y acumulación durante la formación de las placas seniles en el parénquima cerebral, dejando una menor disponibilidad para su difusión en el LCR (Sunderland et al. 2003; Blennow y Hampel 2003). Así mismo, se ha demostrado que el $A\beta_{42}$ presenta baja solubilidad, lo que dificulta su excreción hacia el LCR. Por otra parte, se ha descrito que la carga de las placas cerebrales en la autopsia se correlaciona inversamente con los niveles de $A\beta_{42}$ en el LCR lumbar antes de la muerte y en el LCR ventricular después de la muerte (Tapiola et al. 2009; Strozyk et al. 2003). Posteriormente se han estudiado diferentes isoformas del péptido β -amiloide, y se ha observado que los niveles de las formas más cortas del péptido no se modifican en la EA (Sunderland et al. 2003; Schoonenboom et al. 2005). Los estudios de investigación clínica y la evaluación de estos biomarcadores han sugerido que la disminución de los niveles de LCR $A\beta_{42}$ puede ocurrir al menos 20-25 años antes de la demencia clínica (Ringman et al. 2012).

- **Proteína tau**

El segundo marcador utilizado para el diagnóstico de la EA, corresponde a la proteína *tau*, involucrada en la formación de los ovillos neurofibrilares. El aumento de esta proteína en LCR es indicativo de daño y degeneración neuronal y axonal. En este sentido, en los controles sanos, los niveles de *tau* total en el LCR aumentan con la edad: <300 pg/ml (21-50 años), <450 pg/ml (51-70 años) y <500 pg/ml (>70 años). Sin embargo, los niveles totales de tau aumentan significativamente en los pacientes con EA

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

35 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

en comparación con los sujetos de control compatibles con la edad con un corte de >600 pg/ml (Sjögren et al. 2001).

- **Proteína tau fosforilada.**

El tercer biomarcador está directamente relacionado con el anterior. Se trata de la proteína tau fosforilada. La forma (hiper)fosforilada de la proteína tau es indicativa del daño neuronal y axonal característica de la enfermedad de Alzheimer (Blennow y Hampel 2003). Dentro de los residuos fosforilados más conservados se encuentra la serina del residuo 181 (tau_{181p}) y al igual que su homólogo no fosforilado, la concentración de la tau fosforilada es superior en pacientes con EA que en sujetos controles, con un corte de 65 pg/ml (Sjögren et al. 2001).

b) Otros fluidos como fuente de biomarcadores

El proceso de obtención de líquido cefalorraquídeo por punción lumbar (PL) es un método invasivo y se asocia con un riesgo pequeño, pero significativo, de cefalea posterior a la extracción (Almeida et al. 2011). Dada la percepción pública negativa del procedimiento de la punción lumbar, es poco probable que todos los pacientes en un ensayo clínico estén dispuestos a realizarse una extracción de LCR. Una alternativa es utilizar muestras de sangre o suero, las cuales se obtienen fácilmente y su extracción es ampliamente aceptada por los pacientes. El desarrollo de un biomarcador de suero fidedigno podría integrarse potencialmente en un proceso de detección y diagnóstico. Ello proporcionaría información valiosa sobre qué pacientes deberían someterse a pruebas más invasivas (y costosas), y para controlar la progresión de la enfermedad (Henriksen et al. 2013). Sin embargo, hasta el momento ha habido poco éxito en la búsqueda de biomarcadores séricos fiables para la enfermedad de Alzheimer (Blennow y Zetterberg 2009), aunque se han realizado numerosos estudios para la detección de los mismos.

Además del suero, la saliva y la orina han sido fluidos atractivos para la búsqueda de marcadores debido a su fácil recolección. Sin embargo, las moléculas muestreadas provenientes de estas fuentes se someten a filtración o procesamientos metabólicos y pueden no reflejar los cambios bioquímicos que se producen en el cerebro (Zürbig y Jahn 2012). Se necesita más investigación sobre estos fluidos de fácil acceso para determinar si podrían proporcionar información significativa sobre los estados cerebrales en procesos de neurodegeneración.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

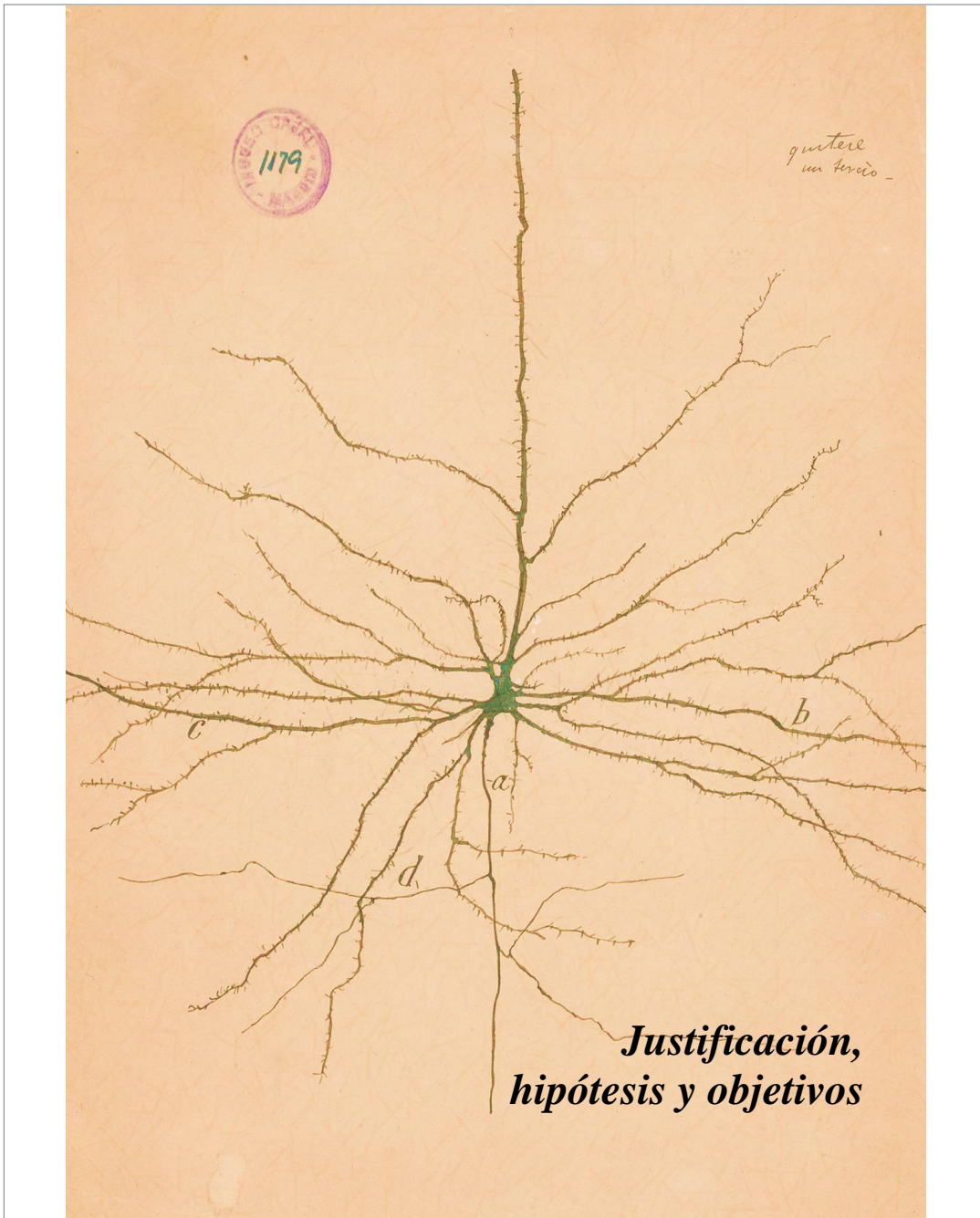
36 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

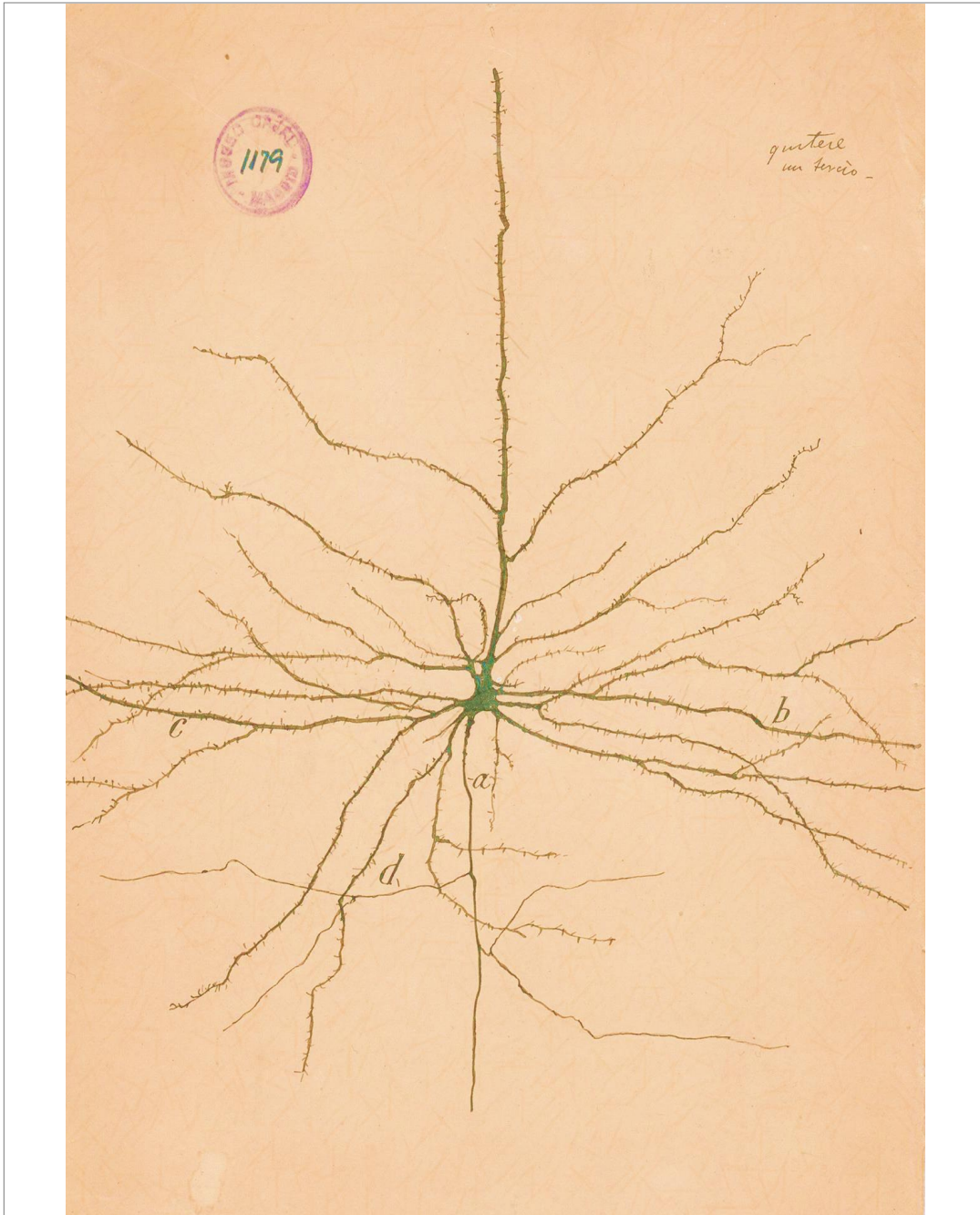
37 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

37 / 179



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

38 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

38 / 179

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Justificación

La enfermedad de Alzheimer representa la forma más común de demencia en personas de edad avanzada, llegando a afectar a más del 50% de los pacientes mayores de 85 años. Debido al progresivo envejecimiento de la población, se estima un incremento crítico en la incidencia de la enfermedad para las próximas décadas, con un enorme impacto sociosanitario, por lo que el diagnóstico precoz de la enfermedad representa un reto de tremenda importancia para la sociedad actual.

Actualmente, los marcadores presentes en el líquido cefalorraquídeo relacionados con la Enfermedad de Alzheimer que se incorporan en los diferentes criterios diagnósticos están vinculados con daños neurohistológicos que se presentan en el tejido cerebral de los pacientes con la enfermedad. Sin embargo, una de las grandes problemáticas existentes con éstos, es que sólo proporcionan diagnósticos confirmativos, pero no desvelan los cambios que se producen durante las etapas prodrómicas de la enfermedad (Zhang et al., 2005). En este sentido, el estudio de la fisiopatología y de los procesos bioquímicos y metabólicos de la enfermedad que se producen en la fase prodrómica son fundamentales, no sólo para desarrollar marcadores que mejoren el diagnóstico de las etapas de progresión hacia la enfermedad, sino también para comprender mejor las bases moleculares de esta patología neurodegenerativa, y que a su vez permitan desarrollar estrategias terapéuticas que ayuden a retrasar su aparición e incluso detener los síntomas clínicos de la enfermedad de Alzheimer.

2.2. Hipótesis

Existen evidencias y un gran consenso sobre el hecho de que los procesos degenerativos en la Enfermedad de Alzheimer comienzan años antes de que aparezcan los primeros síntomas clínicos de la enfermedad. En este estudio, se ha analizado parcialmente la estructura neuroquímica del líquido cefalorraquídeo en una cohorte de pacientes en diferentes estadios de acuerdo con la magnitud de sus alteraciones psicométricas. Estos estadios se corresponderían con los de la progresión hacia la enfermedad de Alzheimer, desde estadios que no manifiestan alteraciones cognitivas apreciables hasta pacientes con demencia tipo Alzheimer establecida. En nuestra hipótesis, se ha asumido una secuencia lineal entre estadios que culminarían en la

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

39 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Enfermedad de Alzheimer, a la que denominamos *Espectro* o *Continuum* de la enfermedad. Y aunque no se ha seguido la evolución de los sujetos mediante un estudio longitudinal (con el objeto de conocer la evolución real entre estadios), en esta tesis doctoral se pretende determinar si las alteraciones de la composición del líquido cefalorraquídeo en etapas consideradas prodrómicas y en la Enfermedad de Alzheimer permiten identificar nuevos marcadores diagnósticos suficientemente sensibles capaces de predecir el estadio la enfermedad, así como su evolución a lo largo de la misma.

2.3. Objetivos principales

- Desarrollar un panel de potenciales biomarcadores del líquido cefalorraquídeo para cada uno de los grupos que forman el *continuum* de la enfermedad de Alzheimer.
- Estudiar la relación de los biomarcadores entre sí para cada uno de los grupos de estudio y sus posibles variaciones a lo largo del espectro de la enfermedad de Alzheimer.
- Explorar herramientas multivariantes que permitan discriminar a los grupos de pacientes dentro del *continuum* en función de la composición de marcadores presentes en el líquido cefalorraquídeo.

2.4. Objetivos específicos

- Evaluación de los marcadores clásicos en el espectro de la Enfermedad de Alzheimer.
- Evaluación de las concentraciones de cationes divalentes, metales traza y metales neurotóxicos como marcadores en el espectro de la Enfermedad de Alzheimer.
- Evaluar los marcadores del estado oxidativo e inflamatorio en el espectro de la Enfermedad de Alzheimer
- Evaluar las proteínas del signalosoma y otras proteínas implicadas en procesos degenerativos en el espectro de la Enfermedad de Alzheimer.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

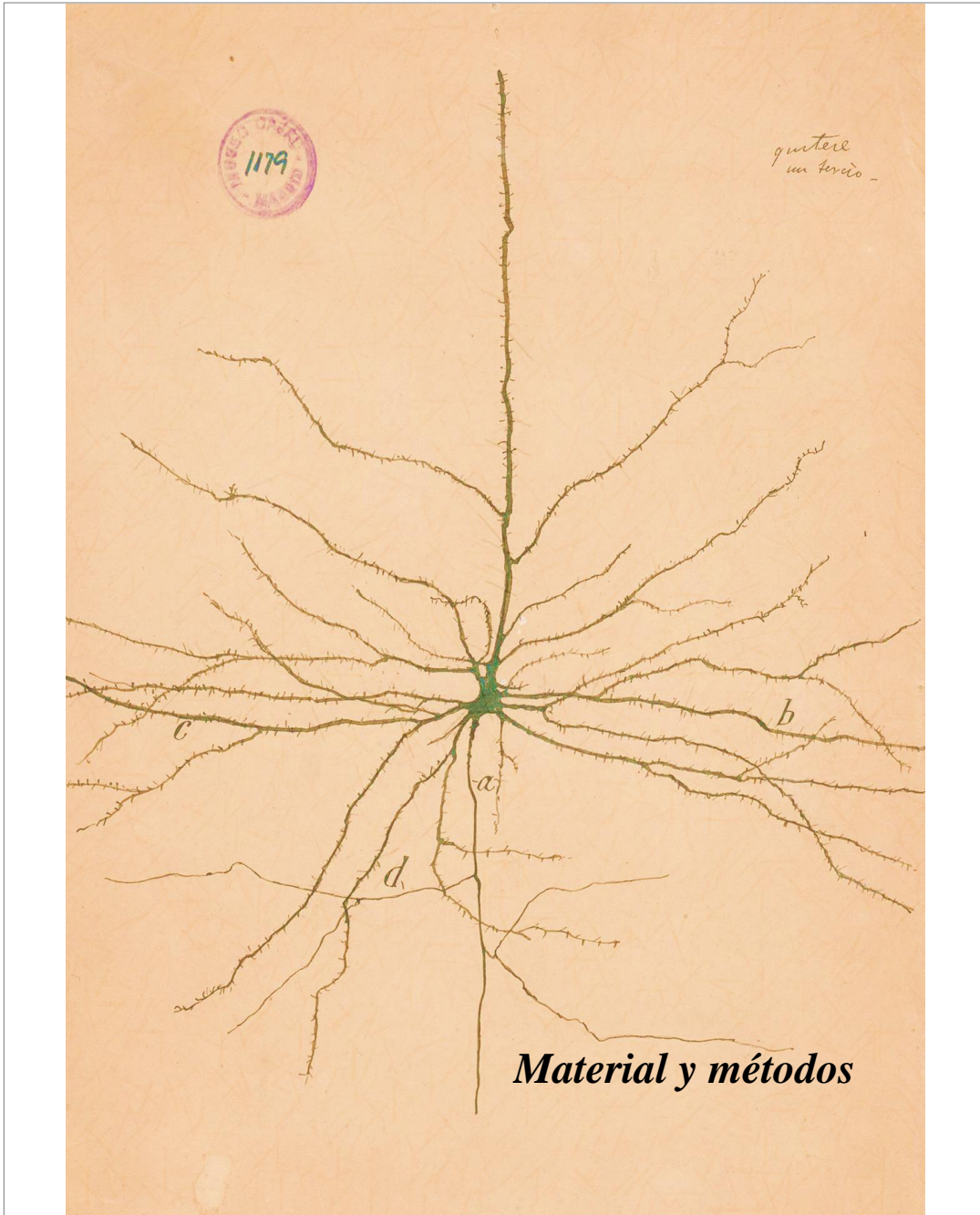
40 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

40 / 179



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

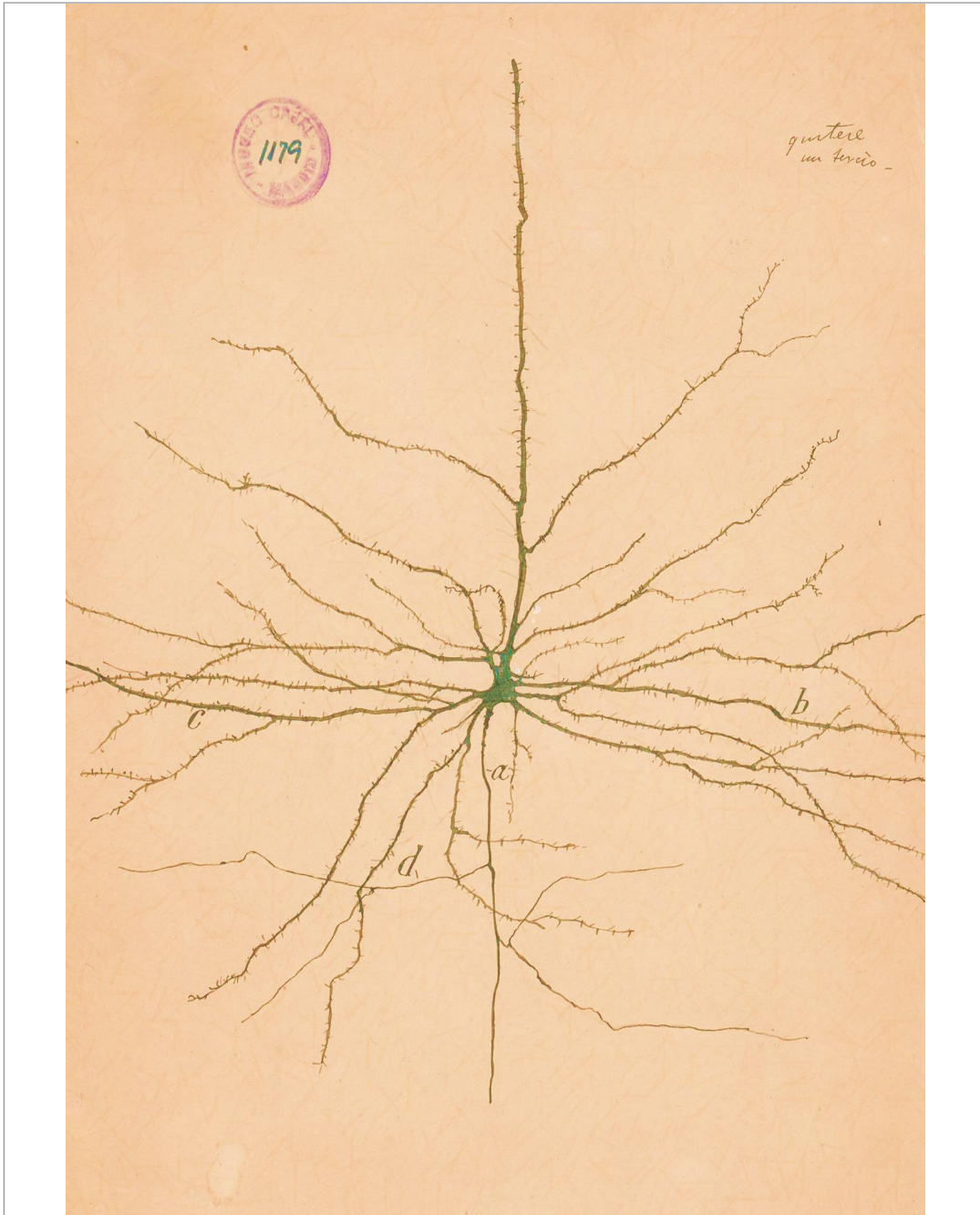
41 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

41 / 179



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

42 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

42 / 179

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Pacientes

En este estudio se utilizaron muestras de líquidos cefalorraquídeos ~~humano~~ procedente pacientes, todos mayores de 59 años, evaluados y clasificados previamente por especialistas del área de neurología del Hospital Universitario de Canarias y del Hospital Universitario Dr. Negrín de las Palmas de Gran Canaria. Se recolectaron un total de 80 muestras procedentes de pacientes anónimos que fueron clasificadas de acuerdo criterios de *Global Deterioration Scale* (GDS) en cuatro grupos de estudio, definiéndose cada uno de ellos como:

- **Pacientes controles (CTRL):** aquellos pacientes de edad avanzada, los cuales no presentan características clínicas de enfermedad neurodegenerativas ni déficits de memoria evidentes tras un examen neurológico, correspondiendo al criterio establecido GDS = 1.
- **Pacientes con queja subjetiva de memoria (QSM):** aquellos pacientes de edad avanzada que no mostraron evidencias objetivas de déficit de memoria en la entrevista clínica ni tampoco mostraron déficits objetivos en el empleo ni en las situaciones sociales. Sin embargo, referían quejas subjetivas de memoria, como olvidar donde habían colocado objetos familiares, olvidar nombres que antes se conocían bien y que mostraban preocupación respecto a la sintomatología, correspondiendo al criterio 2 establecido según el *Global Deterioration Scale* (GDS=2).
- **Pacientes con diagnóstico de deterioro cognitivo leve (DCL)** se incluyeron todos los pacientes que forman parte del espectro de deterioro cognitivo leve, tanto en fases amnésicas como no amnésicas. Los pacientes que formaron parte de este grupo presentaron bajo rendimiento cognitivo sin afectación por éste en las actividades de la vida diaria, siendo clasificados tras la evaluación con el criterio 3 establecido según el *Global Deterioration Scale* (GDS=3).
- **Pacientes con Enfermedad de Alzheimer (EA)** aquellos que tras la valoración previa de un neurólogo satisficieron los criterios diagnósticos descritos en el Manual de Diagnóstico Estadístico de Desórdenes Mentales (DSM-V) de la Asociación Americana de Psiquiatría (2013). Estos pacientes mostraron bajo

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

43 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

rendimiento cognitivo y afectación de las actividades de la vida diaria según los criterios establecidos según el *Global Deterioration Scale* (GDS=4).

En la tabla 3.1 se muestra el resumen de todos los casos, rangos de edad y género.

Tabla 3.1: Resumen de los casos del estudio. H: Hombre, M: Mujer.

Grupo	Número de casos	Rango de edad	Sexo (H/M)
Controles (CTRL)	15	64-85	7/8
Queja subjetiva de memoria (QSM)	9	60-79	3/6
Deterioro Cognitivo Leve (DCL)	29	65-90	12/17
Enfermedad de Alzheimer (EA)	17	70-87	7/10
Totales	70	-	29/41

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Sospecha de daño cerebral focal o difuso debido a condiciones clínicas diferentes a la EA;
- Enfermedades sistémicas no controladas o delirio en los últimos 30 días;
- Antecedentes de drogadicción o alcoholismo;
- Estar bajo tratamiento para la EA;
- Antecedentes de depresión mayor o estar bajo tratamiento con dos o más antidepresivos;
- Más de una dosis diaria de benzodiazepinas;
- Trastornos perceptivos o motores graves.

Todas las muestras procedieron de donaciones realizadas con el consentimiento informado del paciente o de sus familiares siguiendo el reglamento establecido por el Comité de Ética del Hospital Universitario de Canarias, el Comité ético del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, el Código de Principios Éticos para las Investigaciones Médicas en Seres Humanos de la Asociación Mundial de Medicina (Declaración de Helsinki), y la Ley 14/2007 de investigación biomédica.

3.2. Obtención y tratamiento de las muestras

Las muestras de líquido cefalorraquídeo fueron extraídas por personal médico siguiendo el protocolo hospitalario establecido para ello. Durante la extracción se descartaron los primeros 0,5 ml - 1 ml para evitar contaminación por sangre. Se obtuvieron 8-10 ml en un tubo de polipropileno y posteriormente el fluido fue centrifugado a 2000 g durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, para realizar este estudio se separó una alícuota de 1,5 ml en un tubo de polipropileno, las cuales fueron

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis según se especifica en el protocolo para la estandarización de recolección de líquido cefalorraquídeo (Teunissen et al. 2009). Las muestras que presentaron sedimentos sanguíneos fueron descartadas del estudio.

3.3. Determinación de la composición iónica del líquido cefalorraquídeo

3.3.1 Determinación de la concentración de cationes divalentes.

La determinación de calcio y magnesio se llevó a cabo mediante espectroscopia de absorción atómica en llama utilizando aire/acetileno para el caso del magnesio y óxido nitroso/acetileno para el caso del calcio. Para ello, las muestras de LCR fueron sometidas a una centrifugación a 1600g durante 5 minutos en una centrífuga Allegra 25R (Beckman Coulter). Posteriormente, las muestras fueron diluidas 1:100 para la determinación de calcio y 1:75 para la determinación de magnesio en óxido de lantano (La_2O_3) 10g/L. La concentración de los electrolitos en estudio se determinó mediante la interpolación del valor de absorbancia de la muestra en una recta patrón de concentración conocida.

Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica Varian SpectrAA-10 Plus utilizando lámparas de cátodo hueco para cada uno de los elementos estudiados. Las condiciones para determinar cada uno de los diferentes elementos se recoge en la siguiente tabla (tabla 3.2)

Tabla 3.2: Condiciones de determinación del Ca y Mg

Elemento	Anchura de rendija	Tipo de llama	Longitud de onda	Corriente de lámpara
Ca	0.5 nm	Óxido nitroso-acetileno	422.7 nm	10 mA
Mg	0.5nm	Aire-acetileno	285.2 nm	4.0 mA

3.3.2. Determinación de elementos traza (cobre, manganeso, hierro, zinc, selenio y aluminio) por ICP-MS.

La determinación de los elementos traza (Fe, Cu, Mn, Zn, Se y Al) se llevó a cabo mediante ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Para ello, las muestras de LCR se diluyeron 1:20 en una solución de HNO_3 al 5% con 1 g/L de Rh. A continuación, las muestras se filtraron utilizando un filtro de 0,45 micras para eliminar cualquier tipo de resto biológico. Para asegurar la exactitud de los métodos analíticos y los resultados, se analizaron muestras de control de calidad junto con las muestras analizadas. En el análisis de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente, se utilizó un control de suero liofilizado para oligoelementos

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

45 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

45 / 179

(ClinChek® Controls). Los valores obtenidos para las muestras de control de calidad mostraron buena concordancia con las concentraciones recomendadas.

Para la determinación de los elementos totales, las soluciones patrón se prepararon mediante dilución de un patrón multielemento (1000 mg/l en 1 M HNO₃) obtenido de Merck (Darmstadt, Alemania). La concentración de los metales traza en estudio se determinó mediante la interpolación del valor de absorbancia de la muestra en una recta patrón de concentración conocida.

3.4. Determinación de actividades enzimáticas.

3.4.1 Determinación de la actividad superóxido dismutasa

Las determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) se llevó a cabo utilizando el método descrito por nuestro laboratorio (Mesa-Herrera, Quinto-Aleman, y Díaz 2019). El fundamento de esta técnica se basa en la autooxidación del pirogalol (1,2,3-bencenotriol o ácido pirogálico), un compuesto que en soluciones alcalinas se autooxida rápidamente generando radicales superóxido en el medio, los cuales aceleran la autooxidación de éste (Mahnheim, 1988). La autooxidación del pirogalol, produce la formación de purpurogalina, un compuesto amarillo-marrón con un pico máximo de absorbancia de $\lambda=420$ nm y con coeficiente de extinción molar $2640 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Cuando la SOD está presente en el medio, la enzima compite con el pirogalol por el radical superóxido, inhibiéndose la reacción de autooxidación, lo que implica menor formación de purpurogalina. La formación de purpurogalina es susceptible de ser medida espectrofotométricamente en el tiempo, por lo que se puede aprovechar para cuantificar la actividad SOD de una muestra midiendo la inhibición de la autooxidación del pirogalol respecto de un control.

Los ensayos se realizaron con las siguientes condiciones: para un volumen total de 1 ml, se utilizó buffer Tris-Cacodílico 50 mM 1mM DTPA (pH 8.2), 0.3 mM de pirogalol, 100 μl de muestra, sustituidos en el blanco y en el control por 100 μl del agua Milli-Q y temperatura de 37°C. La reacción se inició mediante la adición de pirogalol y los cambios de absorbancia se midieron a 420 nm en un espectrofotómetro lector de placas Appliskan multiplate reader (Thermo Scientific). La actividad específica de SOD se expresó en unidades/mg de proteína. Una unidad se define como la cantidad de enzima necesaria para obtener el 50% de la autooxidación de pirogalol.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

46 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

3.4.2 Determinación de la actividad glutatión-S-transferasa (GST)

La determinación de la actividad glutatión-S-transferasa se llevó a cabo siguiendo el método de Habdous y colaboradores (Habdous et al. 2002). El fundamento de la técnica se basa en la capacidad que tiene la enzima glutatión-S-transferasa para conjugar el glutatión reducido (GSH) con el 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB) a través del grupo tiol de la enzima para formar el complejo tioéter glutatión-dinitrobenzono y ácido clorhídrico.



Figura 3.1: formación del tioéter glutatión-dinitrobenzono y ácido clorhídrico por acción de la enzima glutatión-S-transferasa

El tioéter glutatión-dinitrobenzono, absorbe luz a $\lambda=340$ nm, siendo la tasa de incremento de absorbancia directamente proporcional a la actividad de la enzima GST en la muestra.

Los ensayos se realizaron con las siguientes condiciones: tampón fosfato potásico 100 (pH 6.5), GSH 5 mM, CDNB 1 mM y 37°C de temperatura. En todos los ensayos, para un volumen total de reacción de 1.0 ml, se utilizaron 50 μ l de muestra añadidos al buffer de reacción, sustituidos en el blanco y en el control por 50 μ l del agua bidestilada. La reacción se inició mediante la adición de CDNB y los cambios de absorbancia se midieron a $\lambda=340$ nm en un espectrofotómetro lector de placas Appliskan multiplate reader (Thermo Scientific). La actividad específica de la glutatión-S-transferasa se expresó en nmol/min/mg proteína.

3.4.3 Determinación de la actividad butirilcolinesterasa (BuCh).

La determinación de la actividad butirilcolinesterasa se llevó a cabo utilizando el método descrito por Ellman y colaboradores (1961) y posteriormente adaptado al formato de microplacas de 96 pocillos por Wheelock y colaboradores (2005) (Wheelock et al. 2005; Ellman et al. 1961). La actividad de la enzima se determinó siguiendo el incremento de la absorbancia a $\lambda=412$ nm en el tiempo, producido por la reacción de tiocolina con el ácido 5,5'-ditio-bis-nitrobenzoico (DTNB) en el acoplamiento de las siguientes reacciones:

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

- (1) Butirilcolina (BuSch) + H₂O (enzima) → ácido acético + tiocolina
(2) Tiocolina + DTNB → 2-nitrobenzoato-5 mercaptotiocolina + 5-tio-2-nitrobenzoato

Los ensayos se realizaron con las siguientes condiciones: para un volumen de 200 µl se añadieron a cada pocillo 180 µl del ion 5,5'-ditio-bis-nitrobenzoico (DTNB) a 320 µM y 10 µl de muestra y se determinaron los cambios de absorbancia a λ=412 nm en un espectrofotómetro lector de placas Appliskan multiplate reader (Thermo Scientific). La actividad específica de la enzima BuCh se expresó en µmol/min/mg proteína.

3.5. Análisis de peroxidación lipídica

3.5.1. Determinación de la concentración total de malondialdehído (MDA).

La determinación de la concentración de malondialdehído (MDA) se llevó a cabo mediante el método de Ohkawa y colaboradores (Ohkawa, Ohishi, y Yagi 1979). Esta técnica se basa en la capacidad de reacción del MDA presente en la muestra con el ácido tiobarbitúrico (TBA), generando un producto cromógeno denominado aducto MDA-TBA cuyo pico de absorbancia se encuentra a λ=532 nm y cuya formación es directamente proporcional a la cantidad de MDA en el medio.

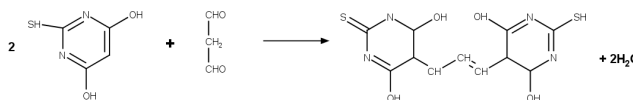


Figura 3.2: formación del aducto MDA-TBA y agua a partir de ácido tiobarbitúrico y el malondialdehído.

Este método consta de dos partes:

- a) Formación del aducto MDA-TBA: para ello, la mezcla de reacción contuvo: SDS al 8,1 % p/v, ácido acético al 20%, ácido tiobarbitúrico al 0.8 % p/v, agua bidestilada y 50 µl de muestra. Para cada uno de los puntos de la recta patrón se substituyó la muestra por concentraciones crecientes de 1,1,3,3-tetrametoxipropane (TMP) en el rango 0 a 250 µM. Todas las muestras fueron incubadas a 95°C durante 60 minutos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 28/09/2020 13:12:33

Mario Lorenzo Díaz González
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/09/2020 15:01:49

Raquel Marín Cruzado
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

b) Extracción del aducto TBA-MDA: se añadieron 500 µl de n-butanol puro a cada una de las muestras y fueron centrifugadas a 11.000 g. durante 15 minutos. Se recuperó la fracción sobrenadante.

Las mediciones de absorbancia se llevaron a cabo a $\lambda=532$ nm en un espectrofotómetro lector de placas Appliskan multiplate reader (Thermo Scientific). La concentración de malondialdehído presente en las muestras se expresó como µM/ml de LCR.

3.5.2 Determinación de 8-iso-prostaglandina F2α (8-Iso-F2α)

La determinación de 8-iso-prostaglandina F2α se llevó a cabo mediante el kit comercial OxiSelect™ 8-iso-prostaglandina F2α (Cell Biolabs) basado en un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). Para ello, se incubó un anticuerpo primario (Anti-8-iso- PGF2α) en cada uno de los pocillos de la placas. Posteriormente se añadieron 55 µl de muestra con el anticuerpo secundario conjugado 8-iso-PGF2α. Después de una breve incubación y lavado, se añadieron 100 µl de bencidina de tetrametilo (TMB), un sustrato oxidante que actúa sobre para la peroxidasa de rabano picante (HRP) que se encuentra unida al anticuerpo secundario, produciendo un color azul. La reacción se detuvo adicionando 100 µl de solución de parada que produjo un cambio de color de azul a amarillo en el pocillo. Las mediciones de absorbancia se llevaron a cabo a $\lambda=450$ nm en un lector de placas Appliskan multiplate reader (Thermo Scientific) siendo la intensidad de color una medida de la cantidad de 8-iso-prostaglandina F2α en la muestra. La cantidad de 8-Iso-F2α fue expresada como pg/ml de LCR.

3.6. Determinación de la proteína total

La cantidad total de proteína presente en la muestra fue determinada mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando una recta patrón de albúmina de suero bovino como estándar. Las lecturas se realizaron a 595 nm en un lector de placas *Appliskan multiplate reader* (Thermo Scientific).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

49 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

3.7. Inmunoensayos

3.7.1. Determinación del péptido β -amiloide

La determinación del péptido β -amiloide (1-42) se llevó a cabo mediante el kit comercial Innotech β -amiloide (1-42) Fujirebio®, un inmunoensayo en fase sólida en el que un primer anticuerpo monoclonal 21F12 (IgG2a) adherido a la placa captura el péptido amiloide 1-42.

Se incubaron 25 μ l de líquido cefalorraquídeo con el anticuerpo biotinilado 3D6 (IgG2b). Posteriormente este complejo antígeno-anticuerpo fue detectado por el método estreptavidina marcada con peroxidasa. Se añadieron 100 μ l de bencidina de tetrametilo (TMB) un sustrato oxidante que actúa sobre para la peroxidasa de rabano (HRP) que se encuentra unida al anticuerpo secundario, produciendo un color azul. La reacción se detuvo adicionando 50 μ l de ácido sulfúrico 0.9 N, que produjo un cambio de color de azul a amarillo en el pocillo. Las mediciones de absorbancia se llevaron a cabo a $\lambda=450$ nm en un espectrofotómetro VICTOR™ X5 (Perkin Elmer) siendo la intensidad de color una medida de la cantidad de la proteína β -amiloide (1-42) en la muestra.

3.7.2 Determinación de la proteína tau total

La determinación de la proteína tau total se llevó a cabo mediante el kit comercial Innotech hTAU Ag de Fujirebio®, un inmunoensayo en fase sólida en el que un primer anticuerpo monoclonal At120 (IgG1) adherido a la placa captura la proteína tau o fragmentos de la misma.

Se incubaron 25 μ l de líquido cefalorraquídeo con el anticuerpo biotinilado HT7 (IgG1) y BT2 (IgG1). Este complejo antígeno-anticuerpo fue detectado por el método estreptavidina marcada con peroxidasa. Después, se añadieron 100 μ l de bencidina de tetrametilo (TMB) un sustrato oxidante que actúa sobre para la peroxidasa de rabano que se encuentra unida al anticuerpo secundario, produciendo un color azul. La reacción se detuvo adicionando 50 μ l de ácido sulfúrico 0.9 N que produjo un cambio de color de azul a amarillo en el pocillo. Las mediciones de absorbancia se llevaron a cabo a $\lambda = 450$ nm en un espectrofotómetro VICTOR™ X5 (Perkin Elmer) siendo la intensidad de color una medida de la cantidad de la proteína tau en la muestra.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

50 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

3.7.3 Determinación de la proteína tau fosforilada

La determinación de la proteína *tau* fosforilada se llevó a cabo mediante el kit comercial Innnotest Phospho-tau (181p) de Fujirebio®, un inmunoensayo enzimático en fase sólida en el que un anticuerpo monoclonal específico humano HT7 (IgG1) adherido a la placa captura la proteína tau fosforilada o fragmentos de la misma.

Se incubaron 75 µl de líquido cefalorraquídeo humano con el anticuerpo biotinilado AT270 (IgG1), siendo posteriormente dicho complejo antígeno-anticuerpo detectado por estreptavidina marcada con peroxidasa. Se añadieron 100 µl de bencidina de tetrametilo (TMB) un sustrato oxidante que actúa sobre para la peroxidasa de rábano que se encuentra unida al anticuerpo secundario, produciendo un color azul. La reacción se detuvo adicionando 50 µl de ácido sulfúrico 0.9 N que produjo un cambio de color de azul a amarillo en el pocillo. Las mediciones de absorbancia se llevaron a cabo a $\lambda = 450$ nm en un espectrofotómetro VICTOR™ X5 (Perkin Elmer) siendo la intensidad de color una medida de la cantidad de la proteína tau fosforilada en la muestra.

3.7.4 Ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas

El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), una técnica inmunoenzimática que permite cuantificar proteínas a través de la interacción proteína-anticuerpo (figura 3.3).

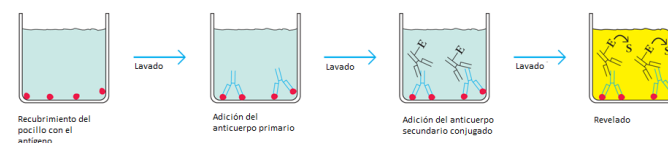


Figura 3.3: El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) se utiliza para detectar un antígeno en una muestra dada. El antígeno (en fase líquida) se añade a los pocillos, donde se adhiere a las paredes. El anticuerpo primario se une específicamente al antígeno. Un anticuerpo secundario ligado a enzima se añade que reacciona con un cromógeno, produciendo un cambio de color para detectar cuantitativa o cualitativamente el antígeno.

Para los experimentos realizados en esta tesis, 10 µg de proteínas procedentes del líquido cefalorraquídeo en estudio se inmovilizaron debido a la unión de éstas con un sustrato que reside en el fondo de las placas de ELISA. Para ello, las muestras de interés fueron diluidas en tampón carbonato-bicarbonato sódico (0,07M NaHCO₃, 0,03M Na₂CO₃) pH 9,6 en agua bidestilada a 4°C e incubada durante 16-18 horas en agitación.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sz
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

A continuación se procedió a lavar los pocillos con tampón PBS-Tween20 al 0.05% (PBS-T). Posteriormente, los pocillos fueron incubados con el anticuerpo primario correspondiente a cada experimento diluido en una solución de PBS-BSA al 5% durante al menos 16-18 horas a 24 °C (tabla 3.3). El anticuerpo primario fue reconocido por un anticuerpo secundario (anti-conejo o anti-ratón, diluido en PBS-T) (tabla 3.4) unido covalentemente a una enzima que permite su detección por espectrofotometría. En particular, en los análisis presentados en esta tesis la actividad peroxidasa fue detectada con un producto comercial (1-Step™ Ultra TMB-ELISA, Thermofisher) produciendo un color azul. La reacción se detuvo adicionando 50 µl de ácido sulfúrico 1N que produjo un cambio de color de azul a amarillo en el pocillo. Las mediciones de absorbancia se llevaron a cabo a $\lambda = 450$ nm en un espectrofotómetro VICTOR™ X5 (Perkin Elmer) siendo la intensidad de color una medida de la cantidad de la proteína.

Tabla 3.3: Anticuerpos primarios y diluciones empleadas en los experimentos de ELISA.

Anticuerpo primario	Dilución	Proveedor
Policlonal de conejo anti-ER α	1:30	Santa Cruz Biotechnology (California, Estados Unidos)
Policlonal de conejo anti-Caveolina-1	1:30	Santa Cruz Biotechnology (California, Estados Unidos)
Policlonal de conejo anti- β amiloide	1:30	Santa Cruz Biotechnology (California, Estados Unidos)
Policlonal de conejo anti-IgF-IRB	1:30	Santa Cruz Biotechnology (California, Estados Unidos)
Monoclonal de ratón anti-Flotilina-1	1:30	Santa Cruz Biotechnology (California, Estados Unidos)
Monoclonal de ratón anti-VDAC-1	1:30	Santa Cruz Biotechnology (California, Estados Unidos)
Monoclonal de ratón anti-Transferrina	1:30	Santa Cruz Biotechnology (California, Estados Unidos)
Policlonal de ratón anti-neurogranina	1:2000	Merck (California, Estados Unidos)
Monoclonal de ratón anti-TDP-43	1:1000	Merck (California, Estados Unidos)

Tabla 3.4: Anticuerpos secundarios y diluciones empleadas en los experimentos ELISA

Anticuerpo secundario	Dilución	Proveedor
Policlonal de cabra anti-ratón HRP conjugado	1:200	Bethyl Laboratories Inc (Texas, Estados Unidos)
Policlonal de cabra anti-conejo HRP conjugado	1:200	Bethyl Laboratories Inc (Texas, Estados Unidos)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguilera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

3.8. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software SPSS 21. Las diferencias entre grupos fueron estudiadas mediante ANOVA-1 seguido de los tests post-hoc Tukey's o Games Howell según se cumpliera o no la homogeneidad de varianzas. Para aquellos casos donde no se consiguió normalidad, las diferencias entre grupos fueron analizadas mediante los tests de Kruskal Wallis y U de Mann-Whitney. En los análisis de curvas ROC (Receiver operating Characteristics) que proporcionan la medida de la sensibilidad y especificidad de cada variable diagnóstica, se calcularon los parámetros AUC (Area bajo la curva), índice de Youden (J), y los puntos cutoff óptimos (Fluss, Faraggi, y Reiser 2005) para cada variable individual o combinación de ellas. La comparación de los valores AUC, J y cutoff obtenidos en las distintas curvas ROC se realizó mediante métodos paramétricos usando un programa escrito al efecto en R. Se realizaron análisis de regresión y de correlación total, con el fin de evaluar la importancia de relaciones lineales entre diferentes variables y los efectos de factores individuales en el establecimiento de las relaciones bivariadas. Las diferencias entre las pendientes y las intersecciones de las regresiones lineales fueron analizadas mediante el software GraphPad Prisma 8.

Además, las variables de estudio fueron sometidas a dos tipos de análisis multivariantes: 1) análisis de componentes principales (PCA), para obtener las matrices de coeficientes de extracción de los componentes de cada grupo de variables y sus contribuciones a la variación y los pesos en la segregación de grupos. Las puntuaciones de los factores fueron analizadas más en profundidad por el análisis bidireccional ANOVA para evaluar la diferencia entre los grupos segregados.

2) Análisis discriminante a través del cual se busca conocer qué variables, medidas en los individuos, explican mejor la atribución de la diferencia de los grupos a los cuales pertenecen dichos individuos. Es una técnica que nos permite comprobar hasta qué punto las variables independientes consideradas en la investigación clasifican correctamente a los sujetos u objetos. A partir de este análisis se obtiene una ecuación con la que clasificar probabilísticamente a los individuos en función de las variables obtenidas

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

53 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

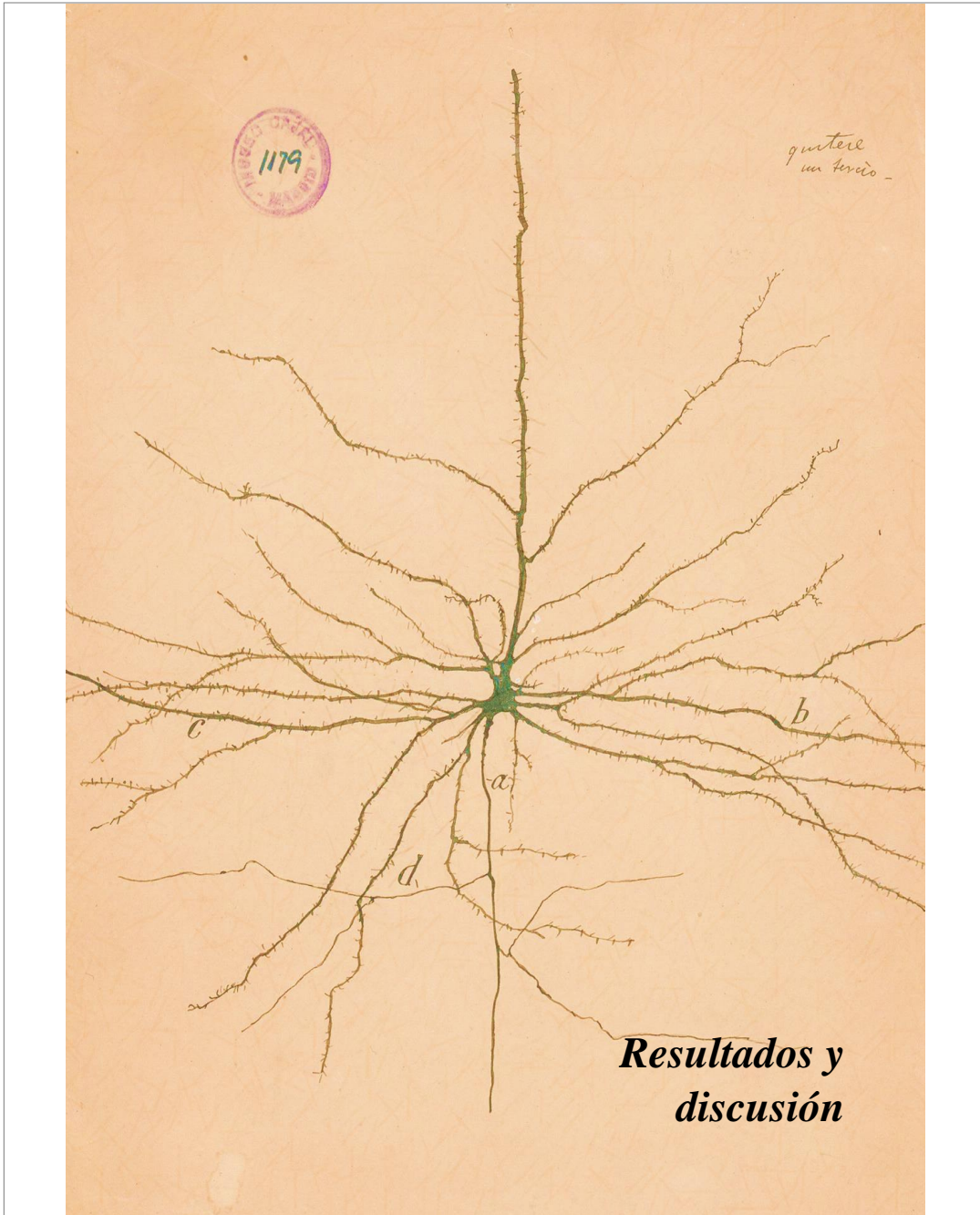
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

54 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

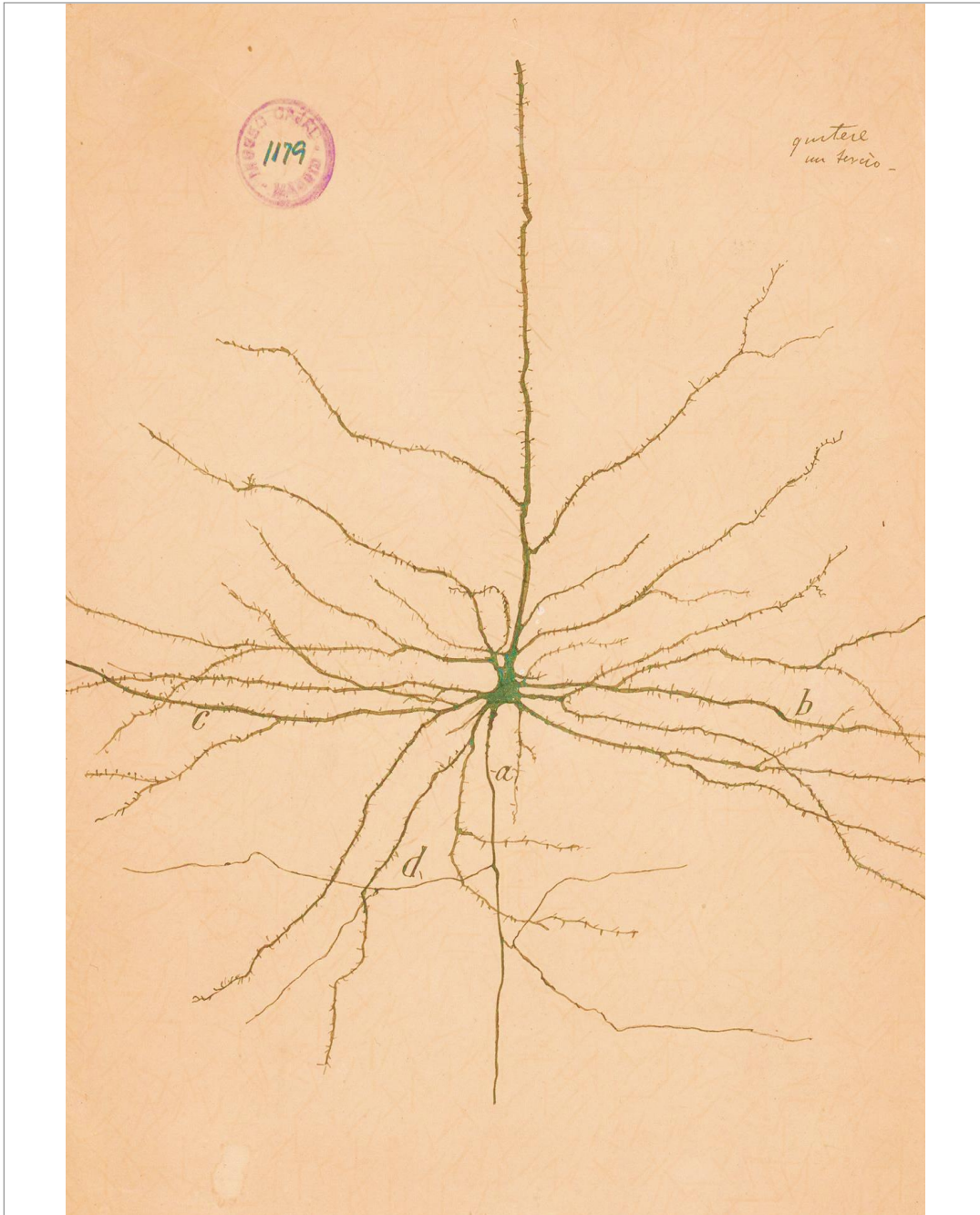
55 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

55 / 179



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

56 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

56 / 179

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de los marcadores clínicos en el espectro de la Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en personas mayores de 65 años y, con el aumento de la longevidad, se prevé que esta enfermedad produzca un problema de salud a nivel mundial. El diagnóstico temprano y exacto presenta un reto, ya que existe un alto porcentaje de pacientes mal diagnosticados o lo son de manera tardía. Esto es debido, en parte, a que los cambios patológicos relacionados con la EA pueden coexistir con una o más patologías (como por ejemplo la Lesión Cerebral Vascular-Isquémica o la Demencia de Cuerpos de Lewy). Con frecuencia, los pacientes no son diagnosticados con suficiente especificidad, porque los síntomas se atribuyen erróneamente a otras patologías. Además, el diagnóstico temprano presenta un desafío, ya que existe el consenso de que los síntomas clínicos de la enfermedad se manifiestan décadas después de que se inicien los procesos neurodegenerativos.

El diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer se basa en criterios clínicos que permiten una aproximación de probabilidad diagnóstica una vez se han descartado otras posibles causas. En contextos de ensayos clínicos, se usan frecuentemente tres pruebas en conjunto: la Escala de Evaluación de la Enfermedad de Alzheimer - Cognitiva (ADAS-Cog: *Alzheimer's Disease Assessment Scale*) (Rosen, Mohs, y Davis 1984), la Clasificación de Demencia Clínica (CDR: *Clinical Dementia Classification*) (Hughes et al. 1982), y el Mini-Examen del Estado Mental (MMSE: *Mini-Mental Scale Examination*) (Folstein, Folstein, y McHugh 1975). Estos test se desarrollaron entre las décadas de 1970 y 1980 con diferentes objetivos específicos, pero en la actualidad se emplean e interpretan de la misma manera general en pacientes con EA, permitiendo evaluar el funcionamiento cognitivo de un individuo. Sin embargo, existen pocos tests suficientemente validados que permitan diferenciar el deterioro cognitivo leve (DCL) de la enfermedad prodrómica y su evolución a Enfermedad de Alzheimer. Existen también otras pruebas que evalúan habilidades cognitivas en pacientes con deterioro cognitivo y enfermedad de Alzheimer. En concreto, existen pruebas basadas en el aprendizaje verbal y de memoria retardada que parecen ser útiles para la detección de la EA y del DCL (Estévez-González et al. 2003; Alladi et al. 2006). Recientemente, se ha publicado un test

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

57 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

denominado *In-out* test (Torrealba et al. 2019), basado en la realización simultánea de tareas ejecutivas y mnemónicas, y que tiene por objetivo mejorar las predicciones de evolución de los pacientes que presentan DCL hacia EA. Otras pruebas recientes se basan en la evaluación de tareas visuales u otras tareas cognitivas, como la visualización, el rendimiento visuoestructivo y la fluidez semántica (Ribeiro, De Mendonça, y Guerreiro 2006; Barbeau et al. 2004).

Como se expuso anteriormente, el *Mini-Mental State Examination* (MMSE) es la escala más utilizada, por su simplicidad y facilidad de aplicación, en la evaluación clínica de la función cognitiva. El MMSE es una prueba escrita con una puntuación máxima de 30, en la que las puntuaciones inferiores indican problemas cognitivos más graves. El punto de corte establecido para el MMSE define la función cognitiva "normal" y generalmente se fija en 24 y el deterioro en las habilidades cognitivas se indica mediante la disminución de la puntuación de la prueba por debajo de este punto de corte. En el presente estudio, los resultados obtenidos para los test MMSE (4.1.1) muestran como existen diferencias significativas entre los valores del test en los controles cuando se comparan con los enfermos de Alzheimer. Dentro de los grupos que forman parte del espectro de la enfermedad, este test permite diferenciar a los sujetos con enfermedad de Alzheimer de aquellos otros con queja subjetiva de memoria (QSM) y con deterioro cognitivo leve (DCL), además de individuos controles. Sin embargo, no permite diferenciar entre estos últimos grupos.

Por otro lado, en nuestro estudio también hemos incluido las puntuaciones obtenidas para el *In-out* test. En este novedoso test, durante su ejecución en pacientes, se satura la acción de redes neuronales activadas a través de mecanismos compensatorios, siendo su resultado la actividad propia de la función mnemónica. En nuestro estudio se ha observado como este test permite diferenciar los individuos CTRL de los DCL y de los EA. Además, dentro del espectro de la enfermedad, las puntuaciones obtenidas para los individuos con QSM son estadísticamente más elevadas a las encontradas en los individuos DCL y EA, no observándose diferencias entre estos dos grupos (tabla 4.1.1).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

58 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

58 / 179

Tabla 4.1.1: Resultados de los test neuropsicológicos realizados en controles (CTRL), Queja Subjetiva de Memoria (QSM), Deterioro Cognitivo Leve (DCL) y enfermedad de Alzheimer (EA).

	CTRL (n=16)	QSM (n=9)	DCL (n=27)	EA (n=17)
MMSE	26,8±0,8 ^a	26,4±0,8 ^a	25,6±0,6 ^a	20,0±1,01 ^b
In-out test	13,6±1,74 ^a	13,0±1,72 ^a	3,74±0,56 ^b	2,02±1,15 ^b

Los datos representan la media ± ES para las puntuaciones de cada test. En el caso del *In-Out test* se indican las puntuaciones totales. El número de datos en cada grupo se indica entre paréntesis. Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes grupos.

Una vez evaluado las diferencias entre las puntuaciones obtenidas para cada uno de los test en los diferentes grupos de estudio, se procedió a evaluar la sensibilidad y especificidad de los mismos obtenidos en las curvas ROC, así como el análisis de las áreas bajo la curva. Las comparaciones de estos parámetros se estimaron en los casos en los que los valores de las áreas bajo la curva fueron superiores o iguales a 0,8, considerados buenos descriptores (Hanley y McNeil, 1982), y se muestran en la tabla 4.1.2.

Tabla 4.1.2: Resultados de los análisis de sensibilidad y especificidad de los test neurocognitivos *Mini Mental State Examination* (MMSE) e *In-out test* cuando se comparan para los grupos controles (CTRL), queja subjetiva de memoria (QSM), deterioro cognitivo leve (DCL) y Enfermedad de Alzheimer (EA).

CTRL vs QSM				QSM vs DCL			
	Área	Cut-off	Sensibilidad/ Especificidad		Área	Cut-off	Sensibilidad/ Especificidad
MMSE	0,678	29,5	0,44/1,00	MMSE	0,773	29,5	0,44/1,00
In-out test	0,433	16,7	0,22/0,50	In-out test	0,876 *	5,45	1,00/0,667
CTRL vs DCL				QSM vs EA			
MMSE	0,383	26,5	0,381/0,30	MMSE	0,000	22	0,00/0,00
In-out test	0,140	6,5	0,875/0,833	In-out test	0,822 *	16,6	1,00/0,78
CTRL vs EA				DCL vs EA			
MMSE	0,000	21	0,00/0,00	MMSE	0,000	21,5	0,00/0,05
In-out test	0,430	15,4	0,20/0,50	In-out test	0,952 ***	14,3	1,00/0,95

Los valores de los puntos de corte se obtuvieron a partir del cálculo de los Índices de Youden que relacionan sensibilidad y especificidad (véase material y métodos). * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$: Nivel de significación de la prueba entre grupos.

Se ha observado que el *In-out test* presenta una mayor relación de sensibilidad/especificidad para diferenciar entre individuos que forman parte del espectro de la enfermedad frente al test MMSE. Desde el punto de vista cognitivo, la forma

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Resultados y discusión 60

amnésica de la enfermedad de Alzheimer, es detectable mediante baterías de test neuropsicológicos, ya que durante esta fase hay alteraciones de las funciones ejecutivas y dificultades para llevar a cabo el procesamiento de información simultánea (Johns et al. 2012). Sin embargo, estas alteraciones cognitivas también se manifiestan en otras patologías, tales como Depresión, Enfermedad de Parkinson, Esclerosis Múltiple, Encefalopatía Isquémica e incluso durante el envejecimiento normal (Trojsi et al. 2018). Aunque las puntuaciones de los test MMSE e *In-out* test permiten diferenciar claramente el déficit cognitivo presente en pacientes con Enfermedad de Alzheimer, permitiendo discriminar entre pacientes cognitivamente sanos de pacientes amnésicos, no constituye un indicador predictivo de la conversión de sujetos con deterioro cognitivo a amnésicos ni permite diferenciar con claridad si los procesos amnésicos que se manifiestan son debido a la EA o a otros procesos neurodegenerativos o psiquiátricos.

Por lo tanto, es necesario complementar los datos obtenidos en los test neuropsicológicos con otros marcadores que aporten mayor información complementaria sobre los procesos neuropatológicos ligados a la EA.

Numerosas investigaciones clínicas han apoyado que tres biomarcadores que se determinan en el líquido cefalorraquídeo (LCR): el péptido β -amiloide ($A\beta$), la proteína tau total (tau-t) y la proteína tau fosforilada (tau-f) representan elementos clave de la fisiopatología de la EA y son indicadores del proceso de desarrollo de la enfermedad (Mattsson et al. 2017). Además, gracias al desarrollo de técnicas de inmunoabsorción ligado a enzimas ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.) y su posterior estandarización, ha sido posible determinar estos marcadores con alta precisión. Ello ha permitido que éstos ocupen un lugar central en los nuevos criterios de diagnóstico de la enfermedad incluidos en la reciente definición neurológica de la EA desarrollada por el *National Institute on Aging and Alzheimer's Association* (Jack et al. 2018). Sin embargo, el esquema de inclusión de los mismos en este criterio diagnóstico corresponde con una clasificación categórica de "positivo" o "negativo" para ellos. El uso de biomarcadores, por lo tanto, identificará los hallazgos "positivos" que impliquen la presencia del proceso fisiopatológico subyacentes a la EA, o los hallazgos "negativos" que impliquen la ausencia de los mismos por lo que es necesario establecer e incluir valores de corte estándares de estos marcadores para un mejor seguimiento de la enfermedad a partir de estos marcadores.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

60 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

60 / 179

Como puede observarse en la tabla 4.1.3 del presente estudio, el perfil de los marcadores en el LCR se caracterizó por una disminución de la concentración del péptido β -amiloide (β A) y un aumento de la concentración de proteína tau total (tau-t) y de proteína tau fosforilada (tau-f) en los pacientes con Enfermedad de Alzheimer.

Tabla 4.1.3: Resultados de las concentraciones de los marcadores β -amiloide (β A), tau total (tau-t) y tau fosforilada (tau-f) realizados en controles (CTRL), Queja Subjetiva de Memoria (QSM), Deterioro Cognitivo Leve (DCL) y enfermedad de Alzheimer (EA).

	CTRL (n=16)	QSM (n=9)	DCL (n=27)	EA (n=17)
β A (pg/ml)	823,09 \pm 54,70 ^a	372,41 \pm 39,90 ^b	516,83 \pm 51,44 ^b	409,00 \pm 49,73 ^b
tau-t (pg/ml)	205,25 \pm 25,87 ^a	283,62 \pm 30,43 ^{ab}	398,20 \pm 35,74 ^{bc}	477,68 \pm 45,24 ^c
tau-f (pg/ml)	38,73 \pm 3,54 ^a	62,45 \pm 8,20 ^b	67,12 \pm 4,47 ^b	65,97 \pm 5,81 ^b

Los datos representan la media \pm ES para cada marcador. El número de datos en cada grupo se indica entre paréntesis. Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes grupos

Observamos que los niveles de β -amiloide en los individuos controles son más elevados si los comparamos con las concentraciones determinadas en los grupos que conforman el espectro de la enfermedad de Alzheimer (individuos con QSM, DCL, y EA). Si comparamos los valores dentro de los grupos que forman el espectro de la enfermedad observamos cómo la concentración va disminuyendo significativamente según avanza la enfermedad, siendo diferentes las concentraciones del péptido para cada uno de los estadios que forman el *continuum* de la enfermedad.

El péptido β -amiloide de 42 aminoácidos es el principal componente de las placas de amiloide de los cerebros con EA (Hardy y Higgins 1992). La base para la disminución del β A en el LCR ha sido ampliamente estudiada y hoy en día existe consenso de que dicha disminución es debida a la acumulación del péptido en las placas seniles extracelulares. Ello se ha demostrado gracias a estudios que revelaron una correlación entre la reducción del β -amiloide medido en muestras en LCR y los recuentos de placas amiloideas medidas tras la autopsia en el tejido cerebral (Tapiola et al. 2009). Posteriormente, este hecho ha sido corroborado mediante tomografía de emisión de positrones (PET) (revisado en Sheikh-Bahaei et al., 2017). En el presente estudio, hemos observado diferencias significativas entre los valores de β A en sujetos con queja subjetiva de memoria, deterioro cognitivo leve cuando los comparamos con los individuos controles. Estos datos concuerdan con los observados previamente por Andersen y colaboradores (1999)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Resultados y discusión 62

quienes observaron un decrecimiento de los valores de βA en DCL respecto a controles. Estos resultados podrían indicar que una disminución del βA en el LCR podría asociarse con una etapa temprana de la EA y ser detectable antes de que los síntomas clínicos de la demencia se hagan evidentes. De hecho, algunos estudios han mostrado que los niveles de βA en LCR para los pacientes con deterioro cognitivo leve son intermedios entre los detectados en EA y en controles (Maruyama et al. 2001). En estudios longitudinales, los pacientes con DCL progresivo muestran niveles de βA en LCR menores que aquellos con DCL estable, aunque la sensibilidad para diferenciar ambos grupos es reducida (Blennow 2004). Por otra parte, existen otros estudios donde se ha observado que los valores de βA en EA son similares a los encontrados en pacientes con DCL (Anoop et al. 2010). La enorme discrepancia entre los diferentes estudios, indica que el marcador β -amiloide por sí solo es incapaz de diferenciar entre los pacientes con DCL y EA. En nuestro estudio hemos observado como el marcador por sí solo es incapaz de diferenciar a aquellos individuos que se encuentran dentro del espectro de la enfermedad, demostrando la baja sensibilidad del marcador para diferenciar los estadios de la enfermedad. Por otro lado, se ha observado que el decrecimiento de los valores de βA en líquido cefalorraquídeo no es exclusivo de la EA, observándose un descenso pacientes diagnosticados con otros tipos de demencias, como la Demencia con Cuerpos de Lewy (Armstrong, Cairns, y Lantos 2000; Bibl et al. 2006) o Demencia Frontotemporal (Hulstaert et al. 1999; Riemenschneider et al. 2002), demostrando una baja especificidad para predecir con exactitud la enfermedad de Alzheimer.

Los marcadores de proteínas tau total y tau fosforilada reflejan la degeneración neuronal y daño cerebral. La proteína tau se localiza en los axones neuronales y es esencial para la estabilización y mantenimiento de los microtúbulos (Blennow y Zetterberg 2009). En nuestro estudio, se han determinado los niveles de la proteína tau total y tau fosforilada, y los datos se resumen en la tabla 4.1.3. Los datos obtenidos muestran que los niveles de proteína tau total son iguales para los pacientes sanos y los pacientes con queja subjetiva de memoria, lo que probablemente se deba a que la degeneración axónica aún no se haya iniciado o su estado no sea lo suficientemente significativo para poder determinarlo a través de una sola prueba bioquímica en los individuos QSM. Por otro lado, los niveles de proteína tau total se encuentran elevados en los grupos de individuos con deterioro cognitivo leve y con Enfermedad de Alzheimer respecto a los individuos sanos, aunque no se observaron diferencias en las concentraciones entre los grupos DCL y EA. La proteína tau, por lo tanto permite

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

62 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

62 / 179

diferenciar los estadios avanzados de la enfermedad frente a individuos sanos, pero no permite diferenciar individuos dentro del espectro de la enfermedad.

Por otra parte, las concentraciones de la proteína tau fosforilada en los controles son significativamente menores respecto a los grupos DCL y EA, aunque sus valores no varían entre estos dos grupos. Como se ha observado anteriormente con tau total, podemos comprobar cómo este marcador por sí solo es incapaz de diferenciar a aquellos individuos que se encuentran dentro del espectro de la enfermedad, demostrando la baja sensibilidad/especificidad del mismo cuando la finalidad es diferenciar los estadios de la enfermedad. Sin embargo, cabe destacar que la variación de las concentraciones de proteína tau fosforilada en los individuos con deterioro cognitivo leve frente a los individuos controles indica que los procesos de fosforilación de la proteína Tau comienzan a aparecer en los primeros estadios donde son apreciables manifestaciones clínicas de deterioro cognitivo, y se mantiene a lo largo del *continuum* de la enfermedad.

Estudios previos han sugerido que diversos índices basados en los niveles de proteína tau, proteína tau fosforilada, y el péptido β A podrían tener valor diagnóstico a la hora de discriminar los estadios tempranos de la EA del envejecimiento normal (Blennow y Hampel 2003). En nuestro estudio hemos evaluado los ratios tau-t/ β A, tau-f/ β A y tau-t/tau-f, observando que estos tres ratios permiten diferenciar a los individuos sanos de los individuos con estadios avanzados de la enfermedad, pero dentro del espectro de la enfermedad, individualmente, por lo que por sí solos no pueden predictores precisos del avance de la misma (figuras 4.1.1 y 4.1.2).

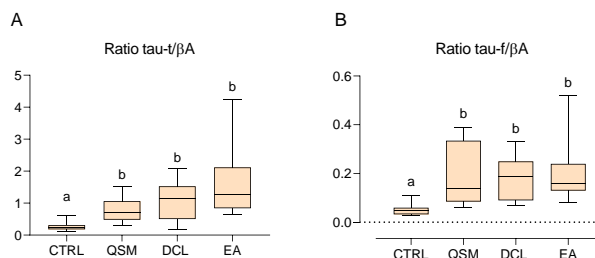


Figura 4.1.1: Diagrama de cajas para las diferencias entre los ratios de tau-t/ β A (A) y tau-f/ β A (B) de individuos controles (CTRL), con queja subjetiva de memoria (QSM) deterioro cognitivo

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

leve (DCL) y con Enfermedad de Alzheimer (EA). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes grupos.

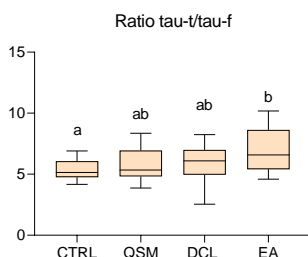


Figura 4.1.2: Diagrama de cajas para las diferencias entre los ratios de tau-t/tau-f de individuos controles (CTRL), con queja subjetiva de memoria (QSM) deterioro cognitivo leve (DCL) y con Enfermedad de Alzheimer (EA). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes grupos.

Una vez evaluadas las diferencias entre las concentraciones de los marcadores en el líquido cefalorraquídeo de los cuatro grupos de estudio, así como los ratios de las mismas, se procedió a evaluar la sensibilidad y especificidad de dichos marcadores. Para ello se obtuvieron las curvas ROC y se analizaron las áreas bajo la curva (AUC), puntos de corte (cut-off) y sensibilidad/especificidad. Las comparaciones de estos parámetros se estimaron en los casos en los que los valores de AUC fueron superiores o iguales a 0,7, por lo tanto considerados buenos descriptores (Hanley y McNeil 1982), y se muestran en la figura 4.1.3 y tabla 4.1.4.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sz
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Tabla 4.1.4: Resultados de los análisis de curvas ROC para la comparación de los distintos marcadores en los grupos de este estudio.

CTRL vs QSM				QSM vs DCL			
	AUC	Cut-off	Sensibilidad/ Especificidad		AUC	Cut-off	Sensibilidad/ Especificidad
βA	0,050	581,25	0,00/0,16	βA	0,560	564,00	0,37/1,00
tau-t	0,800 *	278,37	0,71/0,92	tau-t	0,696	380,82	0,54/1,00
tau-f	0,750	51,75	0,71/0,92	tau-f	0,643	58,50	0,62/0,71
tau-t/ βA	0,940 ***	0,43	0,85/0,92	tau-t/ βA	0,589	1,10	0,50/0,85
tau-f/ βA	0,930 ***	0,07	0,85/0,92	tau-f/ βA	0,542	0,15	0,54/0,71
tau-t/ tau-f	0,54	5,21	0,57/0,67	tau-t/ tau-f	0,604	5,35	0,66/0,71
CTRL vs DCL				QSM vs EA			
βA	0,181	1049,5	0,12/0,91	βA	0,420		
tau-t	0,858 ***	255,5	0,87/0,83	tau-t	0,800 *	385,5	0,6/1,0
tau-f	0,889 ***	50,75	0,87/0,91	tau-f	0,560		
tau-t/ βA	0,896 ***	0,382	0,83/0,91	tau-t/ βA	0,750		
tau-f/ βA	0,913 ***	0,068	0,87/0,91	tau-f/ βA	0,620		
tau-t/ tau-f	0,682	5,49	0,62/0,83	tau-t/ tau-f	0,800 *	7,17	0,53/1,0
CTRL vs EA				DCL vs EA			
βA	0,090	486,50	0,20/0,06	βA	0,375	262	
tau-t	0,950 ***	274,63	0,93/0,92	tau-t	0,583	39,40	
tau-f	0,880 ***	0,55	0,87/0,92	tau-f	0,426	64,60	
tau-t/ βA	0,970 ***	0,61	0,93/1,00	tau-t/ βA	0,658	0,575	
tau-f/ βA	0,950 ***	0,07	0,93/0,92	tau-f/ βA	0,553	0,374	
tau-t/ tau-f	0,820 ***	5,39	0,8/0,75	tau-t/ tau-f	0,697	7,531	

AUC: Área bajo la curva. Los valores de los puntos de corte (*Cut-off*) se obtuvieron a partir del cálculo de los Índices de Youden que relacionan sensibilidad y especificidad (véase material y métodos). * p<0.05 y *** p<0.001: Nivel de significación de la prueba entre grupos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Resultados y discusión

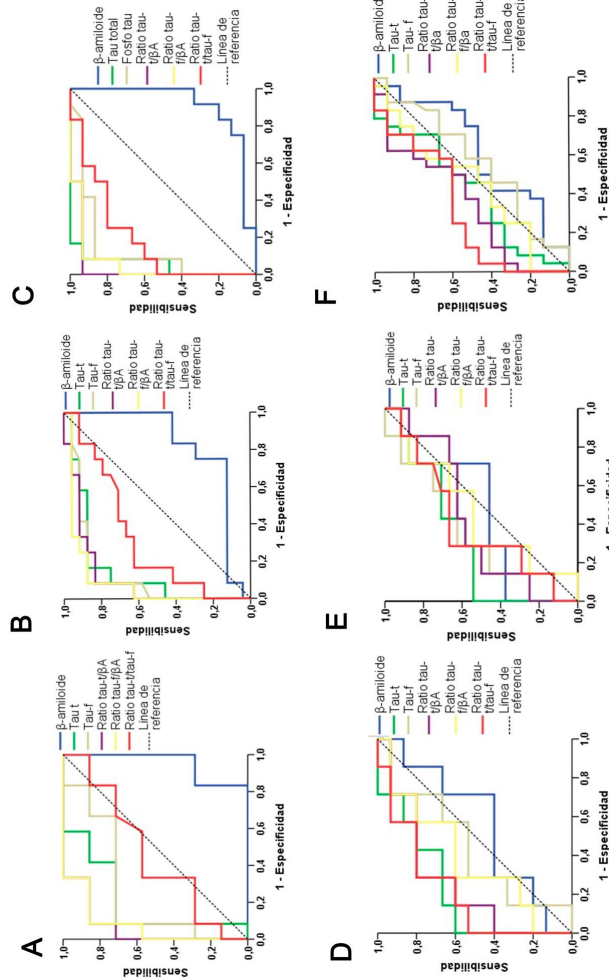


Figura 4.1.3: Área bajo la curva (AUC) de los marcadores clásicos y sus ratios cuando se comparan CTRL vs. QSM (A); CTRL vs. DCL (B); CTRL vs. EA (C); QSM vs. DCL (D); QSM vs. EA; DCL vs. EA (E). CTRL: controles, QSM: queja subjetiva de memoria; DCL: deterioro cognitivo leve; EA: Enfermedad de Alzheimer.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khk

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Como podemos observar, para todos los casos, el marcador β -amiloide mostró los menores valores de área bajo la curva, no presentando por lo tanto capacidad predictiva en ninguna de las pruebas, ni siquiera para los enfermos EA. Por su parte, los marcadores tau-total y tau-fosforilada presentaron en general alta especificidad y sensibilidad. En el caso de las comparaciones con controles, las curvas para Tau-t permitieron distinguir entre pacientes controles y QSM, controles y DCL o controles y EA. Mostrando este marcador sensibilidades por encima del 71% y especificidad alrededor del 92% (tabla 4.1.4). En el caso de tau-f, los grupos DCL y EA pudieron ser bien distinguidos en las curvas ROC respecto a los controles, con valores de área abajo la curva de alrededor del 88%. No se obtuvo un resultado significativo al comparar controles vs QSM, ni los DCL vs QSM o DCL vs EA. Así pues, en nuestro estudio, de los marcadores clásicos analizados sólo tienen valor diagnóstico la proteína tau-t y P-tau, aunque sólo al realizar las comparaciones con controles. Es también significativo el hecho de ninguna de estas variables fue capaz de distinguir entre DCL y EA, lo que sugiere que los cambios en estos marcadores están ocurriendo en el estadio DCL, antes de que se haya instalado el estado de EA. Estos resultados son coherentes con los hallazgos neuropatológicos de la EA según el estadije de Braak y Braak (1991), en la que se observa que la formación de ovillos neurofibrilares son eventos tempranos en el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, los ratios tau-t/ β A y tau-f/ β A presentan buena sensibilidad y especificidad cuando se utilizan para comparar los controles con los diferentes grupos de estudios, mostrando sensibilidades/especificidades del 85%/92% para ambos marcadores cuando se comparan pacientes controles con QSM; del 83%/91,7%; para el ratio tau-total/ β A y del 87,5%/91,7% para tau-f/ β A cuando se hace con pacientes con DCL y por último del 93%/92% cuando se comparan con pacientes con EA. Sin embargo, estos ratios no parecen ser predictivos ni tener poder diagnóstico cuando se comparaban el grupo DCL y los grupos QSM o EA (tabla 11), por lo tanto, en este estudio, los ratios no presentan ventajas diagnósticas respecto a los marcadores individuales.

Finalmente, hemos explorado las posibles correlaciones entre las concentraciones de los marcadores clásicos; β -amiloide, tau-total y tau-fosforilada en el líquido cefalorraquídeo y los resultados de los las puntuaciones del MMSE e *In-out* test en los diferentes grupos de estudio, con el fin de establecer otros posibles abordajes de predicción y seguimiento de la enfermedad. En la figura 4.1.4 se muestran las matrices de correlaciones de para cada uno de los grupos de estudio. Los resultados de los análisis

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

67 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

67 / 179

de correlación y su significación estadística se encuentran recogidos en la tabla del anexo IV.

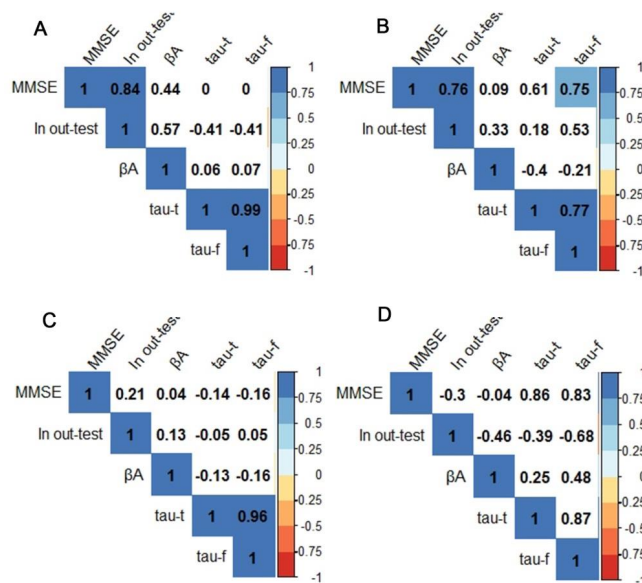


Figura 4.1.4: Matrices de correlaciones para los marcadores clásicos en CTRL (A), QSM (B); DCL (C) y EA (D). La intensidad del color indica el nivel de correlación significativa ($p < 0,05$). Los colores azules indican correlaciones positivas y los rojos indican correlaciones negativas entre las variables.

Como se observa en las matrices de la figura 4.1.4, se aprecia una relación positiva entre las puntuaciones de test neurocognitivos MMSE e *In-out test* con la concentración βA los individuos CTRL, que posteriormente va desapareciendo en el estadio de QSM y se anula en pacientes con DCL, apareciendo una relación negativa en los pacientes con EA. Para el caso de los marcadores tau-t y tau-f, aparece una relación positiva con MMSE e *In-out Test* en los individuos con QSM, que posteriormente desaparece en los individuos con DCL para reaparecer como una relación positiva en individuos con EA para el caso del test MMSE y negativa con el test *In-out test*.

Respecto a las formas tau, éstas se encuentran positivamente relacionadas entre ellas en todos los grupos, pero pobremente o nada correlacionadas con el marcador β -

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sz
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

amiloide en los distintos grupos. Un resultado llamativo es la práctica ausencia de todas las correlaciones entre variables en el grupo DCL, con la excepción de la relación entre las formas de la proteína tau. Aunque existe poca información sobre la producción y dinámica de la proteína tau en el cerebro de las personas con Enfermedad de Alzheimer, se ha observado que la secreción de la proteína tau se da durante un proceso fisiológico activo, y puede ocurrir independientemente de la lesión neuronal (Clavaguera et al. 2015). Además, la elevación de esta proteína en el líquido cefalorraquídeo y la relación existente entre la misma y su versión fosforilada no son exclusivas de la enfermedad de Alzheimer, ya que se han observado elevaciones crónicas en otras enfermedades neurodegenerativas de tipo taupatías, como la demencia frontotemporal con parkinsonismo-17, la enfermedad de Pick (PiD), la parálisis supranuclear progresiva (PSP) y degeneración corticobasal (Gao et al. 2018), lo que sugiere que la elevación de las distintas formas de esta proteína, por sí solas, podrían reflejar lesiones neuronales inespecífica. También se ha demostrado que se producen elevaciones transitorias después de un accidente cerebrovascular (Hesse et al. 2001) o lesión cerebral traumática (Franz et al., 2003).

A partir de los resultados observados en este estudio, parece evidente que se producen cambios progresivos en la transición CTRL → EA, y que éstos se reflejan en las relaciones entre las puntuaciones cognitivas y los valores bioquímicos. Así, un seguimiento de las correlaciones existentes entre estos marcadores podría ser una buena indicación del avance del proceso patológico característico de la enfermedad.

Por otra parte, los principales factores de riesgo para desarrollar la enfermedad de Alzheimer (EA) son la edad y el género. La incidencia de la enfermedad es mayor en las mujeres que en los hombres, y ello no puede atribuirse simplemente a la mayor longevidad de las mujeres en comparación con los hombres, sino a que debe existir un mecanismo patogénico específico que explique la mayor incidencia de los casos de EA en las mujeres. En este sentido, evaluamos si podrían existir diferencias por género en las puntuaciones del test MMSE así como en las concentraciones de los marcadores evaluados en clínica para los diferentes grupos de estudio. Los resultados de las concentraciones para cada uno de los grupos por género se recogen en la siguiente tabla (tabla 4.1.5).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

69 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Tabla 4.1.5: Concentraciones de β -amiloide (β A), tau-total (tau-t) y tau fosforilada (tau-f) y de los test cognitivos Mini Mental state examination (MMSE) e In-out test en hombres y mujeres de los cuatro grupos de estudio. Los datos se expresan en pg/ml como media \pm ES.* Diferencia significativa al nivel $p < 0.05$ entre hombres y mujeres.

	CTRL		OSM		
	Hombre (n=5)	Mujer (n=10)	Hombre (n=3)	Mujer (n=6)	
β A	697,66 \pm 78,9	756,95 \pm 65,6	β A	364,33 \pm 32,2	376 \pm 45 \pm 60,0
tau-t	218,55 \pm 57,8	286,14 \pm 59,4	tau-t	299,00 \pm 32,2	396,73 \pm 87,1*
tau-f	39,40 \pm 6,8	44,84 \pm 6,6	tau-f	60,57 \pm 3,9	63,38 \pm 12,5
MMSE	25 \pm 1,4	27 \pm 0,9	MMSE	28 \pm 1,67	27 \pm 1,0
In-out test	10,2 \pm 1,7	13,91 \pm 1,7	In-out test	13,55 \pm 1,7	12,6 \pm 1,9
	DCL		EA		
	Hombre (n=14)	Mujer (n=15)	Hombre (n=10)	Mujer (n=8)	
β A	449,49 \pm 60,9	477,25 \pm 37,6	β A	414,40 \pm 75,92	397,79 \pm 57,1
tau-t	338,81 \pm 27,3	589,61 \pm 118,4*	tau-t	424,50 \pm 51,98	705,57 \pm 143,3*
tau-f	63,93 \pm 7,7	81,43 \pm 8,4*	tau-f	62,39 \pm 4,59	86,96 \pm 7,8*
MMSE	26 \pm 0,6	25 \pm 1,2	MMSE	17 \pm 0,35	19 \pm 1,0
In-out test	6,37 \pm 1,8	3,86 \pm 1,03	In-out test	0,5 \pm 1,0	3,2 \pm 1,2

Los resultados obtenidos para los test MMSE e In-out test muestran que no existen diferencias por género en las puntuaciones del test dentro de cada uno de los grupos de estudio. En el caso de los marcadores, se observa que los valores β -amiloide en las pacientes mujeres del grupo con queja subjetiva de memoria son superiores a los de los hombres. Así mismo, las concentraciones de tau, tanto en su forma total como en su forma fosforilada se encuentran incrementadas en el caso de las mujeres que sufren deterioro cognitivo leve y Enfermedad de Alzheimer. Estos resultados son interesantes ya que son indicativos de que los procesos de acumulación del péptido A β y consecuentemente la formación de placas seniles es posterior en mujeres que en hombres, ya que una mayor concentración de β -amiloide presente en el líquido indica que hay una menor concentración de placas. Por otro lado, la presencia de un incremento de proteína tau y su análoga fosforilada en mujeres con deterioro cognitivo leve, es indicativo de que los procesos neurodegenerativos se encuentran más acentuados en este grupo de pacientes. En su conjunto, estos datos indican que durante los procesos primarios de la enfermedad, las mujeres pueden presentar mecanismos neuroprotectores frente a la enfermedad que no se dan en el grupo de hombres (Beam et al. 2018). En este sentido, en estudios previos llevados en nuestro laboratorio, hemos demostrado como en mujeres pre-menopáusicas, la presencia de receptores de estrógeno (RE) ubicados en las plataformas de signalosomas presentes en las balsas lipídicas, desencadenan respuestas neuroprotectoras al anclarse al andamiaje de la caveolina-1 unida a otras proteínas (Canerina-Amaro et al. 2017). Por

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

otro lado, en este mismo estudio hemos observado que durante la Enfermedad de Alzheimer se produce una pérdida de la función del receptor de estrógenos presente en los signalosomas, disociándose del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), y produciendo en última instancia un aumento de la neurotoxicidad del péptido β -amiloide, y como consecuencia la neurodegeneración y aumento de la proteína tau observado en mujeres con deterioro cognitivo.

En base a lo evaluado anteriormente, diagnosticar la EA utilizando tan sólo los resultados de los test neuropsicológicos junto con marcadores clásicos no asegura una especificidad diagnóstica alta. El desarrollo de un panel de marcadores sensitivos y específicos que reflejen los procesos subyacentes a la enfermedad como son la amilogénesis, la disfunción neuronal, la pérdida de sinapsis y los procesos de estrés oxidativo e inflamación, dishomeostasis cerebral, podrían no sólo confirmar el diagnóstico de la enfermedad sino predecir su progresión y la evaluación de los efectos de los tratamientos existentes.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

71 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

4.2. Alteraciones de las concentraciones de cationes divalentes, metales traza y metales neurotóxicos como marcadores en el espectro de Enfermedad de Alzheimer

Como se expuso en el capítulo de la introducción, los iones y los metales trazas son fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis cerebral, intervienen en la excitabilidad nerviosa y en la fisiología sináptica, además de ser cofactores de metaloproteínas con funciones diversas a distintos niveles en el tejido cerebral. Aunque hay evidencia documentada de una relación entre los niveles de ciertos metales en el cerebro y la patogénesis de la EA, la asociación epidemiológica no es concluyente, probablemente debido a la complejidad de las vías involucradas. Hasta la fecha, la mayor parte de los trabajos de investigación se han centrado en la interacción entre el péptido β -amiloide y los iones metálicos como el cobre y el zinc (Maynard et al. 2005; Duce y Bush 2010), aunque se sabe que existen otros mecanismos adicionales por los que los metales pueden intervenir en la neurodegeneración (Bush y Tanzi 2008; Ayton, Lei, y Bush 2015; Chin-Chan, Navarro-Yepes, y Quintanilla-Vega 2015; Z. Zhang et al. 2016). Varios procesos enzimáticos críticos asociados fundamentalmente con la patología de la EA están influenciados sustancialmente por algunos metales, sin embargo, la base molecular de esta regulación aún no se comprende (Duce y Bush 2010). Parece que la localización errónea de los iones metálicos en el cerebro, así como un déficit o un exceso de la concentración de los mismos juega un papel significativo en la patogénesis de la EA (Duce y Bush 2010).

En el presente capítulo, hemos analizado la composición de los principales cationes divalentes y metales en el líquido cefalorraquídeo de individuos pertenecientes a los cuatro grupos considerados en este estudio (CRTL, QSM, DCL y EA).

4.2.1. Cationes divalentes

Sin duda, los principales cationes divalentes en los líquidos extracelulares son el calcio y el magnesio. Ambos iones desempeñan papeles críticos en la fisiología de las células nerviosas y están implicados en la señalización celular, en la excitabilidad nerviosa y en la transmisión sináptica, además de actuar como cofactores en numerosas procesos bioquímicos cerebrales. En nuestro estudio, los resultados obtenidos para estos electrolitos en los distintos grupos se muestran en la tabla 4.2.1.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

72 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Tabla 4.2.1: concentración de cationes divalentes en el LCR de los cuatro grupos de estudio.

Elemento	CTRL n=16	QSM n=9	DCL n=32	EA n= 17
Magnesio	1,28±0,7 ^a IC 95%: 1,13-1,43	0,99±0,02 ^b IC 95%:0,92-1,07	1,00±0,032 ^{bc} IC 95%:0,93-1,07	1,33±0,13 ^a IC 95%:1,04-1,61
Calcio	2,03±0,29 ^a IC 95%:1,38-2,67	0,73±0,11 ^b IC 95%:0,47-0,99	0,88±0,01 ^{bc} IC 95%:0,84-0,90	2,09±0,20 ^a IC 95%:1,66-2,53

Media ±ES e intervalo de confianza al 95% de los electrolitos (en mM) en LCR de individuos controles (CTRL), con queja subjetiva de memoria (QSM) deterioro cognitivo leve (DCL) y con Enfermedad de Alzheimer (EA). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes grupos. Las concentraciones se expresan en mM.

Basándonos en los resultados obtenidos, hemos observado que en los estadios previos a la presentación sintomática de la EA se produce un cambio en la composición de los cationes divalentes del líquido cefalorraquídeo y que ello puede estar debida a un cambio de dichas concentraciones en el parénquima cerebral. Los valores obtenidos para los grupos controles de Mg^{2+} y Ca^{2+} se corresponden con los descritos previamente por Gellein y colaboradores (Gellein et al. 2008). Teniendo en cuenta que el magnesio y el calcio participan en numerosos mecanismos neuronales implicados en la memoria, es razonable hipotetizar que la alteración en sus niveles podría contribuir en la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer. De hecho, se ha demostrado que el Mg^{2+} puede modular el tráfico y el procesamiento de la proteína precursora del amiloide, interviniendo en la formación de placas seniles (Yu et al. 2010). También, se ha observado que dicha modulación es dependiente de la dosis y del tiempo, de modo que a altas concentraciones de magnesio extracelular se favorece la vía no amiloidogénica, mientras que a dosis bajas de éste aumenta la vía amiloidogénica y por ello secreción βA (Yu et al. 2010). En nuestro estudio hemos observado un descenso de las concentraciones de Mg^{2+} en el LCR en estadios pre-sintomáticos de la enfermedad. Por lo tanto, parece que la tendencia al incremento intracelular de Mg^{2+} , reflejado como una disminución de este ion en el LCR, en los estadios de QSM y DCL podría ser parte del mecanismo patológico que subyace a la disminución de las funciones mnésicas, afectando por tanto a la formación de la memoria. Por otro lado, la disminución de la concentración de magnesio favorecería la neoformación de placas amiloides. Por otro lado, en estadios de Enfermedad de Alzheimer, hemos observado que los valores de este ion se vuelven a incrementar en LCR, hasta alcanzar los valores observados en los controles. Estos resultados están de acuerdo con los publicados por Kovatsi y colaboradores donde no encontraron diferencias significativas entre individuos sanos y con EA (Kovatsi et al. 2006). Esto podría deberse

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

a un aumento de la permeabilidad de las membranas neuronales ligada a la acción del péptido β -amiloide como describieron previamente Glabe y Kaye (Glabe y Kaye 2006). Aunque los mecanismos por los que actúa el péptido β -amiloide incrementa la permeabilidad de la membrana se han relacionado con la salida de calcio hacia el medio extracelular (Supnet y Bezprozvanny 2010; Bonda et al. 2011; Glabe y Kaye 2006), este mismo mecanismo podría estar causando la movilización del Mg^{2+} hacia el líquido cefalorraquídeo. Además, este fenómeno concordaría con lo observado previamente en tejido cerebral, donde se observan menores niveles de magnesio en diferentes regiones cerebrales en pacientes con EA (Andrási et al. 2005).

Se ha observado que en la enfermedad de Alzheimer se produce la desregulación del calcio neuronal (Ca^{2+}) y que ésta puede contribuir a la patogénesis de la EA, una idea que estableció la denominada "*hipótesis del calcio*" como evento iniciador de la EA (Khachaturian 2006; Gibson et al. 2017). En particular, se ha observado que la desregulación de la dinámica del Ca^{2+} en el retículo endoplásmico, la mitocondria y/o la membrana celular, en modelos celulares y de ratones para la EA provocan niveles aumentados de Ca^{2+} citosólico que pueden causar excitotoxicidad, así como la modulación anómala de cascadas de señalización perjudiciales para la función neuronal, produciendo en última instancia la muerte neuronal (Magi et al. 2016; Popugaeva, Pchitskaya, y Bezprozvanny 2018, 2017). El descenso observado en los estadios QSM y DCL no tiene una explicación evidente, aunque es posible que éste pudiera acompañar la formación de acúmulos extracelulares como las propias placas amiloides.

Por otro lado, en estadios de EA, como ya se citó anteriormente, la presencia de placas seniles y la acumulación del péptido β -amiloide provocarían un incremento de la permeabilidad para el calcio (Kelly y Ferreira 2006; Bonda et al. 2011), lo que aumentaría la salida celular de este ion hacia el medio extracelular del tejido nervioso. Este hecho, junto con la adición de calcio al espacio extracelular como consecuencia de la muerte neuronal asociada con la EA, explicaría el incremento del Ca^{2+} en el LCR de estos pacientes.

El análisis de las relaciones bivariadas entre Ca^{2+} y Mg^{2+} en los distintos grupos (Figura 4.2.1) muestra la existencia de una correlación positiva ($R^2=0,611$) y significativa ($p=0,002$) en el grupo control. Por otro lado, para el caso QSM y DCL se observa una tendencia positiva de la relación entre ambos metabolitos, mientras que para el caso del grupo EA, aunque no es significativa, la tendencia de la relación se vuelve negativa.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

74 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

74 / 179

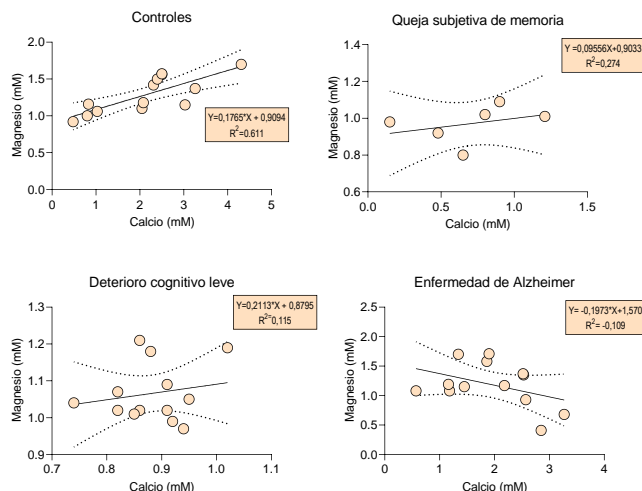


Figura 4.2.1: Relación bivalente entre calcio y magnesio para A) controles, B) queja subjetiva de memoria; C) deterioro cognitivo leve; D) Enfermedad de Alzheimer. Los parámetros de cada recta de regresión están incluidos en la gráfica. R^2 : coeficiente de determinación.

En nuestro estudio, se observa una relación positiva entre las concentraciones de los cationes divalentes calcio y magnesio en el LCR de pacientes controles. La pérdida de la relación observada en los estadios QSM y DCL sugiere que los cambios en las concentraciones de estos dos cationes están de alguna manera relacionados con la evolución y desarrollo de la EA, ya que tanto el Ca^{2+} como el Mg^{+} son dos oligoelementos esenciales, regulados intrincadamente por la homeostasis celular. Bajo condiciones fisiológicas el magnesio mantiene los niveles intracelulares de calcio y protege a las neuronas de las respuestas excitatoria inducida por un aumento en la concentración del calcio (Levitsky y Takahashi 2013) y la alteración en la homeostasis del magnesio y del calcio se ha visto relacionada con el desencadenante de una cascada de eventos que produce un proceso de neurodegeneración (Health y Volpe 2013). Aunque las alteraciones de estos cationes se han visto alteradas en pacientes con EA respecto sujetos sanos de la misma edad (Çilliler, Öztürk, y Özbakir 2008; Stutzmann 2007), pocos estudios han investigado el papel de la alteración coordinada de los niveles de Mg^{+} y Ca^{2+}

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

en la patogénesis de la EA. Por lo tanto, el estudio de las relaciones de estos cationes divalentes debe ser objeto de futuras investigaciones para la mejor comprensión de la función de estos metales en relación con el desarrollo y avance de la patogenicidad de la Enfermedad de Alzheimer.

4.2.2. Metales traza

Los metales traza son oligoelementos, los cuales a pesar de sus bajas concentraciones, tienen un papel relevante en la función cerebral y se consideran esenciales. De manera general, entre sus principales funciones destacan la de actuar como cofactores de un buen número de procesos enzimáticos en las que son parte de los centros activos de las enzimas implicadas, como moduladores de la excitabilidad celular, como parte de los sistemas antioxidantes nerviosos, entre otras funciones (Yakugaku Zasshi 2004), por lo que se les considera metales esenciales. La homeostasis de los metales en el tejido cerebral se logra a través de transportadores específicos dentro de la barrera hematoencefálica, el plexo coroideo, el hipocampo y otras regiones, que son capaces de movilizar los metales esenciales desde la sangre al cerebro así como de la eliminación del exceso de metales en dirección opuesta (Crichton y Ward 2006).

En nuestro estudio, se han analizado los niveles de cobre, hierro, manganeso, zinc selenio y aluminio en LCR de individuos pertenecientes a los cuatro grupos de estudio. Los resultados se resumen en la tabla 4.2.2.

Tabla 4.2.2: concentración de metales en el LCR para los cuatro grupos de estudio.

Elemento	CTRL n=16	QSM n=9	DCL n=32	EA n= 17
Cobre	1.15±0.21 ^a IC 95%:0.70-1.60	0.52±0.08 ^b IC 95%:0.31-0.72	0.58±0.07 ^{bc} IC 95%:0.43-0.72	1.19±0.10 ^a IC 95%:0.96-1.40
Hierro	6.40±1.33 IC 95%:3.09-6.16	4.64±0.33 IC 95%:3.76-5.49	4.46±0.17 IC 95%:4.04-4.73	5.72±0.84 IC 95%:3.56-6.78
Manganeso	0.31±0.06 ^a IC 95%:0.17-0.43	0.10±0.03 ^b IC 95%:0.03-0.17	0.16±0.03 ^{bc} IC 95%:0.09-0.22	0.26±0.04 ^{ac} IC 95%:0.18-0.33
Zinc	3.40±0.44 ^a IC 95%:2.43-4.37	1.33±0.24 ^b IC 95%:0.80-1.84	0.38±0.05 ^c IC 95%:0.28-0.48	0.53±0.09 ^{cd} IC 95%:0.33-0.72
Selenio	0.33±0.06 ^a IC 95%:0.17-0.50	0.28±0.09 ^a IC 95%:0.04-0.52	0.47±0.09 ^a IC 95%:0.28-0.65	0.90±0.17 ^b IC 95%:0.51-1.29

Media ±SEM e intervalo de confianza al 95% de los metales traza en LCR de individuos controles (CTRL), con queja subjetiva de memoria (QSM) deterioro cognitivo leve (DCL) y con Enfermedad de Alzheimer (EA). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05) entre los diferentes grupos. Las concentraciones se expresan en µM.

A *grosso modo*, se observa que para casi todos los elementos esenciales estudiados se produce una disminución de los valores en los estadios previos a la EA, los

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Kh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

que corresponden con la de queja subjetiva de memoria y el deterioro cognitivo leve, mientras que en pacientes con EA alcanzan concentraciones similares a las presentes en los individuos sanos. Teniendo en cuenta que el transporte de metales esenciales a través de la barrera hematoencefálica está mediado por mecanismos que secuestran metales en la superficie apical y los exportan a la superficie basolateral para su distribución en el parénquima cerebral, cabría esperar alteraciones entre los mecanismos de transporte de estos elementos en etapas avanzadas de la enfermedad. Si bien estos transportadores se han identificado para metales esenciales (McCarthy y Kosman 2015; Zheng y Monnot 2012), probablemente regulen el transporte de metales potencialmente neurotóxicos como el aluminio (Bressler et al. 2007; Yokel 2006). De acuerdo con la hipótesis de la neurodegeneración mediada por la alteración neurometalómica sería la incapacidad del cerebro para regular y eliminar niveles elevados de metales a través de la barrera hematoencefálica, lo que provocaría una acumulación aberrante y una mayor carga de metales en el tejido cerebral, que resultaría ser un detonante de la patología de la EA (Bush y Tanzi 2008). Así por ejemplo, los niveles de cobre y zinc en cerebros de EA pueden alcanzar hasta tres veces los niveles normales observados en cerebros sanos (Rembach et al. 2013). Nuestros datos sugieren que la disminución observada de la concentración de metales como el cobre y el zinc en los líquidos cefalorraquídeos de los grupos QSM y DCL indican que durante los estadios previos a la manifestación clínica de la Enfermedad de Alzheimer estos metales podrían estar acumulándose en el tejido cerebral y contribuir a la formación de placas de amiloide como se ha descrito previamente en diferentes estudios (Bush 2003; Maynard et al. 2005). En este sentido, se ha observado que las placas seniles presentan altas concentraciones de iones cobre (M.A Lovell et al. 1998). Además, se sabe que este ion favorece la formación de las estructuras en lámina β plegada de los péptidos amiloideos, lo que facilitaría, en última instancia, la agregación de β -amiloide y la formación de las placas seniles (X. L. Dai, Sun, y Jiang 2006). Diferentes estudios han demostrado que el cobre se une con una alta afinidad con el péptido β -amiloide y facilita la formación de las placas, en un proceso favorecido a pH ácidos (Töugu, Karafin, y Palumaa 2008; Jin et al. 2011). Por otro lado, los datos obtenidos para las concentraciones del zinc en nuestro estudio son similares a los llevados a cabo por Kovatsr y colaboradores (2006), quienes observaron un descenso significativo de su concentración en el LCR de pacientes con deterioro cognitivo leve (Kovatsi et al. 2006). El zinc es un elemento esencial para el desarrollo cerebral y su funcionamiento, encontrándose generalmente en los botones sinápticos de las neuronas glutamatérgicas

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

77 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

donde regula los receptores ionotrópicos para el glutamato (Pochwat, Nowak, y Szewczyk 2015). Las diferencias encontradas en los valores de zinc pueden deberse a la precipitación del mismo en las placas seniles. Diferentes estudios han demostrado que el zinc es el metal con mayor poder para inducir la agregación del péptido β -amiloide (Atwood et al. 1998, 2008). Una serie de estudios han demostrado un papel clave del zinc sináptico en la deposición de $A\beta$ y la formación de amiloide en ratones transgénicos Tg2576 (Friedlich et al. 2004; Lee et al. 2002, 2004). Este proceso parece deberse a la pérdida de eficiencia de los procesos de recaptación de Zn^{2+} después de su liberación sináptica, lo que provocaría un aumento de su concentración extracelular, contribuyendo a la formación de las placas seniles por precipitados de zinc (Bush 2003). En este sentido, utilizando técnicas de inmunofluorescencia, se ha demostrado que los transportadores de zinc (ZnT1, 3, 4, 5, 6, y 7 encargados de la recaptación del mismo desde el botón sináptico) están ampliamente presentes en las placas seniles de la corteza cerebral humana, lo que indica un papel relevante del zinc sináptico y su acumulación a la formación de placas amiloideas en la EA (Zhang et al. 2008) y por lo que se esperaría una menor presencia en el líquido cefalorraquídeo. En conjunto, puede especularse que la menor presencia de los metales Cu y Zn en el LCR de los sujetos de los grupos QSM y DCL estaría relacionada con la progresiva acumulación de los mismos en las placas de nueva formación. La dinámica de este proceso provocaría que, una vez saturadas las posibles uniones de estos iones a las placas ya formadas (en estadios de EA), el exceso de estos iones se acumulara en la solución extracelular desde donde serían desplazados hacia el líquido cerebroespinal.

Aunque en este estudio no se han encontrado diferencias en las concentraciones de hierro entre los diferentes grupos de estudio, la alteración de la concentración de este ion en el tejido neuronal ha sido implicada en la patogénesis de la EA (Gaeta y Hider 2005). La acumulación de hierro del cerebro, que es una característica patológica de la enfermedad de Alzheimer (Ayton, Lei, y Bush 2015), tiene el potencial de promover la neurodegeneración a través de promover la formación de placas seniles, ovillos neurofibrilares y daño oxidativos a los compartimentos subcelulares (Yamamoto et al. 2002; Lovell et al. 1998). De hecho, aunque nuestros datos no muestran una disminución significativa de las concentraciones de hierro, durante los estadios de QSM y DCL se observa una tendencia hacia la disminución de este ion en el LCR. Ello podría estar debido a la acumulación del Fe en el tejido cerebral y en las placas seniles como

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

previamente ha sido descrito por Lovell y colaboradores (1998) y seguir una dinámica de acumulación similar a la observada con el Cu y el Zn (Lovell et al. 1998).

Datos recientes sugieren que el exceso de Mn está asociado con el deterioro del aprendizaje y la memoria y puede conducir a un deterioro cognitivo leve irreversible y progresivo y a la EA (Qin y Yuan-Zhong 2018). Sin embargo, el mecanismo de participación del Mn en la patogénesis de la EA sigue siendo controvertido. Los efectos del Mn sobre la patogénesis de la EA están relacionados con efectos de este elemento sobre la función mitocondrial, la expresión de la p53 y el metabolismo de la proteína precursora del amiloide/ β -amiloide (revisado en Qin and Yuan-zhong, 2018). Algunos estudios han reportado niveles de Mn significativamente más altos en la corteza parietal del cerebro en la enfermedad de Alzheimer (Srivastava y Jain 2002). En nuestro estudio hemos observado que las concentraciones de manganeso son similares entre individuos controles y con Enfermedad de Alzheimer, pero que durante los estadios de QSM y DCL se produce un descenso de las concentraciones de este metal en el LCR. Además es interesante observar que el manganeso se encuentra inversamente correlacionado con la formación de placas seniles, lo que podría explicar el descenso de los niveles de este ion en los estadios de QSM y DCL, debido a su precipitación en las mismas (Wallin et al. 2016). Además, en un meta-análisis reciente se ha observado una asociación entre la disminución de los niveles séricos de Mn en pacientes con deterioro cognitivo leve, sugiriendo un papel potencialmente contribuyente para la deficiencia de Mn en el desarrollo de la enfermedad (Du et al. 2017).

Finalmente, los niveles de selenio también se han asociado con la formación de placas amiloideas y ovillos neurofibrilares, y las alteraciones de sus concentraciones se han relacionado con alteraciones en el metabolismo de neurotransmisión, teniendo las selenoproteínas una importancia especial en el desarrollo y el funcionamiento del sistema GABAérgico (ácido γ -aminobutírico, GABA) de la corteza cerebral y el hipocampo (revisado en Loef et al., 2011). En nuestro estudio hemos observado un incremento de los niveles de Se en el LCR de pacientes con EA. Estos datos corroboran lo publicado previamente por Basun y colaboradores (1991), quienes observaron una elevación de Se en LCR, de pacientes con EA (Basun et al., 1991). Quisiéramos destacar que, al igual que para el caso del manganeso, el descenso de los niveles de selenio observado en estadios QSM y DCL se describen por primera vez en el presente estudio, y que, considerando la relevancia de estos hallazgos serán necesarios estudios complementarios

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

79 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

para explicar el papel de la desregulación de este elemento durante los estadios previos a la enfermedad de Alzheimer.

4.2.3. Metales neurotóxicos: el caso del aluminio

El aluminio es un metal no esencial y está bien establecido que en el cerebro juega un papel neurotóxico (Exley 2016). Varios estudios epidemiológicos han revelado una mayor incidencia de la EA o de la mortalidad por EA en zonas con altos niveles de aluminio en el agua potable, lo que sugiere una fuerte asociación entre el aluminio y la EA (Flaten 2001; Forbes y McLachlan 1996; Neri y Hewitt 1991). De hecho, los estudios experimentales realizados han demostrado que el aluminio atraviesa la barrera hematoencefálica y que se acumula de forma semipermanente en el hipocampo (Andrási et al. 2005) y la corteza frontal (Christopher Exley y Vickers 2014), principales regiones cerebrales afectadas en la EA. En nuestro estudio, hemos analizado las concentraciones de Al en el LCR de toda la cohorte de pacientes de los cuatro grupos de estudio. Los datos se muestran en la tabla siguiente (tabla 4.2.3):

Tabla 4.2.3: Concentración de aluminio en el LCR para los cuatro grupos de estudio.

CTRL n=9	QSM n=6	DCL n=25	EA n= 13
0,33±0,06 ^a	0,28±0,09 ^a	0,47±0,08 ^b	0,90±0,11 ^c
IC 95%:0,17-0,49	IC 95%:0,04-0,53	IC 95%:0,28-0,65	IC 95%:0,51-1,29

Media ±SEM e intervalo de confianza al 95% del contenido en Al en LCR de individuos controles (CTRL), con queja subjetiva de memoria (QSM) deterioro cognitivo leve (DCL) y con Enfermedad de Alzheimer (EA). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05) entre los diferentes grupos. Las concentraciones se expresan en µM.

Nuestros datos en LCR están en línea con estudios previos en los que se han demostrado niveles elevados de aluminio en cerebros *postmortem* de sujetos que sufrieron la enfermedad de Alzheimer, en áreas asociados a funciones cognitivas, en particular la corteza frontal, la corteza entorrinal, la amígdala y el hipocampo (Tomljenovic 2011). Además, es notable el hecho de que los sujetos en el grupo DCL presenten niveles aumentados de Al, ya que de existir una relación causa-efecto entre aluminio y EA, ésta tendría su origen en las etapas prodrómicas. Sin embargo, se observa gran dispersión en los niveles de Al en estos dos grupos (0.01-1.76 en DCL y 0.09-2.03 en AD), comparado con los grupos CTRL+QSM (0.01-0.71), lo que sugiere que la relación entre neurotoxicidad inducida por aluminio y patogénesis tipo Alzheimer es mucho más compleja y que no se trata de una relación causa-efecto directa.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

La presencia de aluminio en el tejido cerebral se ha relacionado con los marcadores histopatológicos de la enfermedad de Alzheimer, las placas seniles y los ovillos neurofibrilares. Se ha observado que el aluminio tiene la capacidad para inducir la degeneración neurofibrilar y promover la aparición de estructuras enmarañadas que se asemejan a los ovillos neurofibrilares que se encuentran en cerebros de personas con EA (Muma y Singer 1996; Scott et al. 1993; Kowall et al. 1989). Además se ha observado que la agregación de tau mediada por el aluminio se debe a que aumenta la actividad de las proteínas tau quinasas CDK5 y GSK-3 β y a que inhibe la capacidad de desfosforilación de tau (Scott et al. 1993; Yamamoto et al. 1990). Los efectos del aluminio también afectan a A β , promoviendo su producción, agregación e inhibiendo su degradación (Exley et al. 1993; Luo et al. 2009; Mantyh et al. 1993; Sakamoto et al. 2006). En particular, el Al induce la transformación de la estructura inicial a la configuración de la hoja β (Zhang et al. 2019). El mecanismo exacto por el que el aluminio promueve la agregación del β -amiloide aún no ha sido descrito, pero puede ser por una vía similar a la observada anteriormente con otros metales como el Cu, el Fe o el Zn (Adlard y Bush 2006).

4.2.4. Relaciones con biomarcadores clásicos y entre metales y elementos trazas

El mantenimiento de un equilibrio entre los biometales se complica por la influencia que tienen los diferentes metales entre sí. Sus concentraciones están reguladas por complejas interacciones entre los iones metálicos traza y sus ligandos. Debido a estas interacciones, la pérdida o el aumento de las concentraciones de metal puede llevar al establecimiento de un perfil biometálico completamente nuevo que afecta a otros metales traza del sistema. Es por ello, que resulta interesante estudiar las relaciones que existen entre los perfiles de electrolitos y metales en los diferentes grupos de estudio, con el fin de comprender cómo pueden actuar estos en el desarrollo de la enfermedad y si la alteración de los mismos podrían actuar como un mecanismo subyacentes a la enfermedad de Alzheimer y a los estadios previos al desarrollo de la misma. Además, dada la relación que existe entre los metales y los marcadores histopatológicos de la enfermedad, el estudio de la relación existente entre ellos puede aportar un mayor valor informativo que los marcadores por sí solos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Los resultados de las relaciones bivariadas entre los marcadores clásicos por un lado, y los cationes divalentes y biometales por otro, se resumen en las tablas del anexo V. En nuestro estudio no hemos observado relaciones significativas entre ellos para el grupo control. Sin embargo, se observa que para el estadio de QSM, se encuentra una relación positiva tanto del Zn como del Se con tau-f ($R^2=0,565$; $p=0,085$; $R^2=0,700$ $p=0,005$, respectivamente), así como una relación negativa del Se con el β A ($R^2=0,476$; $p=0,040$) (figura 18). Para el grupo DCL se ha observado una relación positiva entre el Mg y el β A ($R^2=0,193$; $p=0,046$) y negativa del Zn con este mismo marcador ($R^2=0,178$; $p=0,045$) (figura 4.2.2, A Y B). También se ha observado una relación positiva entre el Zn y tau-f ($R^2=0,231$; $p=0,020$) (figura 20). Por otro lado, se observa una relación negativa entre el Fe con tau-t ($R^2=0,363$; $p=0,086$) y el Al con la tau-f ($R^2=0,342$; $p=0,085$) para el grupo EA (figura 21, A y B). En las siguientes figuras se incluyen las relaciones significativas encontradas entre los marcadores histopatológicos y los electrolitos y metales para cada grupo. Los parámetros de todas las relaciones estudiadas en el presente capítulo se pueden consultar en las tablas del anexo V.

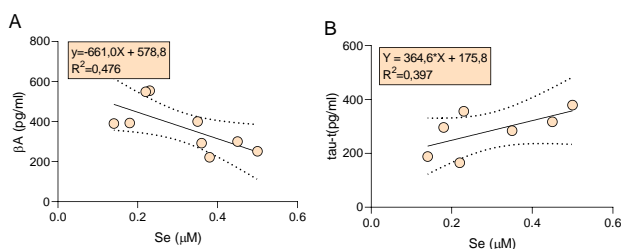


Figura 4.2.2: Relaciones bivariadas entre selenio y β -amiloide (A) y selenio y tau-t (B) para el grupo QSM. Los parámetros de cada recta de regresión están incluidos en la gráfica. R^2 : coeficiente de determinación.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

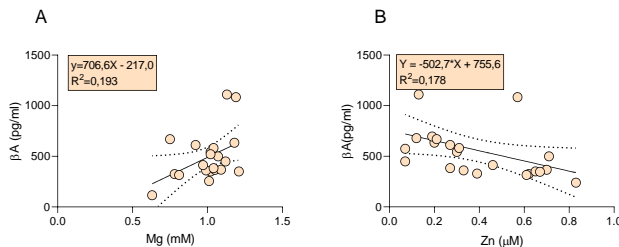


Figura 4.2.3: Relaciones bivariadas entre magnesio y β -amiloide (A) y zinc y β -amiloide (B) para el grupo DCL. Los parámetros de cada regresión están incluidos en la gráfica. R^2 : coeficiente de determinación.

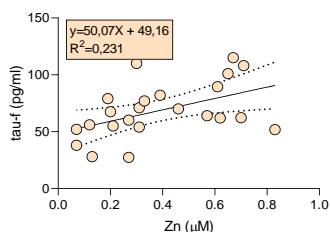


Figura 4.2.4: Relación bivariada entre tau-f y zinc para el grupo DCL. Los parámetros de cada regresión están incluidos en la gráfica. R^2 : coeficiente de determinación.

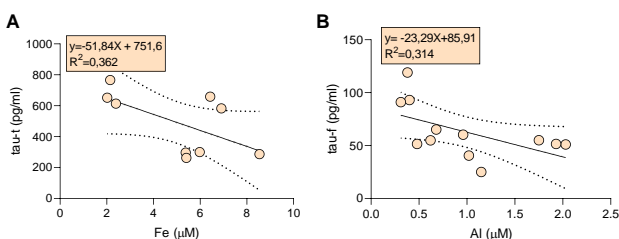


Figura 4.2.5: Relaciones bivariadas entre hierro y tau-t (A) y tau-f (B) y aluminio para el grupo EA. Los parámetros de cada recta de regresión están incluidos en la gráfica. R^2 : coeficiente de determinación.

En nuestro estudio hemos observado una relación positiva entre el Zn y el β -amiloide lo que corroboraría la idea descrita previamente de que este elemento

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sz
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

precipitaría junto el β -amiloide (Maynard et al. 2005), observándose así una relación entre ambas variables y mostrándose una menor concentración de este ion en el LCR como se demostró anteriormente. Así mismo, es la primera vez que se describe una relación entre la concentración de Se y el péptido β A. Aunque en nuestro estudio sólo se ha verificado con dos elementos (Zn y Se), nuestros datos corroboran lo descrito previamente en otros estudios donde se ha observado una correlación inversa entre la concentración de elementos como el Cu, Fe, Zn y Mn en el LCR y la carga de los mismos en las placas seniles (M.A Lovell et al. 1998; X. Dai, Sun, y Jiang 2006), lo que indica un papel significativo de los metales en el metabolismo aberrante del péptido β -amiloide (Rembach et al. 2013; Gaeta y Hider 2005; Wallin et al. 2016; Religa et al. 2006). Además, es importante destacar el hecho de que en individuos sanos no se observa ningún tipo de relación, mientras que las primeras relaciones entre los metales y los marcadores patológicos de la enfermedad se observan en estadios prodrómicos de la misma, observándose relaciones significativas tanto en QSM como en DCL. Estos datos corroboran la idea ampliamente establecida de que los procesos metabólicos y fisiopatológicos asociados a la enfermedad de Alzheimer se producen bastante antes, incluso décadas, de que se manifieste clínicamente la enfermedad (Dubois et al. 2016).

En relación a las asociaciones entre metales, hemos observado que para el grupo control se obtuvieron relaciones positivas entre Mg/Ca; Cu/Mn; Cu/Zn (figura 4.2.6). Para el grupo QSM se observaron relaciones positivas para los pares Fe/Zn; Fe/Mn; Zn/Mn y Zn/Al. Las relaciones observadas para el grupo DCL fueron entre Cu/Mn; Cu/Se y por último, se observaron las siguientes relaciones positivas entre Cu/Al; Mn/Se y Mn/Al para el grupo con Enfermedad de Alzheimer.

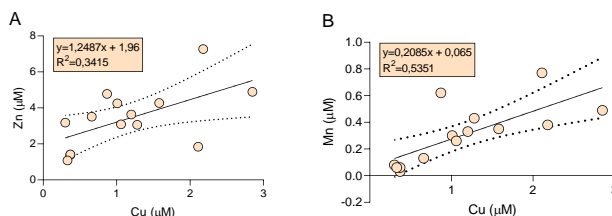


Figura 4.2.6: Relación biviada entre cobre y zinc (A) y cobre y manganeso (B) para el grupo control. Los parámetros de cada recta están incluidos en la gráfica. R²: coeficiente de determinación.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sZ
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

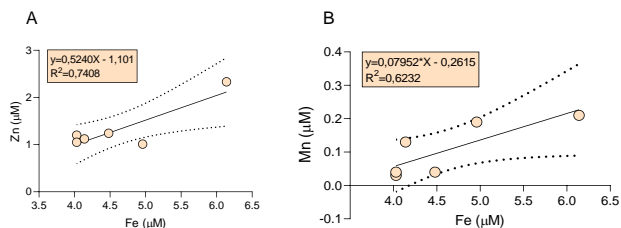


Figura 4.2.7: Relaciones bivariadas entre hierro y zinc (A) y hierro y manganeso (B) para el grupo queja subjetiva de memoria. Los parámetros de cada recta están incluidos en la gráfica. R²: coeficiente de determinación.

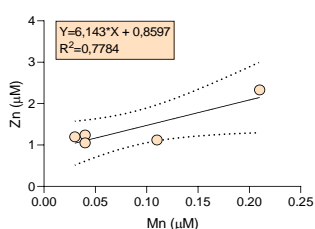


Figura 4.2.8: Relación bivariada entre manganeso y zinc para el grupo queja subjetiva de memoria. Los parámetros de cada recta están incluidos en la gráfica. R²: coeficiente de determinación.

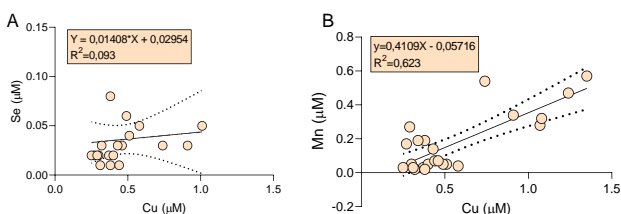


Figura 4.2.9: Relación entre cobre y manganeso (A) y cobre y selenio (B) para el grupo deterioro cognitivo leve. Los parámetros de cada recta están incluidos en la gráfica. R²: coeficiente de determinación.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sZ
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

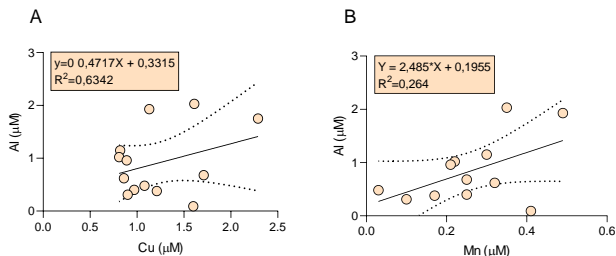


Figura 4.2.10: Relación bivalente entre cobre y aluminio (A) y manganeso y selenio (B) para el grupo enfermedad de Alzheimer. Los parámetros de cada recta están incluidos en la gráfica. R^2 : coeficiente de determinación.

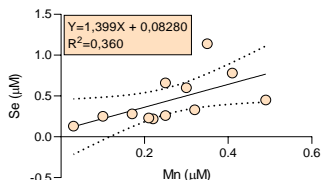


Figura 4.2.11: Relación bivalente manganeso y selenio para el grupo enfermedad de Alzheimer. Los parámetros de cada recta están incluidos en la gráfica. R^2 : coeficiente de determinación.

Los niveles de electrolitos y metales en LCR de los distintos grupos de estudio tienen un valor informativo y descriptivo mientras que la forma en que estos metales están coregulados puede representar una medida más útil para una investigación como posible biomarcador diagnóstico del estado de la EA y de los estadios prodrómicos. En nuestro estudio observamos diferentes asociaciones entre los metales dependiendo del estadio considerado. Además, a diferencia de los estadios CTRL, QSM y DCL, en los individuos con EA, el LCR muestra un menor número de asociaciones lineales entre las concentraciones de los metales, por lo que sugerimos que estas alteraciones en la relación entre metales podrían proporcionar un método adecuado y complementario para el establecimiento de nuevos criterios diagnósticos en los trastornos asociados a la EA. Nuestros análisis de regresión demuestran que existen diferentes grados de interrelación entre metales en el *continuum* de la enfermedad de Alzheimer, y que éstos son específicos de estadios prodrómicos. Sin duda, los cambios en las relaciones entre los distintos metales y sus concentraciones se producen de manera temprana y probablemente

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

participan en los procesos metabólicos que subyacen a la aparición de las características patológicas de la EA.

4.2.5. Relaciones multivariantes y validación de los cationes divalentes, metales y elementos traza como marcadores

Una vez evaluados los perfiles metalómicos individuales y sus relaciones bivariantes, y dada la complejidad de los resultados procedimos a realizar una evaluación multivariante de los datos. Inicialmente realizamos análisis factoriales mediante el análisis de componentes principales (PCA). Utilizando el conjunto de todas las variables y todos los casos, se encuentra que mediante dos componentes principales se explica un 64,73% del total de la varianza. Un 38,52% del total de la varianza se explica con la componente 1 (PC1) mientras que el resto de la varianza, el 17,79%, se explica con la inclusión de la componente 2 (PC2). Las variables que mayores coeficientes de extracción presentan ($>0,5$) sobre PC1 son cobre, selenio, manganeso hierro y calcio mientras que para el caso de la PC2 son el aluminio y el manganeso. En la figura 4.2.12, A se muestran las puntuaciones para cada variable en la componente canónica. Las diferencias entre grupos se atribuyeron principalmente a las variables con coeficientes más altos de cada componente (PC1 y PC2), respectivamente, y revelaron que las alteraciones de las concentraciones de los metales traza y cationes divalentes en el conjunto de datos son suficientemente diferentes como para permitir una completa segregación de los grupos. Los análisis de diferencias entre grupos de los *factors scores* obtenidos en los análisis de componentes principales indican que la conjunción de PC1 y PC2 permite diferenciar los grupos CTRL de los grupos QSM, DCL y EA y que dentro del espectro de la enfermedad, este análisis permite diferenciar el conjunto de grupos que forman su *continuum* (figura 4.2.12).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

87 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

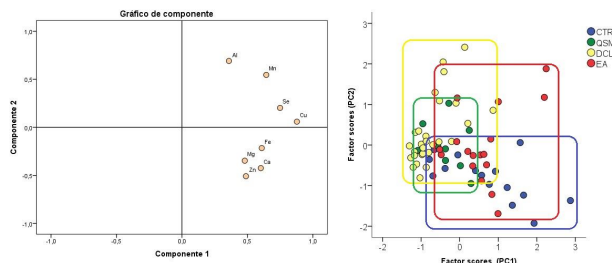


Figura 4.2.12: Resultados de los análisis PCA. A) Puntuaciones para cada variable en las dos componentes principales B) Gráfico de las puntuaciones de los factores (factor scores) para los grupos diferentes de estudio.

A continuación se llevó a cabo un análisis multivariante de tipo discriminante a partir de los valores de las variables mejor representadas en los resultados de PCA, dado que el PCA proporciona un método estadístico para la reducción de dimensiones. Se utilizaron las variables cobre, hierro, manganeso, selenio, aluminio, calcio y zinc. Mediante el análisis de funciones discriminantes es posible determinar la influencia cuantitativa de estas variables en la discriminación del estadio de la enfermedad y los controles, mediante una función polinómica que cuantifica la pertenencia a cada grupo preasignado. Los resultados que se muestran en la figura 4.2.13 revelan que la primera función canónica representaba la gran mayoría de la variación entre grupos (68,2%) mientras que la segunda variable canónica representaba un 30,6% adicional.

Las matrices de estructura se muestran en la tabla anexa a la figura 4.2.13. El test de *chi-cuadrado* reveló que la primera función discriminante contribuye a la discriminación muy significativa entre los grupos ($\chi^2 = 100,36$ $p = 0,000$), y según los coeficientes de estructura, estaría determinada principalmente por la variable zinc. La segunda función discriminante contribuye a la discriminación de los grupos en menor medida, pero de manera muy significativa ($\chi^2 = 40,06$ $p=0,000$), y según los coeficientes de estructura, estaría determinada principalmente por las variables selenio, cobre y hierro. En la figura 4.2.13 se muestra la distribución de casos en función de las funciones canónicas obtenidas, observándose una muy buena segregación por grupos. El resumen de las funciones canónicas con la aportación en términos de coeficientes para cada variable se muestra anexa a la figura 4.2.13.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sz
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

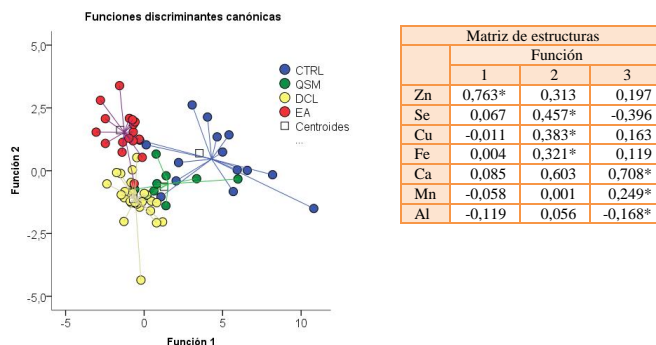


Figura 4.2.13: Resultados de los análisis discriminantes para los cuatro grupos de estudio. A) representación gráfica de las dos primeras funciones discriminantes para los cuatro grupos. B) Matriz de estructuras de las tres funciones discriminantes canónicas. * Nivel de significación dentro de cada función, $p < 0.05$.

Este es el primer estudio detallado que muestra la relación multivariante entre las alteraciones de los patrones metálicos en el líquido cefalorraquídeo y estadios cognitivos previos a la enfermedad de Alzheimer. El impacto de los diferentes patrones metálicos presentes en los diferentes grupos nos permite *a priori* hipotetizar sobre las variaciones de los mismos a lo largo del proceso patológico de la enfermedad. Con ellos, parece que durante el *continuum* del espectro patológico, las alteraciones de los patrones metálicos y electrolíticos durante los estadios prodrómicos de la enfermedad, en la queja subjetiva de memoria son similares a los presentes en los individuos con deterioro cognitivo leve, encontrándose el grupo QSM englobado en éste último. Sin embargo, conforme avanza la enfermedad, se observa una clara diferencia entre los patrones presentes en los individuos sanos que en los pacientes tanto con deterioro cognitivo leve como con Enfermedad de Alzheimer. La alteración de la homeostasis cerebral metálica y electrolítica en las etapas de deterioro cognitivo leve, podrían estar contribuyendo al desarrollo de la pérdida cognitiva, la pérdida de funciones fundamentales para la correcta fisiología cerebral y en definitiva el inicio de procesos que disparen las alteraciones neuropatológicas de la enfermedad de Alzheimer.

Por lo tanto, la determinación de los patrones metálicos, y la relación existente entre las alteraciones de los mismos, tanto con un abordaje univariante como

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sz
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

multivariante podrían proporcionar herramientas diagnósticas y de seguimiento del espectro de la enfermedad de Alzheimer. Así mismo, el análisis de los mismos abre una nueva ventana al abordaje metalómico del cerebro y su relación procesos patológicos ligados a la enfermedad de Alzheimer.

Finalmente, una vez evaluadas las alteraciones multivariantes en los diferentes grupos de estudio, se procedió a validar el potencial de los cationes divalentes y metales traza, utilizando las puntuaciones factoriales, como marcadores del estadio correspondiente al espectro de la enfermedad a través del estudio de especificidad y sensibilidad. Los resultados del análisis del área bajo la curva característica de funcionamiento para factor scores obtenidos en los análisis de PCA se muestran en la tabla 4.2.4.

Tabla 4.2.4: Resultados de los análisis de curvas ROC para la comparación de los distintos marcadores en los grupos de este estudio.

	CTRL vs QSM			QSM vs DCL			
	AUC	Cut-off	Sensibilidad/ Especificidad	AUC	Cut-off	Sensibilidad/ Especificidad	
<i>Factor score 1</i>	0,173	1,09	0,16/0,23	<i>Factor score 1</i>	0,581	1,01	0,56/0,67
<i>Factor score 2</i>	0,128	1,63	0,00/0,30	<i>Factor score 2</i>	0,681	0,81	0,78/0,67
CTRL vs DCL			QSM vs EA				
<i>Factor score 1</i>	0,171	1,14	0,13/0,30	<i>Factor score 1</i>	0,771 *	1,12	0,69/0,83
<i>Factor score 2</i>	0,194	1,10	0,13/0,30	<i>Factor score 2</i>	0,937 ***	1,27	0,81/1,00
CTRL vs EA			DCL vs EA				
<i>Factor score 1</i>	0,555	1,57	0,37/0,923	<i>Factor score 1</i>	0,791 *	1,07	0,81/0,74
<i>Factor score 2</i>	0,524	1,09	0,93/0,30	<i>Factor score 2</i>	0,921 ***	1,09	0,938/0,870

AUC: Área bajo la curva. Los valores de los puntos de corte (Cut-off) se obtuvieron a partir del cálculo de los Índices de Youden que relacionan sensibilidad y especificidad (véase material y métodos). *p<0.05 y ***p<0.001: Nivel de significación de la prueba entre grupos.

Seleccionamos los marcadores con el área bajo la curva (AUC) superiores a 0,7. El análisis de los *factos scores* presentan buen poder de discriminación entre los grupos QSM-EA y DCL-EA, por lo tanto, nuestros datos sugieren que la determinación de los cationes monovalentes y así como las alteraciones en su co-regulación podrían proporcionar una representación útil de las perturbaciones que tienen lugar en el cerebro durante los diferentes estadios del espectro de la enfermedad de Alzheimer. La determinación de los mismos en el LCR tiene importancia para orientar futuras

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sz
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2914873	Código de verificación: yguD1Khh
Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27

investigaciones sobre la utilidad de los estos elementos como posibles biomarcadores para seguir rápidamente la progresión o la gravedad en los sujetos con EA, y posiblemente para predecir la aparición de la enfermedad antes de que se manifiesten claramente los síntomas clínicos y neurológicos. No obstante, se hace necesario aumentar el número de casos dentro de cada grupo con el objeto de comprobar la utilidad real de estas aproximaciones, así como para precisar los rangos de valores de valor diagnóstico.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

91 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

91 / 179

4.3. Marcadores del estado oxidativo e inflamatorio en el espectro de la Enfermedad de Alzheimer

Varias líneas de evidencias apoyan la hipótesis de que el estrés oxidativo y nitrosativo juegan un papel perjudicial en la patogénesis de la EA y que conduce al daño de elementos celulares vitales como ácidos nucleicos, lípidos y proteínas (D. A. Butterfield y Lauderback 2002). La peroxidación lipídica es uno de los principales eventos que causa el desequilibrio de la homeostasis redox y el consiguiente daño oxidativo dentro de la célula. La peroxidación de lípidos puede dañar directamente las membranas, ya que las especies reactivas del oxígeno atacan a los ácidos grasos poliinsaturados en la bicapa lipídica, produciendo lipoperóxidos reactivos. Las membranas neuronales son particularmente ricas en ácidos grasos poliinsaturados, que se descomponen fácilmente y liberan niveles elevados de aldehídos electrofílicos reactivos, capaces de reaccionar con más lípidos de membrana y oxidarlos, causando la desestabilización de la membrana (D. A. Butterfield y Stadtman 1997). Además, también se ha observado que algunos de los metabolitos resultantes de procesos oxidativos de ácidos grasos cerebrales desencadenan procesos inflamatorios cerebrales (Bona et al. 2010). Se ha propuesto que estos peróxidos lipídicos juegan un papel determinante en la patogénesis del deterioro cognitivo leve y la enfermedad de Alzheimer (Praticò et al. 2002).

Como se expuso en el capítulo de introducción, para combatir el exceso de generación de especies reactivas del oxígeno (EROS) se encuentra toda la red de mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo, desarrollada para detectar y controlar diversas formas de estrés oxidativo. Esta defensa incluye la acción de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa como primera línea de defensa, el sistema del glutatión/glutaredoxina y el sistema tioredoxina/peroxiredoxina (Calabrese et al. 2007). Durante el transcurso de la enfermedad, la actividad de estas enzimas se puede ver alterada. De hecho, se ha observado, que la actividad de estas enzimas SOD y CAT se reduce a lo largo de todo el espectro de la EA, desde el DCL no amnésico hasta los pacientes con deterioro cognitivo amnésico, lo que indica que los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo están comprometidos en las primeras fases de la enfermedad (Ansari y Scheff 2010; Stephen W. Scheff, Ansari, y Mufson 2016).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

92 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

4.3.1. Marcadores de peroxidación lipídica

La presencia de productos de peroxidación lipídica ha sido ampliamente estudiada como marcadores del daño oxidativo de las membranas celulares neuronales en diversas patologías neurodegenerativas, incluyendo la EA, la enfermedad de Parkinson, la Esclerosis Lateral Amiotrófica, entre otras (Singh et al. 2019; Gaschler y Stockwell 2017). El malondialdehído (MDA) es uno de los compuestos más ampliamente estudiados como metabolito residual (*by-product*) y marcador de procesos de estrés oxidativo sobre lípidos. El MDA es un cetoaldehído fisiológico producido por descomposición de lípidos insaturados. El exceso de MDA producido como resultado del daño tisular puede combinarse con grupos aminos de proteínas (fundamentalmente con residuos de lisina por la reacción de adición de Michael) lo que produce aductos de proteínas modificadas de funcionalidad alterada.

En nuestro estudio hemos determinado la concentración de malondialdehído en el líquido cefalorraquídeo de los cuatros grupos de estudio. Como se muestra en la figura 4.3.1, se observaron diferencias entre las concentraciones de MDA de los CTRL frente a los QSM. Así mismo, dentro del espectro de la enfermedad, las concentraciones de MDA son estadísticamente inferiores cuando se compraran con las de DCL y EA. No se observan diferencias en las concentraciones entre DCL y EA.

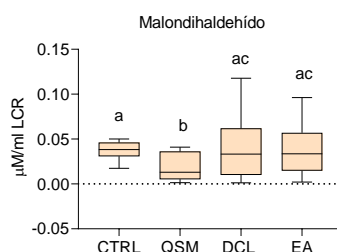


Figura 4.3.1: Contenidos de malondialdehído del líquido cefalorraquídeo en los grupos de estudio: controles (CTRL), queja subjetiva de memoria (QSM), deterioro cognitivo leve (DCL) y Enfermedad de Alzheimer (EA). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Las membranas neuronales son particularmente ricas en ácidos grasos poliinsaturados, que se descomponen en respuesta a ataques oxidativos y liberan niveles elevados de aldehídos electrofílicos reactivos, capaces de unirse covalentemente a las proteínas formando aductos con aminoácidos específicos (D. A. Butterfield y Stadtman 1997).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Cabría esperar los niveles de especies oxidativas relacionadas con los lípidos aumenten progresivamente a medida que avanza la EA, sin embargo nuestros datos muestran que no existe un aumento de las mismas en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer. Aunque generalmente se considera que las especies reactivas del oxígeno ejercen efectos deletéreos, cada vez es más evidente que los EROS pueden servir a segundos mensajeros implicados en los procesos de señalización y participar en una serie de fenómenos fisiológicos normales. Por lo tanto, es probable que los metabolitos oxidados derivados puedan ser responsables de desencadenar señales transcripcionales que potencien la expresión de los componentes de los sistemas antioxidantes celulares, como hemos observado anteriormente en nuestro laboratorio para los lipoperóxidos derivados del ácido docosahexaenoico (Casañas-Sánchez et al. 2014). Este fenómeno podría comenzar a darse en las etapas presintomáticas de la enfermedad, y verse reflejado a través del descenso de los niveles de MDA observado en el grupo QSM cuando se compara con el CTRL. Por otra parte, estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado una reducción de los niveles de ácidos grasos de la serie omega-3 en cerebros de personas con Alzheimer. Como consecuencia de la reducción de los PUFA se produce una disminución del índice de insaturación y por ello una reducción de la peroxidabilidad de las membranas, dado un incremento de ácidos grasos saturados no oxidables, pudiendo ser éste otro motivo para explicar los resultados encontrados en el líquido cefalorraquídeo de estudio para los grupos DCL y EA (Martín et al. 2010b).

Además del daño directo por oxidación de las macromoléculas celulares, la formación de radicales libres también puede causar daño indirectamente mediante la activación de otros mecanismos nocivos, tales como inflamación (M. A. Smith et al. 1997). En este sentido, el estrés oxidativo y la inflamación están relacionada recíprocamente de tal manera que los procesos inflamatorios conducen a un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno y viceversa (Wang et al. 2004). Existe una variedad de eicosanoides (derivados de ácidos grasos poliinsaturados de 20 átomos de carbono, que se convierten a endoperóxidos), que son moduladores directos de procesos de inflamación en diversos tejidos, incluido el cerebro. Uno de los más estudiados son los F2-isoprostanos (F2-IsoPs), moléculas que contienen un anillo de prostanos tipo F similares a la prostaglandina F2 α . Son generados *in vivo* e *in situ*, por peroxidación no enzimática catalizada por radicales libres provenientes del ácido

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

94 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

araquidónico, presente y abundante en los lípidos de las membranas neuronales. En el presente estudio se evaluó la prostaglandina F2a (8-IsoF2 α) como lipoperóxido implicado en procesos inflamatorios cerebrales. Los niveles de 8-IsoF2 α en el grupo CTRL son significativamente inferiores a los encontrados en pacientes con EA, pero no hay diferencias con los grupos QSM y DCL. Dentro del *continuum* de la enfermedad aunque se observa un incremento significativo cuando se compara el grupo DCL y el grupo EA (figura 4.3.2).

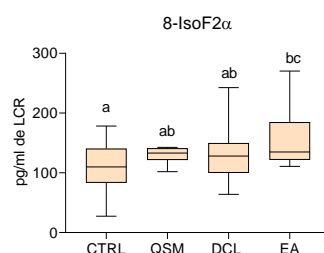


Figura 4.3.2: Diagrama de caja para la concentración de 8-IsoF2 α en el líquido cefalorraquídeo de pacientes controles (CTRL), pacientes con queja subjetiva de memoria (QSM), con deterioro cognitivo leve (DCL) y con Enfermedad de Alzheimer (EA). Letras diferentes indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que los procesos inflamatorios predominan en las etapas avanzadas de enfermedad de Alzheimer. El aumento de la síntesis y la secreción de prostaglandinas en el LCR de enfermos de Alzheimer se ha asociado con la activación de los monocitos, un proceso que puede ser regulado por peroxinitrilos (Landino et al. 1996). El incremento observado de la concentración de este marcador es similar al observado por Montine y colaboradores (2011), los cuales observaron que las concentraciones de 8-IsoF2 α aumenta conforme avanza la edad de los sujetos de estudio y que su aumento se cronifica en pacientes que sufren EA (Montine et al. 2011). Así mismo, este mismo grupo investigó este marcador en otros fluidos corporales como saliva u orina, no observando diferencias entre las concentraciones del 8-IsoF2 α , sugiriendo por lo tanto que el LCR actúa como mejor fluido para establecer marcadores frente a otros fluidos biológicos (Montine et al. 2002). Análogamente, los experimentos en cultivo de tejidos han demostrado que la activación inflamatoria de la microglía puede resultar en un aumento de la producción de diferentes prostaglandinas. Además, estudios previos han

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sZ
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

demonstrado que la relación entre la prostaglandina E2 (PGE2), también implicada en los procesos pro-inflamatorios, y la severidad de la demencia puede deberse a aumento de la actividad inflamatoria de la enzima ciclo-oxigenasa (COX) y la posterior pérdida progresiva de neuronas, lo que resultaría en una producción mayor de PGE2 en los pacientes con Enfermedad de Alzheimer (Combrinck et al. 2006). Por lo tanto, un incremento de las concentraciones del 8-IsoF2α en el LCR de los pacientes con EA podría estar reflejando la activación microglial conocida en esta enfermedad.

Dado que tanto en MDA como el 8-IsoF2α parecen comportarse de manera similar en los distintos grupos, hemos realizado el análisis de las relaciones entre ambos marcadores de estrés oxidativo en lípidos (figura 4.3.3).

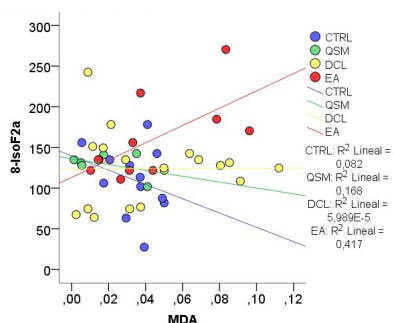


Figura 4.3.3: Relaciones bivariadas entre MDA e 8-IsoF2α para los grupos de estudio controles (CTRL), pacientes con queja subjetiva de memoria (QSM), con deterioro cognitivo leve (DCL) y con Enfermedad de Alzheimer (EA). Los valores de R² se incluyen en el gráfico.

Los análisis de regresión lineal muestran que no existe una relación aparente ($R^2 \sim 0$ y $p > 0.1$) entre ambos marcadores, con la excepción del grupo EA, donde se observa una correlación positiva ($R^2 = 0.417$) que resulta ser estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Este resultado sugiere que en el estadio más avanzado, los mecanismos que tienden a tamponar la generación de ROS y de contener el nivel de oxidación lipídica y de integridad de membranas se han vuelto ineficientes, iniciándose por tanto una situación de estrés oxidativo por peroxidación lipídica. Por otro lado, es interesante el hecho de que las pendientes de las regresiones van siendo cada vez mayores a medida que se progresa en la evolución de la enfermedad (CTRL < QSM < DCL < EA) (figura 4.3.3), lo que sugiere

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sz
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2914873	Código de verificación: yguD1Khh
Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27

que estos mecanismos probables mencionados anteriormente ocurren gradualmente, y que sólo cuando son suficientemente elevados, los marcadores lipídicos son detectables en el LCR con niveles significativamente mayores.

4.3.2. Relación de los marcadores de peroxidación lipídica con los metales

Los metales traza han sido relacionados con el estrés oxidativo y con la peroxidación lipídica. Como hemos descrito anteriormente, la sobreproducción de EROS que resulta en estrés oxidativo puede tener un efecto nocivo y puede ser un importante mediador de los procesos inflamatorios y de los daños a las estructuras celulares y, en consecuencia, de varios estados de enfermedad y envejecimiento (Tönnies y Trushina 2016). Además se ha observado que estos procesos se encuentran acentuados cuando en el medio se encuentra una exposición de agentes pro-oxidantes. Como vimos en el capítulo anterior, a lo largo del *continuum* de la enfermedad de Alzheimer se produce una alteración de las concentraciones de metales en el LCR. Esta alteración de metales podría ser mediadora de procesos de estrés oxidativo a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Lavado et al. 2019). Con el objeto de examinar esta posible relación en los datos de nuestro estudio, hemos analizado en las mismas muestras de LCR las posibles relaciones entre los contenidos de Cu, Fe, Mn, Zn, Mn, Se y Al y las de los marcadores MDA y 8-IsoF 2α , mediante análisis de regresión múltiple. Los resultados obtenidos se encuentran en la figura 4.3.4 (A y B), figura 4.3.5 y tabla 4.3.1 (A y B).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

97 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Tabla 4.3.1: Resultados del análisis de regresión múltiple para el marcador 8-IsoF2α y los metales de transición para el conjunto de datos de todos los grupos de estudio. A) Análisis incluyendo todos los metales objeto de estudio. B) Análisis incluyendo las variables más significativas.

A) Coeficientes de la función de regresión

Dependiente 8-IsoF2α	Coeficientes		t	p-valor
	b	ES		
(Constante)	105,476	15,494	6,807	0,000
Fe	-1,906	2,954	-,645	0,524
Al	21,936	11,498	1,908	0,066
Cu	1,550	24,740	,063	0,950
Mn	-7,265	34,316	-,212	0,834
Zn	-,942	6,042	-,156	0,877
Se	62,195	32,646	1,905	0,066

B) Coeficientes de la función de regresión

Dependiente 8-IsoF2α	Coeficientes		t	p-valor
	b	ES		
(Constante)	96,534	11,333	8,518	0,000
Al	21,622	9,844	2,197	0,035
Se	49,352	24,409	2,022	0,051

b: coeficiente de regresión. ES: error estándar de la estimación

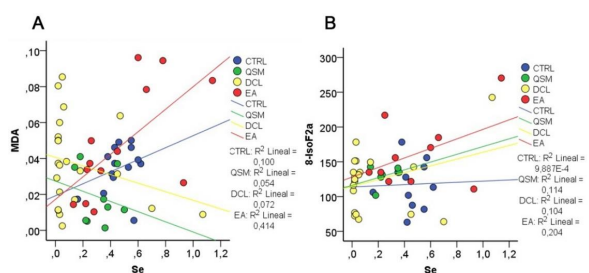


Figura 4.3.4: Relaciones bivariantes entre MDA y Se (A) y 8-IsoF2α y Se (B) en los grupos de estudio para los grupos de estudio controles (CTRL), pacientes con queja subjetiva de memoria (QSM), con deterioro cognitivo leve (DCL) y con Enfermedad de Alzheimer (EA). Los valores de R² se incluyen en el gráfico.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33

Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49

Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguilera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

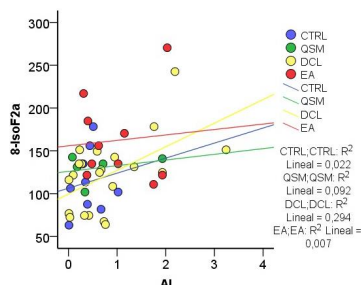


Figura 4.3.5: Relación bivalente entre 8-IsoF2 α y aluminio en los grupos de estudio para los grupos de estudio control (CTRL), queja subjetiva de memoria (QSM), deterioro cognitivo leve (DCL) y Enfermedad de Alzheimer (EA). Los valores de R² se incluyen en el gráfico.

Los resultados muestran que sólo el 8-IsoF2 α presenta relaciones lineales significativas con los metales (ANOVA $p=0,870$ para MDA; $p=0,070$ para 8-IsoF2 α), en particular con el aluminio y el selenio (Tabla 16A). Una vez aisladas las variables metálicas, se obtiene una asociación muy significativa (ANOVA $p=0,003$) entre los niveles de 8-IsoF2 α como variable dependiente y Al y Se como variables independientes (Tabla 4.3.1B). Una vez establecida la relación entre estos dos metales y los valores de 8-IsoF2 α , se analizaron los comportamientos de esta relación en cada uno de los grupos de estudio. Los resultados se muestran en las figuras 4.3.4 y 4.3.5. Como se puede observar los valores mayores del coeficiente de determinación (R²) para el selenio se observan para el grupo EA, no existiendo relación en los grupos CTRL y QSM. Respecto al aluminio, los mayores de R² se observan sólo en el grupo DCL. Un hallazgo interesante y consistente con la relación MDA/8-IsoF2 α , es que en el estadio EA se observa una muy buena correlación entre los valores de MDA y Se, que no se observa en estadios anteriores. Estos resultados indican existe una transición en la generación del metabolito lipídico que dependería sobre todo del aluminio en el estadio DCL y del selenio en el estadio EA. Por lo tanto, una consecuencia importante de estos hallazgos es que la conversión a demencia se podría asociar, entre otros factores, a la presencia de niveles elevados de aluminio, al menos en los casos en los que este metal se encuentra elevado.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

4.3.3. Marcadores de la actividad antioxidante y detoxificante

En línea de los resultados anteriores, y con el objeto de dilucidar la hipótesis del papel del estrés oxidativo como mecanismo subyacente a la Enfermedad de Alzheimer, se evaluó la actividad de varias enzimas críticas implicadas en la defensa antioxidante y detoxificante. En primer lugar la actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD), como primera línea de defensa antioxidante y la actividad de la glutatión-S-transferasa (GST) y butirilcolinesterasa (BuCh), enzimas con capacidad antioxidante y/o detoxificante.

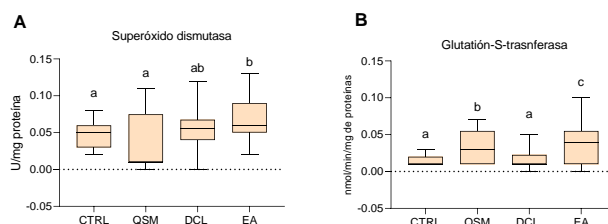


Figura 4.3.6: Diagrama de cajas para la actividad de la superóxido dismutasa (A) y la glutatión-S-transferasa (B) en el líquido cefalorraquídeo en los grupos de estudio: controles (CTRL), queja subjetiva de memoria (QSM), deterioro cognitivo leve (DCL) y Enfermedad de Alzheimer (EA). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Existen pocos estudios donde se haya determinado la actividad de la enzima SOD extracelular en líquido cefalorraquídeo humano, y aún menos en pacientes con patologías neurodegenerativas. En este estudio, hemos observado que la actividad de SOD extracelular aumenta sustancialmente en los pacientes con EA en comparación con los sujetos control, y que dentro del espectro de la enfermedad parece que se puede apreciar un incremento progresivo de la actividad de esta enzima, siendo estadísticamente significativo entre los estadios control o de queja subjetiva de memoria y los pacientes con Enfermedad de Alzheimer (figura 4.3.6A). En estudios llevados a cabo en tejido cerebral, se ha mostrado que existe un aumento de la actividad de la enzima SOD en hipocampo de pacientes con Enfermedad de Alzheimer frente a cerebros de pacientes sanos (Omar et al. 1999). También se han observado elevaciones en otras enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa en hipocampo y en

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

amígdala (Mark A. Lovell et al. 1995). Otros estudios han mostrado que no se producen cambios en los niveles de ARNm de los principales genes antioxidantes durante el proceso de envejecimiento y de Enfermedad de Alzheimer, sugiriéndose que la modulación de las enzimas antioxidantes se encuentra bajo regulación postranscripcional, y que el aumento de su actividad es debido a la presencia de daño oxidativo tisular y de un incremento del estatus oxidativo del medio (Calabrese et al. 2007). En nuestro trabajo, el incremento observado de la SOD extracelular en el líquido cefalorraquídeo, podría reflejar un aumento de la respuesta del tejido cerebral a la elevación de los niveles de radicales superóxido generados durante el proceso oxidativo-degenerativo.

Por otra parte, la inducción de la GST está muy relacionada con la neutralización de productos tóxicos, así como la regulación de la homeostasis redox celular y participan en la activación de señales en la apoptosis celular (Raza 2011). La acción detoxificante de la GST es llevada a cabo mediante un ataque nucleófilo del GSH a los átomos electrofílicos de carbono, azufre o nitrógeno del sustrato xenobiótico, impidiendo así su interacción con proteínas y ácidos nucleicos celulares cruciales (Hayes, Flanagan, y Jowsey 2005). Hasta el momento, hay pocas referencias en las que se describa la actividad de la GST en el líquido cefalorraquídeo y aquellas en las que se utiliza tejido de individuos con Enfermedad de Alzheimer los datos son controvertidos. Así, estudios desarrollados en tejidos post-mortem de pacientes con EA, han mostrado que la actividad GST se encuentra significativamente disminuida en todas las áreas del cerebro, específicamente en la amígdala, hipocampo, lóbulo parietal inferior y núcleo basal de Meynert (Lovell, Xie, y Markesbery 1998). Sin embargo, en estudios posteriores se ha observado un ligero aumento en los niveles de la enzima en la corteza cerebral de los pacientes con EA y un aumento de la enzima en el líquido cefalorraquídeo post-mortem (Burgess et al. 2006). En nuestro estudio, hemos observado como los niveles de GST son superiores en pacientes con Enfermedad de Alzheimer cuando se comparan con los individuos controles, lo que es indicativo de la producción y vertido de compuestos residuales y neurotóxicos, y de su eliminación hacia el LCR en los individuos con EA (figura 4.3.6B). Sin embargo, aunque cabría esperar un incremento paulatino a lo largo del *continuum* de la enfermedad, en nuestro estudio la actividad de la enzima GST se ve disminuida durante el estadio DCL. Es posible que la actividad de esta enzima se encuentre anormalmente elevada durante estadios prodrómicos de la enfermedad, como observamos durante el estadio QSM. Aunque el estrés oxidativo es evidentemente más significativo e impactante en la maquinaria redox cuando se inician los indicios de la patología, los

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

101 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

motivos de las variaciones de la actividad podrían tener diversas causas, por lo que será necesario realizar estudios adicionales para la comprobación de estos resultados y dilucidar el papel de la disminución de la actividad GST en la patogénesis y la progresión de la enfermedad.

En el metabolismo sináptico que llevan a cabo estas enzimas intervienen las enzimas colinesterasas, acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, las cuales hidrolizan acetilcolina o ésteres de colina respectivamente en la hendidura sináptica. En el cerebro, la butirilcolinesterasa (BuCh) se expresa principalmente la glía, la materia blanca y en poblaciones específicas de neuronas de la formación de la amígdala y el hipocampo, así como en el tálamo, regiones que son importantes en la cognición y el comportamiento, funciones comprometidas en la enfermedad de Alzheimer (Darvesh y Hopkins 2003). Aunque las funciones del BuCh no han sido completamente dilucidadas, se ha demostrado que está involucrada, junto con la acetilcolinesterasa (ACh), en la co-regulación de la neurotransmisión colinérgica (Mesulam et al. 2002). Además, se ha demostrado que la BuCh está involucrada en un número de procesos que incluyen la eliminación de xenobióticos, el metabolismo de los lípidos, el desarrollo cerebral, la inflamación (revisado en Lockridge, 2015). En nuestro estudio, hemos determinado la actividad de la enzima BuCh en el líquido cefalorraquídeo de los cuatro grupos de estudio. Los resultados obtenidos se encuentran en la figura 4.3.7.

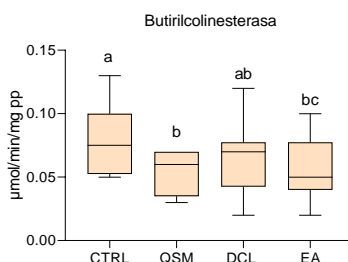


Figura 4.3.7: Diagrama de cajas para la actividad de enzima butirilcolinesterasa en el líquido cefalorraquídeo en los grupos de estudio: controles (CTRL), queja subjetiva de memoria (QSM), deterioro cognitivo leve (DCL) y Enfermedad de Alzheimer (EA). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En nuestro estudio, hemos observado que existe una disminución de la actividad de esta enzima en los pacientes QSM y EA cuando se compara con los CTRL (figura

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

4.3.7). Esto podría estar mostrando el inicio de la pérdida de la actividad de las neuronas colinérgica, lo que llevaría a una disminución detectable de la actividad de la enzima. Posteriormente dentro del espectro, los cambios sólo son detectables cuando el proceso degenerativo se encuentra ya avanzado. Aunque otros estudios han mostrado un aumento de la actividad butilcolinesterasa en el cerebro de los pacientes con EA (Darreh-Shori et al. 2006), las mediciones en el LCR y en las regiones sinápticas están en fuerte contradicción, observándose niveles reducidos de la enzima (Appleyard, McDonald, y McDonald 1992; Kuhl et al. 2006), resultados que se encuentran en línea con nuestro estudio. Aunque no se ha esclarecido con exactitud, parece que los niveles de BuCh circulante en el LCR de los pacientes con EA está inversamente asociada con su captura en los agregados de A β (Darreh-Shori et al. 2006; Darreh-shori et al. 2012). Además, la presencia del alelo ApoE ϵ 4, el sexo femenino y la edad avanzada son factores de riesgo para el desarrollo de la EA. Estos factores influyen en los niveles detectados de BuCh presentes de LCR de pacientes con EA (Darreh-Shori et al. 2006; Darreh-shori et al. 2012), lo que es indicativo de la fuerte relación que tiene esta enzima con el desarrollo y progreso de la enfermedad.

4.3.4. Relaciones entre metabolitos de estrés oxidativo, actividades enzimáticas y marcadores clásicos.

El incremento de especies reactivas del oxígeno en el tejido cerebral puede generarse a partir de mecanismos como la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, por la acumulación aberrante de metales de transición y por la disfunción mitocondrial (Zhao et al. 2013). Además, parece que la acumulación anormal de las péptidos A β y proteína tau parecen promover el desequilibrio redox (Huang et al. 1999; Bieschke et al. 2006). El estrés oxidativo resultante puede aumentar la producción y la agregación de A β y facilitar la fosforilación y polimerización de tau, formando así un círculo vicioso que promueve el inicio y la progresión de la EA (Lovell et al. 2004). Debido a la íntima relación existente entre los marcadores clásicos y los procesos oxidativos, hemos procedido a evaluar la relación que existe entre ambos tipos de marcadores. En la figura 4.3.8 se recogen las matrices de correlaciones para cada uno de los grupos de estudio. Las tablas del anexo contienen los coeficientes de correlación y los *p*-valores obtenidos para cada grupo de estudio.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

103 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

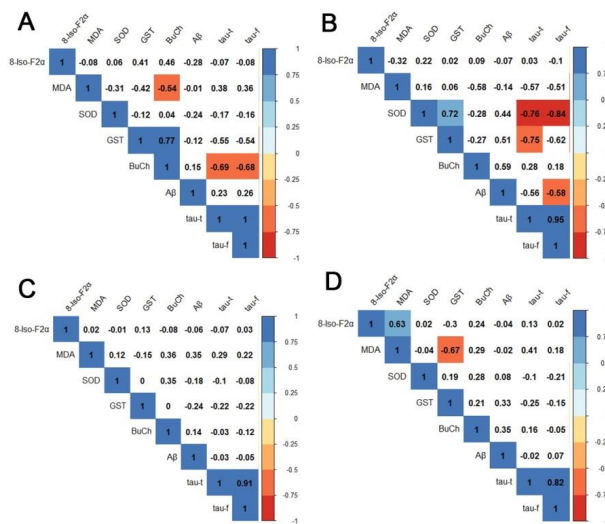


Figura 4.3.8: Matrices de correlación de Pearson para los grupos de estudio controles (A) queja subjetiva de memoria (B) deterioro cognitivo leve (C) y Enfermedad de Alzheimer (D). Las matrices muestran el valor del coeficiente de correlación r . Las correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) aparecen coloreadas de azul (positivas) o rojo (negativas).

Para el grupo control, se ha observado una correlación negativa estadísticamente significativa entre la BuCh/tau-t ($R^2 = -0,491$, $p = 0,005$) y entre la BuCh/tau-f ($R^2 = -0,501$, $p = 0,005$). Para el grupo QSM, se ha observado una correlación negativa entre la SOD/tau-t ($R^2 = -0,459$, $p = 0,045$) y entre SOD/tau-f ($R^2 = -0,509$, $p = 0,031$) una relación positiva entre SOD/GST ($R^2 = 0,638$; $p = 0,013$). Cabe destacar, que para el grupo de estudio DCL no se observó ninguna correlación estadísticamente significativa entre los marcadores de estrés oxidativo y los marcadores clásicos. Tampoco se observaron correlaciones significativas entre los marcadores de estrés oxidativo y los marcadores clásicos para el grupo EA. Sin embargo, si se observó en este grupo una correlación estadísticamente significativa entre 8-IsoF2a y MDA ($R^2 = 0,391$, $p = 0,039$) y una correlación negativa significativa para MDA/GST ($R^2 = -0,443$, $p = 0,007$).

Las relaciones negativas encontradas entre las enzimas antioxidantes con los marcadores clásicos en los pacientes CTRL en el grupo de QSM parecen sugerir que éstas podrían estar interviniendo en la protección de la formación de los ovillos neurofibrilares.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

De hecho, la BuCh se encuentra asociada con las placas A β (Guillozet et al. 1997) y los ovillos neurofibrilares, en el tejido cerebral humano de la EA (Gómez-Ramos, Bouras, y Morán 1994). Aunque el papel del BuCh en la patología de la EA no se ha dilucidado del todo, la relación negativa encontrada en los grupos CTRL y que posteriormente desaparece en los grupos que forman el *continuum* de la enfermedad, sugiere que la actividad de esta enzima podría ser responsable de la prevención de la formación de ovillos neurofibrilares en el tejido cerebral. Por otro lado, para el caso de la SOD, se ha observado que en modelos de ratón transgénicos para la EA, la actividad de esta enzima previene la acumulación de tau en los ovillos neurofibrilares (Clausen, Bi, y Baudry 2012). Serán necesarios estudios específicos para aclarar el papel de la BuCh y de la SOD en el metabolismo de la proteína tau y la formación de los ovillos neurofibrilares.

La relación existente entre las actividades proteicas antioxidantes (SOD) y detoxificantes (GST) en individuos con queja subjetiva de memoria podrían ser indicativas de que en este primer estadio comienzan a darse los primeros desbalances oxidativos y de acumulación de productos neurotóxicos, ligados al desarrollo de la enfermedad y que es en este momento donde se pone en marcha la maquinaria para el mantenimiento del estado redox en el cerebro. La relación positiva entre el marcador de peroxidación lipídica e inflamación observada en el estadio de EA indican la co-regulación de ambos procesos en estadios avanzados de la enfermedad. Por otro lado, se observa una relación negativa entre la GST y el MDA, sugiriendo la acción de esta enzima en los procesos de detoxificación y eliminación de productos de peroxidación lipídica.

4.3.5. Validación de los metabolitos de estrés oxidativo, y de las actividades enzimáticas como marcadores en el *continuum* de la enfermedad.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los metabolitos de estrés oxidativo y las actividades oxidantes en el *continuum* de la enfermedad de Alzheimer, y teniendo en cuenta que éstos se encuentran relacionados con los marcadores histológicos de la EA, se procedió a evaluar la capacidad que tienen éstos como marcadores del estadio de la enfermedad. Para ello, se evaluó mediante el estudio en las curvas ROC del área bajo la curva, la sensibilidad y especificidad de los marcadores para cada estadio de la enfermedad. Los resultados obtenidos se encuentran en la figura 4.3.9 y tabla 4.3.2. Como criterio general se tomaron como marcadores válidos para el estadio aquellos cuya área bajo la curva superaba el 0,7.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

105 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Tabla 4.3.2: Resultados de los análisis de curvas ROC para la comparación de los distintos marcadores en los grupos de este estudio.

CTRL vs QSM				QSM vs DCL			
	AUC	Cut-off	Sensibilidad/ Especificidad		AUC	Cut-off	Sensibilidad/ Especificidad
BuCh	0,370	0,09	0,22/0,73	BuCh	0,527	0,06	0,44/0,77
GST	0,311	0,04	0,33/0,66	GST	0,700 *	0,02	0,85/0,66
SOD	0,933 **	0,009	1,00/0,80	SOD	0,214	0,01	0,33/0,33
8-Iso-F2α	0,712 *	120,6	0,83/0,63	8-Iso-F2α	0,426	133,3	0,41/0,50
MDA	0,277	0,039	0,33/0,66	MDA	0,691	0,04	0,41/1,00
CTRL vs DCL				QSM vs EA			
BuCh	0,375	0,06	0,55/0,40	BuCh	0,451	0,06	0,37/0,77
GST	0,605	0,01	0,29/1,00	GST	0,764 *	0,01	1,00/0,55
SOD	0,644	0,05	0,55/0,80	SOD	0,507	0,03	0,62/0,66
8-Iso-F2α	0,607	117,5	0,64/0,63	8-Iso-F2α	0,621	149,2	0,45/1,00
MDA	0,481	0,03	0,47/0,48	MDA	0,697	0,02	0,72/0,66
CTRL vs EA				DCL vs EA			
BuCh	0,279	0,04	0,50/0,00	BuCh	0,419	0,05	0,40/0,32
GST	0,717 *	0,07	0,50/0,93	GST	0,736 *	0,04	0,53/0,89
SOD	0,848 *	0,01	0,68/1,00	SOD	0,598	0,04	0,86/0,39
8-Iso-F2α	0,802 *	117,5	0,90/0,63	8-Iso-F2α	0,611	109,6	1,00/0,33
MDA	0,463	0,03	0,45/0,63	MDA	0,684	0,02	1,00/0,38

AUC: Área bajo la curva. Los valores de los puntos de corte (Cut-off) se obtuvieron a partir del cálculo de los Índices de Youden que relacionan sensibilidad y especificidad (véase material y métodos). * p<0.05 y *** p<0.001: Niveles de significación de la prueba entre grupos.

A modo de recapitulación, el estrés oxidativo es un fenómeno causado por un desequilibrio entre la producción y la acumulación de especies reactivas y la capacidad de un sistema biológico para desintoxicar estos productos reactivos. Durante un estado saludable, el organismo pone en marcha varias estrategias para contrarrestar los efectos de los radicales libres y el estrés oxidativo que se produce como actividad normal en el cerebro, ya que las especies reactivas del oxígeno desempeñan una función fisiológica importante. Cuando se produce este desbalance, se activan tanto los sistemas enzimáticos antioxidantes como no enzimáticos para regular los niveles de ROS y previniendo el daño oxidativo. Los cambios en los niveles de antioxidantes y de los marcadores de inflamación apoyan la idea de que los cambios significativos en el estrés oxidativo y la neuroinflamación son eventos que juegan un papel importante en la progresión de la enfermedad, siendo buenos marcadores de los diferentes estadios de la enfermedad.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Aunque no está claro si la disminución del nivel de antioxidantes precede o no al aumento de los oxidantes, los niveles ciertamente no son capaces de neutralizarlos provocando una cadena de eventos que pueden conducir a la degeneración observada en las etapas sintomáticas de la EA. Además las relaciones existentes entre los marcadores histológicos de la EA con los marcadores de estrés oxidativo sugieren que los eventos de formación de placas seniles y ovillos fibrilares son dependientes de los fenómenos de estrés oxidativo. Estas conclusiones sugieren que los esfuerzos encaminados a aumentar la presencia de moléculas antioxidantes y antiinflamatorias en el cerebro, pueden tener una actividad beneficiosa si se realizan en las primeras etapas de la enfermedad.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

107 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

4.4. Proteínas del signalosoma y otras proteínas implicadas en procesos degenerativos.

Como se ha mencionado en la introducción, varios estudios han revelado alteraciones tanto en la composición lipídica de los microdominios de membrana conocidos como balsas lipídicas, o *lipid rafts*, como un reordenamiento de las proteínas que se encuentran en éstos durante el transcurso de la enfermedad de Alzheimer. Aunque muchos de los mecanismos que subyacen a las funciones desarrolladas en las balsas lipídicas aún están por esclarecer, muchas de las proteínas que se encuentran en ellas juegan papeles importantes en la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer, ya sea por participar en los procesos de procesamiento y aclaramiento del péptido β -amiloide como por intervenir en las funciones neuroprotectoras.

4.4.1. Proteínas del signalosoma y de las balsas lipídicas.

Las balsas de lípidos, o *lipid rafts*, son microestructuras de membrana dinámicas enriquecidas en distintas clases de lípidos, como el colesterol, los esfingolípidos, los ácidos grasos saturados y los gangliósidos (Lingwood y Simons 2010). Esta peculiar composición molecular confiere propiedades físico-químicas particulares, observando un orden molecular y una microviscosidad más elevadas en comparación con las regiones de membrana adyacentes. Los *lipid rafts* incluyen plataformas de señalización (denominadas signalosomas) formadas por subconjuntos de proteínas que se compartimentalizan en grupos multimoleculares para desencadenar diferentes respuestas celulares (Levental, Grzybek, y Simons 2010). En este escenario, se ha demostrado que numerosas proteínas asociadas a los *lipid rafts* están involucradas en la fisiología celular del sistema nervioso. Se ha demostrado que la asociación de esta plétora de proteínas en los signalosomas modula la sinapsis, la plasticidad neuronal, la comunicación entre células, la organización y estabilidad de la mielina, la autofagia, la supervivencia neuronal y la neurodegeneración (Egawa et al. 2016, Canerina-Amaro et al., 2017).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, en esta tesis doctoral nos hemos propuesto investigar si debido a la alteración de la composición lipídica y de las características físico-químicas de los microdominios de membrana observada previamente en nuestro laboratorio (Martín et al. 2010a; Díaz et al. 2014; Fabelo et al. 2014), se produce algún reordenamiento de las proteínas presentes en los mismos, y si

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

108 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

este reordenamiento podría verse reflejado en el líquido cefalorraquídeo. Algunas de las principales proteínas que forman parte de las balsas lipídicas y de los signalosomas contenidos en ellas son: la caveolina (Cav), la flotilina (Flo), el receptor de estrógeno tipo alfa (RE α), el receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R β), la proteína priónica (PrP) y el canal aniónico de alta conductancia (VDAC, *voltage-dependent anion channel*). En las neuronas, la caveolina y la flotilina actúan como proteínas de andamiaje dentro de las balsas lipídicas. La PrP, por su parte, es una proteína que se encuentra generalmente anclada a la membrana plasmática a través de un anclaje lipídico de glicosilfosfatidilinositol (GPI), el IGF-1R β un receptor de membrana específico para el factor de crecimiento IGF-1R β , y VDAC es un canal aniónico, implicado en procesos de apoptosis, y que además de intercambiar iones interviene en procesos de señalización e interacción con otras proteínas. Nuestro grupo ha demostrado la asociación de todas estas proteínas en las balsas lipídicas en diversos modelos neuronales, desde líneas celulares hasta corteza cerebral humana, habiendo identificado alteraciones en las asociaciones entre ellos, que posiblemente contribuyen a las condiciones celulares que conducen a procesos de neurodegeneración, especialmente en enfermedad de Alzheimer (Fabelo et al. 2011, 2014; Canerina-Amaro, Hernandez-Abad, Ferrer, Quinto-Aleman, Mesa-Herrera, Ferri, Puertas-Avenidaño, et al. 2017).

Considerando las alteraciones que se observan en las asociaciones entre estas proteínas durante el proceso neurodegenerativo y que conducen a la enfermedad de Alzheimer, en nuestro estudio hemos analizado su presencia y concentración en el líquido cefalorraquídeo en los cuatro grupos de estudio. En la figura 4.4.1 se muestran los datos obtenidos para cada una de las proteínas de estudio.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

109 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

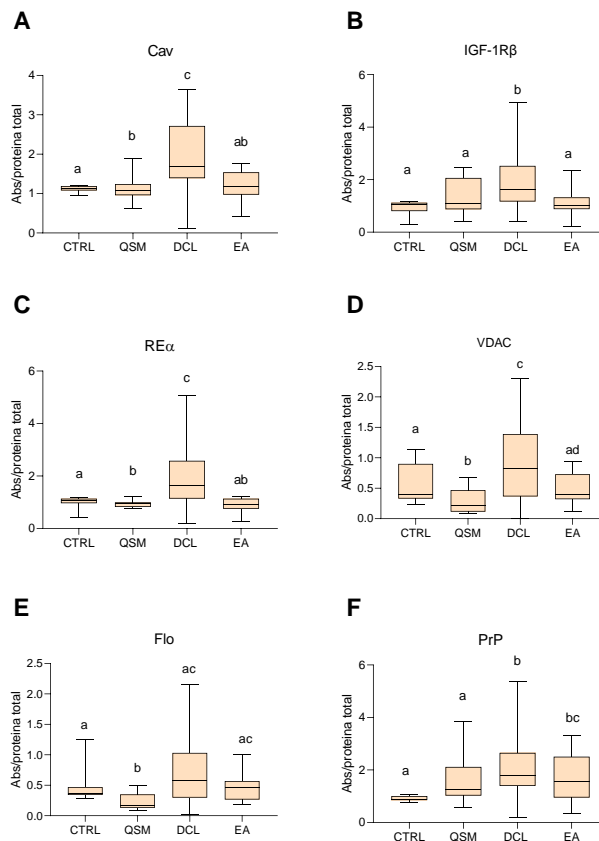


Figura 4.4.1: Diagrama de cajas para el contenido de proteínas de los lisosomas en el líquido cefalorraquídeo de pacientes controles (CTRL), pacientes con queja subjetiva de memoria (QSM), con deterioro cognitivo leve (DCL) y con Enfermedad de Alzheimer (EA). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

A primera vista, los datos obtenidos indican que una gran parte de los cambios se producen en el grupo de pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL). Así, la proteína Cav y el RE α muestran un incremento de la concentración en el líquido cefalorraquídeo

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 28/09/2020 13:12:33

Mario Lorenzo Díaz González
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/09/2020 15:01:49

Raquel Marín Cruzado
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

del grupo DCL cuando se comparan con los grupos que forman el *continuum* de la enfermedad de Alzheimer (QSM y EA), donde las concentraciones no muestran diferencias significativas. También se observa que las concentraciones de los individuos DCL son superiores cuando se comparan con los individuos sanos, y que las concentraciones de este grupo CTRL no muestran diferencias con los individuos con QSM y EA (figura 4.4.1A, C). Los resultados obtenidos para VDAC muestra que las concentraciones de esta proteína en los individuos controles es superior a la presente en los individuos con queja subjetiva de memoria. Cuando se comparan las concentraciones de VDAC entre de los grupos que forman el espectro de la enfermedad, las concentraciones de VDAC para el grupo para el grupo de QSM son inferiores a las observadas en los grupos DCL y EA, y entre estos dos estadios, mientras que las concentraciones para el grupo EA son estadísticamente inferiores (figura 4.4.1D). Para la flotilina, como se observa en la figura 4.4.1, las concentraciones de esta proteína en los individuos controles es superior a la presente en los individuos con queja subjetiva de memoria. Dentro del *continuum* de la enfermedad, las concentraciones del grupo QSM son inferiores a las presentes en los individuos con deterioro cognitivo leve y con Enfermedad de Alzheimer, pero no se observan diferencias entre los individuos que forman parte de estos dos últimos grupos. Las concentraciones del IGF-R1 β (figura 4.4.1B) muestran que las concentraciones son iguales en los individuos controles cuando se comparan con los individuos con queja subjetiva de memoria y Enfermedad de Alzheimer, observándose un incremento significativo en los individuos con deterioro cognitivo leve. Dentro del espectro de la enfermedad, sólo se observa un incremento de la concentración de la proteína en los individuos DCL cuando se comparan con los enfermos de Alzheimer, pero no cuando se compara con los individuos con queja subjetiva de memoria. Por último, las concentraciones de la PrP se encuentran aumentadas en los individuos con deterioro cognitivo leve y con EA cuando respecto a los pacientes sanos, pero dentro del *continuum* de la enfermedad no se encuentran diferencias entre los grupos de estudio (figura 4.4.1F).

Es de resaltar el hecho de que este estudio es el primero en el que se demuestran las alteraciones del perfil proteico correspondiente al signalosoma en el LCR durante el espectro de la enfermedad de Alzheimer. Estas alteraciones son de gran interés no sólo como marcadores pronósticos de la enfermedad sino que abren un abanico al mejor entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad. Es plausible que las alteraciones en la composición lipídica de los *lipid rafts*, tanto a nivel lipídico como proteico puedan

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

111 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

alterar la señalización y en consecuencia las respuestas celulares (Marin 2011). Además, se sabe que estos cambios afectan a las propiedades físico-químicas de las balsas de lípidos que pueden alterar posteriormente las proteínas integradas en estos dominios. En este orden de ideas, en estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, se ha observado que las proteínas que forman parte del signalosoma se alteran en los cerebros posmenopáusicos, observándose un desplazamiento fuera de los *lipid rafts* tanto ER α como IGF-1R β como consecuencia de la disociación de caveolina-1. Además se produce un desajuste ER α /IGF-1R β /caveolina-1, que produce la redistribución del VDAC a las fracciones no vehiculares, en paralelo con una desfosforilación del canal, lo que puede aumentar la vulnerabilidad neuronal (Canerina-Amaro et al. 2017). Resulta interesante que los desajustes de las señales de ER α se agraven en los *lipid rafts* corticales e hipocámpales de los cerebros de la EA (Ramírez et al. 2009), apoyando así la relación entre las modificaciones complejas de la composición de las balsas lipídicas y el proceso de envejecimiento y declive cognitivo.

En general, parece que las anomalías en la matriz de los *lipid rafts* parecen ser un acontecimiento temprano en los procesos neurodegenerativos (Díaz et al., 2015 y Fabelo et al., 2014) y podría estar contribuyendo a la modificación de la agrupación de proteínas que forman parte del signalosoma. Aunque algunos de los componentes de estas plataformas están empezando a ser identificados, el cuadro completo es sin duda más complejo, ya que implica alteraciones en los procesos de señalización y cuyas consecuencias adversas y/o beneficiosas están aún por aclarar. Además, un aspecto importante es que la composición alterada de las diferentes clases de lípidos integrados en estos compartimentos de membrana contribuye a deteriorar los mecanismos de señalización y puede ser la base de algunos de los procesos neuropatológicos. Por lo tanto, la identificación de marcadores lípidos y de las proteínas de señalización de los *lipid rafts* supone un reto importante para dilucidar los mecanismos implicados en las fisiopatologías neuronales. La comprensión de estos complejos, diversos e interactivos ensamblajes moleculares proporcionará, sin duda, alguna de las claves para el desarrollo de futuras terapias contra estas enfermedades neurológicas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

112 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

112 / 179

4.4.2. Proteínas sinápticas y de función neuronal.

4.4.2.1 Neurogranina

La disfunción sináptica está relacionada con los procesos cognitivos asociados a la enfermedad de Alzheimer (Reddy et al. 2005). Diferentes estudios han mostrado que proteínas pre- y post-sinápticas como SNAP25, sinaptotagamina, neurogranina son detectables en líquido cefalorraquídeo y que sus concentraciones se encuentran alteradas en los procesos patogénicos de la enfermedad de Alzheimer (Janelidze et al. 2016; Davidsson y Blennow 1998). La neurogranina (Ng) es una proteína post-sináptica neuronal específica implicada en la señalización de la potenciación de largo plazo, mecanismo sináptico involucrado en la memoria y plasticidad neuronal. Se encuentra concentrada en las espinas dendríticas del hipocampo y del cerebro basal. La neurogranina se une a la calmodulina para regular el flujo de calcio intracelular (Reddy et al. 2005).

En nuestro estudio hemos determinado la concentración de neurogranina como posible marcador de la disfunción sináptica. Hemos observado que la concentración de Ng se encuentra disminuida en los pacientes con Enfermedad de Alzheimer cuando se comparan con los individuos control. Aunque no se observan diferencias significativas dentro de los grupos que forman del espectro de la enfermedad, se observa una marcada tendencia a un descenso de los niveles de esta proteína en el líquido cefalorraquídeo conforme avanza la enfermedad (figura 4.4.2).

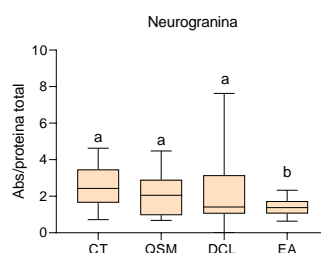


Figura 4.4.2: Diagrama de cajas para la concentración de neurogranina en el líquido cefalorraquídeo de individuos controles (CTRL), con queja subjetiva de memoria (QSM), con deterioro cognitivo leve (DCL) y con enfermedad de Alzheimer (EA). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

En estudios previos realizados tanto en cerebro humano como en modelos murinos de EA, se ha observado que las concentraciones de esta proteína disminuyen en el hipocampo y que dicho decrecimiento está relacionada con el aumento de la edad y con la disfunción del sistema nervioso central (Reddy et al. 2005). Aunque no se han explicado con claridad los mecanismos que regulan dicha disminución en pacientes con EA, algunos estudios han postulado que este detrimento puede ser debido a una disfunción de los mecanismos implicados en la transcripción del gen que codifica para la neurogranina (Sato et al. 1995). Se ha observado que algunas isoformas de la proteína quinasa C (PKC) regulan la actividad del promotor del gen Ng (Sato et al. 1995). Se ha demostrado que la fase de mantenimiento de la potenciación a largo plazo en el hipocampo está asociada con un aumento en la fosforilación mediada por PKC de Ng (Chen, Sweatt, y Klann 1997; Ramakers et al. 2000). Estos hallazgos, junto con otros informes de desregulación de la translocación de la PKC en roedores muy longevos (Battaini et al. 1995; Colombo, Wetsel, y Gallagher 1997), claramente sugieren que las alteraciones en la cascada de señalización de la PKC con el aumento de la edad también podrían contribuir a las disminuciones relacionadas con la edad en el ARNm y la concentración de Ng. Además, en este contexto, el déficit relacionado con la edad en la actividad de la PKC está asociado con la disminución del estado de fosforilación de las proteínas GAP43 (Gianotti et al. 1993) y sinapsina (Eckles et al. 1997). Además otros estudios han observado una marcada pérdida sináptica en el hipocampo durante el estadio temprano de la enfermedad, donde se ha observado una correlación inversa entre la densidad sináptica y el grado de deterioro de la memoria (Reddy et al. 2005). Los biomarcadores sinápticos como la neurogranina conforme avanza la edad podrían ir disminuyendo en los fluidos extracelulares del cerebro como hemos observado en nuestro estudio. El seguimiento de dicha disminución podría resultar útil como herramienta para monitorizar la disfunción sináptica durante la progresión de la enfermedad.

4.4.2.2. Proteína de unión al ADN TAR (TDP43)

Otra proteína de interés en el estudio es la proteína de unión al ADN TAR o TDP-43. TDP-43 es una proteína que interviene en el *splicing* exónico. Esta proteína se ha relacionado con procesos neurodegenerativos tanto en modelos celulares como en modelos murinos (Baskaran, Shaw, y Guthrie 2018; Y. Liu, Chiang, y Tsai 2013). En condiciones fisiológicas esta proteína es transportada desde el núcleo hasta el citoplasma

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

114 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

donde desarrolla su función. Sin embargo, en condiciones patológicas de Enfermedad de Alzheimer, se ha observado que presenta un estado anormal de fosforilación que produce que se acumule en inclusiones en el citoplasma tanto de neuronas como de células gliales (Harrison y Shorter 2017). En nuestro estudio hemos observado cómo la concentración de la proteína se encuentra disminuida en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con deterioro cognitivo leve y en pacientes con EA cuando se compara con individuos controles. No obstante, aunque dentro del espectro no se observen diferencias estadísticamente significativas, al igual que con la Ng, se observa una clara tendencia a ir disminuyendo conforme avanza la enfermedad (figura 4.4.3).

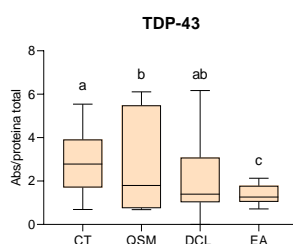


Figura 4.4.3: Diagrama de cajas para la concentración de TDP-43 en el líquido cefalorraquídeo de individuos controles (CTRL), con queja subjetiva de memoria (QSM), con deterioro cognitivo leve (DCL) y con enfermedad de Alzheimer (EA). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

La disminución observada de la concentración de la TDP-43 podría mostrar una mayor acumulación intracelular de inclusiones en aquellos individuos donde el deterioro cognitivo es más marcado. Esta observación sugiere que la proteína podría contribuir al desarrollo de procesos atróficos y muerte neuronal, producida en conjunto con otros marcadores potenciales patogénicos de la EA, como son la formación de ovillos neurofibrilares, la presencia de cuerpos de Lewy y la formación de placas seniles. De hecho, estudios previos han demostrado que esta proteína está fuertemente correlacionada con la atrofia del lóbulo temporal y con el estadio IV y V de Braak y Braak, y que la ausencia de inclusiones citoplasmáticas se asocia con una cognición normal (Josephs et al. 2015). Por lo tanto, los datos observados previamente, junto con los datos obtenidos en nuestro estudio muestran que TDP-43 puede jugar un papel clave en el desarrollo de la enfermedad. Por consiguiente, la determinación de las concentraciones de esta proteína

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sZ
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2914873	Código de verificación: yguD1Khh
Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27

en líquido cefalorraquídeo podría contribuir a ser un buen candidato para un potencial panel de biomarcadores de seguimiento en pacientes con alteraciones cognitivas que puedan o no evolucionar a Enfermedad de Alzheimer.

4.4.3. Relación entre las proteínas del signalosoma, proteínas sinápticas y de función neuronal y marcadores clásicos.

Una vez evaluadas las diferencias de estas proteínas entre los grupos de este estudio, se procedió, como en capítulos anteriores, a evaluar las relaciones entre ellas. Las correlaciones de las relaciones bivariantes entre las proteínas del signalosoma, las proteínas sinápticas y los marcadores clásicos se encuentra representada en las matrices de la siguiente figura:

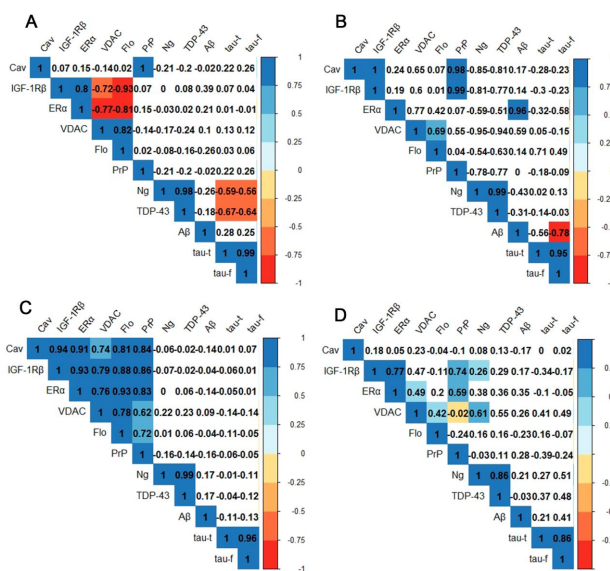


Figura 4.4.4: Matrices de correlaciones proteínas del proteínas del signalosoma, las proteínas sinápticas y los marcadores clásicos en controles (A), queja subjetiva de memoria (B), deterioro cognitivo leve (C) Enfermedad de Alzheimer (D). Las relaciones significativas ($p < 0,05$) cuando son positivas aparecen coloreadas de azul y cuando son negativas aparecen coloreadas de rojo.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33

Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49

Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Como observamos en la figura 4.4.4, en lo que corresponde a las relaciones encontradas entre las proteínas del signalosoma en el grupo CTRL se observan correlaciones positivas significativas entre Cav y PrP ($R^2=1,00$ $p=0,000$). Así mismo, el IGF-1R β se encuentra relacionado positivamente con ER α ($R^2=0,64$, $p=0,000$). VDAC/Flo se encuentran correlacionados positivamente ($R^2=0,68$; $p=0,000$). Por otro lado, las relaciones negativas que se encuentran en el grupo CTRL corresponden a las relaciones IGF-1R β /VDAC ($R^2=-0,52$, $p=0,002$); IGF-1R β /Flo ($R^2=-0,86$; $p=0,000$); ER α /VDAC ($R^2=-0,58$; $p=0,000$); ER α /Flo ($R^2=-0,65$; $p=0,000$). En relación a las proteínas de sinapsis y función neuronal se observó una relación positiva entre Ng y TDP-43 ($R^2=0,744$; $p=0,000$). En relación a los marcadores clásicos, no se observaron relaciones significativas entre las proteínas del signalosoma con los marcadores clásicos. Sin embargo, si se observa una relación negativa en los pares Ng/tau-t ($R^2=-0,39$; $p=0,020$) y Ng/tau-f ($R^2=-0,35$; $p=0,024$). De la misma forma, TDP-43 se encuentra relacionada negativamente con tau-t ($R^2=-0,47$; $p=0,007$) y con tau-f ($R^2=-0,45$; $p=0,008$).

Para el grupo QSM, aparecen relaciones positivas para IGF-1R β /ER α ($R^2=0,79$, $p=0,000$) y IGF-1R β /PrP ($R^2=0,55$; $p=0,009$). En relación a las proteínas de sinapsis y función neuronal se observó una relación positiva entre Ng/TDP-43 ($R^2=0,97$; $p=0,000$). Referente a los marcadores clásicos, A β se relacionaba positivamente con ER α ($R^2=0,91$; $p=0,044$).

Para el grupo DCL, todas las proteínas del signalosoma aparecen relacionadas entre ellas. Se observa una relación en los pares Cav/IGF-1R β ($R^2=0,89$; $p=0,000$); Cav/ER α ($R^2=0,84$; $p=0,000$); Cav/VDAC ($R^2=0,51$; $p=0,000$); Cav/Flo ($R^2=0,65$; $p=0,000$); Cav/PrP ($R^2=0,73$; $p=0,000$). También IGF-1R β aparece correlacionado positivamente con ER α ($R^2=0,93$; $p=0,000$), VDAC ($R^2=0,61$; $p=0,000$), Flo ($R^2=0,83$; $p=0,000$) y con PrP ($R^2=0,82$; $p=0,000$). Así mismo, también se encuentran correlaciones positivas entre ER α /VDAC ($R^2=0,45$; $p=0,000$); ER α /Flo ($R^2=0,83$; $p=0,000$); ER α /PrP ($R^2=0,69$; $p=0,000$); VDAC/Flo ($R^2=0,57$; $p=0,000$); VDAC/PrP ($R^2=0,46$; $p=0,000$) y Flo/PrP ($R^2=0,62$; $p=0,000$). En relación a las proteínas de sinapsis y función neuronal se observó una relación positiva entre Ng/TDP-43 ($R^2=0,97$; $p=0,000$). De forma sorprendente, los marcadores clásicos no aparecen relacionados ni con las proteínas del signalosoma ni con las proteínas sinápticas y de función neuronal, lo que sugiere que la

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

117 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

dinámica de reordenación de las proteínas del signalosoma difiere de la de aquella del metabolismo de los marcadores clásicos.

Para el grupo EA, las relaciones encontradas entre las proteínas del signalosoma y de las balsas lipídicas fueron: IGF-1R β /ER α ($R^2=0,59$; $p=0,05$); IGF-1R β /PrP ($R^2=0,54$; $p=0,009$). En relación a las proteínas de sinapsis y función neuronal se observó una relación positiva para Ng/TDP-43 ($R^2=0,74$; $p=0,000$). También una relación negativa para Ng/IGF-1R β ($R^2=0,065$; $p=0,009$); Ng/VDAC ($R^2=0,37$; $p=0,000$), presentándose estas relaciones sólo para el grupo EA.

Una característica de los resultados obtenidos en estos análisis bivariantes es la existencia de correlaciones sistemáticas y co-linealidad entre variables. Aún más, la mayoría de las correlaciones positivas simultáneas y significativas que se detectan aparecen en el grupo DCL, se transforman en negativas en los controles (Figura anterior) y menos evidentes en los grupos QSM y EA. Esta característica es muy interesante desde el punto de vista del diagnóstico, dado que identifica al grupo DCL como singular y diferenciado tanto del estadio previo como del posterior en el espectro de la patología de Alzheimer. Considerando que estas proteínas presentan diversos grados de asociación dinámica en los *lipid rafts*, el hecho de que se encuentren en el LCR y de que las relaciones entre ellas varíen a tal grado entre grupos, indican que durante el proceso degenerativo se desestabilizan los diferentes tipos de dominios de membrana. Por otro lado, los resultados sugieren que las asociaciones observadas en los estadios controles (Cav/ER α /IGF-1R β) se transformarían en estructuras más complejas, ahora en forma de Cav/ER α /IGF-1R β /Flo/PrP, durante el estadio DCL, para acabar desintegrándose en el estadio EA. Una conclusión importante de estos hallazgos es que la dinámica de reordenación de las proteínas del signalosoma difiere de la de acumulación de agregados proteicos clásicos, amiloide y tau. De hecho no se observan correlaciones significativas en estadios QSM, DCL o EA, por lo que es probable que los cambios que observamos en el LCR reflejen otra perspectiva de la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. No obstante, se necesitarán estudios adicionales en los *lipid rafts*, signalosomas aislados y LCR con el objeto de comprobar estas hipótesis.

4.4.4. Relaciones multivariantes y validación de los marcadores.

Dada la complejidad de los resultados obtenidos, una vez evaluados los perfiles proteicos y sus relaciones, procedimos a realizar una evaluación multivariante de los

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

118 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

datos. Basándonos en los análisis factoriales evaluados a través del análisis de componentes principales, la utilización de dos componentes principales explicaría el 79,39% del total de la varianza. Un 54,43% del total de la varianza es explicado con la componente 1 (PC1) y un 24,97% es explicado con la inclusión de la componente 2 (PC2). Las variables que más relacionadas se encuentran con la PC1 son, el receptor de estrógenos (ER α) y el receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R β), mientras que para el caso de la PC2 son la neurogranina y la proteína TDP-43. Las diferencias entre grupos se atribuyeron principalmente a las variables con coeficientes más altos de cada componente. Estos análisis revelaron que las alteraciones de las concentraciones de las proteínas que forman parte del signalosoma así como de señalización en el conjunto de datos son suficientemente diferentes como para permitir una buena segregación de los grupos, especialmente entre los grupos CTRL, QSM y EA. Los análisis de varianza de los *factor scores* indican que la PC1 permite diferenciar significativamente el grupo CTRL de los grupos QSM, DCL y EA ($p < 0.05$), y que dentro del espectro de la enfermedad, este análisis permite diferenciar el conjunto de grupos que forman su *continuum* excepto entre los estadios DCL y EA (figuras 4.4.5 y 4.4.6).

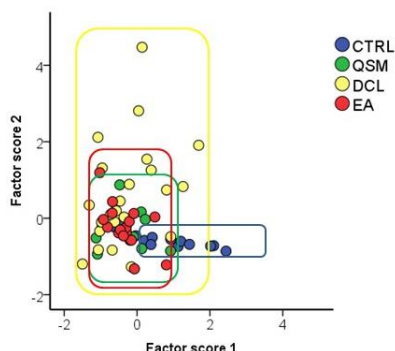


Figura 4.4.5: Resultados de los análisis PCA. Gráfico de las puntuaciones de los factores (factor scores) para los cuatro grupos diferentes de estudio

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

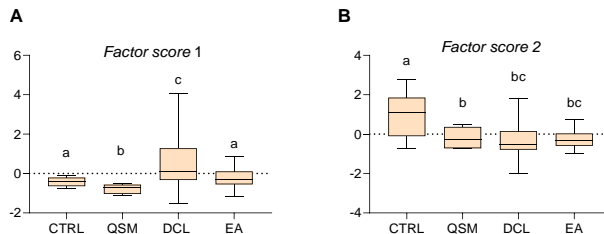


Figura 4.4.6: Diagrama de cajas para las puntuaciones obtenidas de los análisis de PCA. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

A continuación se llevó a cabo un análisis discriminante a partir de los valores de las concentraciones de las proteínas analizadas en el líquido cefalorraquídeo de los cuatro grupos de pacientes, con el fin de evaluar el grado de probabilidad de pertenencia de cada paciente al grupo diagnóstico. Como ya se ha mencionado, mediante el análisis de función discriminante es posible determinar la influencia cuantitativa de estas variables proteicas en la discriminación de grupos (figura 4.4.7).

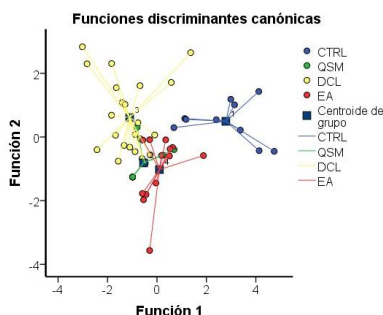


Figura 4.4.7: Representación de casos según las funciones discriminantes canónicas obtenidas para los cuatro grupos de estudio y tabla de puntuaciones de la matriz de estructura de cada una de ellas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1KhH

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Tabla 4.4.1: puntuaciones de la matriz de estructura de cada una de funciones discriminantes canónicas obtenidas para los cuatro grupos de estudio.

	Matriz de estructuras		
	Función		
	1	2	3
TDP-43	0,508*	0,467	0,191
REα	-0,286	0,621*	0,363
Ng	0,414	0,469*	0,097
IGF-1Rβ	-0,277	0,447*	0,404
VDAC	-0,161	0,468	0,788*
Flot	-0,086	0,404	0,675*
PrP	-0,286	0,082	0,581*
Cav	-0,278	0,352	0,371*

Se observa que la primera función canónica representaba la gran mayoría de la variación entre grupos (64,4%) mientras que la segunda variable canónica representaba sólo el 28,8%. Las variables que mostraron la mayor correlación absoluta con respecto a cada función discriminante fueron la TDP-43 y la flotina para la primera función, mientras que para la segunda función fueron el receptor de estrógenos y la proteína priónica. El test de *chi*-cuadrado reveló que la primera función discriminante contribuye a la discriminación en gran medida de los grupos ($\chi^2 = 63,98 p < 0,001$), y según los coeficientes de estructura, se determinó principalmente por la variables TDP-43 y caveolina. La segunda función discriminante contribuye a la discriminación de los grupos en menor medida ($\chi^2 = 26,09 p < 0,05$), y según los coeficientes de estructura, se determinó principalmente por el receptor de estrógenos y la neurogranina.

Finalmente, una vez evaluadas las alteraciones multivariantes en los diferentes grupos de estudio, se procedió a validar la sensibilidad y especificidad de los marcadores, utilizando las puntuaciones factoriales, como marcadores del estadio correspondiente al espectro de la enfermedad a través del estudio de especificidad y sensibilidad. Los resultados del análisis del área bajo la curva para cada uno de los grupos se muestran en la tabla 4.4.2.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Tabla 4.4.2: Resultados de los análisis de curvas ROC para la comparación de los distintos marcadores en los grupos de este estudio.

CTRL vs QSM				QSM vs DCL			
	AUC	Cut-off	Sensibilidad/ Especificidad		AUC	Cut-off	Sensibilidad/ Especificidad
Factor score 1	0,720 *	-0,23	0,60/0,60	Factor score 1	0,608	0,94	0,60/0,76
Factor score 2	0,387	1,63	1,00/0,20	Factor score 2	0,746 *	0,30	0,60/0,92
CTRL vs DCL				QSM vs EA			
Factor score 1	0,626	-0,08	0,50/0,80	Factor score 1	0,773 *	-0,25	0,83/0,72
Factor score 2	0,184	0,42	0,13/0,30	Factor score 2	0,621	0,27	0,50/0,90
CTRL vs EA				DCL vs EA			
Factor score 1	0,467	1,57	0,37/0,92	Factor score 1	0,619	-0,20	0,57/0,75
Factor score 2	0,806 *	1,09	0,73/1,00	Factor score 2	0,635	-1,33	0,92/0,40

AUC: Área bajo la curva. Los valores de los puntos de corte (Cut-off) se obtuvieron a partir del cálculo de los Índices de Youden que relacionan sensibilidad y especificidad (véase material y métodos). *p<0.05 y ***p<0.001: Niveles de significación de la prueba entre grupos.

Se seleccionaron los resultados que mostraron áreas bajo la curva (AUC) superiores a 0,7. En general, a pesar de los resultados de los análisis multivariantes anteriores, las curvas ROC derivadas no mostraron poder diagnóstico homogéneo, con la excepción de algunas de las comparaciones. Las más importantes, por afectar a estadios previos a la EA, son las que se observan para el factor score 1 entre CTRL y QSM, y para factor score 2 entre QSM y DCL. Así pues, a falta de ampliar el número de casos analizados para cada grupo, nuestros datos sugieren que el abordaje de las alteraciones de las proteínas del signalosoma y de función sináptica permitiría diagnosticar los grupos de estudio, sobre todo en estadios prodrómicos de la enfermedad.

El presente abordaje proporciona las primeras evidencias de la alteración de la composición de los signalosomas en pacientes del espectro de la enfermedad de Alzheimer. Estas alteraciones se basan inicialmente en la pérdida progresiva de la estabilidad estructural que produciría un desequilibrio paulatino de la homeostasis de las balsas lipídicas. En consecuencia, la integridad funcional de los signalosomas proteicos se vería comprometida por la desestabilización físico-química lipídica de estas microestructuras, como se ha comentado anteriormente. El impacto de los diferentes patrones proteicos presentes en los diferentes grupos nos permite *a priori* hipotetizar sobre las variaciones de los mismos a lo largo del proceso patológico de la enfermedad. Con todo ello, parece que durante el *continuum* del espectro patológico, las alteraciones de la composición del signalosoma y de otras proteínas neuronales se producen durante

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

etapas prodrómicas de la enfermedad, observándose una clara diferencia entre los individuos sanos y los que presentan queja subjetiva de memoria. Conforme avanza la enfermedad, se observa una clara diferencia entre los patrones presentes en los individuos con queja subjetiva de memoria y los pacientes tanto con deterioro cognitivo leve como con Enfermedad de Alzheimer. La alteración de la estabilidad de estos complejos proteicos durante la etapa de queja subjetiva de memoria podría reflejar etapas muy iniciales de los procesos conducentes a los déficits cognitivos y a la disminución de las reservas de memoria que desembocan en la EA.

En definitiva, en este estudio sugerimos que estos desajustes moleculares estarían en el origen de los procesos que desencadenarían las posteriores alteraciones neuropatológicas de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, la determinación de los patrones proteicos, así como las alteraciones de la relación existente entre ellos, tanto mediante abordajes univariante, bivariantes y multivariante, podrían proporcionar herramientas diagnósticas y de seguimiento del espectro de la enfermedad de Alzheimer. Asimismo, el análisis de los mismos abre una nueva ventana a un abordaje proteómico más profundo de los procesos conducentes a la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, la validez diagnóstica de estas hipótesis requiere de la comprobación de los resultados en ensayos a mayor escala en todas las categorías de pacientes contempladas en este estudio.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

123 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

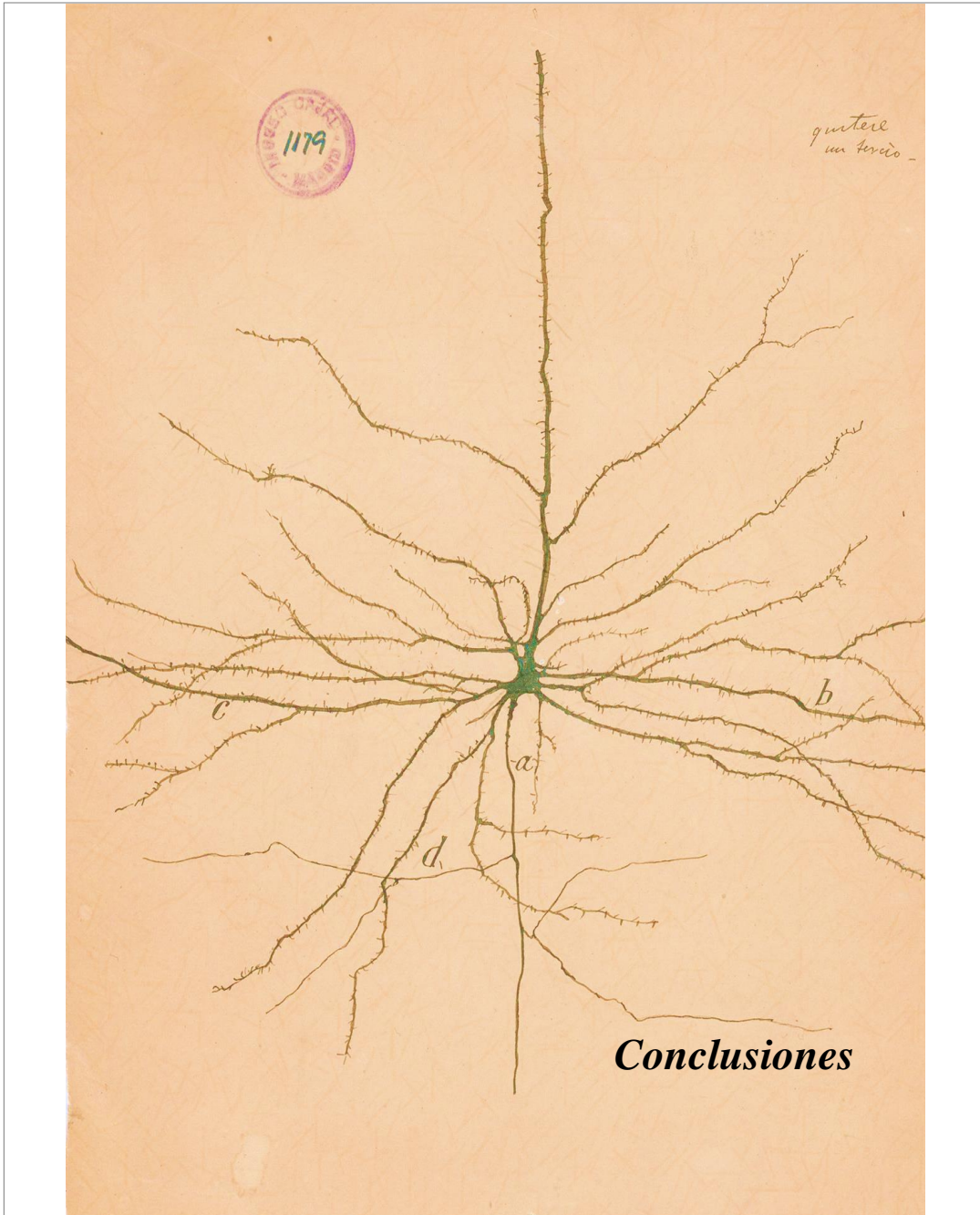
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

124 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

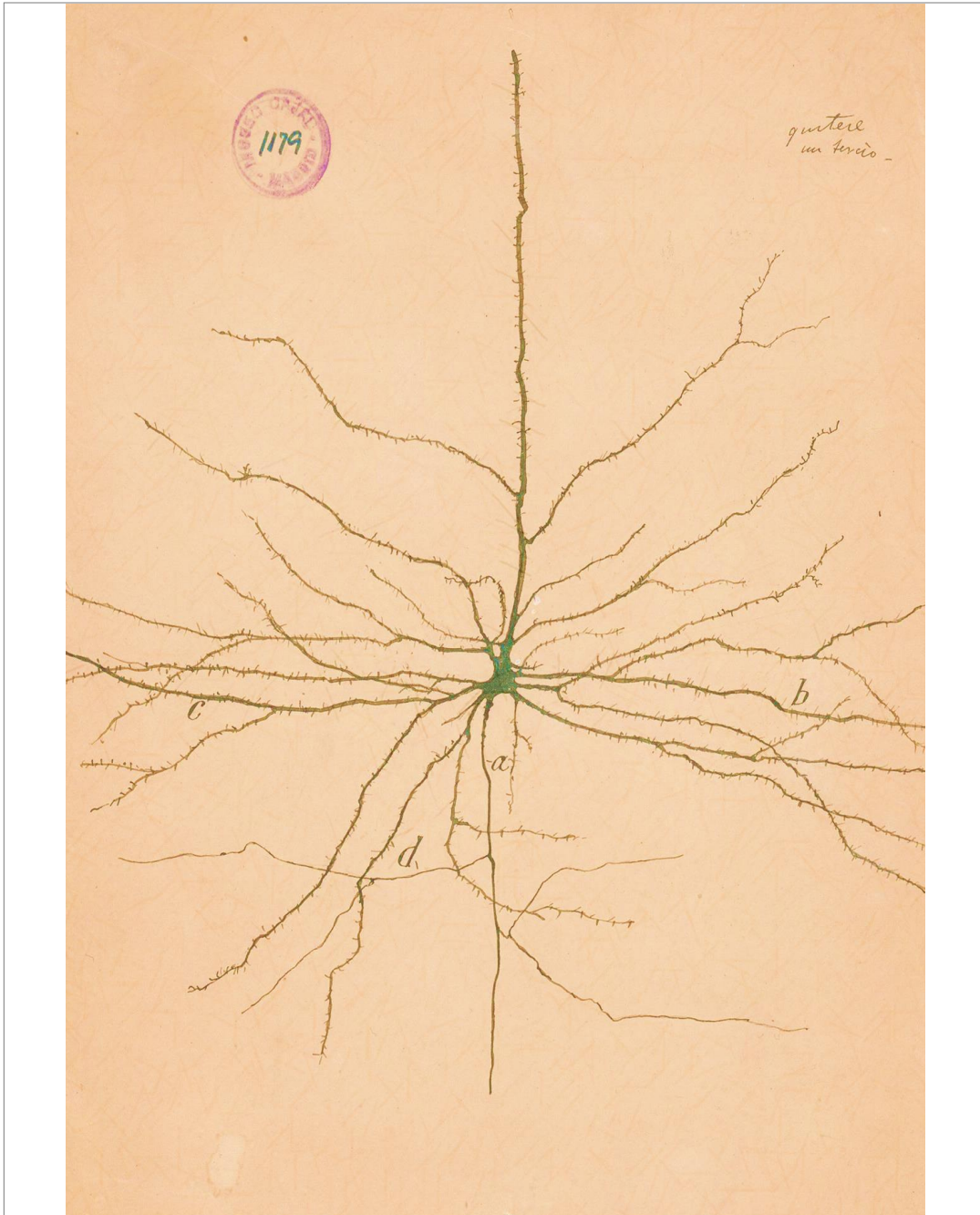
125 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

125 / 179



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

126 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

126 / 179

5. CONCLUSIONES

1. Los marcadores clásicos para la enfermedad de Alzheimer (β -amiloide, tau-total y tau fosforilada), así como sus ratios, y los tests cognitivos (MMSE e *In-Out-test*), permiten diferenciar entre los individuos cognitivamente sanos y con EA, pero no son buenos indicadores de los estadios intermedios de la enfermedad.
2. Durante la transición del estadio control hasta la Enfermedad de Alzheimer, se producen cambios progresivos en las relaciones entre las puntuaciones de los test cognitivos y las concentraciones de los marcadores clásicos. El seguimiento de los cambios en las relaciones existentes entre estos marcadores podrían ser buenos indicadores del avance del proceso patológico característico de la enfermedad.
3. En el líquido cefalorraquídeo, la composición de los cationes divalentes magnesio y calcio y de la mayoría de los metales traza (cobre, manganeso, zinc y selenio), así como sus relaciones bivariadas, se encuentra modificada a lo largo del *continuum* de la enfermedad.
4. De forma paralela a los cambios en los contenidos de cationes y biometales, se detectan relaciones significativas de éstos con los marcadores clásicos, las cuales se modifican a lo largo del *continuum* de la enfermedad.
5. Los niveles de selenio se ven alterados durante el *continuum* de la enfermedad, observándose un incremento en el estadio de EA.
6. Las concentraciones de aluminio en LCR se encuentran incrementadas en el grupo EA y en el grupo DCL, aunque no de manera homogénea, existiendo una parte significativa de casos de los grupos DCL y EA que presentan niveles elevados de este metal neurotóxico.
7. Las concentraciones de metabolitos de peroxidación lipídica MDA y 8-IsoF2a en el LCR se ven alterados a lo largo del *continuum* de la enfermedad de Alzheimer.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

127 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Conclusiones 128

8. La relación existente entre los marcadores de peroxidación lipídica sugiere que los mecanismos de peroxidación lipídica son graduales y que los mayores cambios de estos marcadores se producen en etapas prodrómicas de la enfermedad.
9. Las relaciones entre los marcadores de peroxidación lipídica y los metales traza muestran que los procesos de estrés oxidativo a lo largo del *continuum* de la enfermedad son dependientes y se relacionan muy significativamente con las variaciones en el perfil metálico.
10. Existe una transición en la generación del metabolito lipídico que dependería sobre todo del aluminio en el estadio DCL lo que sugiere que la conversión a demencia se podría asociar, entre otros factores, a la presencia de niveles elevados de aluminio.
11. La actividad superóxido dismutasa en el LCR se va incrementando a lo largo del *continuum* de la enfermedad, lo que podría reflejar un aumento de la respuesta del tejido cerebral a la elevación de los niveles de radicales superóxido generados durante el proceso degenerativo.
12. Se observa un aumento progresivo de la actividad glutatión-S-transferasa durante el espectro de la enfermedad, lo que podría reflejar cambios en la actividad detoxificante del tejido cerebral en a la producción de aductos lipídicos durante el proceso degenerativo.
13. La disminución de la actividad de la enzima butirilcolinesterasa en estadios de queja subjetiva de memoria podría ser indicativo de que la pérdida de la actividad de las neuronas colinérgica es anterior a la manifestación de la Enfermedad de Alzheimer.
14. Las alteraciones entre las relaciones existentes de enzimas antioxidantes y los metabolitos de estrés oxidativo juegan un papel importante en la progresión de la enfermedad, siendo buenos marcadores de los diferentes estadios de la enfermedad.
15. Las relaciones existentes entre los marcadores clásicos de la EA en el LCR con los marcadores de estrés oxidativo, sugieren que los eventos de formación de placas seniles y ovillos fibrilares son dependientes de los fenómenos de estrés oxidativo.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

128 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

16. Es posible detectar proteínas de complejo del signalosoma y otras proteínas neuronales en el LCR en todos los grupos de estudio. Los perfiles de estas proteínas son alterados en distinto grado durante el *continuum* de la enfermedad de Alzheimer.
17. Las correlaciones negativas entre proteínas del signalosoma que se detectan en los controles, se transforman en positivas en el grupo DCL, pero son casi indetectables en los grupos QSM y EA. Esta característica tiene valor diagnóstico ya que identifica al grupo DCL como singular y diferenciado tanto del estadio previo como posterior de la Enfermedad de Alzheimer.
18. El abordaje multivariante de los parámetros estudiados permiten segregar por estadios de la enfermedad a los pacientes en función de la composición de marcadores estudiados en el líquido cefalorraquídeo.
19. El desarrollo de un panel de marcadores sensitivos y específicos que reflejen los diferentes procesos fisiopatológicos subyacentes a la enfermedad de Alzheimer permitiría no sólo apoyar el diagnóstico de la enfermedad sino predecir su progresión y la capacidad para la detención del proceso degenerativo de los tratamientos existentes y futuros.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

129 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

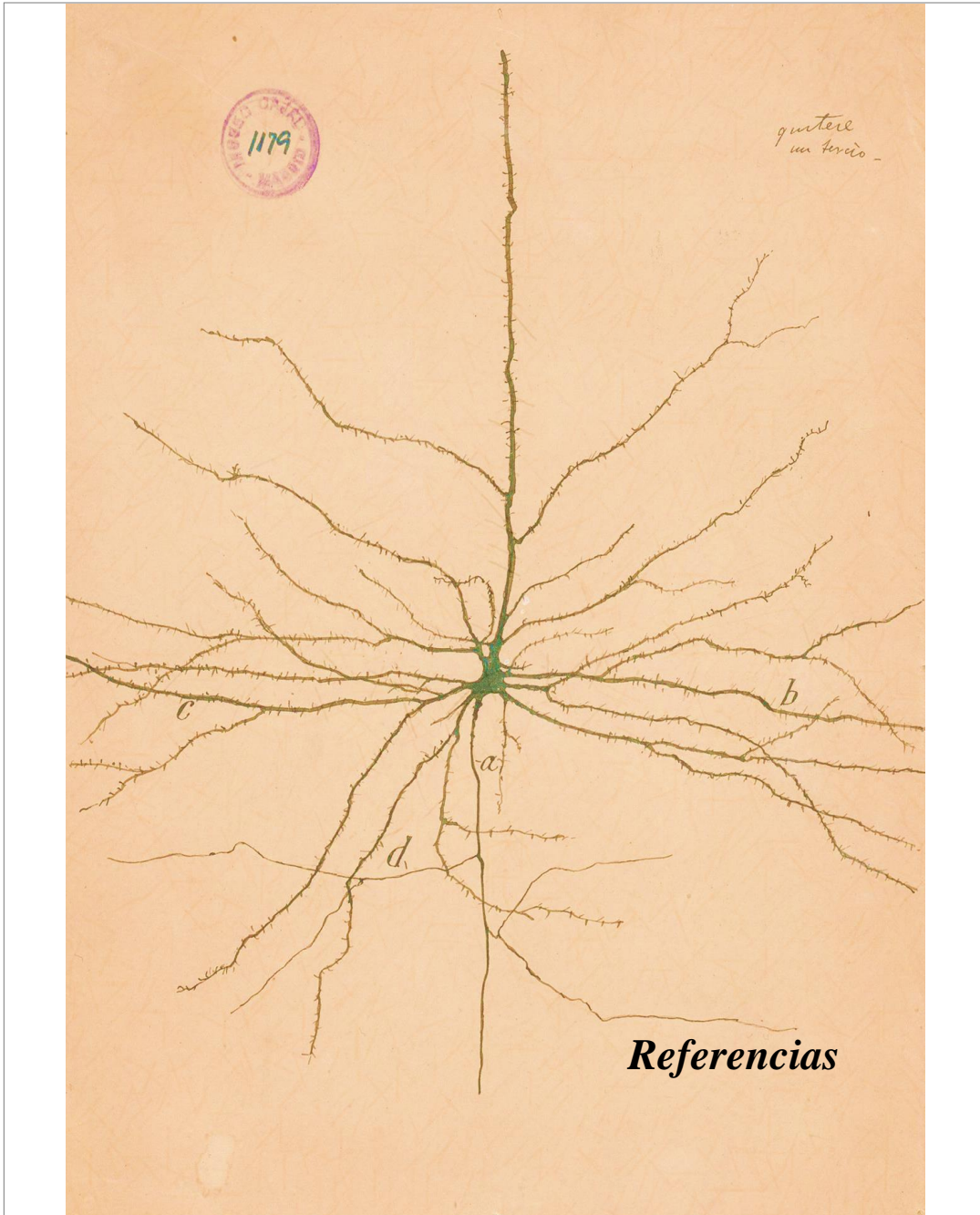
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

130 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

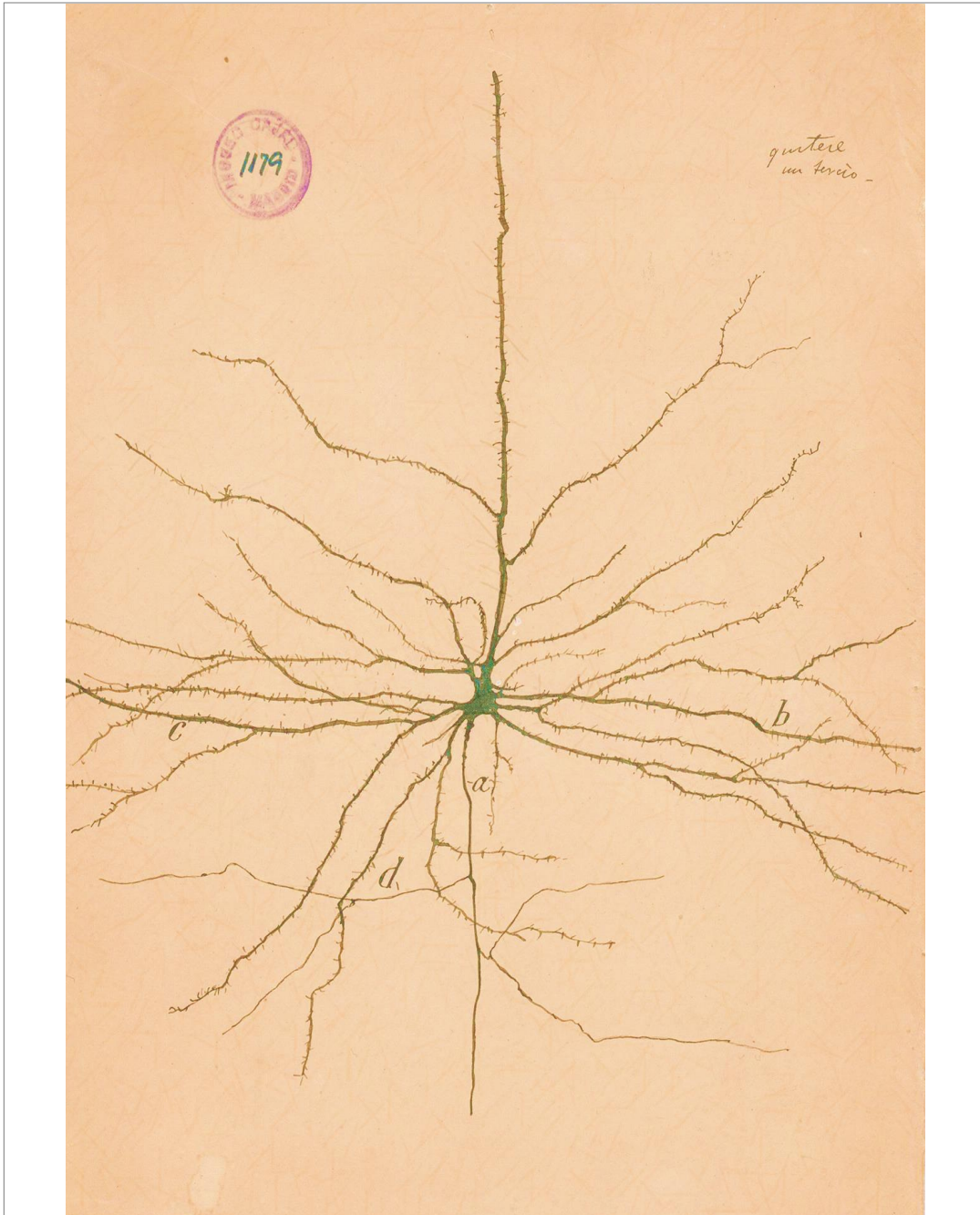
131 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

131 / 179



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

132 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

132 / 179

6. REFERENCIAS

Adlard, P.A., y A.I. Bush. 2006. «Metals and Alzheimer's disease». *Journal of Alzheimer's Disease* 10 (2-3): 145-63. <https://doi.org/10.3233/JAD-2006-102-303>.

Akatsu, H., Akira H., Takayuki Y., Mari Y., Maya M., Yoshio H., et al., 2012. «Transition metal abnormalities in progressive dementias». *BioMetals* 25 (2): 337-50. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9504-8>.

Albert, M.S., S.T. DeKosky, D. Dickson, B. Dubois, H.H. Feldman, N.C. Fox, et al., 2011. «The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease». *Alzheimer's and Dementia* 7 (3): 270-79. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.008>.

Alford, S., D. Patel, N. Perakakis, y C. S. Mantzoros. 2018. «Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: weighing the evidence». *Obesity Reviews* 19 (2): 269-80. <https://doi.org/10.1111/obr.12629>.

Alladi, S., R. Arnold, J.Mitchell, P.J. Nestor, y J.R. Hodges. 2006. «Mild cognitive impairment: Applicability of research criteria in a memory clinic and characterization of cognitive profile». *Psychological Medicine* 36 (4): 507-15. <https://doi.org/10.1017/S0033291705006744>.

Almeida, S., S.D. Shumaker, S.K Leblanc, P.Delaney, J.Marquie-Beck, S. Ueland, et al., 2011. «Research Submission Incidence of Post-Dural Puncture Headache in Research Volunteers». *Headache* 51: 1503-10. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.2011.01959.x>.

Álvarez, A., R.Cacabelos, C.Sanpedro, M.García-Fantini, y M.Aleixandre. 2007. «Serum TNF-alpha levels are increased and correlate negatively with free IGF-I in Alzheimer disease». *Neurobiology of Aging* 28: 533-36. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.02.012>.

Alzheimer's Association Committee. 2019. «2019 Alzheimer's disease facts and figures». *Alzheimer's & Dementia* 15 (3): 321-87. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.010>.

Andrási, E., N.Páli, Z.Molnár, y S. Kösel. 2005. «Brain aluminum, magnesium and phosphorus contents of control and Alzheimer-diseased patients». *Journal of Alzheimer's Disease* 7 (4): 273-84. <https://doi.org/10.3233/JAD-2005-7402>.

Anoop, A., P.K. Singh, R.S. Jacob, y S.K. Maji. 2010. «CSF Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis». *International Journal of Alzheimer's Disease* 1-12. <https://doi.org/10.4061/2010/606802>.

Ansari, M.A., y S.W. Scheff. 2010. «Oxidative Stress in the Progression of Alzheimer Disease in the Frontal Cortex». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 69 (2): 155-67. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.

Appleyard, M.E. B. Mcdonald, y B. Mcdonald. 1992. «Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in cerebrospinal fluid from different levels of the neuraxis of patients with dementia of the Alzheimer type». *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 1074-78.

Armstrong, R.A., N.J. Cairns, y P.L. Lantos. 2000. «Beta-amyloid deposition in the temporal lobe of patients with dementia with Lewy bodies: Comparison with non-demented cases and Alzheimer's disease». *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 11 (4): 187-92. <https://doi.org/10.1159/000017235>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

133 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Referencias 134

- Atwood, C.S, R.D Moir, X. Huang, R.C. Scarpa, N. Michael E. Bacarra, et al., 1998. «Dramatic aggregation of Alzheimer A β by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis». *Journal of Biological Chemistry* 273 (21): 12817-26. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.12817>.
- Atwood, C.S, R.C. Scarpa, X.Huang, R.D. Moir, W.D. Jones, D.P. Fairlie, et al., 2008. «Characterization of Copper Interactions with Alzheimer Amyloid β Peptides». *Journal of Neurochemistry* 75 (3): 1219-33. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0751219.x>.
- Ayton, S., P. Lei, y A.I. Bush. 2015. «Biomaterials and Their Therapeutic Implications in Alzheimer's Disease». *Neurotherapeutics* 12 (1): 109-20. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0312-z>.
- Bandyopadhyay, S., C. Cahill, A. Balleidier, C. Huang, D.K. Lahiri, X. Huang, et al., 2013. «Novel 5' Untranslated Region Directed Blockers of Iron-Regulatory Protein-1 Dependent Amyloid Precursor Protein Translation: Implications for Down Syndrome and Alzheimer's Disease». *PLoS ONE* 8 (7): 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065978>.
- Barbeau, E., M. Didic, E. Tramoni, O. Felician, S. Joubert, A. Sontheimer, et al., 2004. «Evaluation of visual recognition memory in MCI patients». *Neurology* 62 (8): 1317-22. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000120548.24298.DB>.
- Baskaran, P., C. Shaw, y S. Guthrie. 2018. «TDP-43 causes neurotoxicity and cytoskeletal dysfunction in primary cortical neurons». *PLoS ONE*, 1-15.
- Battaini, F., S. Elkabes, S. Bergamaschi, V. Ladisa, L. Lucchi, P.N.E. De Graan, et al., 1995. «Protein kinase C activity, translocation, and conventional isoforms in aging rat brain». *Neurobiology of Aging* 16 (2): 137-48. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(94\)00154-5](https://doi.org/10.1016/0197-4580(94)00154-5).
- Beam, C.R., C. Kaneshiro, J.Y. Jang, C.A. Reynolds, N.L. Pedersen, y M. Gatz. 2018. «Differences between Women and Men in Incidence Rates of Dementia and Alzheimer's Disease». *Journal of Alzheimer's Disease* 64 (4): 1077-83. <https://doi.org/10.3233/JAD-180141>.
- Bell, K.F.S., D.A. Bennett, y A.C. Cuello. 2007. «Paradoxical upregulation of glutamatergic presynaptic boutons during mild cognitive impairment». *Journal of Neuroscience* 27 (40): 10810-17. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3269-07.2007>.
- Bennett, D.A., R.S. Wilson, P.A. Boyle, A.S. Buchman, y J.A. Schneider. 2012. «Relation of neuropathology to cognition in persons without cognitive impairment». *Annals of Neurology* 72 (4): 599-609. <https://doi.org/10.1002/chem.201803785>.
- Bermejo, P., S. Martín-Aragón, J. Benedí, C. Susín, E. Felici, P. Gil, et al. 2008. «Differences of peripheral inflammatory markers between mild cognitive impairment and Alzheimer's disease». *Immunology letters* 117: 198-202. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.02.002>.
- Bibl, M., B. Mollenhauer, H. Esselmann, P. Lewczuk, H.W. Klafki, K. Sparbier, et al. 2006. «CSF amyloid- β -peptides in Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia». *Brain* 129 (5): 1177-87. <https://doi.org/10.1093/brain/awl063>.
- Bierer, L.M, R. Patrick, J.Schmeidler, D.P Perl, y L. Carlin. 1995. « Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study». *Archives of Neurology* 52 (1995): 81-88. <https://doi.org/10.1001/archneur.1995.00540250089017>.
- Bieschke, J.A.N., Q. Zhang, D.A. Bosco, R.A. Lerner, E.T. Powers, P. Wentworth, et al. 2006. «Small molecule oxidation products trigger disease-associated protein misfolding». *Accounts of Chemical Research* 39 (9): 611-19. <https://doi.org/10.1021/ar0500766>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

134 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Referencias 135

- Blennow, K. 2004. «Cerebrospinal Fluid Protein Biomarkers for Alzheimer's Disease». *NeuroRx* 1 (2): 213-25. <https://doi.org/10.1602/neurorx.1.2.213>.
- Blennow, K., y H. Hampel. 2003. «CSF markers for incipient Alzheimer's disease». *Neurology* 2: 605-13.
- Blennow, K., y H. Zetterberg. 2009. «Cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease». *Journal of Alzheimer's Disease* 18 (2): 413-17. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1177>.
- Bona, D., G. Scapagnini, G. Candore, L. Castiglia, G. Colonna-Romano, G. Duro, et al. 2010. «Immune-Inflammatory Responses and Oxidative Stress in Alzheimers Disease: Therapeutic Implications». *Current Pharmaceutical Design* 16 (6): 684-91. <https://doi.org/10.2174/138161210790883769>.
- Bonda, D.J., H.G. Lee, J.A. Blair, X. Zhu, y G. Perry. 2011. «Role of metal dyshomeostasis in Alzheimer Disease». *Metallomics* 3 (3): 267-70. <https://doi.org/10.1039/c0mt00074d>.Role.
- Braak, H., y E. Braak. 1991. «Neuropathological staging of Alzheimer-related changes». *Acta Neuropathologica* 82: 239-59. <https://doi.org/10.1109/ICINIS.2015.10>.
- Bressler, J.P., L. Olivi, H.C. Jae, Y. Kim, A. Maerten, y D. Bannon. 2007. «Metal transporters in intestine and brain: Their involvement in metal-associated neurotoxicities». *Human and Experimental Toxicology* 26 (3): 221-29. <https://doi.org/10.1177/0960327107070573>.
- Brunsgaard, H., K. Andersen-Ranberg, B. Jeune, A.N. Pedersen, P. Skinhej, y B.K. Pedersen. 1999. «A High Plasma Concentration of TNF- α Is Associated With Dementia in Centenarians». *Journal of Gerontology* 54 (7).
- Burgess, J.A., P.Lescuyer, A. Hainard, P.R. Burkhard, N. Turck, P. Michel, et al. 2006. «Identification of Brain Cell Death Associated Proteins in Human Post-mortem Cerebrospinal Fluid». *Journal of Proteome Research* 5 (7): 1674-81. <https://doi.org/10.1021/pr060160v>.
- Bush, A.I. 2003. «The metallobiology of Alzheimer's disease». *Trends in Neurosciences* 26 (4): 207-14. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00067-5](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00067-5).
- Bush, A.I., y R.E. Tanzi. 2008. «Therapeutics for Alzheimer's Disease Based on the Metal Hypothesis». *Neurotherapeutics* 5 (3): 421-32. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2008.05.001>.
- Butterfield, D.A., y E.R. Stadtman. 1997. «Protein Oxidation Processes in Aging Brain». *Advances in Cell Aging and Gerontology*. Vol. 2. [https://doi.org/10.1016/S1566-3124\(08\)60057-7](https://doi.org/10.1016/S1566-3124(08)60057-7).
- Butterfield, D.A., y C.M. Lauderback. 2002. «Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress». *Free Radical Biology and Medicine* 32 (11): 1050-60. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00794-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00794-3).
- Butterfield, S.M., y H.A. Lashuel. 2010. «Amyloidogenic protein-membrane interactions: Mechanistic insight from model systems». *Angewandte Chemie - International Edition* 49 (33): 5628-54. <https://doi.org/10.1002/anie.200906670>.
- Calabrese, V., E. Guagliano, M. Sapienza, M. Panebianco, S. Calafato, E. Puleo, et al., 2007. «Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: Role of vitagenes». *Neurochemical Research* 32 (4-5): 757-73. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9203-y>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

135 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Referencias 136

- Calsolaro, V., y P.Edison. 2016. «Neuroinflammation in Alzheimer 's disease : Current evidence and future directions». *Alzheimer's & Dementia*, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.010>.
- Campbell, N., F. Unverzagt, M. LaMantia, B. Kahn, y M. Boustani. 2011. «Risk Factors for the Progression of Mild Cognitive Impairment to Dementia». *Clinics in Geriatric Medicine* 7 (3): 263-69. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>.
- Canerina-Amaro, A. L.G Hernandez-Abad, I. Ferrer, D. Quinto-Aleman, F. Mesa-Herrera, C. Ferri, et al. 2017. «Lipid raft ER signalosome malfunctions in menopause and Alzheimer's disease». *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* 9: 111-26. <https://doi.org/10.2741/S476>.
- Casañas-Sánchez, V., J.A. Pérez, N. Fabelo, A.V. Herrera-Herrera, C. Fernández, R. Marín, et al., 2014. «Addition of docosahexaenoic acid, but not arachidonic acid, activates glutathione and thioredoxin antioxidant systems in murine hippocampal HT22 cells: Potential implications in neuroprotection». *Journal of Neurochemistry* 131 (4): 470-83. <https://doi.org/10.1111/jnc.12833>.
- Castaña, E.M., A.E. Roher, C.L. Esh, T.A. Kokjohn, y T.Beach. 2006. «Comparative proteomics of cerebrospinal fluid in neuropathologically-confirmed Alzheimer's disease and non-demented elderly subjects». *Neurological Research* 28 (2): 155-63. <https://doi.org/10.1179/016164106X98035>.
- Castegna, A., C.M. Lauderback, H. Mohmmad-Abdul, y D.A. Butterfield. 2004. «Modulation of phospholipid asymmetry in synaptosomal membranes by the lipid peroxidation products, 4-hydroxynonenal and acrolein: Implications for Alzheimer's disease». *Brain Research* 1004 (1-2): 193-97. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.01.036>.
- Castellani, R.J., R.K. Rolston, y M.A. Smith. 2011. «Alzheimer Disease». *Disease a month* 56 (9): 1-60. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2010.06.001>.Alzheimer.
- Cheignon, C., D. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot, P. Faller, C.Hureau, y F. Collin. 2018. «Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease». *Redox Biology* 14 (September 2017): 450-64. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>.
- Chen, S.J., J.D. Sweatt, y E. Klann. 1997. «Enhanced phosphorylation of the postsynaptic protein kinase C substrate RC3/neurogranin during long-term potentiation». *Brain Research* 749 (2): 181-87. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01159-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01159-6).
- Chin-Chan, M., J. Navarro-Yepes, y B. Quintanilla-Vega. 2015. «Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9: 1-22. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00124>.
- Çilliler, A.E., Ş. Öztürk, y Ş. Özbakir. 2008. «Serum magnesium level and clinical deterioration in Alzheimer's disease». *Gerontology* 53 (6): 419-22. <https://doi.org/10.1159/000110873>.
- Clausen, A., X. Bi, y M. Baudry. 2012. «Effects of the superoxide dismutase/catalase mimetic in a mouse model of Alzheimer's disease: Protection against and interruption of progression of amyloid and tau pathology and cognitive decline». *Journal of Alzheimer's Disease* 30 (1): 183-208. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-111298>.
- Clavaguera, F. J. Hench, M. Goedert, y M. Tolnay. 2015. «Prion-like transmission and spreading of tau pathology». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 41 (1): 47-58. <https://doi.org/10.1111/nan.12197>.
- Colombo, P.J., W.C. Wetsel, y M. Gallagher. 1997. «Spatial memory is related to hippocampal subcellular concentrations of calcium-dependent protein kinase C isoforms in young and aged rats». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (25): 14195-99. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.14195>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

136 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguilera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Referencias 137

- Combrinck, M., J. Williams, M. De Berardinis, D. Warden, M. Puopolo, et al. 2006. «Levels of CSF prostaglandin E2, cognitive decline, and survival in Alzheimer's disease». *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 77 (1): 85-88. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2005.063131>.
- Corder, E., A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, et al., 1993. «Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families». *Science* 8 (14): 41-43.
- Counts, S.E., M.Nadeem, S.P. Lad, J. Wu, y E.J. Mufson. 2006. «Differential expression of synaptic proteins in the frontal and temporal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 65 (6): 592-601. <https://doi.org/10.1097/00005072-200606000-00007>.
- Crichton, R.R., y R.J. Ward. 2006. «Metals in Brain, Metal Transport, Storage and Homeostasis». *Metal-based Neurodegeneration*, 1-20. <https://doi.org/10.1002/0470022574.ch1>.
- Cserr, H., C. Harling-Berg, y P. Knopf. 1992. «Drainage of Brain Extracellular Fluid into Blood and Deep Cervical Lymph and its Immunological Significance». *Brain Pathology* 276 (1): 269-76.
- Dai, X.L., Y.X. Sun, y Z.F. Jiang. 2006. «Cu (II) Potentiation of Alzheimer A β 1-40 Cytotoxicity and Transition on its Secondary Structure» *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 38 (11): 765-72. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2006.00228.x>.
- Darreh-Shori, T., S.Brimijoin, A. Kadir, O. Almkvist, y A. Nordberg. 2006. «Differential CSF butyrylcholinesterase levels in Alzheimer's disease patients with the ApoE ϵ 4 allele, in relation to cognitive function and cerebral glucose metabolism». *Neurobiology of Disease* 24 (2): 326-33. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.07.013>.
- Darreh-Shori, T., M. Siawesh, M. Mousavi, N. Andreasen, y A. Nordberg. 2012. «Apolipoprotein ϵ 4 Modulates Phenotype of Butyrylcholinesterase in CSF of Patients with Alzheimer's Disease» *Journal of Alzheimers Disease* 28: 443-58. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-111088>.
- Darvesh, S., y D.A. Hopkins. 2003. «Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus». *Journal of Comparative Neurology* 463 (1): 25-43. <https://doi.org/10.1002/cne.10751>.
- Davidson, W.S., A. Jonas, D.F. Clayton, y J.M. George. 1998. «Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes». *Journal of Biological Chemistry* 273 (16): 9443-49.
- Davidsson, P., y K. Blennow. 1998. «Neurochemical dissection of synaptic pathology in Alzheimer's disease». *International Psychogeriatrics* 10 (1): 11-23. <https://doi.org/10.1017/S1041610298005110>.
- Davson, H., F.R. Domer, y J.R. Holungsworth. 1973. «The mechanism of drainage of the cerebrospinal fluid». *Brain* 329-36.
- Deibel, M.A., W.D. Ehmann, y W.R. Markesbery. 1996. «Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: Possible relation to oxidative stress». *Journal of the Neurological Sciences* 143 (1-2): 137-42. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(96\)00203-1](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(96)00203-1).
- Díaz, M., V. Casañas-Sánchez, D. Quinto-Aleman, y J.A. Pérez. 2019. «Ethanol and hippocampal gene expression: Linking in ethanol metabolism, neurodegeneration, and resistance to oxidative stress». *Neuroscience of Alcohol: Mechanisms and Treatment*, 463-72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813125-1.00048-9>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

137 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

- Díaz, M., N. Fabelo, V. Martín, I. Ferrer, T. Gómez, y R. Marín. 2014. «Biophysical alterations in lipid rafts from human cerebral cortex associate with increased BACE1/A β PP interaction in early stages of Alzheimer's disease». *Journal of Alzheimer's Disease* 43 (4): 1185-98. <https://doi.org/10.3233/JAD-141146>.
- Dimopoulos, N., C. Piperi, A. Salonicoti, P. Mitropoulos, E. Kallai, I. Liappas, et al. 2006. «Indices of low-grade chronic inflammation correlate with early cognitive deterioration in an elderly Greek population» 398: 118-23. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.12.064>.
- Droge, W. 2002. «Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function.pdf», 47-95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>.
- Du, K., M. Liu, Y. Pan, X. Zhong, y M. Wei. 2017. «Association of serum manganese levels with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis». *Nutrients* 9 (3). <https://doi.org/10.3390/nu9030231>.
- Dubois, B., H.H. Feldman, C. Jacova, H. Hampel, J.L. Molinuevo, K. Blennow, et al. 2014. «Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: The IWG-2 criteria». *The Lancet Neurology* 13 (6): 614-29. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70090-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70090-0).
- Dubois, B., H. Hampel, H.H. Feldman, P. Scheltens, P. Aisen, S. Andrieu, et al. 2016. «Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria». *Alzheimer's and Dementia*. 12: 292-323. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.002>.
- Duce, J.A., y A.I. Bush. 2010. «Biological metals and Alzheimer's disease: Implications for therapeutics and diagnostics». *Progress in Neurobiology* 92 (1): 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.04.003>.
- Duthey, B. 2013. «Alzheimer Disease and other Dementias». *World Health Organization*, 20: 1-77. http://www.who.int/medicines/areas/priority_medicines/BP6_11Alzheimer.pdf.
- Eckles, K.E., E.M. Dudek, P.C. Bickford, y M.D. Browning. 1997. «Amelioration of age-related deficits in the stimulation of synapsin phosphorylation». *Neurobiology of Aging* 18 (2): 213-17. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(97\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(97)00008-0).
- Egawa, J., M.L. Pearn, B.P. Lemkuil, P.M. Patel, y B.P. Head. 2016. «Membrane lipid rafts and neurobiology: age-related changes in membrane lipids and loss of neuronal function» 16: 4565-79. <https://doi.org/10.1113/JP270590>.
- Ellman, G.L., K. D. Courtney, V. Andres, y R.M. Featherstone. 1961. «A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity». *Biochemical Pharmacology* 7 (2): 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- Engelhart, M.J., M.I. Geerlings, J. Meijer, A. Kiliaan, A. Ruitenber, J.C. Van Swieten, T et al. 2004. «Inflammatory Proteins in Plasma and the Risk of Dementia: The Rotterdam Study». *Archives of Neurology* 61 (5): 668-72. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.5.668>.
- Estévez-González, A., J. Kulisevsky, A. Boltes, P. Otermín, y C. García-Sánchez. 2003. «Rey verbal learning test is a useful tool for differential diagnosis in the preclinical phase of Alzheimer's disease: Comparison with mild cognitive impairment and normal aging». *International Journal of Geriatric Psychiatry* 18 (11): 1021-28. <https://doi.org/10.1002/gps.1010>.
- Exley, C. 2016. «The toxicity of aluminium in humans». *Morphologie* 100 (329): 51-55. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2015.12.003>.
- Exley, C., N.C. Price, S.M. Kelly, y J.D. Birchall. 1993. «An interaction of β -amyloid with aluminium in vitro». *FEBS Letters* 324 (3): 293-95. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80137-J](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80137-J).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

138 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Referencias 139

- Exley, C., y T. Vickers. 2014. «Elevated brain aluminium and early onset Alzheimer's disease in an individual occupationally exposed to aluminium: A case report». *Journal of Medical Case Reports* 8 (1): 1-3. <https://doi.org/10.1186/1752-1947-8-41>.
- Fabelo, N., V. Martín, R. Marín, D. Moreno, I. Ferrer, y M. Díaz. 2014. «Altered lipid composition in cortical lipid rafts occurs at early stages of sporadic Alzheimer's disease and facilitates APP/BACE1 interactions». *Neurobiology of Aging* 35 (8): 1801-12. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.005>.
- Fabelo, N., V. Martín, G. Santpere, R. Marín, L. Torrent, et al. 2011. «Severe Alterations in Lipid Composition of Frontal Cortex Lipid Rafts from Parkinson's Disease and Incidental Parkinson's Disease». *Molecular Medicine* 17 (9-10): 1. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00119>.
- Felgenhauer, K., G. Schliep, y N. Ropic. 1976. «Evaluation of the blood-CSF barrier by protein gradients and the humoral immune response within the central nervous system». *Journal of the Neurological Sciences* 30 (1): 113-28. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(76\)90259-8](https://doi.org/10.1016/0022-510X(76)90259-8).
- Ferreira-Vieira, I.M. Talita, F. Guimaraes, R. Silva, y F.M. Ribeiro. 2016. «Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System». *Current Neuropharmacology* 14 (1): 101-15. <https://doi.org/10.2174/1570159x13666150716165726>.
- Finehout, E.J, Z. Franck, L.H. Choe, N. Relkin, y K.H. Lee. 2007. «Cerebrospinal Fluid Proteomic Biomarkers for Alzheimer's Disease», 120-29. <https://doi.org/10.1002/ana.21038>.
- Flaten, T.P. 2001. «Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water». *Brain Research Bulletin* 55 (2): 187-96. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00459-2](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00459-2).
- Fluss, R., D. Faraggi, y B. Reiser. 2005. «Estimation of the Youden Index and its associated cutoff point». *Biometrical Journal* 47 (4): 458-72. <https://doi.org/10.1002/bimj.200410135>.
- Folstein, M., S. Folstein, y P. McHugh. 1975. «Mini-Mental State': a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician». *J Psychiatr Res* 12: 189-98. <https://doi.org/10.3744/snak.2003.40.2.021>.
- Forbes, W.F., y D.R.C. McLachlan. 1996. «Further thoughts on the aluminum-Alzheimer's disease link ». *Journal of Epidemiology and Community Health* 50 (4): 401-3. <https://doi.org/10.1136/jech.50.4.401>.
- Friedlich, A.L., J.L.Lee, T. Van Groen, R.A. Cherny, I. Volitakis, T.B. Cole, et al. 2004. «Neuronal Zinc Exchange with the Blood Vessel Wall Promotes Cerebral Amyloid Angiopathy in an Animal Model of Alzheimer's Disease» 24 (13): 3453-59. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0297-04.2004>.
- Gaeta, A., y R.C. Hider. 2005. «The crucial role of metal ions in neurodegeneration: The basis for a promising therapeutic strategy». *British Journal of Pharmacology* 146 (8): 1041-59. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706416>.
- Gao, Y.L., N. Wang, F.Sun, X. Cao, W. Zhang, y J. Yu. 2018. «Tau in neurodegenerative disease». *Annals of traslational medicine* 21 (10): 1-13. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.04.23>.
- Gaschler, M.M., y B.R. Stockwell. 2017. «Lipid peroxidation in cell death». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482 (3): 419-25. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>.
- Gatz, M., C.A. Reynolds, L. Fratiglioni, B. Johansson, J.A. Mortimer, S. Berg, et al. 2006. «Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease». *Archives of General Psychiatry* 63 (2): 168-74. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.2.168>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

139 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguilera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Referencias 140

- Gellein, K., J.H. Skogholt, J. Aaseth, G.B. Thoresen, S. Lierhagen, E. Steinnes, et al. 2008. «Trace elements in cerebrospinal fluid and blood from patients with a rare progressive central and peripheral demyelinating disease» 266: 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.08.042>.
- Gianotti, C., A. Porta, P.N.E. De Graan, A.B. Oestreicher, y M.G. Nunzi. 1993. «B-50/GAP-43 phosphorylation in hippocampal slices from aged rats: Effects of phosphatidylserine administration». *Neurobiology of Aging* 14 (5): 401-6. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(93\)90098-V](https://doi.org/10.1016/0197-4580(93)90098-V).
- Gibson, G., C. Cotman, G. Lynch, J. Blass, P. Coleman, y S. Buell. 2017. «Calcium Hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging: A framework for integrating new evidence into a comprehensive theory of pathogenesis». *Alzheimer's and Dementia* 13 (2): 178-182.e17. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.12.006>.
- Glabe, C.G., y R. Kaye. 2006. «Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis». *Neurology* 66 (Issue 1, Supplement 1): S74-78. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000192103.24796.42>.
- Gómez-Ramos, P., C. Bouras, y M.A. Morán. 1994. «Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase on neurofibrillary degeneration sites in the brains of aged and Alzheimer's disease patients». *Brain Research* 640 (1-2): 17-24. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91852-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91852-X).
- Greenough, M.A., J. Camakaris, y A.I. Bush. 2013. «Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease». *Neurochemistry International* 62 (5): 540-55. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.08.014>.
- Group, Biomarkers Definitions Working. 2001. «Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework». *Clinical pharmacology and therapeutics* 69 (3): 89-95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>.
- Guillozet, A.L., J.F. Smiley, D.C. Mash, y M.M. Mesulam. 1997. «Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques». *Annals of Neurology* 42 (6): 909-18. <https://doi.org/10.1002/ana.410420613>.
- Habdous, M., M. Vincent-Viry, S. Visvikis, y G. Siest. 2002. «Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity». *Clinica Chimica Acta* 326 (1-2): 131-42. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(02\)00329-7](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(02)00329-7).
- Hampel, H., S. Lista, y Z.S. Khachaturian. 2012. «Development of biomarkers to chart all Alzheimer's disease stages: The royal road to cutting the therapeutic Gordian Knot». *Alzheimer's & Dementia* 8 (4): 312-36. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.05.2116>.
- Hanley, J.A., y B.J. McNeil. 1982. «The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve». *Radiology* 143 (1): 29-36. <https://doi.org/10.2196/jmir.9160>.
- Hardy, J., y G. Higgins. 2009. «The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: A critical reappraisal». *Journal of Neurochemistry* 110 (4): 1129-34. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06181.x>.
- Hardy, J., y G. Higgins. 1992. «Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis». *Science* 256: 184-85. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>.
- Harrison, A.F., y J. Shorter. 2017. «RNA-binding proteins with prion-like domains in health and disease». *Journal Biochemical Molecular Biology* 474 (8): 1417-38. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160499.RNA-binding>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

140 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Referencias 141

- Hayes, J.D., J.U. Flanagan, y I.R. Jowsey. 2005. «Glutathione transferases». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 51-88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>.
- Health, O., y S.L.Volpe. 2013. «Magnesium in Disease Prevention». *Adv. Nutr.* 4: 378S-383S. <https://doi.org/10.3945/an.112.003483.low>.
- Henriksen, K., S.E.O. Bryant, H. Hampel, J.Q. Trojanowski, T.J. Montine, A. Jeromin, et al. 2013. «The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease». *Alzheimer's & Dementia*, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.01.013>.
- Henriques, A.D., A.L. Benedet, E.F. Camargos, P. Rosa-Neto, y O.Toledo-Nóbrega. 2018. «Fluid and imaging biomarkers for Alzheimer's disease: Where we stand and where to head to». *Experimental Gerontology* 107:169-77. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.01.002>.
- Hensley, K., N. Hall, R. Subramaniam, P. Cole, M. Harris, M. Aksenov, et al. 1995. «Brain Regional Correspondence Between Alzheimer's Disease Histopathology and Biomarkers of Protein Oxidation». *Journal of Neurochemistry* 65 (5): 2146-56. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65052146.x>.
- Hesse, C., L. Rosengren, N. Andreasen, P. Davidsson, H. Vanderstichele, E. Vanmechelen, et al. 2001. «Transient increase in total tau but not phospho-tau in human cerebrospinal fluid after acute stroke, NeurosciLett2001 by Hasse et al.pdf» 297: 187-90. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01697-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01697-9).
- Hicks, D.A., N. Nalivaeva, y A.J.Turner. 2012. «Lipid rafts and Alzheimer's disease : protein-lipid interactions and perturbation of signaling» 3: 1-18. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00189>.
- Huang, X., C.S. Atwood, M.A. Hartshorn, G. Multhaup, L.E. Goldstein, R.C. Scarpa, et al. 1999. «The A β peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction». *Biochemistry* 38 (24): 7609-16. <https://doi.org/10.1021/bi990438f>.
- Hughes, C.P., L. Berg, W.L. Danziger, L.A. Coben, y R.L. Martin. 1982. «A new clinical scale for the staging of dementia». *British Journal of Psychiatry* 140 (6): 566-72. <https://doi.org/10.1192/bjp.140.6.566>.
- Hulstaert, F., K. Blennow, A. Ivanoiu, H.C. Schoonderwaldt, M. Riemenschneider, P.P.D. Deyn, et al. 1999. «Improved discrimination of AD patients using β -amyloid₍₁₋₄₂₎ and tau levels in CSF». *Neurology* 52 (8): 1555-1555. <https://doi.org/10.1212/WNL.52.8.1555>.
- Ishii, Tsuyoshi, y Seiji Haga. 1975. «Identification of Components of Immunoglobulins in Senile Plaques by means of Fluorescent Antibody Technique» *Acta neuropathologica* 162: 157-62.
- Jack, C.R., M.S. Albert, D.S. Knopman, G.M. McKhann, R.A. Sperling, M.C. Carrillo, et al. 2011. «Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease». *Alzheimer's and Dementia* 7 (3): 257-62. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.004>.
- Jack, C.R., D.A. Bennett, K. Blennow, M.C. Carrillo, B. Dunn, S.B. Haeberlein, et al. 2018. «NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease». *Alzheimer's and Dementia* 14 (4): 535-62. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>.
- Janelidze, S., J. Hertz, H. Zetterberg, M. L. Waldö, A. Santillo, K. Blennow, y O. Hansson. 2016. «Cerebrospinal fluid neurogranin and YKL-40 as biomarkers of Alzheimer's disease». *Annals of Clinical and Translational Neurology* 3 (1): 12-20. <https://doi.org/10.1002/acn3.266>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

141 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguilár UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
---	----------------------------

Referencias 142

- Janicki, S.C., y N. Schupf. 2010. «Hormonal Influences on Cognition and Risk for Alzheimer's Disease», 359-66. <https://doi.org/10.1007/s11910-010-0122-6>.
- Jin, L., W. H. Wu, Q. Li, Y.F. Zhao, y Y. Li. 2011. «Copper inducing A β 42 rather than A β 40 nanoscale oligomer formation is the key process for A β neurotoxicity». *Nanoscale* 3 (11): 4746-51. <https://doi.org/10.1039/c1nr11029b>.
- Johns, E.K., N.A. Phillips, S. Belleville, D. Goupil, L. Babins, N. Kelner, et al. 2012. «The profile of executive functioning in amnesic mild cognitive impairment: Disproportionate deficits in inhibitory control». *Journal of the International Neuropsychological Society* 18 (3): 541-55. <https://doi.org/10.1017/S1355617712000069>.
- Josephs, K.A., J.L. Whitwell, S.D. Weigand, M.E. Murray, N. Tosakulwong, A.M. Liesinger, et al. 2015. «TDP-43 is a key player in the clinical features associated with Alzheimer's disease». *Acta Neuropathologica* 127 (6): 811-24. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1269-z>.TDP-43.
- Kalaria, R.N. 2010. «Vascular basis for brain degeneration: Fluctuating controls and risk factors for dementia». *Nutrition Reviews* 68 113-15. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00352.x>.
- Karran, E., y J. Hardy. 2014. «Anti-amyloid Therapy for Alzheimer's Disease — Are We on the Right Road?» *New England Journal of Medicine* 370 (4): 377-78. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1313943>.
- Kelly, B.L., y A. Ferreira. 2006. « β -amyloid-induced dynamin 1 degradation is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors in hippocampal neurons». *Journal of Biological Chemistry* 281 (38): 28079-89. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605081200>.
- Khachaturian, Z.S. 2006. «Calcium Hypothesis of Alzheimer's Disease and Brain Aging». *Annals of the New York Academy of Sciences* 747 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb44398.x>.
- Kovatsi, L., K.K. Touliou, M. Tsolaki, y A. Kazis. 2006. «Cerebrospinal fluid levels of calcium, magnesium, copper and zinc in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment». *Trace elements and electrolytes* 23 (4): 247-51.
- Kowall, N.W., W.W. Pendlebury, J.B. Kessler, D.P. Perl, y M.F. Beal. 1989. «Aluminum-induced neurofibrillary degeneration affects a subset of neurons in rabbit cerebral cortex, basal forebrain and upper brainstem». *Neuroscience* 29 (2): 329-37. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90060-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90060-2).
- Kuhl, D.E., R.A. Koeppe, S.E. Snyder, S. Minoshima, K.A. Frey, y M.R. Kilbourn. 2006. «In Vivo Butyrylcholinesterase Activity Is Not Increased in Alzheimer's Disease Synapses» *Annals of Neurology* 13-20. <https://doi.org/10.1002/ana.20672>.
- Landino, L.M., B.C. Crews, M.D. Timmons, J.D. Morrow, y L.J. Marnett. 1996. «Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (26): 15069-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15069>.
- Lane, R.M., M. Kivipelto, y N.H. Greig. 2004. «Acetylcholinesterase and its inhibition in Alzheimer disease». *Clinical Neuropharmacology* 27 (3): 141-49. <https://doi.org/10.1097/00002826-200405000-00011>.
- Lavado, L.K., M.Zhang, K. Patel, S. Khan, y U.K. Patel. 2019. «Biomaterials as Potential Predictors of the Neurodegenerative Decline in Alzheimer's Disease.» *Cureus* 11-17. <https://doi.org/10.7759/cureus.5573>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

142 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Referencias 143

Lee, J.Y., T.B.Cole, R.D. Palmiter, S.W. Suh, y J.Y. Koh. 2002. «Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (11): 7705-10.

Lee, J.Y., J.H.Kim, S. Ho, J. Lee, R.A. Cherny, A.I. Bush, et al. 2004. «Molecular Basis of Cell and Developmental Biology: Estrogen Decreases Zinc Transporter 3 Expression and Synaptic Vesicle Zinc Levels in Mouse Brain». *The Journal of Biological Chemistry* 279:8602-8607 <https://doi.org/10.1074/jbc.M309730200>.

Leuba, G., A. Savioz, A. Vernay, B. Carnal, R. Kraftsik, E. Tardif, et al. 2008. «Differential changes in synaptic proteins in the Alzheimer frontal cortex with marked increase in PSD-95 postsynaptic protein». *Journal of Alzheimer's Disease* 15 (1): 139-51. <https://doi.org/10.3233/JAD-2008-15112>.

Levental, I., M. Grzybek, y K. Simons. 2010. «Greasing Their Way: Lipid Modifications Determine Protein Association with Membrane Rafts». *Biochemistry* 49: 6305-16. <https://doi.org/10.1021/bi100882y>.

Levitsky, D.O., y M. Takahashi. 2013. «Interplay of Ca²⁺ and Mg²⁺ in Sodium-Calcium Exchanger and in Other Ca²⁺-Binding Proteins: Magnesium, Watchdog That Blocks Each Turn if Able». *Sodium Calcium Exchange: A Growing Spectrum of Pathophysiological Implications* 65-78. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4756-6_7.

Li, W., T. Wang, y S. Xiao. 2016. «Type 2 diabetes mellitus might be a risk factor for mild cognitive impairment progressing to Alzheimer's disease». *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 12: 2489-95. <https://doi.org/10.2147/NDT.S111298>.

Licastro, F., S. Pedrini, L. Caputo, G. Annoni, L. Jane, C. Ferri, et al. 2000. «Increased plasma levels of interleukin-1, interleukin-6 and a -1-antichymotrypsin in patients with Alzheimer's disease: peripheral inflammation or signals from the brain?». *Journal of neuroimmunology*, 97-102.

Lingwood, D., y K. Simons. 2010. «Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle», *Science* 46-51.

Lippa, C.F., y J.C. Morris. 2006. «Alzheimer neuropathology in nondemented aging: Keeping mind over matter». *Neurology* 66 (12): 1801-2. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000234879.82633.f3>.

Liu, Y.C., P.M. Chiang, y K.J. Tsai. 2013. «Disease Animal Models of TDP-43 Proteinopathy and Their Pre-Clinical Applications». *International Journal of Molecular Sciences* 14: 20079-111. <https://doi.org/10.3390/ijms141020079>.

Liu, Z., T. Zhou, A.C. Ziegler, P. Dimitrion, y L. Zuo. 2017. «Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 25(2): 59-67. <https://doi.org/10.1155/2017/2525967>.

Lockridge, O. 2015. «Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses». *Pharmacology and Therapeutics* 148: 34-46. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.011>.

Loef, M., G.N. Schrauzer, y H. Walach. 2011. «Selenium and Alzheimer's disease: A systematic review». *Journal of Alzheimer's Disease* 26 (1): 81-104. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110414>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

143 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Referencias 144

- Lovell, M.A., C. Xie, y W.R. Markesbery. 1998. «Decreased glutathione transferase activity in brain and ventricular fluid in Alzheimer's disease». *Neurology* 51 (6): 1562-66. <https://doi.org/10.1212/WNL.51.6.1562>.
- Lovell, M.A., J.D Robertson, W.J Teesdale, J.L Campbell, y W.R Markesbery. 1998. «Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques». *Journal of the Neurological Sciences* 158 (1): 47-52. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(98\)00092-6](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(98)00092-6).
- Lovell, M.A., S. Xiong, C. Xie, P. Davies, y W.R. Markesbery. 2004. «Induction of hyperphosphorylated tau in primary rat cortical neuron cultures mediated by oxidative stress and glycogen synthase kinase-3». *Journal of Alzheimers Disease* 6 (6): 659-81. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2594-y>.
- Lovell, M.A., W.D. Ehmann, S.M. Butler, y W.R. Markesbery. 1995. «Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in alzheimer's disease». *Neurology* 45 (8): 1594-1601. <https://doi.org/10.1212/WNL.45.8.1594>.
- Luo, Y., F. Niu, Z. Sun, W. Cao, X. Zhang, D. Guan, Z. Lv, et al. 2009. «Altered expression of A β metabolism-associated molecules from d-galactose/AICl₃ induced mouse brain». *Mechanisms of Ageing and Development* 130 (4): 248-52. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.12.005>.
- Magi, S., P. Castaldo, M.L. MacRi, M. Maiolino, A. Matteucci, G. Bastioli, et al . 2016. «Intracellular Calcium Dysregulation: Implications for Alzheimer's Disease». *BioMed Research International* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6701324>.
- Mantyh, P.W., J.R. Ghilardi, S. Rogers, E. DeMaster, C.J. Allen, E.R. Stimson, et al. 1993. «Aluminum, Iron, and Zinc Ions Promote Aggregation of Physiological Concentrations of β -Amyloid Peptide». *Journal of Neurochemistry* 61 (3): 1171-74. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03639.x>.
- Marin, R.. 2011. «Signalosomes in the brain: relevance in the development of certain neuropathologies such as Alzheimer's disease». *Frontiers in Physiology* 2: 1-4. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00023>.
- Martín, V., N.Fabelo, G. Santpere, B. Puig, R. Marín, I. Ferrer et al 2010a. «Lipid alterations in lipid rafts from Alzheimer's disease human brain cortex». *Journal of Alzheimer's Disease* 19 (2): 489-502. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1242>.
- Maruyama, M., H. Arai, M. Sugita, H. Tanji, M. Higuchi, N. Okamura, et al. 2001. «Cerebrospinal fluid amyloid β 1-42 levels in the mild cognitive impairment stage of Alzheimer's disease». *Experimental Neurology* 172 (2): 433-36. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7814>.
- Mattsson, N., A. Lönneborg, M. Boccardi, K. Blennow, y O. Hansson. 2017. «Clinical validity of cerebrospinal fluid A β 42, tau, and phospho-tau as biomarkers for Alzheimer's disease in the context of a structured 5-phase development framework». *Neurobiology of Aging* 52: 196-213. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.034>.
- Maynard, C.J., A.I. Bush, C.L. Masters, R. Cappai, y Q.X. Li. 2005. «Metals and amyloid- β in Alzheimer's disease». *International Journal of Experimental Pathology*, 147-59.
- McCarthy, R.C., y D.J. Kosman. 2015. «Iron transport across the blood-brain barrier: Development, neurovascular regulation and cerebral amyloid angiopathy». *Cellular and Molecular Life Sciences* 72 (4): 709-27. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1771-4>.
- McDonnell, T.J., y S.J. Korsmeyer. «Early onset Alzheimer's Disease caused by mutation at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene». *Nature* 354: 56-58.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

144 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Referencias 145

McKhann, G.M., D.S. Knopman, H. Chertkow, B.T. Hyman, C.R. Jack, C.H. Kawas, et al. 2011. «The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease». *Alzheimer's and Dementia* 7 (3): 263-69. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>.

Mesa-Herrera, F., D. Quinto-Aleman, y M. Díaz. 2019. «A Sensitive, Accurate, and Versatile Method for the Quantification of Superoxide Dismutase Activities in Biological Preparations». *Reactive Oxygen Species* 7 (19): 10-20. <https://doi.org/10.20455/ros.2019.809>.

Mesulam, M.M., A. Guillozet, P. Shaw, A. Levey, E.G. Duysen, y O. Lockridge. 2002. «Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine». *Neuroscience* 110 (4): 627-39. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00613-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00613-3).

Mieyal, J.J., M.M. Gallogly, S. Qanungo, E.A. Sabens, y M.D. Shelton. 2008. «Molecular Mechanisms and Clinical Implications of Reversible Protein S-Glutathionylation». *Antioxidants & Redox Signaling* 10 (11). <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2089>.

Miller, L.M., Q. Wang, T.P. Telivala, R.J. Smith, A. Lanzirrotti, y J. Miklossy. 2006. «Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with β -amyloid deposits in Alzheimer's disease». *Journal of Structural Biology* 155 (1): 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.09.004>.

Molander-Melin, M., K. Blennow, N. Bogdanovic, B. Dellheden, y P. Fredman. 2005. «Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional disease development; increased density of gangliosides GM1 and GM2 and loss of cholesterol in detergent-resistant membrane domains». *Journal of neurochemistry* 171-82. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02849.x>.

Montine, T.J., E.R. Peskind, J.F. Quinn, A.M. Wilson, K.S. Montine, y D. Galasko. 2011. «Increased cerebrospinal fluid F2-isoprostanes are associated with aging and latent Alzheimer's disease as identified by biomarkers». *NeuroMolecular Medicine* 13 (1): 37-43. <https://doi.org/10.1007/s12017-010-8126-6>.

Montine, T.J., J.F. Quinn, D. Milatovic, L.C. Silbert, T. Dang, S. Sanchez, et al. 2002. «Peripheral F2-isoprostanes and F4-neuroprostanes are not increased in Alzheimer's disease». *Annals of Neurology* 52 (2): 175-79. <https://doi.org/10.1002/ana.10272>.

Morishima-Kawashima, M., N. Oshima, H. Ogata, H. Yamaguchi, M. Yoshimura, S. Sugihara, et al. 2000. «Effect of apolipoprotein E allele $\epsilon 4$ on the initial phase of amyloid β -protein accumulation in the human brain». *American Journal of Pathology* 157 (6): 2093-99. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64847-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64847-X).

Mukaetova-Ladinska, E.B., F. Garcia-Siera, J. Hurt, H.J. Gertz, J.H. Xuereb, R. Hills, et al. 2000. «Staging of cytoskeletal and β -amyloid changes in human isocortex reveals biphasic synaptic protein response during progression of Alzheimer's disease». *American Journal of Pathology* 157 (2): 623-36. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64573-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64573-7).

Mullan, M., F. Crawford, K. Axelman, H. Houlden, L. Lilius, B. Winblad, et al. 1992. «A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid». *Nature Genetics* 2 (1): 345-50. <https://doi.org/10.1038/ng0892-345>.

Muma, N.A., y S.M. Singer. 1996. «Aluminum-induced neuropathology: Transient changes in microtubule-associated proteins». *Neurotoxicology and Teratology* 18 (6): 679-90. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(96\)00126-2](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(96)00126-2).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

145 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Referencias 146

- Murphy, M.P., y H.L. Iii. 2010. «Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide». *Journal of Alzheimer's Disease* 19 (1): 1-17. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1221>. Alzheimer.
- Nakada, T., y I.L. Kwee. 2019. «Fluid Dynamics Inside the Brain Barrier: Current Concept of Interstitial Flow, Glymphatic Flow, and Cerebrospinal Fluid Circulation in the Brain». *Neuroscientist* 25 (2): 155-66. <https://doi.org/10.1177/1073858418775027>.
- Nakamura, M., N. Shishido, A. Nunomura, M.A. Smith, G. Perry, Y. Hayashi, et al. 2007. «Three histidine residues of amyloid- β peptide control the redox activity of copper and iron». *Biochemistry* 46 (44): 12737-43. <https://doi.org/10.1021/bi701079z>.
- Neri, L.C., y D. Hewitt. 1991. «Aluminium, Alzheimer's disease, and drinking water». *Lancet*, 390. <https://doi.org/10.1007/s005350170018>.
- Ohkawa, H., N. Ohishi, y K. Yagi. 1979. «Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction». *Analytical Biochemistry* 95 (2): 351-58. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
- Omar, R.A., Y.J. Chyan, A.C. Adorn, B. Poeggeler, N.K. Robakis, y M.A. Pappolla. 1999. «Increased expression but reduced activity of antioxidant enzymes in Alzheimer's disease». *Journal of Alzheimer's Disease* 1 (3): 139-45. <https://doi.org/10.3233/JAD-1999-1301>.
- Paine, S.M.L., y J.S. Lowe. 2011. «Approach to the post-mortem investigation of neurodegenerative diseases: From diagnosis to research». *Diagnostic Histopathology* 17 (5): 211-16. <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2011.02.004>.
- Panayi, A.E., N.M. Spyrou, B.S. Iversen, M.A. White, y P. Part. 2002. «Determination of cadmium and zinc in Alzheimer's brain tissue using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry». *Journal of the Neurological Sciences* 195 (1): 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(01\)00672-4](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(01)00672-4).
- Parsons, R.B., y B.M. Austen. 2007. «Protein-protein interactions in the assembly and subcellular trafficking of the BACE (β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme) complex of Alzheimer's disease». *Biochemical Society Transactions* 35 (5): 974-79. <https://doi.org/10.1042/bst0350974>.
- Patterson, C. 2018. «The state of the art of dementia research : New frontiers World Alzheimer Report 2018».
- Petersen, R. G.E. Smith, S.C. Waring, R.J. Ivnik, E.G. Tangalos, y Emre Kokmen. 1999. «Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome». *Archives of neurology* 56 (3): 303-8. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1212/01.CON.0000429175.29601.97>.
- Pochwat, B., G. Nowak, y B. Szewczyk. 2015. «Relationship between Zinc (Zn^{2+}) and Glutamate Receptors in the Processes Underlying Neurodegeneration». *Neural Plasticity* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/591563>.
- Popugaeva, E. E. Pchitskaya, y I. Bezprozvanny. 2017. «Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer's disease – A therapeutic opportunity?» *Biochemical and Biophysical Research Communications* 483 (4): 998-1004. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.053>.
- Praticò, D., C.M. Clark, F. Liun, V.Y.M. Lee, y J.Q. Trojanowski. 2002. «Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: A possible predictor of Alzheimer disease». *Archives of Neurology* 59 (6): 972-76. <https://doi.org/10.1001/archneur.59.6.972>.
- Qin, Y., y Z. Yuan-Zhong. 2018. «High level of Mn in brain is a risk for Alzheimer disease». *Acta Physiologica Sinica*, 70 (2): 193-200. <https://doi.org/10.13294/j.aps.2018.0024>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

146 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Referencias 147

- Ramakers, G.M.J., K. Heinen, W.H. Gispen, y P.N.E. De Graan. 2000. «Long term depression in the CA1 field is associated with a transient decrease in pre- and postsynaptic PKC substrate phosphorylation». *Journal of Biological Chemistry* 275 (37): 28682-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003068200>.
- Ramírez, C.M., M. González, M. Díaz, R. Alonso, I. Ferrer, G. Santpere, et al. 2009. «Molecular and Cellular Neuroscience VDAC and ERα interaction in caveolae from human cortex is altered in Alzheimer's disease». *Molecular and Cellular Neuroscience* 42 (3): 172-83. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.07.001>.
- Rauk, A. 2009. «The chemistry of Alzheimer's disease». *Chemical Society Reviews* 38 (9): 2698-2715. <https://doi.org/10.1039/b807980n>.
- Raza, H. 2011. «Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria : implications in oxidative stress, toxicity and disease» 278: 4243-51. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08358.x>.
- Reddy, P.H., G. Mani, B.S. Park, J. Jacques, G. Murdoch, W. Whetsell, et al. 2005. «Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: Implications for synaptic dysfunction». *Journal of Alzheimer's Disease* 7 (2): 103-17. <https://doi.org/10.3233/JAD-2005-7203>.
- Reeg, S., y T. Grune. 2014. «Protein Oxidation in Aging: Does It Play a Role in Aging Progression?» *Antioxidants & Redox Signaling* 23 (3): 239-55. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6062>.
- Reitz, C., y R. Mayeux. 2014. «Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers». *Biochemical Pharmacology* 88 (4): 640-51. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>.
- Religa, D., D. Strozyk, R.A. Cherny, I. Volitakis, V. Haroutunian, B. Winblad, et al. 2006. «Elevated cortical zinc in Alzheimer disease». *Neurology* 67 (1): 69-75. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000223644.08653.b5>.
- Rembach, A., D.J. Hare, M.Lind, C.J. Fowler, R.A. Cherny, C. McLean, et al. 2013. «Decreased Copper in Alzheimer's Disease Brain Is Predominantly in the Soluble Extractable Fraction». *International Journal of Alzheimer's Disease* 1(3): 1-7. <https://doi.org/10.1155/2013/623241>.
- Ribeiro, F., A. De Mendonça, y M. Guerreiro. 2006. «Mild cognitive impairment: Deficits in cognitive domains other than memory». *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 21 (5-6): 284-90. <https://doi.org/10.1159/000091435>.
- Riemenschneider, M., S. Wagenpfeil, J. Diehl, N. Lautenschlager, T. Theml, B. Heldmann, et al. 2002. «Tau and Aβ42 protein in CSF of patients with frontotemporal degeneration». *Neurology* 58 (11): 1622-28. <https://doi.org/10.1212/WNL.58.11.1622>.
- Ringman, J.M., G. Coppola, D. Elashoff, Y. Rodriguez-Agudelo, L.D. Medina, K. Gyllys, et al. 2012. «Cerebrospinal fluid biomarkers and proximity to diagnosis in preclinical familial Alzheimer's disease». *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 33 (1): 1-5. <https://doi.org/10.1159/000335729>.
- Rogers, J., J. Lubner-Narod, D.S. Scot, y C.W Harold. 1988. «Expression of Immune System-Associated Antigens by Cells of the Human Central Nervous System: Relationship to the Pathology of Alzheimer's Disease». *Neurobiology of Aging* 9: 115-20.
- Rosen, W.G., R.C. Mohs, y K.L. Davis. 1984. «A new rating scale for Alzheimer's disease». *American Journal of Psychiatry* 141: 1356-64. <https://doi.org/10.1176/ajp.141.11.1356>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

147 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Referencias 148

- Sakamoto, T., H. Saito, K. Ishii, H. Takahashi, S. Tanabe, y Y. Ogasawara. 2006. «Aluminum inhibits proteolytic degradation of amyloid β peptide by cathepsin D: A potential link between aluminum accumulation and neuritic plaque deposition». *FEBS Letters* 580 (28-29): 6543-49. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.075>.
- Sato, T., D.M. Xiao, H. Li, F.L. Huang, y K.P. Huang. 1995. «Structure and regulation of the gene encoding the neuron-specific protein kinase C substrate neurogranin (RC3 protein)». *Journal of Biological Chemistry*. 13-17 <https://doi.org/10.1074/jbc.270.17.10314>.
- Scheff, S.W., D.A. Price, F.A. Schmitt, S.T. Dekosky, y E.J. Mufson. 2007. «Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment». *Neurology* 68 (18): 1501-8. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000260698.46517.8f>.
- Scheff, S.W., M.A. Ansari, y E.J. Mufson. 2016. «Oxidative stress and hippocampal synaptic protein levels in elderly cognitively intact individuals with Alzheimer's disease pathology». *Neurobiology of Aging* 42: 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.030>.
- Schoonenboom, N.S., C. Mulder, G. J. Van Kamp, S.P. Mehta, P. Scheltens, M.A. Blankenstein, et al. 2005. «Amyloid β 38, 40, and 42 species in cerebrospinal fluid: More of the same?». *Annals of Neurology* 58 (1): 139-42. <https://doi.org/10.1002/ana.20508>.
- Scott, C.W., A. Fieles, L.A. Sygowski, y C.B. Caputo. 1993. «Aggregation of tau protein by aluminum». *Brain Research* 628 (1-2): 77-84. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90940-O](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90940-O).
- Selkoe, D.J. 2001. «Alzheimer's Disease : Genes , Proteins , and Therapy». *Physiological reviews* 81 (2): 741-67. <https://doi.org/10.1186/s13195-018-0373-z>.
- Seubert, P., C.Vigo-Pelfrey, F. Esch, M. Lee, H. Dovey, D. Davis, et al. 1992. «Insolation and quantification of soluble Alzheimer's b-peptide from biological fluids.» *Nature* 359: 710-13.
- Sheikh-Bahaei, N., S.A. Sajjadi, R. Manavaki, y J.H. Gillard. 2017. «Imaging Biomarkers in Alzheimer's Disease: A Practical Guide for Clinicians». *Journal of Alzheimer's Disease Reports* 1 (1): 71-88. <https://doi.org/10.3233/adr-170013>.
- Singh, A., R. Kukreti, L. Saso, y S. Kukreti. 2019. «Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases». *Molecules* 24 (8): 1-20. <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>.
- Sjögren, M.B., G.M. Van Engelen, K.J.B Lamers, F.J.M. Gabreels, R.A. Wevers, W.J. Van Geel, et al. 2001. «Tau and Abeta42 in Cerebrospinal Fluid from Healthy Adults 21-93 Years of Age: Establishment of Reference Values». *Clinical Chemistry* 47 (10): 1776-81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1375875>.
- Slot, R.E.R., S.A.M. Sikkas, J. Berkhof, H. Brodaty, R. Buckley, E. Cavedo, et al. 2019. «Subjective cognitive decline and rates of incident Alzheimer's disease and non-Alzheimer's disease dementia». *Alzheimer's and Dementia* 15 (3): 465-76. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.10.003>.
- Smith, D.G., R. Cappai, y K.J. Barnham. 2007. «The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid β peptide» *Redox* 1768: 1976-90. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2007.02.002>.
- Smith, M.A., L. Peggy, R. Harrys, L.M. Sayre, J.S. Beckman, y G. Perry. 1997. «Widespread Peroxynitrite-Mediated Damage in Alzheimer's Disease». *The Journal of Neuroscience* 17 (8): 2653-57. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-08-02653.1997>.
- Spires-Jones, T.L., W.H. Stoothoff, A. de Calignon, P.B. Jones, y B.T. Hyman. 2009. «Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue». *Trends in Neurosciences* 32 (3): 150-59. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.11.007>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

148 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Referencias 149

- Srivastava, R.A., y J.C. Jain. 2002. «Scavenger receptor class B type I expression and elemental analysis in cerebellum and parietal cortex regions of the Alzheimer's disease brain». *Journal of the Neurological Sciences* 196: 45-52.
- Strozyk, D., K. Blennow, L.R. White, y L.J. Launer. 2003. «CSF A β 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study». *Neurology* 60 (4): 652-56. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000046581.81650.D0>.
- Stutzmann, G.E. 2007. «The pathogenesis of Alzheimers disease - Is it a lifelong "calciumopathy"?» *Neuroscientist* 13 (5): 546-59. <https://doi.org/10.1177/1073858407299730>.
- Sultana, R., D. Boyd-Kimball, H. Fai Poon, J. Cai, W.M. Pierce, J.B. Klein, et al. 2006. «Redox proteomics identification of oxidized proteins in Alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: An approach to understand pathological and biochemical alterations in AD». *Neurobiology of Aging* 27 (11): 1564-76. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.021>.
- Sunderland, T., K.T. Putnam, D.L. Friedman, L.H. Kimmel, J. Bergeson, G.J. Manetti, et al. 2003. «Decreased β -Amyloid₍₁₋₄₂₎ and Increased Tau Levels in Cerebrospinal Fluid of Patients With Alzheimer Disease». *Psychiatry: Interpersonal and Biological Processes* 289 (16): 2094-2103.
- Supnet, C., y I. Bezprozvanny. 2010. «The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease». *Cell Calcium* 47 (2): 183-89. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.12.014>.
- Tapiola, T., I. Alafuzoff, S.K. Herukka, L. Parkkinen, P. Hartikainen, H. Soininen, et al. 2009. «Cerebrospinal fluid [beta]-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain.» *Archives of neurology* 66 (3): 382-89. <https://doi.org/10.1177/153331750201700211>.
- Teunissen, C.E., A. Petzold, J.L. Bennett, F.S. Berven, L. Brundin, M. Comabella, et al. 2009. «A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking». *Neurology* 73 (22): 1914-22. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c47cc2>.
- Tomljenovic, L. 2011. «Aluminum and Alzheimer's disease: After a century of controversy, is there a plausible link?» *Journal of Alzheimer's Disease* 23 (4): 567-98. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101494>.
- Tönnies, E., y E. Trushina. 2016. «Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease». *Journal of Alzheimer's Disease* 57 (4): 1005-1121. <https://doi.org/10.3233/JAD-161088>.
- Torrealba, E., P. Garcia-Morales, J.C. Cejudo, M. Diaz, F. Rodriguez-Esparragon, O. Fabre, Fatima Mesa-Herrera, et al. 2019. «In-Out-Test: A New Paradigm for Sorting the Wheat from the Chaff in Prodromal Alzheimer's Disease». *Journal of Alzheimer's Disease* 67 (1): 265-77. <https://doi.org/10.3233/JAD-171007>.
- Töugu, V., A. Karafin, y P. Palumaa. 2008. «Binding of zinc(II) and copper(II) to the full-length Alzheimer's amyloid- β peptide». *Journal of Neurochemistry* 104 (5): 1249-59. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05061.x>.
- Trojsi, F., F. Christidi, R. Migliaccio, H. Santamaría-García, y G. Santangelo. 2018. «Behavioural and Cognitive Changes in Neurodegenerative Diseases and Brain Injury». *Behavioural neurology*, 1-3. <https://doi.org/10.1155/2018/4935915>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

149 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Vetrivel, K.S., X. Meckler, Y. Chen, P.D. Nguyen, G. Nabil, R. Vassar, et al. 2009. «Alzheimer Disease A β -Production in the Absence of S -Palmitoylation-dependent Targeting of BACE1 to Lipid Rafts». *Journal of Biological Chemistry* 268: 3793-3803. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808920200>.

Wallin, C., Y.S. Kulkarni, A. Abelein, J. Jarvet, Q. Liao, B. Strodel, et al. 2016. «Characterization of Mn(II) ion binding to the amyloid- β peptide in Alzheimer's disease». *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 38 (1): 183-93. <https://doi.org/10.1016/j.jtmb.2016.03.009>.

Wang, T., L. Qin, B. Liu, Y. Liu, B. Wilson, T. E. Eling, et al. 2004. «Role of reactive oxygen species in LPS-induced production of prostaglandin E₂ in microglia». *Journal of Neurochemistry* 88 (4): 939-47. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02242.x>.

Weller, J., y A. Budson. 2018. «Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment». *F1000Research* 7 (0): 1-9. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14506.1>.

Wheelock, C.E., K.J. Eder, I. Werner, H. Huang, P.D. Jones, B.F. Brammell, et al. 2005. «Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos». *Aquatic Toxicology* 74 (2): 172-92. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.05.009>.

Wojsiat, J., K.M. Zoltowska, K. Laskowska-Kaszub, y U. Wojda. 2018. «Oxidant/Antioxidant Imbalance in Alzheimer's Disease: Therapeutic and Diagnostic Prospects». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 201-208. <https://doi.org/10.1155/2018/6435861>.

Yakugaku Z. 2004. «Essential Trace Metals and Brain Function». *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 124 (9): 577-85.

Yamamoto, A., R. Woon Shin, K. Hasegawa, H. Naiki, H. Sato, F. Yoshimasu, et al. 2002. «Iron (III) induces aggregation of hyperphosphorylated τ and its reduction to iron (II) reverses the aggregation: Implications in the formation of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease». *Journal of Neurochemistry* 82 (5): 1137-47. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01061.x>.

Yamamoto, H., Y. Saitoh, S. Yasugawa, y E. Miyamoto. 1990. «Dephosphorylation of τ Factor by Protein Phosphatase 2A in Synaptosomal Cytosol Fractions, and Inhibition by Aluminum». *Journal of Neurochemistry* 55 (2): 683-90. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb04187.x>.

Yokel, R.A. 2006. «Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration». *Journal of Alzheimer's Disease* 10 (2-3): 223-53. <https://doi.org/10.3233/JAD-2006-102-309>.

Yu, J., M. Sun, Z. Chen, J. Lu, Y. Liu, L. Zhou, et al. 2010. «Magnesium modulates amyloid- β protein precursor trafficking and processing». *Journal of Alzheimer's Disease* 20 (4): 1091-1106. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091444>.

Yusufov, M., L.L. Weyandt, y I. Piryatinsky. 2016. «Alzheimer's Disease and Diet: A Systematic Review». *International Journal of Neuroscience*, 1-12. <https://doi.org/10.3109/00207454.2016.1155572>.

Zhang, L.H., X. Wang, M. Stoltenberg, G. Danscher, L. Huang, y Z.Y. Wang. 2008. «Abundant expression of zinc transporters in the amyloid plaques of Alzheimer's disease brain». *Brain Research Bulletin* 77 (1): 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.03.014>.

Zhang, Q., F. Zhang, Y. Ni, y S. Kokot. 2019. «Effects of aluminum on amyloid-beta aggregation in the context of Alzheimer's disease». *Arabian Journal of Chemistry* 12 (8): 2897-2904. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.06.019>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

150 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Referencias 151

Zhang, Z., M. Miah, M. Culbreth, y M. Aschner. 2016. «Autophagy in neurodegenerative diseases and metal neurotoxicity». *Neurochemical Research* 41 (1-2): 409-22. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1844-x>.

Zhao, Y., B. Zhao, Y. Zhao, y B. Zhao. 2013. «Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease». *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013: 316523. <https://doi.org/10.1155/2013/316523>.

Zheng, W., y A.D. Monnot. 2012. «Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: Implication in neurodegenerative diseases». *Pharmacology and Therapeutics* 133 (2): 177-88. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.10.006>.

Zhou, Z.D., C. Chan, Q. Hong Ma, X. Hong Xu, Z. Xiao, et al. 2011. «The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis, implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer Disease (AD)». *Cell Adhesion and Migration* 5 (4): 280-92. <https://doi.org/10.4161/cam.5.4.16986>.

Zuliani, G., M. Ranzini, G. Guerra, L. Rossi, M.R. Munari, A. Zurlo, et al. 2007. «Plasma cytokines profile in older subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia». *Journal of Psychiatric Research* 41: 686-93. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2006.02.008>.

Zürbig, P., y H. Jahn. 2012. «Use of proteomic methods in the analysis of human body fluids in Alzheimer research». *Electrophoresis* 33 (24): 3617-30. <https://doi.org/10.1002/elps.201200360>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

151 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

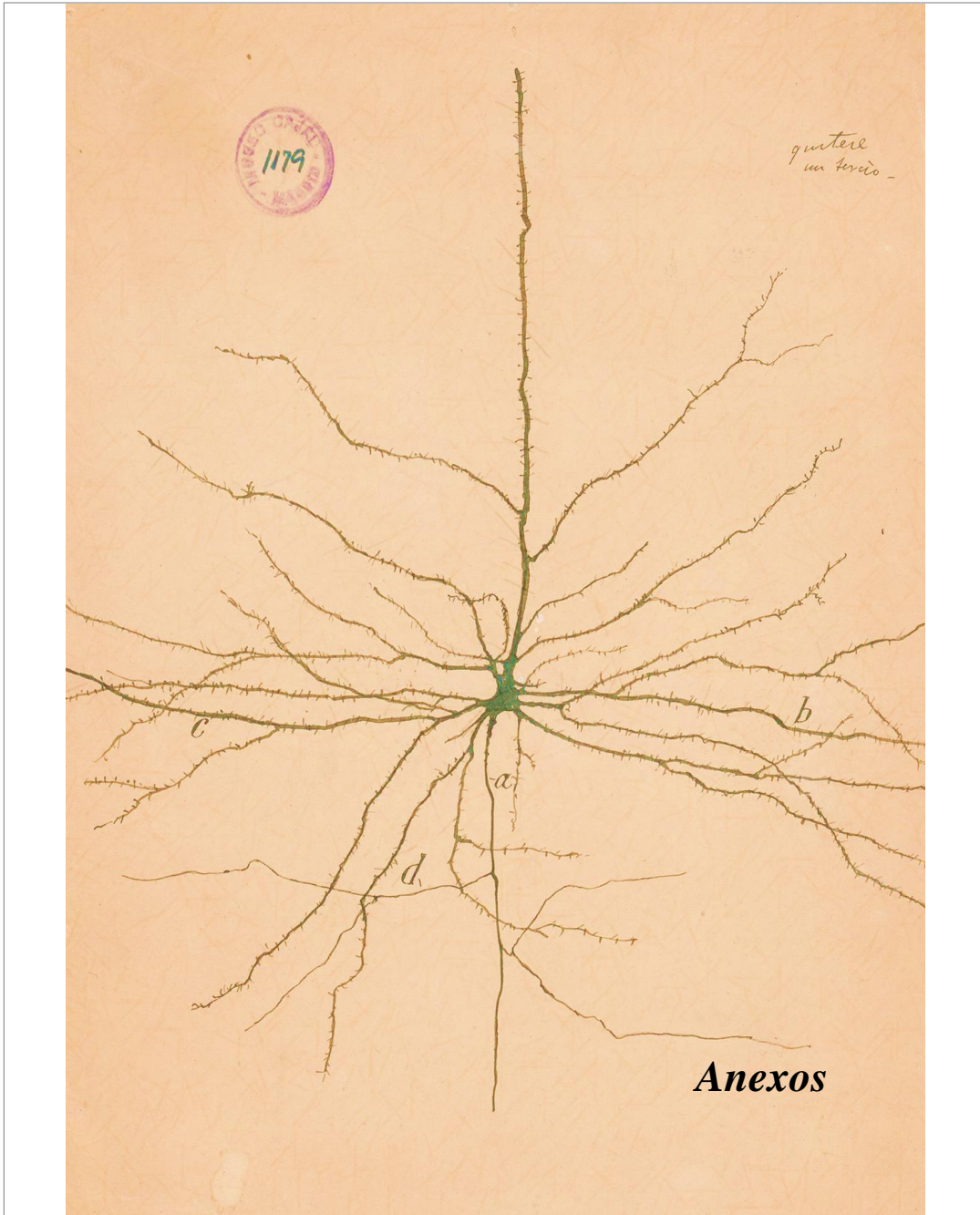
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

152 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

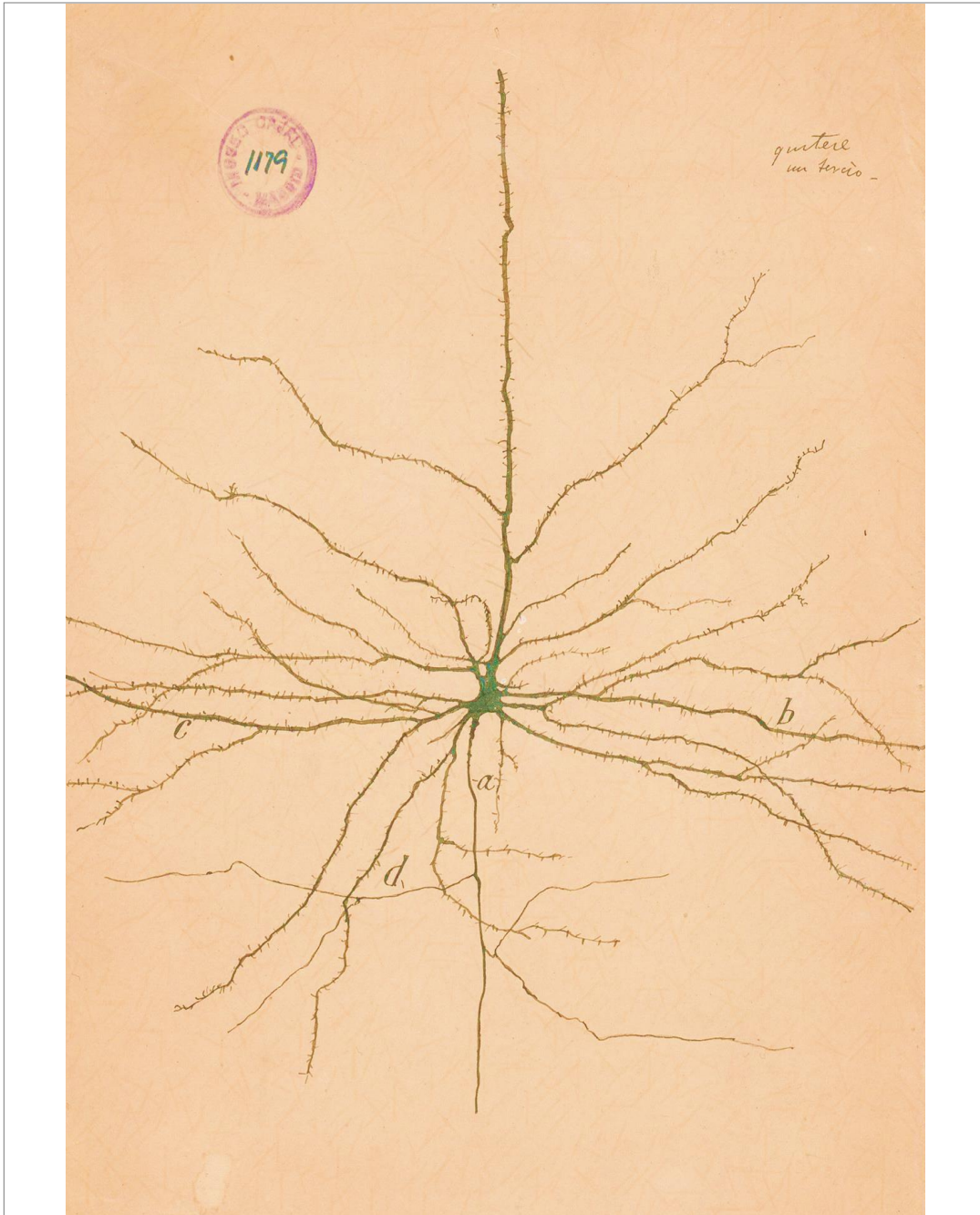
153 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

153 / 179



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

154 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

154 / 179

7. ANEXOS

Anexo I: criterios diagnósticos para la Enfermedad de Alzheimer.

a) Criterios diagnósticos según el Manual diagnóstico y estadístico de las enfermedades mentales.

En la última edición del DSM-V se introduce el concepto de 'trastorno neurocognitivo', que ocupa el lugar de los 'trastornos mentales orgánicos' de ediciones anteriores. Según el DMS-V se recogen los siguientes subtipos de trastornos neurocognitivos:

- ❖ Trastorno neurocognitivo debido a enfermedad de Alzheimer
- ❖ Trastorno neurocognitivo vascular
- ❖ Trastorno neurocognitivo frontotemporal
- ❖ Trastorno neurocognitivo debido a traumatismo craneoencefálico
- ❖ Trastorno neurocognitivo debido a demencia por cuerpos de Lewy
- ❖ Trastorno neurocognitivo debido a enfermedad de Parkinson
- ❖ Trastorno neurocognitivo debido a infección por el virus de inmunodeficiencia humana
- ❖ Trastorno neurocognitivo inducido por sustancias
- ❖ Trastorno neurocognitivo debido a enfermedad de Huntington
- ❖ Trastorno neurocognitivo debido a enfermedad priónica
- ❖ Trastorno neurocognitivo debido a otra condición médica
- ❖ Trastorno neurocognitivo no clasificado en otro lugar

Los criterios diagnósticos propuestos en el DSM-V para *trastorno neurocognitivo menor* son los siguientes:

A. Evidencia de un declive cognitivo modesto desde un nivel previo de mayor desempeño en uno o más de uno de los dominios cognitivos referidos:

1. Preocupación del individuo, de un tercero informado o del facultativo con respecto a un declive modesto en las funciones cognitivas
2. Declive en el desempeño neuropsicológico, implicando un desempeño en los tests del rango de una a dos desviaciones estándares por debajo de lo esperado en la evaluación neuropsicológica reglada o ante una evaluación clínica equivalente

B. Los déficits cognitivos son insuficientes para interferir con la independencia (p. ej., actividades instrumentales de la vida diaria, tareas complejas como manejo de medicación o de dinero), pudiendo ser preciso esforzarse más, utilizar estrategias compensatorias o hacer una acomodación para mantener la independencia

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 28/09/2020 13:12:33

Mario Lorenzo Díaz González
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/09/2020 15:01:49

Raquel Marín Cruzado
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/09/2020 15:28:51

155 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Anexos 156

C. Los déficits cognitivos no ocurren exclusivamente en el contexto de un delirium.
Los déficits cognitivos no son atribuibles de forma primaria a la presencia de otros trastornos mentales (p. ej., trastorno depresivo mayor, esquizofrenia).

Para el caso de los *trastorno neurocognitivo mayor*, se establecen los siguientes criterios

A. Evidencia de un declive cognitivo sustancial desde un nivel previo de mayor desempeño en uno o más de los dominios cognitivos referidos:

1. Preocupación del individuo, de un tercero informado o del facultativo con respecto a un declive sustancial en las funciones cognitivas
2. Declive en el desempeño neuropsicológico, implicando un desempeño en los tests del rango de dos o más desviaciones estándares por debajo de lo esperado en la evaluación neuropsicológica reglada o ante una evaluación clínica equivalente

B. Los déficits cognitivos son suficientes para interferir con la independencia (p. ej., requieren asistencia para las actividades instrumentales de la vida diaria, tareas complejas como manejo de medicación o dinero)

C. Los déficits cognitivos no ocurren exclusivamente en el contexto de un delirium

D. Los déficits cognitivos no son atribuibles de forma primaria a la presencia de otros trastornos mentales (p. ej., trastorno depresivo mayor, esquizofrenia).

b) Diagnóstico basado en el criterio del Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Comunicativos y Accidente Cerebrovascular y la Asociación de la Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados

I. Criterios para el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer probable

Para diagnosticar EA probable, el paciente debe cumplir las siguientes características:

1. Presentar un cuadro de demencia establecido mediante examen clínico y además éste se debe caracterizar por:

- A. Un comienzo insidioso. Los síntomas se manifiestan gradualmente a lo largo de meses o años, y no de forma repentina durante horas o días;
- B. Historial claro de empeoramiento de las funciones cognitivas
- C. Los déficits cognitivos iniciales son evidentes y se pueden clasificar en una de las siguientes categorías:

- Presentación amnésica: es la forma más común de la demencia de EA.
Los déficits deben incluir: deterioro en el aprendizaje y del recuerdo

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

156 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

156 / 179

Anexos 157

de la información aprendida recientemente. También debe haber evidencia de disfunción cognitiva en al menos otro dominio cognitivo.

- Presentaciones no amnésicas, puede caracterizarse por:
 - ✚ Presentación de problemas con el idioma: Los déficits más prominentes están en la búsqueda de palabras, además de presentar déficits en otros dominios cognitivos.
 - ✚ Presentación de problemas visuales-espaciales: Los déficits en la cognición espacial, incluyendo la agnosia, reconocimiento facial deficiente, simultanagnosia y alexia. Los déficits en otros dominios cognitivos deben estar presentes.
 - ✚ Disfunción ejecutiva: Los déficits más prominentes son el deterioro del razonamiento, el juicio y la resolución de problemas.

D. El diagnóstico de una probable demencia por EA no debe aplicarse cuando hay evidencia de:

- enfermedad cerebrovascular concomitante sustancial, definida por un antecedente de accidente cerebrovascular relacionado temporalmente con el inicio o empeoramiento del deterioro cognitivo; o la presencia de infartos múltiples o extensos o carga de hipertensión severa de la materia blanca;
- características principales de la demencia con cuerpos de Lewy que no sean la demencia en sí;
- características destacadas de la variante conductual de la demencia frontotemporal; o características destacadas de la variante semántica de la afasia progresiva primaria o de la variante no fluida/agramática de la afasia progresiva primaria;
- evidencia de otra enfermedad neurológica activa concurrente, o de una enfermedad médica no neurológica. comorbilidad o uso de medicamentos que podrían tener un efecto sustancial en la cognición.

2. EA probable con mayor nivel de certeza se corresponde con aquella que cumple las siguientes características:

A. Demencia de EA probable con deterioro documentado

Corresponden con aquellos pacientes que presentan demencia y además presentan un proceso de deterioro cognitivo documentado. En este sentido, la EA probable con

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

157 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

deterioro documentado se define de la siguiente manera: evidencia de deterioro cognitivo progresivo en evaluaciones posteriores basadas en información del paciente o familiares y pruebas cognitivas en el contexto de una evaluación neuropsicológica formal o de exámenes estandarizados del estado mental.

B. Probable demencia de EA en un portador de una mutación genética causal de EA

Corresponde con aquellos pacientes que presentan demencia y además presentan mutaciones en los genes que codifican para APP, PSEN1 o PSEN2.

II. Criterios para para el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer posible

Este diagnóstico se basa en el cumplimiento de las siguientes circunstancias:

1. Curso atípico

El curso atípico cumple con los criterios clínicos básicos en cuanto a la naturaleza de los déficits cognitivos para la demencia de la EA, pero o bien tiene un inicio repentino de deterioro cognitivo o demuestra insuficiente detalle histórico o documentación cognitiva objetiva del deterioro progresivo.

2. Presentación mixta desde el punto de vista etiológico

La presentación heterogénea desde el punto de vista etiológico cumple todos los criterios clínicos básicos para la demencia de la EA, pero tiene pruebas de (a) enfermedad cerebrovascular concomitante, definida por un historial de accidente cerebrovascular relacionado temporalmente con el inicio o empeoramiento del deterioro cognitivo (b) características de demencia con cuerpos de Lewy distintos de la demencia en sí o (c) pruebas de otra enfermedad neurológica o de una comorbilidad médica no neurológica. La EA posible con mayor nivel de certeza se corresponde con aquella que cumple las siguientes características:

- ❖ Corresponden a aquellas personas que cumplen con los criterios clínicos básicos para el diagnóstico de EA probable y además se presenta positividad para los biomarcadores establecidos. Los resultados de las pruebas con biomarcadores pueden clasificarse en tres categorías: claramente positivo, claramente negativo e indeterminado.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

158 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

c) Otros criterios: criterio de Dubois y colaboradores.

A continuación se recogen en detalle los criterios descritos para EA por Dubois y colaboradores (Dubois et al. 2014). Su diagnóstico se caracteriza porque un enfermo con EA debe cumplir el criterio principal y al menos una de las características adicionales.

Criterio principal	Presencia un trastorno de memoria episódica inicial y significativo que incluya las siguientes características: <ul style="list-style-type: none"> - Pérdida de memoria progresiva y gradual durante al menos seis meses comunicada por el paciente o un informador fiable - Objetivar mediante tests neuropsicológicos la pérdida de memoria episódica. Normalmente consiste en recoger fallos de reconocimiento que no mejoran o no se normalizan con claves 3.El defecto de memoria episódica puede ser aislado o asociarse a otras alteraciones cognitivas Características adicionales
Características adicionales	Presencia de atrofia en el lóbulo temporal medial: <ul style="list-style-type: none"> - Pérdida de volumen del hipocampo, la amígdala y la corteza entorrinal, evidenciada por resonancia magnética utilizando medidas visuales directas o por técnicas de volumetría Alteraciones de biomarcadores en líquido cefalorraquídeo: <ul style="list-style-type: none"> - Disminución de Aβ42 o aumento de la concentración de tau total o tau fosforilada, o combinaciones de ellos Otros posibles marcadores futuros Alteraciones características de neuroimagen funcional con tomografía por emisión de positrones: <ul style="list-style-type: none"> - Hipometabolismo de glucosa bilateral en regiones temporales y parietales Otras alteraciones con radioligandos que sean validadas tal y como se prevé con el compuesto B de Pittsburgh (PIB) o el FDDNP

Los criterios de exclusión para este grupo incluyen la rapidez de instauración del cuadro, la presencia de enfermedades psiquiátricas o de condiciones médicas o farmacológicas que puedan justificar la clínica, así como la existencia de datos que sugieran otro origen neurodegenerativo. Así mismo, los criterios de exclusión de EA se basan en tres criterios:

- Por datos de historial clínico
 - Inicio súbito
 - Presencia temprana de alguna de la siguiente sintomatología: trastornos de la marcha, crisis convulsivas o alteraciones conductuales.
- Por datos de exploración
 - Datos de focalidad en la exploración neurológica

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sZ
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Anexos 160

- Signos extrapiramidales precoces
- Otras enfermedades médicas que presenten intensidad suficiente como para justificar la pérdida de memoria
 - Demencia no Alzheimer
 - Depresión mayor
 - Enfermedad cerebrovascular
 - Enfermedades toxicometabólicas
 - Anomalías en la neuroimagen (T2W o FLAIR) del lóbulo temporal consistentes con enfermedad vascular o infecciosa

Según este grupo, el diagnóstico de EA es definitivo cuando aparecen conjuntamente evidencia clínica y anatomopatológica (biopsia o necropsia) de la enfermedad según criterios NIA-Reagan para el diagnóstico post mortem, o bien cuando a la evidencia clínica se suma evidencia genética (mutaciones en cromosomas 1, 14 o 21) de EA.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

160 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

160 / 179

Anexo II: genes implicados en la patología de Alzheimer.

Gen	Posibles vías / procesos biológicos patológicos
APP	
PSEN1	Regulación del procesamiento de APP (cascada amiloide); división de APP, el receptor Notch, y otras proteínas transmembrana
PSEN2	Regulación del procesamiento de APP (cascada amiloide); división de APP, el receptor Notch, y otras proteínas transmembrana
APOE	Metabolismo del colesterol/lípidos
TREM 1	Respuesta inmunitaria; inflamación crónica; Regulación del procesamiento de APP (cascada amiloide)
TREM2	Respuesta inmunitaria; inflamación crónica; Regulación del procesamiento de APP (cascada amiloide);
CLU	Sistemas inmunes y del complemento/respuesta inflamatoria; metabolismo del colesterol/lípidos
PICALM	Endocitosis mediada por clatrina
CRI	Sistemas inmunológicos y de complemento/respuesta inflamatoria
BIN1	Endocitosis de vesículas sinápticas
MS4A64	Sistemas inmunológicos y de complemento/respuesta inflamatoria
MS4A4E	Sistemas inmunológicos y de complemento/respuesta inflamatoria
CD33	Sistemas inmunológicos y de complemento/respuesta inflamatoria
ABCA7	Metabolismo de colesterol/lípidos; Sistemas inmunes y del complemento/inflamatorio
CS2AP	Endocitosis del receptor y citoquinas
EPHA1	Sistemas inmunológicos y de complemento/respuesta inflamatoria
HLA-DRB5	Respuesta inmunitaria e inflamación
SORL1	Endocitosis y clasificación de la carga (tráfico y metabolismo de APP), transporte de lípidos
PTK2B	Función sináptica del hipocampo; migración celular
CELF1	Función citoesquelética y transporte axonal
FERMT2	Patología de la Tau; función citoesquelética y transporte axonal
CASS4	APP y patología de la Tau; función citoesquelética y transporte axonal
INPP5D	Respuesta inmunitaria e inflamación; Metabolismo APP
MEF2C	Respuesta inmunitaria e inflamación; Función sináptica del hipocampo
NME8	Función citoesquelética y transporte axonal

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Anexo III: metaloenzimas y funciones de los metales en el cerebro.

Actividad	Metal/es	Enzima
Neurotransmisión		
Síntesis de dopamina	Hierro	Tirosina hidroxilasa
Síntesis de norepinefrina	Cobre	Dopamina β hidroxilasa
Neuromodulación de la sinapsis excitatoria (regulación negativa de la respuesta del glutamato)	Zinc	N/A Zn ²⁺ vesicular
Defensa antioxidante		
Dismutación del O ₂ ⁻ to H ₂ O ₂	Cobre	Cu-SOD
Dismutación del O ₂ ⁻ to H ₂ O ₂	Manganeso	Mn-SOD
Reducción del H ₂ O ₂	Selenio	Glutatión peroxidasa
Reducción del H ₂ O ₂	Hierro	Catalasa
Protección del ADN _m del daño por EROS	Hierro	Aconitasa
Metabolismo del hierro		
Registro del estado del hierro celular y regulación traslacional de la expresión de las proteínas del metabolismo del hierro	Hierro	IRP1/aconitasa
Oxidación del ion ferroso	Cobre	Ceruloplasmina y hefaestina
Síntesis del grupo hemo		
Conversión de δ ALA a porfobilinógeno	Zinc	δ ALA deshidratasa
Inserción de hierro ferroso en la protoporfirina IX con formación de hemo	Hierro	Ferroquelatasa
Glicolisis		
Conversión de glucosa a piruvato, NADH and ATP	Potasio y magnesio	Quinasas dependientes de Mg ²⁺
Síntesis de acetyl-CoA		
Activación del complejo piruvato deshidrogenasa	Calcio	Piruvato deshidrogenasa fosfatasa (activada por Ca ²⁺)
Ciclo del ácido cítrico		
Isomerización del citrato a isocitrato	Hierro	Aconitasa
Isomerización del citrato al isocitrato	Hierro	Aconitasa
Deshidrogenación de succinato a fumarato	Hierro	Succinato deshidrogenasa
Descarboxilación de isocitrato a α-cetoglutarato	Calcio	Isocitrato deshidrogenasa (activada por Ca ²⁺)

*La tabla continúa en página siguiente.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Transporte electrónico		
Transporte de e ⁻ al CoQ	Hierro	Complejo I y Complejo II
Transporte de e ⁻ desde CoQ al citocromo c	Hierro	Complejo III
Transporte de e ⁻ al complejo IV	Grupo hemo (hierro)	Citocromo c
Otros procesos		
Síntesis de colesterol	Hierro	HMG-CoA reductasa
Síntesis de óxido nítrico	Hierro	NO sintasa
Síntesis de desoxirribonucleótidos	Hierro	Ribonucleótido reductasa
Transporte de oxígeno	Hierro	Hemoglobina
Unión del ADN	Zinc	NFκβ, Sp1, PARP
Formación de la mielina	Zinc	MBP, MAG
Iniciación y propagación de la sinapsis	Sodio, potasio, calcio	N/A
Potencialización a largo plazo (comunicación sináptica)	Magnesio, calcio, zinc	N/A
Segundos mensajeros	Calcio	N/A
Apoptosis	Calcio, zinc	N/A

N/A no aplicable; O₂⁻ anión superóxido; H₂O₂ peróxido de hidrogeno; SOD superóxido dismutasa; IRP proteína reguladora del hierro; ALA ácido aminolevulánico; NADPH Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NADH Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido); ATP adenosina trifosfato; CoA coenzima A; CoQ coenzima Q; NO óxido nítrico; NFκβ factor nuclear κβ; Sp1 proteína de especificidad 1; PARP poli (adenosina difosfato-ribosa) polimerasa; MBP proteína básica de la mielina; MAG glicoproteína asociada a la mielina

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

Anexo IV: matrices de correlaciones para los marcadores clásicos y los test neurocognitivos.

a) Matriz de correlación para el grupo control.

		MMSE	In out test	βA	tau-t	tau-f
MMSE	r	1	0,845**	0,441	0,002	0,000
	p-valor		0,002	0,202	0,996	1,000
In-out test	r	0,845**	1	0,566	-0,413	-0,408
	p-valor	0,002		0,088	0,235	0,242
βA	r	0,441	0,566	1	0,059	0,068
	p-valor	0,202	0,088		0,872	0,852
tau-t	r	0,002	-0,413	0,059	1	0,994**
	p-valor	0,996	0,235	0,872		0,000
tau-f	r	0,000	-0,408	0,068	0,994**	1
	p-valor	1,000	0,242	0,852	0,000	

MMSE: Mini mental state examination; βA: péptido β-amiloide

b) Matriz de correlaciones para el grupo queja subjetiva de memoria.

		MMSE	In out test	βA	tau-t	tau-f
MMSE	r	1	0,764*	0,088	0,608	0,748*
	p-valor		0,017	0,821	0,083	0,020
In-out test	r	0,764*	1	0,334	0,177	0,532
	p-valor	0,017		0,380	0,648	0,141
βA	r	0,088	0,334	1	-0,397	-0,212
	p-valor	0,821	0,380		0,290	0,584
tau-t	r	0,608	0,177	-0,397	1	0,770*
	p-valor	0,083	0,648	0,290		0,015
tau-f	r	0,748*	0,532	-0,212	0,770*	1
	p-valor	0,020	0,141	0,584	0,015	

MMSE: Mini mental state examination; βA: péptido β-amiloide

c) Matriz de correlaciones para el grupo deterioro cognitivo leve.

		MMSE	In-out test	βA	tau-t	tau-f
MMSE	r	1	0,214	0,037	-0,136	-0,159
	p-valor		0,352	0,875	0,557	0,492
In-out test	r	0,214	1	0,131	-0,052	0,051
	p-valor	0,352		0,572	0,822	0,827
βA	r	0,037	0,131	1	-0,128	-0,161
	p-valor	0,875	0,572		0,580	0,485
tau-t	r	-0,136	-0,052	-0,128	1	0,959**
	p-valor	0,557	0,822	0,580		0,000
tau-f	r	-0,159	0,051	-0,161	0,959**	1
	p-valor	0,492	0,827	0,485	0,000	

MMSE: Mini mental state examination; βA: péptido β-amiloide

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

d) Matriz de correlaciones para el grupo Enfermedad de Alzheimer

		MMSE	In-out test	β A	tau-t	tau-f
MMSE	r	1	-0,297	-0,036	0,857	0,830
	p-valor		0,628	0,954	0,064	0,082
In-out test	r	-0,297	1	-0,459	-0,395	-0,678
	p-valor	0,628		0,437	0,511	0,209
β A	r	-0,036	-0,459	1	0,252	0,475
	p-valor	0,954	0,437		0,683	0,418
tau-t	r	0,857	-0,395	0,252	1	0,868
	p-valor	0,064	0,511	0,683		0,056
tau-f	r	0,830	-0,678	0,475	0,868	1
	p-valor	0,082	0,209	0,418	0,056	

MMSE: Mini mental state examination; β A: péptido β -amiloide

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33

Mario Lorenzo Díaz González
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49

Raquel Marín Cruzado
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Anexo V: matrices de correlaciones para los cationes divalentes con los metales trazas y los marcadores clásicos.

a) Matriz de correlación para el grupo control.

	Mg	Ca	Cu	Mn	Fe	Zn	Al	Se	βA	tau-t	tau-f
Mg	r	0,782**	0,632*	0,840**	0,560	0,259	0,610	-0,075	-0,413	-0,026	-0,033
	p-valor	1	0,027	0,001	0,117	0,416	0,146	0,827	0,182	0,943	0,927
Ca	r	0,782**	0,590*	0,669*	0,437	0,470	0,715**	-0,172	-0,227	-0,055	-0,079
	p-valor	1	0,034	0,012	0,207	0,105	0,046	0,592	0,457	0,873	0,817
Cu	r	0,632*	0,590*	0,732**	0,392	0,584*	0,691*	-0,248	0,123	0,112	0,286
	p-valor	0,027	0,034	0,003	0,263	0,028	0,039	0,414	0,688	0,743	0,393
Mn	r	0,840**	0,669*	0,732**	0,433	0,393	0,623	-0,049	-0,125	0,202	0,312
	p-valor	0,001	0,012	0,003	0,212	0,164	0,073	0,874	0,684	0,551	0,350
Fe	r	0,560	0,437	0,392	0,433	0,055	-0,182	-0,559	0,386	0,279	0,274
	p-valor	0,117	0,207	0,263	1	0,881	0,730	0,118	0,305	0,504	0,511
Zn	r	0,259	0,470	0,584*	0,393	0,055	0,555	-0,112	-0,190	0,373	0,512
	p-valor	0,416	0,105	0,028	0,164	0,881	0,121	0,715	0,534	0,258	0,107
Al	r	0,610	0,715**	0,691*	0,623	0,555	1	0,288	-0,095	0,387	0,499
	p-valor	0,146	0,046	0,039	0,073	0,121	1	0,490	0,822	0,343	0,208
Se	r	-0,075	-0,172	-0,248	-0,049	-0,112	0,288	1	-0,386	-0,183	-0,158
	p-valor	0,827	0,592	0,414	0,874	0,715	0,490	1	0,193	0,590	0,643
βA	r	-0,413	-0,227	0,123	-0,125	-0,190	-0,095	-0,386	1	0,243	0,182
	p-valor	0,182	0,457	0,688	0,684	0,305	0,822	0,193	1	0,448	0,571
tau-t	r	-0,026	-0,055	0,112	0,202	0,279	0,387	-0,183	0,243	1	0,951**
	p-valor	0,943	0,873	0,743	0,551	0,504	0,343	0,590	0,448	1	0,000
tau-f	r	-0,033	-0,079	0,286	0,312	0,274	0,499	-0,158	0,182	0,951**	1
	p-valor	0,927	0,817	0,393	0,350	0,511	0,208	0,643	0,571	0,000	1

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.

Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 28/09/2020 13:12:33

Mario Lorenzo Díaz González
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/09/2020 15:01:49

Raquel Marín Cruzado
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.

Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

b) Matriz de correlación para el grupo queja subjetiva de memoria.

	Mg	Ca	Cu	Mn	Fe	Zn	Al	Se	βA	tau-t	tau-f
Mg	r p-valor	0,524 0,476	-0,347 0,774	0,500 0,667	0,420 0,580	0,526 0,474	0,999* 0,020	0,312 0,688	-0,319 0,681	-1,000**	0,564 0,436
Ca	r p-valor	1 0,524	0,389 0,518	0,364 0,547	0,377 0,531	0,029 0,963	0,306 0,616	-0,021 0,965	-0,598 0,156	-0,232 0,658	0,127 0,787
Cu	r p-valor	0,389 0,774	1 0,518	0,602 0,206	0,661 0,224	0,763 0,134	-0,465 0,692	0,595 0,213	-0,523 0,287	0,001 0,999	0,361 0,482
Mn	r p-valor	0,500 0,667	0,364 0,547	1 0,206	0,886* 0,045	0,882* 0,048	-0,542 0,458	0,560 0,191	-0,155 0,741	0,114 0,855	0,066 0,888
Fe	r p-valor	0,420 0,580	0,377 0,531	0,886* 0,045	1 0,224	0,861* 0,028	-0,400 0,600	0,476 0,340	-0,387 0,448	0,524 0,476	0,547 0,261
Zn	r p-valor	0,526 0,474	0,029 0,963	0,882* 0,048	0,861* 0,028	1 0,581	-0,419 0,298	0,816* 0,048	-0,513 0,298	0,711 0,289	0,752 0,085
Al	r p-valor	0,999* 0,020	0,306 0,616	-0,465 0,692	-0,400 0,458	-0,419 0,581	1 0,156	0,156 0,767	-0,287 0,581	0,210 0,735	0,444 0,378
Se	r p-valor	0,312 0,688	-0,021 0,965	0,595 0,213	0,560 0,191	0,816* 0,048	0,156 0,767	1 0,040	-0,690* 0,040	0,630 0,129	0,837** 0,005
βA	r p-valor	-0,319 0,681	-0,598 0,287	-0,155 0,741	-0,387 0,448	-0,513 0,298	-0,287 0,581	-0,690* 0,040	1 0,040	-0,420 0,348	-0,765* 0,016
tau-t	r p-valor	-1,000**	-0,232 0,658	0,001 0,999	0,524 0,476	0,711 0,289	0,210 0,735	0,630 0,129	-0,420 0,348	1 0,011	0,871* 0,011
tau-f	r p-valor	0,564 0,436	0,127 0,787	0,066 0,888	0,547 0,261	0,752 0,085	0,444 0,378	0,837** 0,005	-0,765* 0,016	0,871* 0,011	1 0,011

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 28/09/2020 13:12:33

Mario Lorenzo Díaz González
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/09/2020 15:01:49

Raquel Marín Cruzado
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sZ

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

168 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27
--	----------------------------

c) Matriz de correlación para el grupo deterioro cognitivo leve.

	Mg	Ca	Cu	Mn	Fe	Zn	Al	Se	β A	tau-t	tau-f
Mg	r	0.004	-0.093	-0.482*	0.170	-0.185	-0.062	0.198	0.440*	0.062	0.041
	p-valor	0.989	0.713	0.043	0.562	0.493	0.806	0.446	0.046	0.812	0.868
Ca	r	0.004	0.250	-0.021	-0.505*	0.136	0.481	0.026	0.173	-0.166	-0.354
	p-valor	0.989	0.349	0.935	0.046	0.602	0.051	0.920	0.466	0.525	0.137
Cu	r	-0.093	0.250	0.789**	0.201	0.125	0.503*	0.096	-0.005	-0.065	-0.194
	p-valor	0.713	0.349	0.000	0.425	0.590	0.014	0.686	0.983	0.786	0.386
Mn	r	-0.482*	-0.021	0.789**	-0.151	0.147	0.594**	0.190	-0.220	-0.226	-0.278
	p-valor	0.043	0.935	0.000	0.526	0.514	0.002	0.398	0.290	0.325	0.189
Fe	r	0.170	-0.505*	0.201	-0.151	0.053	-0.285	0.162	0.008	-0.057	0.144
	p-valor	0.562	0.046	0.425	0.526	0.824	0.252	0.520	0.972	0.827	0.558
Zn	r	-0.185	0.136	0.125	0.147	0.053	-0.064	-0.038	-0.422*	0.246	0.481*
	p-valor	0.493	0.602	0.590	0.514	0.824	0.782	0.877	0.045	0.295	0.020
Al	r	-0.062	0.481	0.503*	-0.285	-0.064	0.782	0.162	0.251	-0.252	-0.307
	p-valor	0.806	0.051	0.014	0.252	0.782	0.002	0.484	0.236	0.284	0.154
Se	r	0.198	0.026	0.096	0.190	-0.038	0.162	0.002	0.002	-0.029	-0.105
	p-valor	0.446	0.920	0.686	0.398	0.877	0.484	0.992	0.992	0.908	0.649
β A	r	0.440*	0.173	-0.005	-0.220	-0.422*	0.251	0.002	0.002	-0.177	-0.137
	p-valor	0.046	0.466	0.983	0.290	0.045	0.236	0.992	0.992	0.418	0.503
tau-t	r	0.062	-0.166	-0.065	-0.226	0.246	-0.252	-0.029	-0.177	0.968**	0.968**
	p-valor	0.812	0.525	0.786	0.325	0.827	0.284	0.908	0.418	0.000	0.000
tau-f	r	0.041	-0.354	-0.194	-0.278	0.144	-0.307	-0.105	-0.137	0.968**	0.968**
	p-valor	0.868	0.137	0.386	0.189	0.558	0.154	0.649	0.503	0.000	0.000

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.

Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 28/09/2020 13:12:33

Mario Lorenzo Díaz González
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/09/2020 15:01:49

Raquel Marín Cruzado
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.

Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

d) Matriz de correlación para el grupo enfermedad de Alzheimer.

	Mg	Ca	Cu	Mn	Fe	Zn	Al	Se	βA	tau-t	tau-f
r	1	-0,097	0,140	-0,579	0,220	-0,220	-0,191	-0,235	0,211	-0,080	0,086
p-valor		0,731	0,633	0,079	0,600	0,517	0,574	0,486	0,449	0,776	0,760
r	-0,097	1	0,011	-0,100	-0,089	-0,116	-0,457	-0,266	-0,179	0,256	0,274
p-valor	0,731		0,969	0,770	0,821	0,720	0,136	0,404	0,507	0,357	0,324
r	0,140	0,011	1	0,316	0,511	0,257	0,331	0,599*	-0,128	-0,327	-0,020
p-valor	0,633	0,969		0,317	0,131	0,397	0,270	0,030	0,637	0,234	0,945
r	-0,579	-0,100	0,316	1	0,468	0,332	0,514	0,601*	-0,385	-0,350	-0,352
p-valor	0,079	0,770	0,317		0,173	0,292	0,087	0,039	0,217	0,291	0,288
r	0,220	-0,089	0,511	0,468	1	0,403	0,123	0,252	0,246	-0,602	0,248
p-valor	0,600	0,821	0,131	0,173		0,248	0,734	0,483	0,493	0,086	0,521
r	-0,220	-0,116	0,257	0,332	0,403	1	0,233	0,417	0,418	-0,475	-0,132
p-valor	0,517	0,720	0,397	0,292	0,248		0,443	0,157	0,155	0,118	0,683
r	-0,191	-0,457	0,331	0,514	0,123	0,233	1	0,503	-0,426	-0,434	-0,561
p-valor	0,574	0,136	0,270	0,087	0,734	0,443		0,079	0,147	0,159	0,058
r	-0,235	-0,266	0,599*	0,601*	0,252	0,417	0,503	1	-0,138	-0,130	-0,187
p-valor	0,486	0,404	0,030	0,039	0,483	0,157	0,079		0,654	0,687	0,561
r	0,211	-0,179	-0,128	-0,385	0,246	0,418	-0,426	-0,138	1	-0,154	0,016
p-valor	0,449	0,507	0,637	0,217	0,493	0,155	0,147	0,654		0,570	0,954
r	-0,080	0,256	-0,327	-0,350	-0,602	-0,475	-0,434	-0,130	-0,154	1	0,515*
p-valor	0,776	0,357	0,234	0,291	0,086	0,118	0,159	0,687	0,570		0,041
r	0,086	0,274	-0,020	-0,352	0,248	-0,132	-0,561	-0,187	0,016	0,515*	1
p-valor	0,760	0,324	0,945	0,288	0,521	0,683	0,058	0,561	0,954	0,041	

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Anexo VII: matrices de correlaciones para los marcadores de estrés oxidativo con los metales trazas y los marcadores clásicos.

a) Matriz de correlaciones para los controles.

	8-Iso-F2α	MDA	SOD	GST	BuCh	Aβ	tau-t	tau-f
8-Iso-F2α	r p-valor	-0,084 0,807	0,065 0,850	0,414 0,206	0,458 0,157	-0,281 0,403	-0,066 0,848	-0,078 0,819
MDA	r p-valor	1	-0,308 0,357	-0,417 0,202	-0,543 0,084	-0,008 0,982	0,376 0,255	0,356 0,283
SOD	r p-valor	0,065 0,850	1	-0,124 0,716	0,037 0,915	-0,237 0,483	-0,166 0,627	-0,158 0,642
GST	r p-valor	0,414 0,206	-0,308 0,357	1	0,772** 0,005	-0,116 0,734	-0,546 0,082	-0,543 0,084
BuCh	r p-valor	0,458 0,157	0,065 0,850	0,414 0,206	1	0,154 0,652	-0,690** 0,019	-0,682** 0,021
Aβ	r p-valor	-0,008 0,982	-0,237 0,483	-0,116 0,734	0,154 0,652	1	0,233 0,490	0,264 0,433
tau-t	r p-valor	-0,066 0,848	-0,166 0,627	-0,546 0,082	-0,690** 0,019	0,233 0,490	1	0,998** 0,000
tau-f	r p-valor	-0,078 0,819	-0,158 0,642	-0,543 0,084	-0,682** 0,021	0,264 0,433	0,998** 0,000	1

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

b) Matriz de correlaciones para el grupo quejía subjetiva de memoria

	8-Iso-F2a	MDA	SOD	GST	BuCh	Aβ	tau-t	tau-f
8-Iso-F2a	r	0,355	0,382	-0,541	0,003	-0,534	-0,449	0,106
	p-valor	0,348	0,311	0,132	0,993	0,139	0,225	0,696
MDA	r	0,355	0,779*	-0,313	0,408	-0,678*	-0,714*	0,052
	p-valor	0,348	0,013	0,412	0,276	0,045	0,031	0,849
SOD	r	0,382	0,779*	-0,297	0,488	-0,701*	-0,612	-0,211
	p-valor	0,311	0,013	0,437	0,182	0,036	0,080	0,433
GST	r	-0,541	-0,297	0,307	0,307	0,177	0,254	-0,180
	p-valor	0,132	0,437	0,307	0,422	0,649	0,509	0,504
BuCh	r	0,003	0,488	0,307	0,422	-0,654	-0,765*	-0,179
	p-valor	0,993	0,276	0,422	0,177	0,056	0,016	0,507
Aβ	r	-0,534	-0,701*	0,177	-0,654	0,177	0,770*	-0,192
	p-valor	0,139	0,036	0,649	0,056	0,177	0,015	0,477
tau-t	r	-0,449	-0,612	0,254	-0,765*	0,770*	0,770*	0,895**
	p-valor	0,225	0,080	0,509	0,016	0,015	0,015	0,000
tau-f	r	0,106	-0,211	-0,180	-0,179	-0,192	0,895**	0,000
	p-valor	0,696	0,433	0,504	0,507	0,477	0,000	0,000

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

c) Matriz de correlaciones para el grupo de deterioro cognitivo leve

	8-Iso-F2a	MDA	SOD	GST	BuCh	Aβ	tau-t	tau-f
8-Iso-F2a	r	-0,074	-0,043	0,115	-0,002	-0,161	0,041	0,106
	p-valor	0,784	0,874	0,673	0,994	0,551	0,879	0,696
MDA	r	1	0,172	-0,072	0,458	0,481	0,186	0,052
	p-valor	0,784	0,525	0,792	0,075	0,059	0,490	0,849
SOD	r	0,172	1	0,269	0,434	-0,269	-0,127	-0,211
	p-valor	0,525	0,314	0,314	0,093	0,314	0,640	0,433
GST	r	0,115	0,269	1	0,231	-0,118	-0,215	-0,180
	p-valor	0,673	0,314	0,390	0,662	0,425	0,425	0,504
BuCh	r	-0,002	0,434	0,231	1	0,210	0,011	-0,179
	p-valor	0,994	0,093	0,390	0,436	0,968	0,968	0,507
Aβ	r	-0,161	-0,269	-0,118	0,210	1	-0,079	-0,192
	p-valor	0,551	0,269	0,425	0,436	0,770	0,770	0,477
tau-t	r	0,041	-0,127	-0,215	0,011	-0,079	1	0,895**
	p-valor	0,879	0,127	0,425	0,968	0,770	0,895**	0,000
tau-f	r	0,106	-0,211	-0,180	-0,179	-0,192	0,895**	1
	p-valor	0,696	0,433	0,504	0,507	0,477	0,000	0,000

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguilera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

d) Matriz de correlaciones para el grupo Enfermedad de Alzheimer

	8-Iso-F2α	MDA	SOD	GST	BuCh	Aβ	tau-t	tau-f
8-Iso-F2α	r	0.595	0.015	-0.314	0.169	-0.111	0.252	0.270
	p-valor	0.070	0.967	0.377	0.640	0.760	0.482	0.451
MDA	r	0.595	-0.024	-0.667*	0.158	-0.218	0.430	-0.016
	p-valor	0.070	0.947	0.035	0.662	0.545	0.215	0.965
SOD	r	0.015	-0.024	0.149	0.120	-0.010	-0.241	-0.302
	p-valor	0.967	0.947	0.682	0.742	0.977	0.503	0.596
GST	r	-0.314	-0.667*	0.149	0.293	0.441	-0.137	0.138
	p-valor	0.377	0.035	0.682	0.412	0.202	0.705	0.704
BuCh	r	0.169	0.158	0.120	0.293	0.141	0.081	-0.222
	p-valor	0.640	0.662	0.742	0.412	0.698	0.824	0.537
Aβ	r	-0.111	-0.218	-0.010	0.441	0.141	-0.099	0.375
	p-valor	0.760	0.545	0.977	0.202	0.698	0.787	0.286
tau-t	r	0.252	0.430	-0.241	-0.137	-0.099	0.414	0.414
	p-valor	0.482	0.215	0.503	0.705	0.787	0.234	0.234
tau-f	r	0.270	-0.016	-0.302	0.138	0.375	0.414	0.414
	p-valor	0.451	0.965	0.396	0.704	0.286	0.234	0.234

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguilera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

Anexo VIII: Matrices de correlaciones para las proteínas del signalosoma y otras de función neuronal, los marcadores clásicos.

a) Matriz de correlaciones para el grupo control

	Cav	IGF-IRβ	RE	VDAC	Flo	Prp	Ng	TDP-43	βA	tau-t	tau-f
Cav	r p-valor	1	0.150 0.625	-0.135 0.660	0.025 0.936	1.000** 0.000	-0.211 0.488	-0.204 0.504	-0.021 0.945	0.218 0.475	0.260 0.391
IGF-IRβ	r p-valor	0.069 0.822	1	-0.723** 0.804**	-0.932** 0.000	0.069 0.822	0.002 0.995	0.083 0.787	0.390 0.187	0.074 0.810	0.037 0.904
REα	r p-valor	0.150 0.625	0.804** 0.001	1	-0.808** 0.001	0.150 0.625	-0.032 0.917	0.017 0.956	0.207 0.497	0.010 0.974	-0.010 0.975
VDAC	r p-valor	-0.135 0.660	-0.723** 0.005	0.768** 0.002	1	-0.135 0.660	-0.168 0.583	-0.240 0.429	0.100 0.745	0.133 0.664	0.119 0.698
Flo	r p-valor	0.025 0.936	-0.932** 0.000	0.821** 0.001	1	0.025 0.936	-0.082 0.790	-0.156 0.610	-0.258 0.394	0.025 0.934	0.058 0.852
Prp	r p-valor	1.000** 0.000	0.069 0.822	-0.135 0.660	0.025 0.936	1	-0.211 0.488	-0.204 0.504	-0.021 0.945	0.218 0.475	0.260 0.391
Ng	r p-valor	-0.211 0.488	0.002 0.995	-0.032 0.917	-0.082 0.790	-0.211 0.488	1	0.982** 0.000	-0.262 0.387	-0.595** 0.032	-0.562** 0.045
TDP-43	r p-valor	-0.204 0.504	0.083 0.787	0.017 0.956	-0.156 0.610	-0.204 0.504	0.982** 0.000	1	-0.177 0.564	-0.674** 0.012	-0.645** 0.017
βA	r p-valor	-0.021 0.945	0.390 0.187	0.207 0.497	-0.258 0.394	-0.021 0.945	-0.262 0.387	-0.177 0.564	1	0.277 0.360	0.251 0.408
tau-t	r p-valor	0.218 0.475	0.074 0.810	0.010 0.974	0.025 0.934	0.218 0.475	-0.595** 0.032	-0.674** 0.012	0.277 0.360	1	0.991** 0.000
tau-f	r p-valor	0.260 0.391	0.037 0.904	-0.010 0.975	0.058 0.852	0.260 0.391	-0.562** 0.045	-0.645** 0.017	0.251 0.408	0.991** 0.000	1

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

b) Matriz de correlaciones para el grupo queja subjetiva de memoria

	Cav	IGF-IRβ	ER	VDAC	Flo	Prp	Ng	TDP-43	βA	tau-t	tau-f
Cav	r	0,998**	0,241	0,646	0,067	0,984*	-0,849	-0,811	0,175	-0,278	-0,229
	p-valor	0,002	0,759	0,354	0,933	0,016	0,151	0,189	0,825	0,722	0,771
IGF-IRβ	r	0,998**	0,194	0,597	0,011	0,988*	-0,814	-0,774	0,140	-0,302	-0,234
	p-valor	0,002	0,806	0,403	0,989	0,012	0,186	0,226	0,860	0,698	0,766
REα	r	0,241	0,194	0,771	0,423	0,071	-0,594	-0,513	0,956*	-0,322	-0,581
	p-valor	0,759	0,806	0,229	0,577	0,929	0,406	0,487	0,044	0,678	0,419
VDAC	r	0,646	0,597	0,771	0,694	0,548	-0,949	-0,938	0,587	0,047	-0,147
	p-valor	0,354	0,403	0,229	0,306	0,452	0,051	0,062	0,413	0,953	0,853
Flo	r	0,067	0,011	0,423	0,694	0,038	-0,536	-0,630	0,145	0,708	0,490
	p-valor	0,933	0,989	0,577	0,306	0,962	0,464	0,370	0,855	0,292	0,510
PrP	r	0,984*	0,988*	0,071	0,548	0,038	-0,784	-0,766	-0,003	-0,184	-0,093
	p-valor	0,016	0,012	0,929	0,452	0,962	0,216	0,234	0,997	0,816	0,907
Ng	r	-0,849	-0,814	-0,594	-0,949	-0,536	-0,784	0,987*	-0,427	0,024	0,134
	p-valor	0,151	0,186	0,406	0,051	0,464	0,216	0,013	0,573	0,976	0,866
TDP-43	r	-0,811	-0,774	-0,513	-0,938	-0,630	-0,766	0,987*	-0,310	-0,136	-0,029
	p-valor	0,189	0,226	0,487	0,062	0,370	0,234	0,013	0,690	0,864	0,971
βA	r	0,175	0,140	0,956*	0,587	0,145	-0,003	-0,427	0,953*	-0,563	-0,783
	p-valor	0,825	0,860	0,044	0,413	0,855	0,997	0,573	0,690	0,437	0,217
tau-t	r	-0,278	-0,302	-0,322	0,047	0,708	-0,184	-0,136	0,437	0,437	0,217
	p-valor	0,722	0,698	0,678	0,953	0,292	0,816	0,864	0,437	0,437	0,217
tau-f	r	-0,229	-0,234	-0,581	-0,147	0,490	0,134	-0,029	-0,783	0,953*	0,047
	p-valor	0,771	0,766	0,419	0,853	0,510	0,907	0,971	0,217	0,047	0,047

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 28/09/2020 13:12:33
 Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:01:49
 Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 08/10/2020 17:11:27

c) Matriz de correlaciones para el grupo deterioro cognitivo leve.

	r	p-valor	Cav	IGF-IRβ	REα	VDAC	Flo	Prp	Ng	TDP-43	βA	tau-t	tau-f
Cav			1	0,938**	0,910**	0,744**	0,805**	0,835**	-0,063	-0,023	-0,135	0,014	0,074
IGF-IRβ			0,938**	1	0,934**	0,789**	0,882**	0,861**	-0,070	-0,020	-0,039	-0,062	0,009
REα			0,910**	0,934**	1	0,760**	0,832**	0,805	0,005	0,057	-0,142	-0,045	0,013
VDAC			0,744**	0,789**	0,760**	1	0,618**	0,618**	0,222	0,226	0,094	-0,140	-0,136
Flo			0,805**	0,882**	0,834**	0,775**	1	0,716**	0,011	0,057	-0,035	-0,105	-0,048
Prp			0,835**	0,861**	0,832**	0,618**	0,716**	1	-0,160	-0,137	-0,165	-0,059	-0,051
Ng			-0,063	-0,070	0,005	0,222	0,011	-0,160	0,465	0,534	0,452	0,790	0,818
TDP-43			0,774	0,751	0,984	0,308	0,960	0,465	1	0,000	0,426	-0,014	-0,110
βA			-0,023	-0,020	0,057	0,226	0,057	-0,137	0,985**	1	0,172	-0,044	-0,115
tau-t			-0,135	-0,039	-0,142	0,094	-0,035	-0,165	0,000	0,172	1	-0,115	-0,133
tau-f			0,014	-0,062	-0,045	-0,140	-0,105	-0,059	-0,014	-0,044	-0,115	1	0,961**
			0,074	0,009	0,013	-0,136	-0,048	-0,051	-0,110	-0,115	-0,133	0,961**	1
			0,737	0,968	0,951	0,537	0,828	0,818	0,617	0,601	0,545	0,000	0,000

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 28/09/2020 13:12:33

Mario Lorenzo Díaz González
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/09/2020 15:01:49

Raquel Marín Cruzado
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27

d) Matriz de correlaciones para el grupo Enfermedad de Alzheimer.

	Cav	IGF-IRβ	REα	VDAC	Flo	Prp	Ng	TDP-43	βA	tau-4	tau-f
Cav	r p-valor	1	0.054 0.876	0.233 0.491	-0.036 0.916	-0.104 0.760	0.076 0.824	0.131 0.701	-0.167 0.624	-0.001 0.998	0.023 0.947
IGF-IRβ	r p-valor	0.176 0.606	1	0.468 0.771**	-0.113 0.147	0.742** 0.009	0.257 0.445	0.290 0.387	0.174 0.609	-0.341 0.304	-0.165 0.628
REα	r p-valor	0.054 0.876	0.771** 0.005	1	0.198 0.559	0.592 0.055	0.380 0.248	0.361 0.275	0.349 0.293	-0.098 0.775	-0.046 0.894
VDAC	r p-valor	0.233 0.491	0.468 0.771**	0.490 0.126	1	-0.018 0.201	0.610* 0.046	0.546 0.083	0.257 0.446	0.413 0.207	0.492 0.124
Flo	r p-valor	-0.036 0.916	-0.113 0.147	0.198 0.559	0.418 0.201	-0.236 0.484	0.161 0.637	0.162 0.635	-0.227 0.502	0.165 0.628	-0.074 0.829
Prp	r p-valor	-0.104 0.760	0.742** 0.009	0.592 0.055	-0.018 0.484	1	-0.033 0.923	0.115 0.737	0.278 0.408	-0.389 0.237	-0.237 0.482
Ng	r p-valor	0.076 0.824	0.380 0.248	0.610* 0.046	0.546 0.083	-0.033 0.923	1	0.865** 0.001	0.209 0.537	0.274 0.414	0.509 0.110
TDP-43	r p-valor	0.131 0.701	0.290 0.387	0.361 0.275	0.162 0.635	0.115 0.737	0.865** 0.001	1	-0.031 0.928	0.368 0.266	0.477 0.138
βA	r p-valor	-0.167 0.624	0.174 0.609	0.349 0.293	-0.227 0.502	0.278 0.408	0.209 0.537	-0.031 0.928	1	0.215 0.526	0.408 0.212
tau-t	r p-valor	-0.001 0.998	-0.341 0.304	-0.098 0.775	0.413 0.207	-0.389 0.237	0.274 0.414	0.368 0.266	0.215 0.526	1	0.888** 0.001
tau-f	r p-valor	0.023 0.947	-0.165 0.628	-0.046 0.894	-0.074 0.829	-0.237 0.482	0.509 0.110	0.477 0.138	0.408 0.212	0.888** 0.001	1

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2866781 Código de verificación: 3BXaS2sz

Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 28/09/2020 13:12:33

Mario Lorenzo Díaz González
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/09/2020 15:01:49

Raquel Marín Cruzado
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/09/2020 15:28:51

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2914873 Código de verificación: yguD1Khh

Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 08/10/2020 17:11:27



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2866781	Código de verificación: 3BXaS2sz
Firmado por: Fátima Concepción Mesa Herrera UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/09/2020 13:12:33
Mario Lorenzo Díaz González UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:01:49
Raquel Marín Cruzado UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/09/2020 15:28:51

179 / 179

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 2914873	Código de verificación: yguD1Khh
Firmado por: María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 08/10/2020 17:11:27