




Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Tesis doctoral

**VALIDACIÓN EN TEJIDO CEREBRAL HUMANO DE  
[F-18]-AV-1451 (T807), UN NUEVO MARCADOR  
DE LA PROTEÍNA TAU-PHF  
PARA TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES**

Doctoranda:

**Marta Marquié Sayagués**

Directores:

**Teresa Gómez Isla**

**Alberto Lleó Bisa**

**Rafael Blesa Gonzàlez**

Tutor:

**Antonio Escartín Siquier**

**Programa de Doctorado en Medicina  
DEPARTAMENT DE MEDICINA  
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
2016**



**Universitat Autònoma de Barcelona**







ÍNDICE DE ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	13
1. Enfermedad de Alzheimer (EA)	15
1.1. Consideraciones generales	15
1.2. Fisiopatología de la EA	16
1.2.1. La proteína tau	16
1.2.2. La proteína $\beta$ -amiloide	20
1.3. Criterios neuropatológicos para el diagnóstico de la EA	23
2. Taupatías distintas a la EA	24
2.1. Consideraciones generales	24
2.2. Taupatías: entidades diagnósticas	26
2.2.1. Enfermedad de Pick	26
2.2.2. Parálisis supranuclear progresiva	27
2.2.3. Degeneración corticobasal	28
2.2.4. Taupatías familiares asociadas a mutación en el cromosoma 17	29
3. Biomarcadores en la EA y otras demencias	30
3.1. Consideraciones generales	30
3.2. Utilidad de los biomarcadores en la EA	31
3.3. Cuantificación de tau total, tau fosforilada y $\beta$ -amiloide en LCR	32
3.4. Neuroimagen con tomografía por emisión de positrones (PET)	34
3.4.1. Consideraciones generales	34
3.4.2. PET-amiloide	34

3.4.3. PET-tau	37
3.4.3.1. Consideraciones generales	37
3.4.3.2. PET-[F-18]-AV-1451	39
3.4.3.2.1. Consideraciones generales y validación en tejido cerebral	39
3.4.3.2.2. Neuroimagen <i>in vivo</i> con PET-[F-18]-AV-1451	41
3.4.3.2.2.1. Captación <i>in vivo</i> de [F-18]-AV-1451 en pacientes con EA y controles sanos	41
3.4.3.2.2.2. Captación <i>in vivo</i> de [F-18]-AV-1451 y severidad de la EA	44
3.4.3.2.2.3. Captación <i>in vivo</i> de [F-18]-AV-1451 en variantes atípicas de la EA	45
3.4.3.2.2.4. Captación <i>in vivo</i> de [F-18]-AV-1451 y biomarcadores en LCR	47
3.4.3.2.2.5. Captación <i>in vivo</i> de [F-18]-AV-1451 en taupatías distintas a la EA	47
HIPÓTESIS DE TRABAJO	51
OBJETIVOS	59
INVESTIGACIÓN Y RESULTADOS	61
1. Metodología	61
1.1. Primera parte: características de unión de [F-18]-AV-1451 en tejido cerebral humano	61
1.1.1. Muestras de tejido	61
1.1.2. Autorradiografía con pantalla de fósforo	62
1.1.3. Autorradiografía de alta resolución con emulsión nuclear	63

1.1.4. Ensayos de unión <i>in vitro</i> con [H-3]-AV-1451	64
1.2. Segunda parte: estudio de tres individuos a los que se les realizó PET-[F-18]-AV-1451 y examen neuropatológico	65
1.2.1. Adquisición de las imágenes y procesamiento de la PET-[F-18]- AV-1451	65
1.2.2. Muestras de tejido	66
1.2.3. Correlaciones regionales entre la PET-[F-18]-AV-1451 y los bloques de tejido cerebral	66
1.2.4. Autorradiografía con pantalla de fósforo	67
1.2.5. Autorradiografía de alta resolución con emulsión nuclear	67
1.2.6. Ensayos de unión <i>in vitro</i> con [H-3]-AV-1451	67
1.2.7. Electroforesis en gel de agarosa con detergente semidesnaturalizado	67
2. Resultados	69
2.1. Primera parte: características de unión de [F-18]-AV-1451 en tejido cerebral humano	69
2.1.1. Características de la cohorte	69
2.1.2. Autorradiografía con pantalla de fósforo	71
2.1.3. Autorradiografía de alta resolución con emulsión nuclear	74
2.1.4. Ensayos de unión <i>in vitro</i> con [H-3]-AV-1451	79
2.2. Segunda parte: estudio de tres individuos a los que se les realizó PET-[F-18]-AV-1451 y examen neuropatológico	81
2.2.1. Casos clínicos	81
2.2.2. PET-[F-18]-AV-1451	82



## SUMARIO

---

2.2.3. Evaluación neuropatológica	83
2.2.4. Autorradiografía con pantalla de fósforo	85
2.2.5. Autorradiografía de alta resolución con emulsión nuclear	87
2.2.6. Ensayos de unión <i>in vitro</i> con [F-18]-AV-1451	87
2.2.7. Cuantificaciones bioquímicas de las distintas especies de tau con SDD-AGE	88
DISCUSIÓN	93
CONCLUSIONES	105
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	109
Índice de tablas	111
Índice de figuras	113
ANEXO	115
BIBLIOGRAFÍA	119

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS



- AA:** Alzheimer's Association
- AAC:** angiopatía amiloide cerebral
- A $\beta$ :**  $\beta$ -amiloide
- ACP:** atrofia cortical posterior
- AMIDE:** Un examinador de datos de imágenes médicas, por sus siglas en inglés
- APP:** afasia progresiva primaria
- BHE:** barrera hematoencefálica
- CE:** corteza entorrinal
- CERAD:** Consorcio para Establecer un Registro para la Enfermedad de Alzheimer, por sus siglas en inglés
- CPI:** cuerpos de Pick
- CTL:** control
- DCL:** deterioro cognitivo leve
- DCB:** degeneración corticobasal
- DCLw:** demencia con cuerpos de Lewy
- EA:** Enfermedad de Alzheimer
- ELISA:** ensayo inmunnosorbente ligado a enzimas, por sus siglas en inglés
- EP:** Enfermedad de Parkinson
- EPI:** Enfermedad de Pick
- FDG:** fluorodeoxiglucosa
- FS:** Freesurfer
- HMW:** alto peso molecular, por sus siglas en inglés
- HRP:** peroxidasa de rábano, por sus siglas en inglés
- LCR:** líquido cefalorraquídeo
- LMW:** bajo peso molecular, por sus siglas en inglés
- MAPT:** proteína tau asociada a los microtúbulos, por sus siglas en inglés
- MADRC:** Centro de Investigación de la Enfermedad de Alzheimer de Massachusetts, por sus siglas en inglés
- MGH:** Hospital General de Massachusetts, por sus siglas en inglés
- NIA:** Instituto Nacional del Envejecimiento, por sus siglas en inglés
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- ONF:** ovillo neurofibrilar
- PART:** taupatía primariamente relacionada con la edad, por sus siglas en inglés
- PBS:** suero salino tamponado con sulfato, por sus siglas en inglés

- PET:** tomografía por emisión de positrones, por sus siglas en inglés
- PHF:** filamentos de hélices apareadas, por sus siglas en inglés
- PiB:** Compuesto B de Pittsburgh, por sus siglas en inglés
- PPA:** proteína precursora del amiloide
- PSP:** parálisis supranuclear progresiva
- RMN:** resonancia magnética nuclear
- RNA:** ácido ribonucleico, por sus siglas en inglés
- ROI:** región de interés, por sus siglas en inglés
- SDD-AGE:** electroforesis en gel de agarosa con detergente semidesnaturalizado, por sus siglas en inglés
- SUVR:** ratio del valor de captación estandarizado, por sus siglas en inglés
- SDS:** sulfato sódico dodecil, por sus siglas en inglés
- TBS-T:** Tris Buffered Saline + Tween 20
- TC:** tomografía computerizada
- TDP-43:** transactive response DNA binding protein 43 kDa

## INTRODUCCIÓN



# 1. Enfermedad de Alzheimer

## 1.1. Consideraciones generales

La enfermedad de Alzheimer (EA) es uno de los mayores problemas de salud pública que afronta el mundo actualmente. La EA afecta a más de 35 millones de personas a nivel mundial, y su prevalencia va en aumento debido al rápido crecimiento de la población anciana, creando una enorme carga social y económica.<sup>2</sup> La previsión de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es que el número de casos de EA se duplique en los próximos 20 años.<sup>3</sup> Además, la EA es la única entre las primeras 10 causas de mortalidad sin prevención o tratamiento.<sup>2, 4</sup> En 2013 los países del G8 alcanzaron un acuerdo para unir esfuerzos a nivel mundial con el objetivo de tratar de curar la EA antes del año 2050 o en su defecto desarrollar un tratamiento lo suficientemente eficaz para frenar su avance.

La EA es la causa de demencia más frecuente en la población anciana, representando más de la mitad de los casos. Los síntomas de la EA consisten en un deterioro cognitivo junto con alteraciones de la conducta de inicio insidioso y curso progresivo que interfieren con la habilidad del sujeto de realizar las actividades de su vida diaria y que representan un claro empeoramiento de las funciones cognitivas previamente adquiridas.<sup>5</sup> Su presentación más frecuente es la amnésica, cursando con dificultad para aprender y recordar nueva información, pero también puede presentarse como alteraciones del lenguaje, disfunción ejecutiva o problemas visuoespaciales. Varias entidades pueden imitar o solaparse con la EA dificultando su diagnóstico clínico, como la demencia vascular,<sup>6</sup> la demencia con cuerpos de Lewy (DCLw)<sup>7</sup> o la demencia frontotemporal (DFT).<sup>8</sup>

En la actualidad no existe ninguna prueba que pueda confirmar el diagnóstico de EA en vida del paciente, y su diagnóstico definitivo solamente es posible mediante el examen neuropatológico del tejido cerebral en la autopsia. El diagnóstico clínico de EA se realiza descartando otras causas de demencia con la historia clínica, exploración física, análisis de sangre, neuroimagen estructural y evaluación neuropsicológica. No obstante, la precisión de estas pruebas es subóptima. Un estudio clínico-patológico en más de 900 casos demostró que casi un 30% de pacientes diagnosticados clínicamente como EA no cumplían criterios de EA en la autopsia, y un 40% de los pacientes diagnosticados



clínicamente como demencias distintas a la EA tenían de hecho un diagnóstico postmortem de EA.<sup>9</sup>

La aparición de nuevos biomarcadores para la detección de las lesiones neuropatológicas características de la EA (agregados de proteína tau y amiloide) en vida del paciente mediante el análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR)<sup>10</sup> y la neuroimagen con tomografía por emisión de positrones (PET)<sup>11, 12</sup> ha supuesto una revolución en el campo de la investigación y el diagnóstico de la EA. Estos biomarcadores permiten identificar patología tipo Alzheimer en sujetos cognitivamente sanos o con mínimo deterioro cognitivo antes de que desarrollen demencia, siendo éste el momento ideal para la aplicación de potenciales terapias modificadoras de la enfermedad, antes de que ocurra una disfunción sináptica y pérdida neuronal irreversibles.

### 1.2. Fisiopatología de la EA

Las características neuropatológicas distintivas de la EA incluyen dos tipos de lesiones principales: los ovillos neurofibrilares (ONFs), agregados intraneuronales de proteína tau hiperfosforilada, y las placas amiloides, depósitos extraneuronales de la proteína  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ).<sup>13-15</sup> Estas lesiones se acompañan frecuentemente de astrogliosis,<sup>16, 17</sup> activación de la microglía<sup>18, 19</sup> y depósitos de A $\beta$  en los vasos en forma de angiopatía amiloide cerebral (AAC).<sup>20</sup> Existe también un daño sináptico en fases precoces de la enfermedad asociado a degeneración retrógrada de axones y dendritas, que finalmente conduce a la muerte neuronal.<sup>21-24</sup>

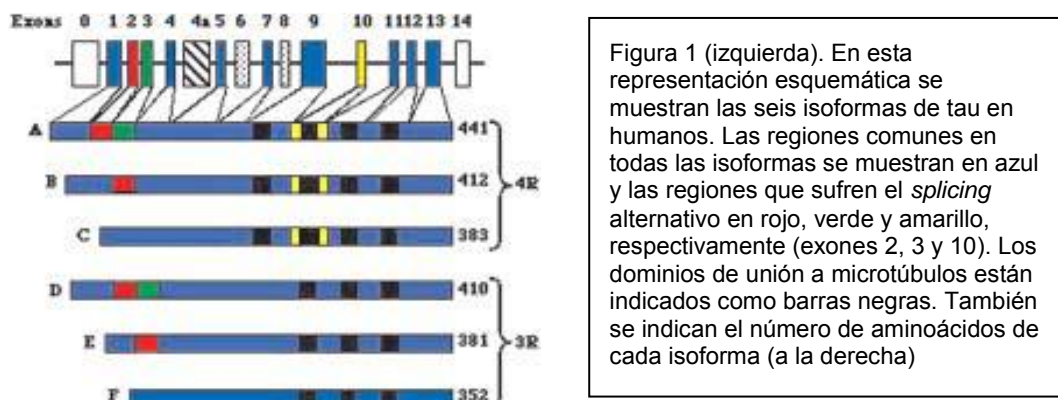
#### 1.2.1. La proteína tau

Tau es una proteína asociada a los microtúbulos cuya función es esencial para la estabilidad neuronal y el transporte axonal de nutrientes. En su forma nativa, tau está fosforilada y no plegada, y se localiza principalmente en los axones de las neuronas, donde se une a los microtúbulos y los estabiliza. Los microtúbulos constituyen el citoesqueleto neuronal, y su función es crítica para mantener la integridad estructural de la neurona y para transportar nutrientes desde el soma hacia los axones y las terminales sinápticas.<sup>25-27</sup> La habilidad de tau para unirse a los microtúbulos está regulada en parte

por sus modificaciones postranslacionales, incluyendo la fosforilación, glicosilación, glicación, ubiquitinación y nitración.<sup>25, 28</sup>

El gen de tau *MAPT* (proteína tau asociada a los microtúbulos, por sus siglas en inglés) está localizado en el cromosoma 17 (17q21.1) y contiene 13 exones. El gen *MAPT* es sometido a un *splicing* alternativo de los exones 2, 3 y 10, generándose 6 isoformas distintas.<sup>29</sup> El exón 10 codifica para una de las cuatro secuencias conservadas de 32 aminoácidos del dominio de unión a microtúbulos del gen. La tau que incluye el exón 10 tiene 4 repeticiones (4R) en el dominio de unión a microtúbulos, mientras que la tau que excluye el exón 10 tiene 3 repeticiones (3R).<sup>30-31</sup> Un cerebro adulto sano contiene un número similar de 3R y 4R, aproximadamente el doble de cantidad en la corteza que en la sustancia blanca y el cerebelo.<sup>25</sup> También existen insertos de aminoácidos variables en la parte terminal (N) del gen de tau, formándose 6 isoformas que se indican como 2N4R, 2N3R, 1N4R, 1N3R, 0N4R, 0N3R (**Figura 1**).<sup>32</sup>

**Figura 1. Representación esquemática de las seis isoformas de tau**<sup>33</sup>



En la EA tau sufre una hiperfosforilación endógena que dificulta su unión a los microtúbulos, disminuyendo la estabilidad de éstos y dando lugar a una afectación del transporte axonal, lo que conduce a una disfunción neuronal y finalmente a la muerte neuronal.<sup>34, 35</sup> Tau se traslada desde el axón, su localización en la forma nativa, hasta el compartimento somatodendrítico de las neuronas por transporte axonal retrógrado.<sup>36</sup> Tau sufre un cambio conformacional pasando de ser un bucle a hoja plegada  $\beta$ , similar a la de la proteína amiloide,<sup>37</sup> y esto promueve su agregación en forma de inclusiones

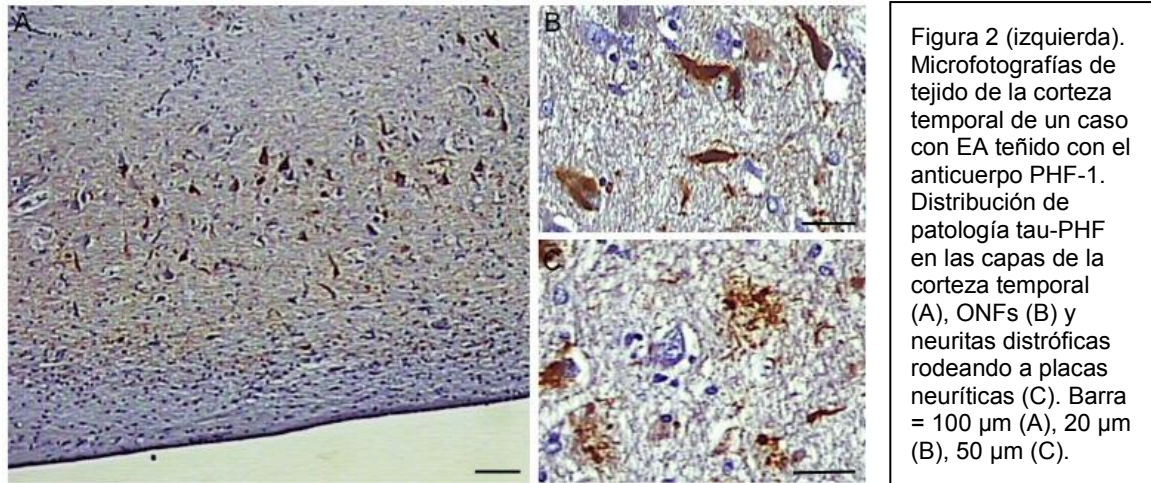
filamentosas intracelulares. Los mecanismos que conducen a estos fenómenos de hiperfosforilación, plegamiento anómalo y agregación no son bien conocidos.

Los agregados de tau en la EA se hallan mayoritariamente en forma de filamentos de hélices apareadas (PHF, por sus siglas en inglés) formando ONFs (**Figura 2**). Los PHF son fibrillas con un diámetro de 8-20 nm que se unen formando pares con una conformación tridimensional y una periodicidad de las vueltas de aproximadamente 65 nm.<sup>38, 39</sup> Una pequeña proporción de los ONFs en la EA se halla en forma de filamentos rectos (FR).<sup>40</sup> Los ONFs contienen las dos isoformas de tau (3R+4R) con una ratio de aproximadamente 1,<sup>41</sup> y se clasifican en tres estadios según su morfología: (1) ONFs difusos o pre-ONFs, visibles como una tinción anti-tau difusa o puntillada en el citoplasma de una neurona de apariencia normal, (2) ONFs maduros o fibrilares, agregados filamentosos de tau en el citoplasma de las neuronas que desplazan el núcleo hacia la periferia y pueden extenderse hacia las dendritas y la parte proximal del axón, y (3) ONFs fantasma, tras la muerte de la neurona de la que formaban parte, identificables por la ausencia de tinción del núcleo y citoplasma.<sup>42-44</sup>

En la EA, los ONFs están acompañados invariablemente de hilos de neurópilo, resultado de la desintegración de las dendritas y axones de las neuronas.<sup>45, 46</sup> Adicionalmente, agregados de tau-PHF en la EA también se encuentran rodeando a las placas neuríticas en forma de neuritas distróficas (**Figura 2**).<sup>42, 47, 48</sup>

El depósito de tau en la EA es capa-específico, y ocurre preferentemente en las capas III y V de la corteza. Específicamente, en la capa V tau se encuentran mayoritariamente ONFs e hilos de neurópilo, mientras que en la capa III predominan las neuritas distróficas.<sup>49</sup>

**Figura 2. Patología tau en la EA**

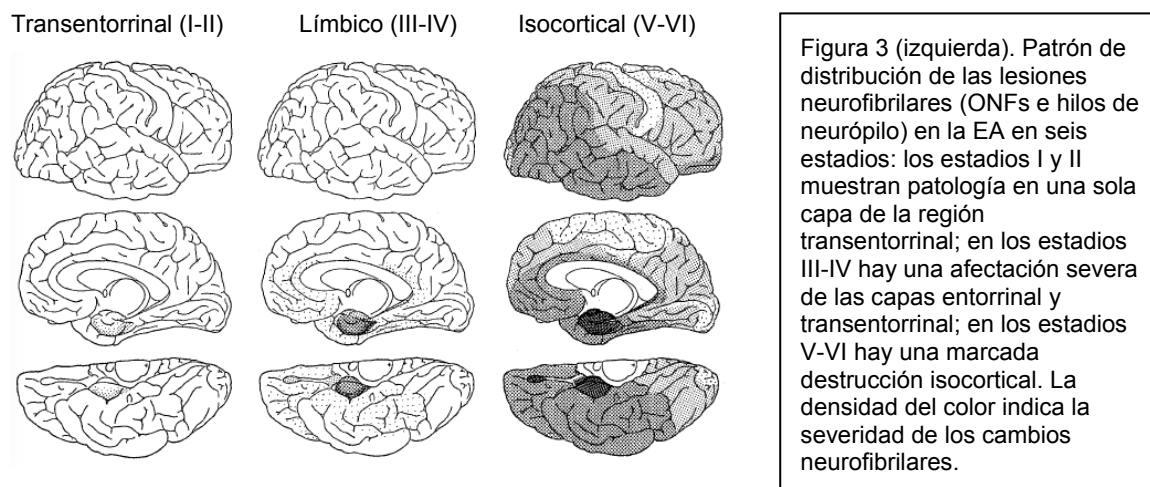


El depósito regional de las lesiones neurofibrilares (ONFs e hilos de neurópilo) en la EA sigue un curso estereotípico y predecible, y su distribución espaciotemporal fue descrita en los estadios de Braak (**Tabla 1, Figura 3**).<sup>49, 50</sup> En fases presintomáticas, los ONFs se forman en la corteza transentorrinal (estadios Braak I y II) y desde allí se expanden hacia áreas límbicas cuando los problemas de memoria son ya evidentes (estadios III y IV), alcanzando la corteza asociativa en fase de demencia severa (estadios V y VI). La progresión regional de los ONFs en la EA se extiende a lo largo del curso de la enfermedad, y se asocia a disfunción sináptica, activación glial y finalmente pérdida neuronal, causando un progresivo deterioro cognitivo como resultado.<sup>23, 51-54</sup> Braak et al. también reportó en estudios de autopsia el hallazgo ocasional de ONFs en cerebros de adultos jóvenes sin deterioro cognitivo.<sup>55</sup>

**Tabla 1. Estadios de Braak para las lesiones neurofibrilares en la EA**<sup>50, 56</sup>

Estadio transentorrinal	<b>Braak I:</b> transentorrinal (perirrinal) y entorrinal <b>Braak II:</b> CA1 del hipocampo
Estadio límbico	<b>Braak III:</b> subículo del hipocampo <b>Braak IV:</b> amígdala, tálamo, claustró
Estadio isocortical	<b>Braak V:</b> áreas asociativas <b>Braak VI:</b> cortezas primarias motoras y sensoriales, corteza visual primaria

**Figura 3. Progresión regional de las lesiones neurofibrilares en la EA según los estadios de Braak<sup>50</sup>**



### 1.2.2. La proteína $\beta$ -amiloide

La proteína amiloide es un péptido de 40 a 42 aminoácidos derivado de la proteína precursora del amiloide (PPA) tras su fragmentación secuencial por las enzimas secretasas  $\beta$  y  $\gamma$  en las neuronas.<sup>57</sup>

Las placas de  $\beta$ -amiloide son uno de los componentes esenciales en el diagnóstico neuropatológico de la EA junto a los agregados de tau.<sup>58</sup> Son estructuras extraneuronales y se clasifican en densas o difusas basándose en su morfología y en su tinción con Rojo Congo o Tioflavina-S. Las placas densas son depósitos fibrilares de amiloide, predominantemente en forma de  $A\beta_{42}$ , que se tiñen con Rojo Congo y Tioflavina-S (**Figura 4A**). Típicamente se encuentran rodeadas de neuritis distróficas (placas neuríticas), astrocitos reactivos y microglía activada.<sup>17, 59, 60</sup> Este tipo de placas se asocia a pérdida sináptica y deterioro cognitivo y forma parte de los criterios CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) para el diagnóstico neuropatológico de la EA.<sup>61</sup> Las placas difusas, por otro lado, son depósitos amorfos de amiloide de contornos mal definidos que no se tiñen con Rojo Congo ni Tioflavina-S (**Figura 4B**). Normalmente son no neuríticas y no se asocian con respuesta glial ni pérdida neuronal. Las placas difusas no se consideran en los criterios neuropatológicos de la EA ya que son un hallazgo relativamente común en población anciana cognitivamente sana.<sup>62, 63</sup>



**Figura 4. Patología A $\beta$  en la EA**

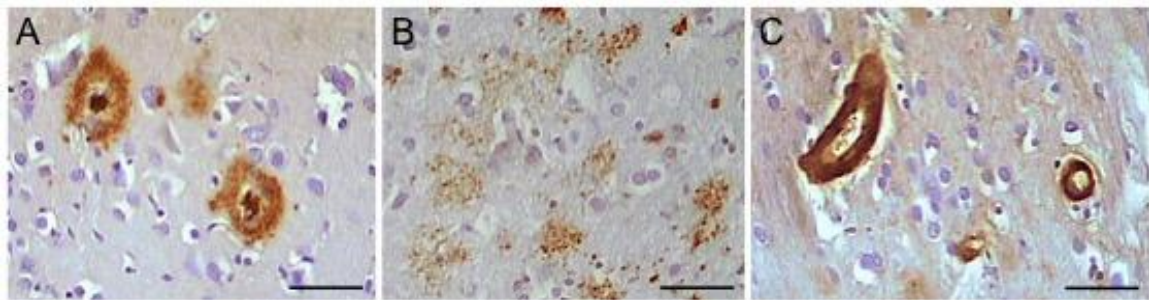


Figura 4 (arriba). Lesiones formadas por agregados de proteína  $\beta$ -amiloide en la corteza occipital en un caso de EA: placas densas (A), placas difusas (B) y depósitos de A $\beta$  en la pared de vasos en forma de AAC (C). Barras = 50  $\mu$ m.

Los criterios CERAD<sup>61</sup> para el diagnóstico neuropatológico de EA consisten en un conteo semicuantitativo de la frecuencia de placas neuríticas únicamente (no placas difusas) en las regiones más severamente afectadas de la neocorteza, usando la tinción de Bielchowsky modificada o la Tioflavina-S. La puntuación del conteo se resume en “0” (ausentes), “A” (escasas), “B” (moderadas) y “C” (frecuentes). Esta puntuación se integra con la información clínica del sujeto (ausencia o presencia de demencia) y la evaluación de otros hallazgos neuropatológicos para determinar el nivel de certeza del diagnóstico patológico de EA, en términos de “posible EA”, “probable EA” y “EA definitiva”, en comparación con el “cerebro normal” (**Tabla 2**).

**Tabla 2. Estadios CERAD para placas neuríticas<sup>61</sup>**

Frecuencia de placas neuríticas: <b>0:</b> ausentes <b>A:</b> escasas <b>B:</b> moderadas <b>C:</b> frecuentes	
Niveles de certeza del diagnóstico patológico de EA: <b>Cerebro normal</b>	Ausencia de evidencia histológica de EA (puntuación “0” para placas neuríticas) + ausencia de historia clínica de demencia + ausencia de otras lesiones neuropatológicas que puedan causar demencia o Puntuación “A” para placas neuríticas + ausencia de historia clínica de demencia o Historia de demencia + ausencia de lesiones neuropatológicas que puedan causar demencia

## INTRODUCCIÓN

<b>EA definitiva</b>	Puntuación “ <b>C</b> ” para placas neuríticas + historia clínica de demencia + presencia o ausencia de otras lesiones neuropatológicas que puedan causar demencia
<b>EA probable</b>	Puntuación “ <b>B</b> ” para placas neuríticas + historia clínica de demencia + presencia o ausencia de otras lesiones neuropatológicas que puedan causar demencia
<b>EA posible</b>	Puntuación “ <b>A</b> ” para placas neuríticas + historia clínica de demencia + presencia o ausencia de otras lesiones neuropatológicas que puedan causar demencia o Puntuaciones “ <b>B</b> ” o “ <b>C</b> ” para placas neuríticas y ausencia de manifestaciones clínicas de demencia

La distribución cerebral de las placas  $\beta$ -amiloideas en la EA es variable entre individuos, a diferencia de la progresión regional estereotípica de los agregados de tau, pero se cree que su depósito empieza en las regiones frontales inferiores y corteza cingulada, y desde allí se extiende a la neocorteza.<sup>50</sup> Thal et al. describió 5 fases de la progresión descendente de los depósitos de  $\beta$ -amiloide en el cerebro, que pueden resumirse en tres estadios: 1 o isocortical, 2 o límbico/alocortical y 3 o subcortical. (**Figura 5 y Tabla 3**). Los depósitos de amiloide se encuentran normalmente homogéneamente distribuidos en todas las capas de la corteza, en comparación con la distribución capa-dependiente de los ONFs.

**Figura 5. Fases de Thal de distribución de lesiones  $\beta$ -amiloide en la EA<sup>64</sup>**

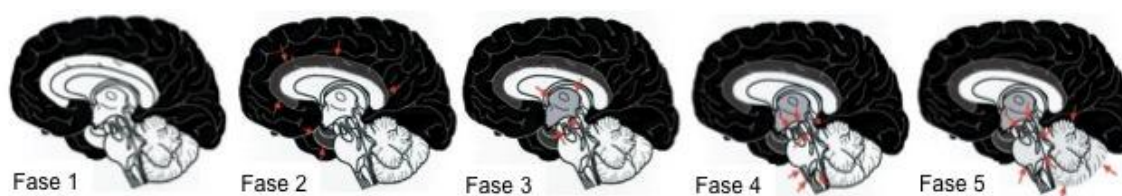


Figura 5 (página anterior). Distribución espacio-temporal de las lesiones  $\beta$ -amiloide en el cerebro según las fases de Thal. La fase 1 se caracteriza por depósitos solo en la neocorteza; la fase 2 por depósitos adicionales alo corticales; la fase 3 por depósitos adicionales en los núcleos del diencefalo y el estriado; la fase 4 por depósitos adicionales en varios núcleos en el mesencéfalo; y la fase 5 por depósitos adicionales en el cerebelo y la protuberancia.

**Tabla 3. Fases de Thal de distribución de lesiones  $\beta$ -amiloide en la EA<sup>64</sup>**

<b>Estadio 1 (Isocortical)</b>	<b>Fase Thal 1:</b> depósitos de $\beta$ -amiloide isocorticales
<b>Estadio 2 (límbico o alocortical)</b>	<b>Fase Thal 2:</b> depósitos de $\beta$ -amiloide adicionales en áreas alocorticales (corteza entorrinal, hipocampo, amígdala, ínsula, corteza cingular)
<b>Estadio 3 (subcortical)</b>	<b>Fase Thal 3:</b> depósitos de $\beta$ -amiloide adicionales en núcleos subcorticales (estriado, núcleos colinérgicos del lóbulo frontal basal, tálamo, hipotálamo) y la sustancia blanca
	<b>Fase Thal 4:</b> depósitos de $\beta$ -amiloide adicionales en el mesencéfalo (núcleo rojo, sustancia negra, formación reticular de la medula oblongata, colículos superior e inferior)
	<b>Fase Thal 5:</b> depósitos de $\beta$ -amiloide adicionales en la protuberancia (formación reticular, núcleo del raphe, locus coeruleus) y en la capa molecular del cerebelo

La proteína  $\beta$ -amiloide también suele hallarse en la EA como AAC en forma de depósitos predominantemente de  $A\beta_{40}$  en la túnica media de los vasos leptomenígeos y en capilares, arteriolas y arterias de mediano tamaño en la corteza cerebral (**Figura 4C**).<sup>20, 65</sup>

El acúmulo de placas de  $\beta$ -amiloide en el cerebro de los pacientes con EA ocurre lentamente y precede en 1-2 décadas a la aparición de cambios neurodegenerativos y de deterioro cognitivo. Los niveles de  $A\beta$  alcanzan una fase de *plateau* antes del inicio de la disfunción cognitiva, y no se correlacionan significativamente con los síntomas cognitivos.<sup>66-68</sup>

### 1.3. Criterios neuropatológicos para el diagnóstico de la EA

Los nuevos criterios de consenso para el diagnóstico neuropatológico de la EA fueron publicados en 2012<sup>58</sup> y representan una revisión de los criterios del National Institute of Aging / Reagan Institute (NIA-Reagan) de la Alzheimer's Association de 1997.<sup>69</sup>

Estos nuevos criterios proponen clasificar los cambios neuropatológicos de 3 parámetros (amiloide,<sup>64</sup> Braak<sup>50, 56</sup> y CERAD<sup>61</sup>) para finalmente obtener una puntuación llamada "ABC" (**Tabla 4**).



**Tabla 4. Clasificación ABC de los cambios neuropatológicos de la EA<sup>58</sup>**

<b>A. Puntuación de placas <math>\beta</math>-amiloide</b> (modificado de Thal et al. <sup>64</sup> )	
<b>A0</b>	ausencia de A $\beta$ o de placas amiloideas
<b>A1</b>	Fases Thal 1 o 2
<b>A2</b>	Fase Thal 3
<b>A3</b>	Fases Thal 4 o 5
<b>B. Estadío de ONFs</b> (modificado de de Braak <sup>50,56</sup> ).	
<b>B0</b>	Ausencia de ONFs
<b>B1</b>	Estadios de Braak I o II
<b>B2</b>	Estadios de Braak III o IV
<b>B3</b>	Estadios de Braak V o VI
<b>C. Puntuación de placas neuríticas</b> (modificado de CERAD <sup>61</sup> )	
<b>C0</b>	ausencia de placas neuríticas
<b>C1</b>	puntuación CERAD: escasas
<b>C2</b>	puntuación CERAD: moderadas
<b>C3</b>	puntuación CERAD: frecuentes

Empleando este sistema, la puntuación ABC puede transformarse en uno de los 4 niveles de cambios neuropatológicos de EA: “no”, “bajo”, “intermedio” o “alto” (**Tabla 5**). Niveles “intermedios” o “altos” de cambios neuropatológicos de EA se consideran suficiente explicación neuropatológica para la demencia en un individuo.

**Tabla 5. Niveles de cambios neuropatológicos de la EA<sup>58</sup>**

		<b>B: puntuación de ONFs</b> (estadios de Braak <sup>50, 56</sup> )		
<b>A: puntuación de A<math>\beta</math> o placas amiloideas</b> (fases Thal <sup>64</sup> )	<b>C: puntuación de placas neuríticas</b> (CERAD <sup>61</sup> )	<b>B0 o B1</b> (no o I/II)	<b>B2 (III/IV)</b>	<b>B3 (V/VI)</b>
<b>A0 (0)</b>	<b>C0 (no)</b>	No	No	No
<b>A1 (1/2)</b>	<b>C0 (0) o C1 (no o escasas)</b>	Bajo	Bajo	Bajo
	<b>C2 o C3 (moderadas a frecuentes)</b>	Bajo	Intermedio	Intermedio
<b>A2 (3)</b>	<b>Cualquier C</b>	Bajo	Intermedio	Intermedio
<b>A3 (4/5)</b>	<b>C0 (0) o C1 (no o escasas)</b>	Bajo	Intermedio	Intermedio
	<b>C2 o C3 (moderadas a frecuentes)</b>	Bajo	Intermedio	Alto

## 2. Taupatías distintas a la EA

### 2.1. Consideraciones generales

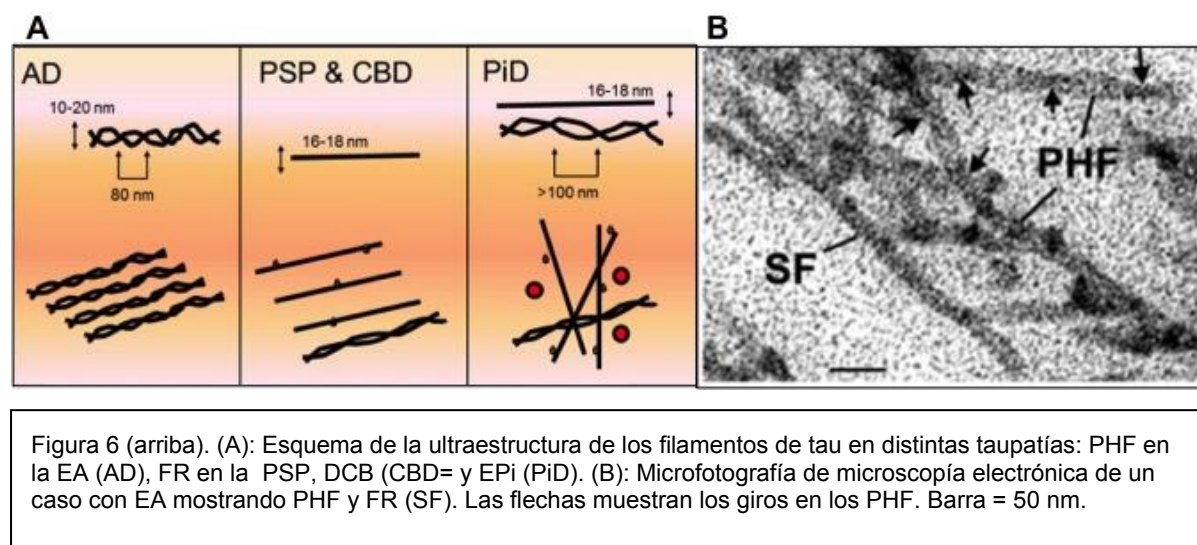
La presencia de agregados de proteína tau hiperfosforilada en el cerebro es una de las características distintivas de la EA, pero también de otras entidades neurodegenerativas llamadas globalmente taupatías.<sup>33, 70-72</sup> En este grupo se incluyen, aparte de la EA, formas de demencia frontotemporal (DFT) como la enfermedad de Pick (EPi),<sup>73</sup> la

parálisis supranuclear progresiva (PSP),<sup>74</sup> la degeneración corticobasal (DCB)<sup>75</sup> y varias formas hereditarias asociadas a mutaciones del gen *MAPT* en el cromosoma 17,<sup>76</sup> entre otras. A pesar de tener algunas similitudes inmunohistoquímicas, estas entidades se distinguen por sus manifestaciones clínicas, el tipo de lesiones neuropatológicas, la localización de los agregados de tau en el cerebro, el número de repeticiones del dominio de unión a microtúbulos de tau (3R vs 4R) y las características ultraestructurales de los agregados de tau (**Tabla 6 y Figura 6**).

**Tabla 6. Características de algunas taupatías**

<i>Entidad</i>	<i>Manifestaciones clínicas</i>	<i>Tipo de lesiones neuropatológicas</i>	<i>Localización de los agregados de tau</i>	<i>Número de repeticiones de dominio de unión a microtúbulos de tau</i>	<i>Características ultraestructurales de los filamentos de tau</i>
<b>EA</b>	Deterioro progresivo de memoria a corto plazo, lenguaje, funciones ejecutivas y visuoespaciales <sup>5</sup>	ONF, placas Aβ neuríticas, distrofias neuríticas <sup>69</sup>	Progresión temporal estereotípica: corteza entorrinal - corteza límbica - neocorteza <sup>50</sup>	3R ≈ 4R	PHF (10-20 nm) >> FR (15 nm) <sup>77</sup>
<b>EPI</b>	Variable: alteraciones de la conducta; afasia progresiva primaria; amnesia	Cuerpos de Pick, neuronas acromáticas hinchadas <sup>78</sup>	Hipocampo, fascia dentada <sup>78</sup>	3R > 4R	FR (15 nm) >> filamentos torcidos (15-30 nm) <sup>79</sup>
<b>PSP</b>	Síndrome de Richardson: inestabilidad postural con caídas hacia atrás, rigidez axial, bradicinesia, oftalmoplejía de la mirada vertical, disartria, disfagia. <sup>80</sup>	Ovillos globosos, astrocitos “en penacho”, cuerpos espirales <sup>81</sup>	Ganglios basales, sustancia negra, núcleo subtalámico <sup>81</sup>	4R > 3R	FR (15 nm) >> infrecuentes filamentos torcidos (15-30 nm) <sup>82</sup>
<b>DCB</b>	Variable: síndrome corticobasal; PSP-like; afasia progresiva primaria <sup>83</sup>	Placas astrocíticas, cuerpos espirales, neuronas hinchadas, hilos de neurópilo <sup>84</sup>	Neocorteza, ganglios basales, tálamo <sup>84</sup>	4R > 3R	FR >> filamentos torcidos (15-30 nm) <sup>85</sup>
<b>Taupatías hereditarias asociadas a mutación en el cromosoma 17</b>	Variable: cambios de personalidad, deterioro cognitivo y síntomas extrapiramidales.	Variable según la mutación.	Capas superficiales de la corteza frontal y temporal, ganglios basales	Variable según la mutación (ej. P301L: 4R; R406W: 3R+4R).	Variable según la mutación (ej. P301L: FR; R406W: PHF)

Figura 6. Ultraestructura de los filamentos de tau en las distintas taupatías<sup>71</sup>



## 2.2. Taupatías: entidades diagnósticas

### 2.2.1. Enfermedad de Pick

La EPI forma parte de un grupo heterogéneo de entidades que cursan con disfunción de los lóbulos frontal y temporal.<sup>86</sup> Sus manifestaciones clínicas dependen de la región cerebral más afectada e incluyen alteraciones de la conducta,<sup>87</sup> afasia progresiva primaria (APP) agramática o no fluente,<sup>88, 89</sup> amnesia,<sup>87</sup> lesión de motoneurona superior<sup>90</sup> y apraxia progresiva de las extremidades.<sup>91</sup>

Macroscópicamente existe una marcada atrofia de las cortezas frontal y temporal anterior. Sus características histopatológicas incluyen una pérdida neuronal severa, espongiosis, gliosis, neuronas hinchadas y las típicas inclusiones intraneuronales argirofílicas llamadas cuerpos de Pick (CPi, **Figura 7**).<sup>78</sup> Los CPi se localizan preferentemente en las neuronas de las capas II y VI de la neocorteza, en las células granulares del giro dentado y en las neuronas piramidales del hipocampo, subículo y corteza entorrinal. El mayor componente de los CPi es la tau hiperfosforilada.

**Figura 7. Patología tau en la EPi**

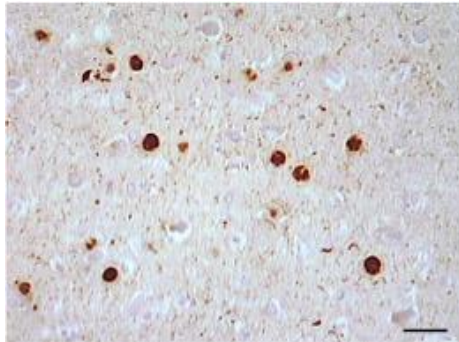


Figura 7 (izquierda). Cuerpos de Pick en la corteza temporal en un caso de EPi. Barra = 20µm.

Tau en los CPi adopta una ultraestructura de filamento recto (FR) de 10-15 nm de ancho predominantemente, aunque también se han observado filamentos similares a los PHF de 10-30 nm de ancho con vueltas cada 130-160 nm.<sup>92</sup> La isoforma exclusiva de tau en la EPi según su número de dominios de unión a microtúbulos es 3R.<sup>93</sup>

## 2.2.2. Parálisis supranuclear progresiva

La PSP es el síndrome parkinsoniano más común tras la Enfermedad de Parkinson. Su presentación clínica clásica es el Síndrome de Steele-Richardson-Olszewski, caracterizado por inestabilidad postural con frecuentes caídas hacia atrás, rigidez axial, bradicinesia sin respuesta a L-Dopa, disartria, disfagia, parálisis pseudobulbar y deterioro cognitivo de tipo subcortical.<sup>74, 80</sup> También se han descrito casos que se manifiestan como DFT,<sup>94</sup> APP no fluente y apraxia del habla<sup>95</sup> y acinesia pura con congelación de la marcha.<sup>96</sup>

Las regiones cerebrales más afectadas en la PSP son los ganglios basales, la sustancia negra en el mesencéfalo y el núcleo subtalámico.<sup>81</sup> Macroscópicamente existe una atrofia marcada del mesencéfalo con dilatación del acueducto, junto con atrofia del pedúnculo cerebeloso superior y del núcleo subtalámico. Histopatológicamente, se observan inclusiones de tau en las neuronas en forma de ONFs globosos e hilos de neuropilo, así como en las células gliales, tanto en los astrocitos (astrocitos “en penacho”) como en los oligodendrocitos (cuerpos espirales, **Figura 8**).<sup>97, 98</sup> También existe una marcada pérdida neuronal y gliosis en el núcleo subtalámico, el globo pálido, el tálamo ventral y el núcleo dentado del cerebelo.

Ultraestructuralmente, la mayoría de tau en la PSP se encuentra en forma de FR (15-20 nm de ancho), junto con infrecuentes filamentos torcidos.<sup>82</sup> La PSP se considera una taupatía 4R según el número de dominios de unión a los microtúbulos de tau.<sup>99</sup>

**Figura 8. Patología tau en la PSP**

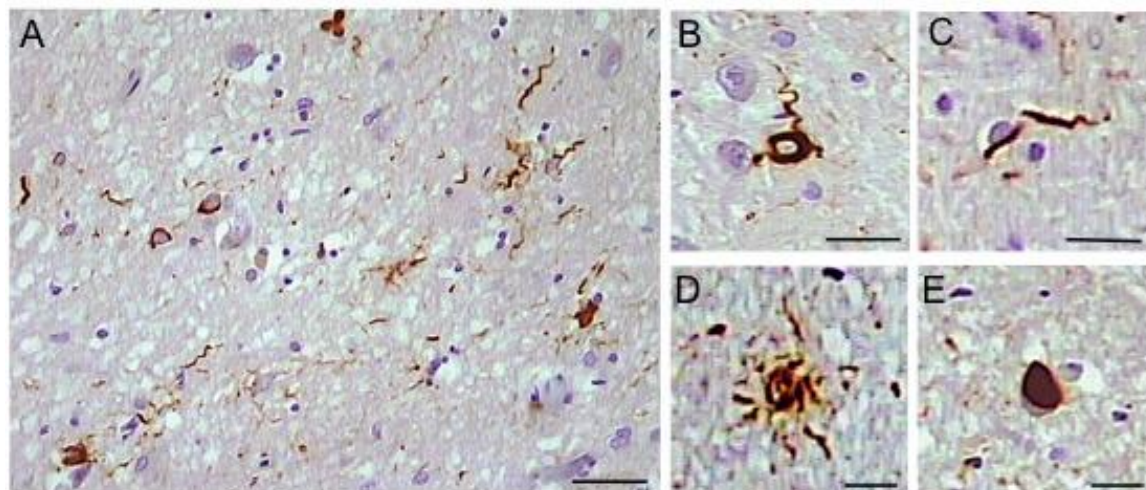


Figura 8 (arriba). Diversas lesiones formadas por agregados de tau en la PSP en el tálamo (A), incluyendo cuerpos espirales en los oligodendrocitos (B), hilos de neurópilo (C), astrocitos “en penacho” (D) y ovillos globosos (E). Barras = 50  $\mu$ m (A), 20  $\mu$ m (B-E).

### 2.2.3. Degeneración corticobasal

La DCB es una entidad muy poco frecuente, y sus características clínicas, bioquímicas y genéticas se solapan con las de la PSP, aunque se consideran entidades distintas neuropatológicamente.<sup>75, 100</sup> La presentación clínica de la DCB es muy variable y depende de la localización de la atrofia cortical y los agregados de tau. Se han descrito casos de síndrome corticobasal,<sup>101</sup> síndromes parecidos a la PSP,<sup>102</sup> DFT<sup>103</sup> y APP no fluente.<sup>104</sup>

La patología de la DCB afecta la corteza cerebral, los ganglios basales y en menor medida la sustancia negra en el mesencéfalo.<sup>105</sup> Macroscópicamente se observa una despigmentación de la sustancia negra y una atrofia asimétrica de las cortezas frontal y parietal. Existe una pérdida neuronal con espongiosis y gliosis. Los filamentos de tau hiperfosforilada se encuentran en las neuronas y también en las células gliales, tanto en los astrocitos (con las lesiones características de la DCB llamadas placas astrocíticas) como en los oligodendrocitos (formando cuerpos espirales). Las inclusiones tau



positivas en los hilos de neurópilo son muy abundantes tanto en la corteza como en la sustancia blanca (**Figura 9**).

**Figura 9. Patología tau en la DCB**

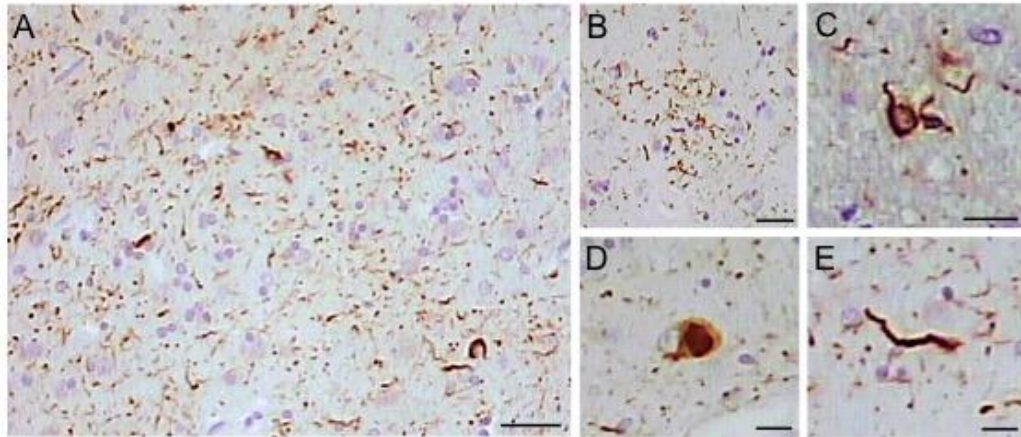


Figura 9 (arriba). Diversas lesiones formadas por agregados de la proteína tau en la DCB en el globo pálido (A), incluyendo placas astrocíticas (B), cuerpos espirales (C), ovillos globosos (D) e hilos de neurópilo (E). Barras = 50  $\mu$ m (A). 20  $\mu$ m (B-E).

En la DCB tau adopta predominantemente la ultraestructura de FR, aunque también existen algunos filamentos parecidos a los PHF.<sup>106</sup> La CBD se considera una taupatía 4R.<sup>107</sup>

### 2.2.2.4. Taupatías hereditarias asociadas a mutaciones en el cromosoma 17

Las DFT asociadas a una mutación del gen *MAPT* en el cromosoma 17 (DFT-17) son un grupo de síndromes de herencia autosómica dominante que cursan con características clínicas y neuropatológicas distintivas pero que a su vez se solapan con frecuencia.<sup>76</sup> Hasta la fecha se han descrito más de 25 mutaciones patogénicas en el gen *MAPT* en un gran número de familias con DFT-17.<sup>108</sup>

Neuropatológicamente las DFT-17 cursan con la presencia de abundante patología filamentosa formada por tau hiperfosforilada en las neuronas y células gliales. Existe una pérdida neuronal severa, con gliosis astrocítica y espongiosis, más pronunciada en las capas superficiales de las cortezas frontal y temporal, mientras que los ganglios basales son las estructuras profundas más afectadas.<sup>109, 110</sup>

Aquellas mutaciones en el exón 10 (E10) y en el intrón posterior al E10 causan lesiones que son bioquímica y estructuralmente distintas a aquellas causadas por las mutaciones fuera del E10. Estas últimas (ej. mutación R406W) están formadas por las 6 isoformas de tau,<sup>111</sup> mientras las lesiones derivadas de las primeras (ej. mutación P301L) solamente están compuestas por 4R. Asimismo, mientras que algunas mutaciones dan lugar a lesiones ultraestructuralmente indistinguibles a las de la EA,<sup>112</sup> otras son más parecidas a las de la EPI<sup>113</sup> o a las de la DCB.<sup>114</sup>

El fenotipo clínico de los individuos con DFT-17 también es muy variable, presentando manifestaciones que van desde la DFT (EPI, PSP o DCB) hasta una degeneración multisistémica. Algunas mutaciones pueden causar un fenotipo clínico diferente en distintas familias,<sup>115</sup> e incluso en diferentes miembros de una misma familia.<sup>116</sup> En general, se caracterizan por cambios de personalidad, síntomas motores y deterioro cognitivo. Los síntomas de presentación suelen ser desinhibición, pérdida de iniciativa, conductas obsesivo-compulsivas y psicosis. Estos van seguidos de un deterioro cognitivo progresivo que culmina en demencia, mientras que los síntomas extrapiramidales suelen ocurrir en fases avanzadas.

### 3. Biomarcadores en la EA y otras demencias

#### 3.1. Consideraciones generales

Un biomarcador es una característica biológica que puede medirse objetivamente y sirve de indicador de un proceso biológico normal, de un proceso fisiopatológico o de una respuesta a una intervención terapéutica.<sup>117</sup>

En la actualidad disponemos de varios tipos de biomarcadores para la EA, tanto de neuroimagen estructural (cuantificación volumétrica de la atrofia cerebral en la resonancia magnética nuclear (RMN)<sup>118</sup>) como funcional (tomografía con emisión de positrones (PET) con marcadores de glucosa,<sup>119</sup> amiloide<sup>120</sup> y más recientemente de tau<sup>121</sup>), así como medidas de tau y A $\beta$  en líquido cefalorraquídeo (LCR).<sup>10</sup> La cuantificación de los niveles de estos biomarcadores en múltiples sujetos ancianos cognitivamente sanos y pacientes en distintas fases del deterioro cognitivo ha permitido definir la secuencia temporal de las alteraciones biológicas subyacentes a la EA y crear modelos que permiten integrar las distintas trayectorias de los biomarcadores,

posibilitando un mejor entendimiento de las relaciones temporales entre ellos y con la aparición posterior del deterioro cognitivo (**Figura 10**).<sup>66, 67, 122</sup>

**Figura 10. Modelo de alteración temporal de los biomarcadores de la EA**<sup>122</sup>

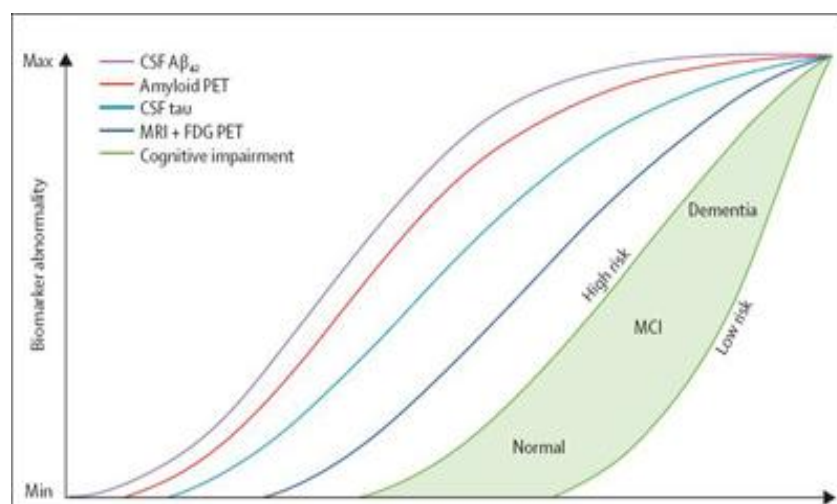


Figura 10 (izquierda). Modelo de curvas sigmoidales representando la aparición temporal y trayectorias de los distintos biomarcadores en la EA: la disminución de  $A\beta_{42}$  en el LCR y la captación de amiloide en la PET preceden al incremento de tau en el LCR, el hipometabolismo en la PET-FDG y los cambios estructurales en la RMN. La aparición de síntomas cognitivos es un evento final.

### 3.2. Utilidad de los biomarcadores en la EA

Las guías del NIA-AA Working Group enfatizan el concepto de EA como un espectro o continuo de enfermedad,<sup>123</sup> idea que es consistente con la presencia de cambios fisiopatológicos en el cerebro mucho tiempo antes del inicio de los síntomas y el desarrollo de demencia. Múltiples estudios de neuroimagen con PET-amiloide y análisis de LCR en portadores asintomáticos de mutaciones autosómicas dominantes en formas familiares de la EA, ancianos cognitivamente sanos y portadores del alelo APO E  $\epsilon 4$  han permitido detectar la presencia de  $A\beta$  15-20 años antes del inicio de la demencia,<sup>124-126</sup> y también se conoce por estudios de autopsia que la acumulación de ONFs en el lóbulo medial temporal es muy común a partir de los 60 años.<sup>50</sup> Esta larga fase prodrómica asintomática de la EA es el momento ideal de actuación para las terapias modificadoras de la enfermedad,<sup>123</sup> y es durante este periodo cuando los biomarcadores ofrecen una gran oportunidad para poder diagnosticar, estadiar y seguir la progresión de la enfermedad, así como para seleccionar a los candidatos adecuados para los ensayos clínicos. Los biomarcadores también sirven para comprender mejor las relaciones causales entre las distintas patologías que ocurren en la EA.



El screening de los candidatos para ensayos clínicos de terapias modificadoras de la EA con biomarcadores es esencial. Recientemente un estudio puso en evidencia que un 25% de los pacientes con sospecha clínica de EA leve-moderada incluidos en dos ensayo clínicos (con Solanezumab y Bapinezumab, ambos anticuerpo monoclonales contra A $\beta$ ) tenían una PET-amiloide negativa, indicando que no padecían EA y cuestionando si el fracaso del ensayo clínico fue debido a la ineficacia del fármaco o a la inclusión de sujetos inadecuados.<sup>127, 128</sup>

La prevención secundaria en la EA incluye aquellas intervenciones terapéuticas en individuos cognitivamente normales con evidencia de que el proceso de la enfermedad ya se ha iniciado en su cerebro y tiene como objetivo prevenir la aparición de los síntomas y la progresión a la fase sintomática de la EA. Aunque la mayoría de estos ensayos clínicos de prevención secundaria se diseñaron para incluir individuos con riesgo genético de EA (portadores asintomáticos de mutaciones en los genes *PPA*, *PSEN1* y *PSEN2*),<sup>129, 130</sup> otros están enfocados a población anciana cognitivamente sana que tiene un riesgo elevado de desarrollar deterioro cognitivo en el futuro basado en la positividad de sus biomarcadores para la EA. Uno de los ensayos de prevención secundaria más importantes en la actualidad, el ensayo A4 (Anti-Amyloid Treatment in Asymptomatic Alzheimer's Disease),<sup>131</sup> está evaluando la eficacia Solanezumab como prevención del deterior cognitivo en individuos cognitivamente sanos de 65-85 años de edad con biomarcadores de amiloide positivos. Los candidatos a entrar en el ensayo deben realizarse PET-amiloide, RMN estructural y funcional y cuantificación de tau y A $\beta$  en LCR (recientemente se añadió la realización de PET-tau en un subgrupo). La evaluación de los resultados se realiza valorando el cambio en una medida global de cognición con el tiempo, aunque también se comparan los cambios longitudinales en la retención *in vivo* de amiloide y tau en la PET entre el grupo que recibió tratamiento vs el grupo placebo.

### 3.3. Cuantificación de tau total, tau fosforilada y $\beta$ -amiloide en LCR

Los pacientes con DCL y demencia debido a EA muestran niveles reducidos de A $\beta_{42}$ <sup>132</sup> y niveles elevados de tau total<sup>133</sup> y tau fosforilada (tau-p)<sup>134</sup> en el LCR en comparación con sujetos cognitivamente sanos. Este perfil se ha denominado la firma biológica de la EA en LCR, y tiene una sensibilidad y especificidad de aproximadamente un 85-95%

para diferenciar pacientes con EA de controles sanos.<sup>10, 135</sup> Esta combinación de biomarcadores ha sido aceptada como evidencia *in vivo* de la patología Alzheimer, y ha sido incorporada en los nuevos criterios diagnósticos del National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Alzheimer's and Related Disorders como característica de apoyo en el diagnóstico de la EA.<sup>136</sup> En la práctica, se usan índices que correlacionan los tres parámetros ( $A\beta_{42}$ , tau total y tau-p) que tienen un mejor rendimiento diagnóstico que cada uno de ellos por separado.<sup>137</sup>

Los niveles de  $A\beta_{42}$  en LCR en pacientes con EA están reducidos en un 50% respecto a los de controles sanos.<sup>138</sup> Existe una correlación inversa entre los niveles de  $A\beta_{42}$  en LCR y el número de placas seniles en la autopsia,<sup>139</sup> así como la captación *in vivo* de amiloide fibrilar en la PET.<sup>140</sup> La concentración de  $A\beta_{40}$  en el LCR, por otro lado, no varía en la EA respecto a controles sanos.<sup>141</sup> La disminución de  $A\beta_{42}$  en LCR no es específica de la EA y se ha demostrado también en el traumatismo craneoencefálico grave,<sup>142</sup> lupus eritematoso sistémico,<sup>143</sup> uso de ciertos anestésicos,<sup>144</sup> demencia asociada al VIH,<sup>145</sup> atrofia multisistémica (AMS),<sup>146</sup> AAC<sup>147</sup> y leucoencefalopatía vascular subcortical.<sup>148</sup> Los niveles de  $A\beta_{42}$  en LCR tienen una oscilación circadiana, por lo que es importante a tener en cuenta la hora en la que se realiza la punción lumbar.<sup>149</sup>

En la EA los niveles de tau total en LCR están aumentados en un 300% y los de tau-p en un 200% respecto a los de controles sanos.<sup>138</sup> La elevación de tau total en el LCR es muy sensible (alrededor de un 90%)<sup>150</sup> pero poco específico, ya que también ocurre tras un ictus,<sup>151</sup> traumatismo craneoencefálico,<sup>142</sup> demencia con cuerpos de Lewy<sup>152</sup> y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.<sup>153</sup> La tau-p que suele detectarse en la mayoría de ensayos de ELISA disponibles está fosforilada en al menos la posición treonina 181<sup>154</sup> y aporta más especificidad que la tau total en el diagnóstico diferencial de la EA.<sup>155</sup> Concentraciones más elevadas de tau total y tau-p se asocian a enfermedad más avanzada y a una progresión más rápida de la misma.<sup>156</sup>

La firma biológica de la EA en el LCR también es capaz de discriminar la EA de otras demencias, especialmente las DFT, con una sensibilidad y especificidad mayor del 70%.<sup>157</sup> Por otro lado, la demencia vascular,<sup>158</sup> demencia asociada a la enfermedad de Parkinson o DCLw<sup>159</sup> no son claramente distinguibles de la EA por el perfil de biomarcadores en LCR.

### 3.4. Neuroimagen con tomografía por emisión de positrones (PET)

#### 3.4.1. Consideraciones generales

La PET es una técnica de imagen no invasiva que usa la señal de moléculas marcadas con isótopos emisores de positrones para visualizar y medir *in vivo* procesos bioquímicos de la biología humana.

Los tomógrafos o cámaras de PET adquieren imágenes en 2D o 3D en forma de estudios estáticos o dinámicos y reconstruyen imágenes volumétricas con una muy buena resolución. El procesamiento informático permite el coregistro y fusión de las imágenes de PET con imágenes de tomografía computarizada (TC) o de RMN para una mejor evaluación de las estructuras anatómicas subyacentes.

Los radioisótopos emisores de positrones más empleados en la PET ([C-11], [N-13], [O-15] y [F-18]) son producidos en un ciclotrón y la mayoría tienen un período de semidesintegración muy corto ([C-11] 20 min, [N-13] 10 min, [O-15] 2 min) por lo que su uso está limitado exclusivamente a los centros que disponen de un ciclotrón propio. El [F-18] tiene una vida media más larga (110 min), permitiendo su traslado a otros centros cercanos para su uso inmediato.

#### 3.4.2. PET-amiloide

La PET-amiloide permite detectar en vida del paciente la presencia y localización de depósitos cerebrales de A $\beta$  fibrilar. El primer compuesto para PET-amiloide, llamado Pittsburgh Compound B (PiB),<sup>160</sup> unido a [C-11], fue descubierto hace más de una década y tuvo un gran impacto tanto en el diagnóstico como en la investigación de la EA. Más tarde se desarrollaron nuevos trazadores unidos a [F-18]: Florbetapir,<sup>161</sup> Flutemetanol<sup>162</sup> y Florbetaben.<sup>163</sup>

Múltiples estudios han demostrado que los pacientes diagnosticados clínicamente de EA tienen una captación *in vivo* en la PET-amiloide de dos a tres veces mayor que ancianos cognitivamente sanos en las cortezas frontal, temporal y parietal (**Figura 11**), regiones en las que se sabe se acumulan grandes cantidades de placas A $\beta$  en el postmortem.<sup>11, 164, 165</sup> Por el contrario, en el cerebelo, la protuberancia y la sustancia blanca, regiones libres de patología A $\beta$ , la señal de los trazadores es insignificante.

**Figura 11. PET-amiloide en controles sanos y pacientes con enfermedades neurodegenerativas<sup>11</sup>**

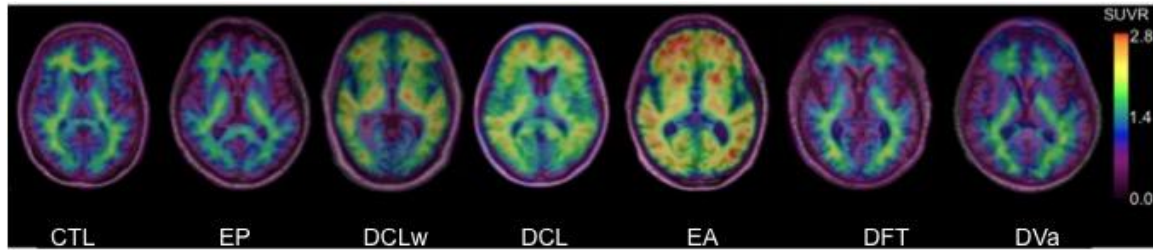


Figura 11 (arriba). Imágenes axiales de PET-Florbetaben coregistradas con RMN en un anciano cognitivamente sano (CTL), un paciente con enfermedad de Parkinson (EP), un paciente con DCLw, un paciente con deterioro cognitivo leve DCL, un paciente con EA, un paciente con DFT y un paciente con demencia vascular (DVa). En el sujeto CTL y los pacientes con EP, DFT y DVa solamente se observó una señal subcortical no específica, mientras que en los paciente con EA, DCL y DCLw la captación del trazador se evidenció en distintas regiones corticales.

Estudios de neuroimagen con PET-amiloide en sujetos asintomáticos portadores de una de las mutaciones del gen de la presenilina 1 (*PSEN1*) que causa una forma familiar de EA<sup>166</sup> sugieren que la acumulación de A $\beta$  puede ser evidente hasta 20 años antes del estadio de demencia.<sup>167</sup>

La carga de A $\beta$  medida *in vivo* en la PET no se asocia con la severidad del deterioro cognitivo en la EA,<sup>168</sup> hallazgo que es consistente con los estudios poblacionales de autopsia.

Múltiples estudios de correlación radiológica-patológica han confirmado que la señal *in vivo* de la PET-amiloide se asocia significativamente con la presencia de A $\beta$  en el examen neuropatológico.<sup>162, 169-177</sup> Estudios *in vitro* demostraron que estos trazadores detectan dos tipos de lesiones compuestas por A $\beta$  fibrilar: las placas amiloideas (esencialmente en forma de placas neuríticas pero también placas difusas con menor afinidad) y el depósito de A $\beta$  en la pared de los vasos en forma de AAC (**Figura 12**),<sup>178, 179</sup> aunque no es posible diferenciarlas por la señal *in vivo*. Ambas lesiones son muy frecuentes en la población anciana con y sin demencia. La AAC suele estar asociada a la EA, pero en ocasiones ocurre en solitario y si es lo suficientemente severa puede asociarse a demencia.<sup>180</sup> Se han publicado varios casos estudiados con PET-amiloide y autopsia en que la elevada captación del trazador era debida únicamente a la presencia de AAC en ausencia de placas de A $\beta$ .<sup>169, 181</sup>

Figura 12. Tinción de PiB en placas amiloideas y AAC

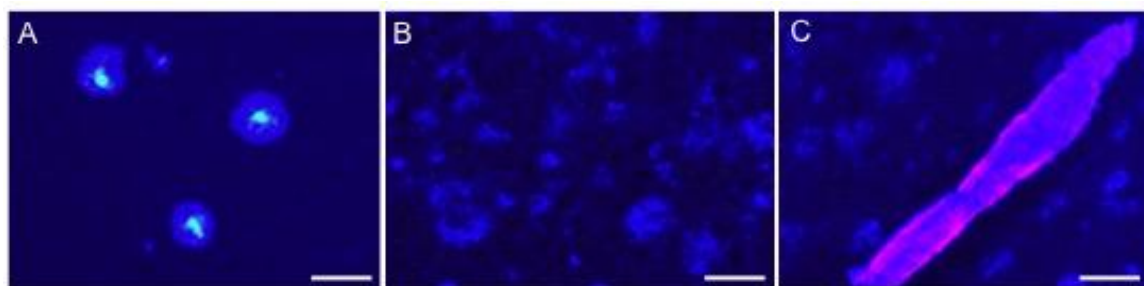


Figura 12 (arriba). Tinción con el compuesto fluorescente PiB en placas A $\beta$  neuríticas (A), placas A $\beta$  difusas (B) y depósitos de A $\beta$  en la pared de vasos en forma de AAC (C) en tejido de la corteza occipital de un caso con EA. Barra = 50  $\mu$ m.

La PET-amiloide es una herramienta más en el proceso diagnóstico de la EA. Es importante enfatizar que la positividad de la PET-amiloide no es equivalente a un diagnóstico de EA sino a la presencia de A $\beta$  fibrilar en el cerebro. Una PET-amiloide positiva no determina por si sola que la causa del deterioro cognitivo en un individuo sea la EA, ya que también puede ser positiva en otras entidades como la DCLw<sup>182, 183</sup> y la AAC aislada.<sup>184</sup>

Otra limitación importante de la PET-amiloide como herramienta diagnóstica de la EA es su elevada positividad en la población anciana cognitivamente sana. Se ha estimado que entre la población de 60-70 años, un 10% tiene una PET-amiloide positiva, entre los 70-80 años un 25% y entre los 80-90 años llega hasta un 50%,<sup>185, 186</sup> datos que están en concordancia con estudios de autopsia<sup>53, 187</sup> y de LCR.<sup>188</sup> Se desconoce si todos los ancianos cognitivamente sanos con evidencia de patología amiloide cerebral progresarán en un futuro a demencia, pero varios estudios han sugerido que muchos de estos individuos están en fase “preclínica” de la EA<sup>123</sup> y tienen un riesgo aumentado de desarrollar deterioro cognitivo y progresar a la fase sintomática de la EA al compararlos con aquellos con una PET-amiloide negativa.<sup>189, 190</sup>

No se considera adecuado realizar una PET-amiloide en todos los pacientes que consultan por deterioro cognitivo, sino que solamente está indicada en un subgrupo de pacientes cuyo diagnóstico es incierto tras una evaluación completa por un médico experto en demencias. En 2013 la Amyloid Imaging Task Force junto con la Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging y la Alzheimer’s Association formularon los criterios para un uso adecuado de la PET-amiloide (**Tabla 7**).<sup>191, 192</sup>

**Tabla 7. Criterios para un uso adecuado de la PET-amiloide**<sup>191, 192</sup>

El uso de la PET-amiloide es <b>apropiado</b> en las situaciones enumeradas más abajo (1-3) en los individuos con las siguientes características: (i) quejas cognitivas con déficits confirmados objetivamente; (ii) la EA es uno de los diagnósticos posibles considerados, pero el diagnóstico es incierto tras una completa evaluación por un experto en demencias; y (iii) cuando el conocimiento de la presencia o ausencia de patología A $\beta$ aumentará la certeza diagnóstica y alterará el manejo y tratamiento del paciente.	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pacientes con DCL persistente o progresivo sin explicación</li> <li>2. Pacientes que cumplen los criterios centrales de posible EA debido a presentación clínica poco clara, incluyendo un curso clínico atípico o bien una presentación con etiología mixta</li> <li>3. Pacientes con demencia progresiva y edad de inicio atípicamente precoz (definida normalmente por edad igual o menor a 65 años).</li> </ol>	
La PET-amiloide es <b>inapropiada</b> en las siguientes situaciones:	
<ol style="list-style-type: none"> <li>4. Pacientes que cumplen los criterios centrales de probable EA con una edad de inicio típica</li> <li>5. Para determinar la severidad de la demencia</li> <li>6. Basada solamente en una historia familiar positiva de demencia o la presencia de apolipoproteína E (APOE) <math>\epsilon</math>4</li> <li>7. Pacientes con quejas cognitivas que no son confirmadas tras el examen clínico</li> <li>8. En vez del genotipo en sospecha de portadores de mutación autosómica</li> <li>9. En individuos asintomáticos</li> <li>10. Para uso no médico (ej. legal, cobertura de seguro médico, chequeo laboral)</li> </ol>	

### 3.4.3. PET-tau

#### 3.4.3.1. Consideraciones generales

Hasta muy recientemente, la presencia, severidad y distribución anatómica de las lesiones de tau en el cerebro no podían ser evaluadas directamente en vida del paciente, pero esto ha cambiado con la aparición de los trazadores de PET específicos para tau.<sup>12, 193-195</sup> La neuroimagen molecular va a jugar un papel esencial en el diagnóstico y manejo de los pacientes con EA y otras demencias en un futuro próximo. Actualmente varios candidatos para marcador de tau para PET están validándose en tejido cerebral y en estudios *in vivo* en sujetos cognitivamente sanos y pacientes con demencias. Estos trazadores pueden facilitar la detección precoz y aumentar la precisión diagnóstica en la EA y otras taupatías, así como permitir la cuantificación de la carga de tau en el cerebro, cosa que podría resultar esencial para evaluar la progresión de la enfermedad y la respuesta a futuras terapias anti-tau, así como para entender mejor la relación de tau con otros biomarcadores de la EA (**Tabla 8**).<sup>12, 196, 197</sup>

**Tabla 8. Potenciales aplicaciones de la PET-tau**<sup>12, 196, 197</sup>

Clínica:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diagnóstico diferencial entre EA y otras demencias</li> <li>• Mejorar la especificidad del diagnóstico de EA</li> <li>• Monitorización no invasiva de la patología tau en pacientes con EA</li> <li>• Marcador sustituto de deterioro cognitivo y predictor de la progresión en la EA</li> <li>• Detección precoz de patología en sujetos a riesgo de padecer EA</li> <li>• Diferenciación del envejecimiento normal vs fases prodrómicas de EA en población anciana</li> </ul>
Investigación:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Replicar los estadios patológicos de Braak<sup>50</sup> del depósito regional de ONFs en vida del paciente</li> <li>• Valorar la cantidad de patología tau a nivel regional</li> <li>• Valorar la relación entre los depósitos regionales de tau y los depósitos de A<math>\beta</math></li> <li>• Valorar la relación entre los depósitos regionales de tau y el metabolismo de la glucosa</li> <li>• Valorar la relación entre los depósitos regionales de tau y la atrofia cortical</li> <li>• Valorar la relación entre los depósitos regionales de tau y los síntomas focales en variantes clínicas de la EA</li> </ul>
Ensayos clínicos de nuevas terapias modificadoras de la enfermedad:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Selección de candidatos adecuados para los ensayos clínicos</li> <li>• Evaluación de la eficacia del tratamiento</li> </ul>

La identificación de trazadores de PET para tau ha resultado mucho más compleja que la de marcadores para  $\beta$ -amiloide. Hay varios factores que han influido en este hecho, como son las características idiosincráticas de tau, su localización intracelular, las múltiples modificaciones postranslacionales que sufre y sus varias isoformas y conformaciones ultraestructurales (**Tabla 9**).<sup>198</sup>

**Tabla 9. Dificultades para la identificación de un trazador para PET-tau**<sup>198</sup>

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Localización intracelular de tau: el trazador deberá cruzar primero la barrera hematoencefálica (BHE) y luego la membrana celular para alcanzar su diana</li> <li>• Múltiples isoformas y ultraestructura de los filamentos de tau en las distintas taupatías<sup>199</sup></li> <li>• Múltiples modificaciones postranslacionales de tau: fosforilación, acetilación, glicosilación, nitración, glicación, ubiquitinación y truncamiento<sup>200</sup></li> <li>• Presencia de agregados de tau en la corteza cerebral así como en la sustancia blanca</li> <li>• Coexistencia de los agregados de tau con los depósitos de A<math>\beta</math> en la EA<sup>201</sup></li> <li>• Menor concentración de tau que de A<math>\beta</math> en la EA<sup>201</sup></li> </ul>
---

Por todos estos factores, los requisitos de un buen marcador de PET para tau son muy estrictos, siendo las características más importantes su lipofilicidad y su afinidad de unión a la diana (**Tabla 10**).

Tabla 10. Requisitos de un trazador de PET-tau<sup>12</sup>

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elevada selectividad para tau respecto a A<math>\beta</math> (20-50 veces)<sup>202</sup> para compensar la mayor concentración de A<math>\beta</math> en la EA</li> <li>• Elevada afinidad de unión a tau</li> <li>• Habilidad para cruzar la BHE: debe ser una molécula pequeña y lipofílica, con log P<sub>OCT</sub> (coeficiente de separación octano/agua) entre 1-3<sup>203, 204</sup></li> <li>• Facilidad para ser marcado con radioisótopos de larga vida media, como el [F-18]</li> <li>• Reducida unión a dianas no específicas</li> <li>• Rápido aclarado de la sangre</li> <li>• Ausencia de metabolitos activos</li> </ul>
--

Los polimorfismos ultraestructurales y la distribución regional de los agregados de tau en el cerebro son característicos de cada taupatía.<sup>71</sup> La especificidad cada trazador de tau (determinando si se une solamente a una o a todas las conformaciones de la proteína) determinará su utilidad para el diagnóstico y diferenciación de la EA del resto de taupatías.

### 3.4.3.2. PET-[F-18]-AV-1451

#### 3.4.3.2.1. Consideraciones generales y validación en tejido cerebral

El nuevo trazador [F-18]-AV-1451 fue elegido entre una biblioteca de más de 900 compuestos de distintas categorías químicas que originalmente habían sido diseñados para unirse a  $\beta$ -amiloide.<sup>205</sup>

El compuesto fluorescente T726 (N-2(fluoroethyl)-N-methyl-5H-pyrido[3,2-b]indol-7-amine) fue identificado inicialmente como posible candidato a trazador de tau al mostrar una elevada afinidad para tau-PHF y ausencia de actividad monoaminoxidasa en estudios preliminares.<sup>205</sup> Las tinciones con T726 en cerebros con patología tipo EA confirmaron que éste se colocalizaba con la tinción del anticuerpo anti-tau PHF-1 en los ONFs, hilos de neurópilo y distrofias neuríticas, pero no con la tinción contra A $\beta$  en las placas amiloideas.<sup>205</sup> Posteriormente se optimizó un radiotrazador a partir de T726 creándose un análogo parecido a éste, T807 (7-(6-fluoropyridin-3-yl)-5H-pyrido[4,3-b]indole), sin propiedades fluorescentes, que posteriormente pasó a llamarse AV-1451. AV-1451 pertenece a la familia química de los carbazoles y tiene una estructura similar, pero no idéntica, a T726 (**Figura 13**). Ambos compuestos compiten por la unión a su diana al ser incubados en la misma sección de tejido cerebral.



**Figura 13. Estructuras químicas de T726 y T807**

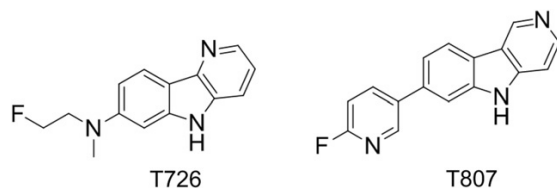


Figura 13 (izquierda). Estructuras químicas de T726 (N-2(fluoroethyl)-N-methyl-5H-pyrido[3,2-b]indol-7-amine) y T807 (7-(6-fluoropyridin-3-yl)-5H-pyrido[4,3-b]indole).

El estudio inicial que evaluó la afinidad y selectividad de T807 en cerebros humanos consistió en autorradiografía con pantalla de fósforo en 26 cerebros con y sin patología tau y A $\beta$ .<sup>205</sup> En todas las secciones de tejido, la señal de [F-18]-AV-1451 en autorradiografía se colocalizaba claramente con la tinción de tau-PHF en la corteza, pero no con la de A $\beta$  (**Figura 14**). La señal en la sustancia blanca en los casos de EA fue indetectable. En el tejido de controles sanos sin patología tau ni A $\beta$ , no se detectó señal de [F-18]-AV-1451. Adicionalmente, se halló una correlación entre la intensidad de la señal de [F-18]-AV-1451 en la autorradiografía y la carga de tau-PHF. AV-1451 demostró tener una selectividad 25 veces mayor para tau (en forma de PHF) que para A $\beta$  (Kd=14.6 nM). En estudios de PET en ratones [F-18]-AV-1451 demostró unas cinéticas de captación y lavado del cerebro favorables, con ausencia de sus metabolitos plasmáticos en el cerebro. Al ser su peso molecular bajo (262.1 g/mol) AV-1451 cruzó fácilmente la BHE.<sup>206</sup>

**Figura 14. Autorradiografía con [F-18]-AV-1451 e inmunotinciones para tau-PHF y A $\beta$ <sup>205</sup>**

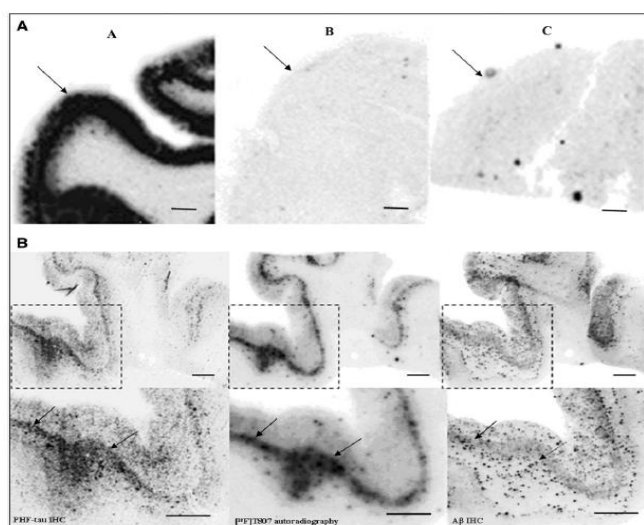


Figura 14 (izquierda). En la parte superior: la señal de [F-18]-AV-1451 en la autorradiografía únicamente estaba presente en tejido cerebral con abundantes agregados tau-PHF (A), pero no en casos con patología A $\beta$  pero en ausencia de tau (B), ni en tejido de controles sanos sin tau ni A $\beta$  (C). En la parte inferior: la señal de [F-18]-AV-1451 en la autorradiografía (medio) se asemeja a la tinción con un anticuerpo anti tau-PHF (izquierda) pero no al patrón de tinción de A $\beta$  (derecha).

Tabla 11. Características de [F-18]-AV-1451<sup>197</sup>

Radioisótopo	F-18
Peso molecular (g/mol)	262.1
Dosis administrada Dosis efectiva corporal	10 mCi = 370 mBq 8.92 mSv
<i>In vitro</i> : Kd (nM) en cerebro con EA Selectividad tau vs A $\beta$	14.6 >25
<i>In vivo</i> : Captación máxima en el cerebro de ratón Captación máxima a los 30 min en el cerebro de ratón Captación cerebral de metabolitos Unión a la sustancia blanca	4.43 7.15 Ausente Baja

AV-1451 se administra de forma endovenosa a una dosis de 10 mCi (370 mBq) para alcanzar una dosis efectiva corporal de 8.92 mSv. La cuantificación de la retención de [F-18]-AV-1451 se realiza a los 80-100 min tras la inyección inicial del trazador. Hasta la fecha no se ha reportado ningún efecto adverso tras la administración del trazador para la realización de la PET.<sup>194</sup>

### 3.4.3.2.2. Neuroimagen *in vivo* con PET-[F-18]-AV-1451

#### 3.4.3.2.2.1. Captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 en pacientes con EA y ancianos cognitivamente sanos

Varios estudios han evaluado recientemente la señal *in vivo* de [F-18]-AV-1451 en sujetos controles y pacientes con deterioro cognitivo, sugiriendo que este compuesto es potencialmente un buen biomarcador para la proteína tau en la EA. Johnson et al.<sup>1</sup> estudió con PET-[F-18]-AV-1451 y PET-[C-11]-PiB a 56 sujetos ancianos cognitivamente sanos, 13 individuos con DCL y 6 pacientes con demencia tipo EA (excluyéndose aquellos con variantes atípicas como DCLw, ACP o demencia semántica). Este estudio demostró que los individuos con DCL y demencia tipo EA tenían una elevada captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 comparado con el grupo de ancianos cognitivamente sanos de forma generalizada en la neocorteza y especialmente en las cortezas temporal inferior, temporal lateral, parietal, parieto-occipital, precúneo y cíngulo posterior, zonas en las que típicamente se depositan ONFs en la EA (**Figuras 15 y 16**). La señal de [F-18]-AV-1451 en el giro temporal inferior se asoció a deterioro cognitivo. También se halló una correlación significativa entre la captación regional de

## INTRODUCCIÓN

[F-18]-AV-1451 y la señal media de PiB en la corteza en estos sujetos, tanto aquellos cognitivamente sanos como los que padecían deterioro cognitivo.

Figura 15. PET-[F-18]-AV-1451 en la EA, el DCL y ancianos cognitivamente sanos<sup>1</sup>

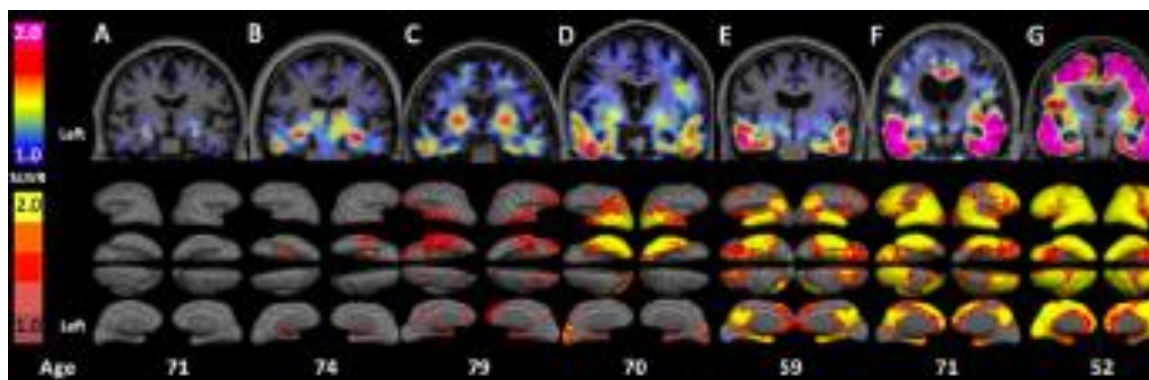


Figura 15 (arriba). Imágenes coronales (parte superior) y mapas de superficie cortical (parte inferior) de la PET-[F-18]-AV-1451 en tres sujetos ancianos cognitivamente sanos (A, B y C), dos individuos con DCL (D y E) y dos pacientes con EA (F y G). Los sujetos cognitivamente sanos mostraron captación ausente (A) o mínima en el lóbulo temporal inferior (B y C). La captación de [F-18]-AV-1451 en los individuos con deterioro cognitivo, todos ellos con un PET-PiB positivo, se extendía sucesivamente hacia las cortezas temporal, parietal, frontal y occipital (D-G).<sup>1</sup>

Figura 16. Contraste de la captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 entre individuos con deterioro cognitivo y ancianos cognitivamente sanos<sup>1</sup>

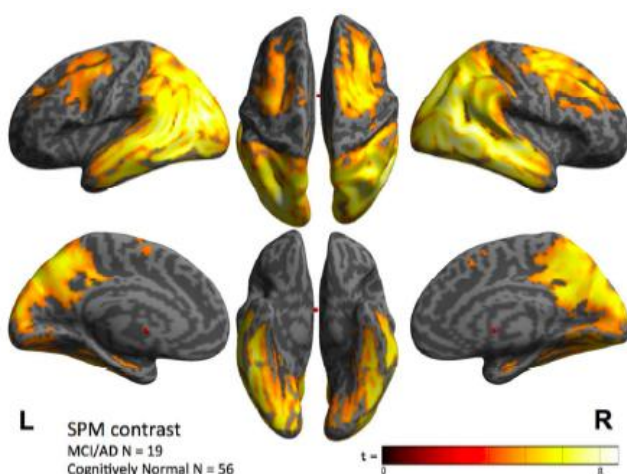


Figura 16 (izquierda). Mapas de superficie cortical mostrando aquellas regiones cerebrales donde la retención *in vivo* de [F-18]-AV-1451 fue significativamente mayor en un grupo de sujetos con deterioro cognitivo (incluyendo DCL y demencia tipo EA, n=19) comparado con ancianos cognitivamente sanos (n=56).

Gordon et al. describió una elevada retención *in vivo* de [F-18]-AV-1451 en 11 sujetos con demencia en el lóbulo temporal medial, la unión temporoparietal, el cíngulo posterior, el precúneo, la corteza medial frontal y la corteza prefrontal dorsal.<sup>207</sup>

Comparados con 41 ancianos cognitivamente sanos, el grupo de sujetos con demencia exhibieron una señal *in vivo* significativamente más elevada en el lóbulo temporal medial, cortezas parietal y occipital, así como en la corteza frontal medial.

Cho et al. describió la captación de [F-18]-AV-1451 en 20 pacientes con EA, 15 pacientes con DCL y 20 ancianos cognitivamente sanos, a los que también se les realizó examen neuropsicológico, RMN y PET-[F-18]-Florbetaben.<sup>208</sup> En los pacientes con DCL, la señal *in vivo* de [F-18]-AV-1451 estaba limitada a la CE, mientras que en aquellos con EA la captación del trazador se extendía a toda la neocorteza. En el grupo de pacientes con deterioro cognitivo (DCL y EA) la captación de [F-18]-AV-1451 en la neocorteza se relacionó con una peor función cognitiva, específicamente las funciones visuales y de memoria verbal se asociaron con la señal del trazador en las regiones temporales mediales.

En los cerebros de sujetos controles jóvenes no se evidencia ninguna captación significativa del trazador más allá de un patrón difuso de actividad de fondo.<sup>209</sup> Muchos sujetos ancianos cognitivamente sanos muestran un acúmulo *in vivo* de [F-18]-AV-1451 en la corteza temporal medial, que a su vez se asocia con pérdidas de memoria episódica.<sup>210</sup> Solamente en aquellos con una PET-amiloide positiva la captación de [F-18]-AV-1451 se extiende más allá de la corteza temporal medial, y se correlaciona con déficits cognitivos más extensos (**Figura 17**).<sup>211</sup>

**Figura 17. Comparación entre captación de amiloide en la PET-[C-11]-PiB y la captación de tau en la PET-[F-18]-AV-1451 en ancianos cognitivamente sanos y pacientes con EA<sup>211</sup>**

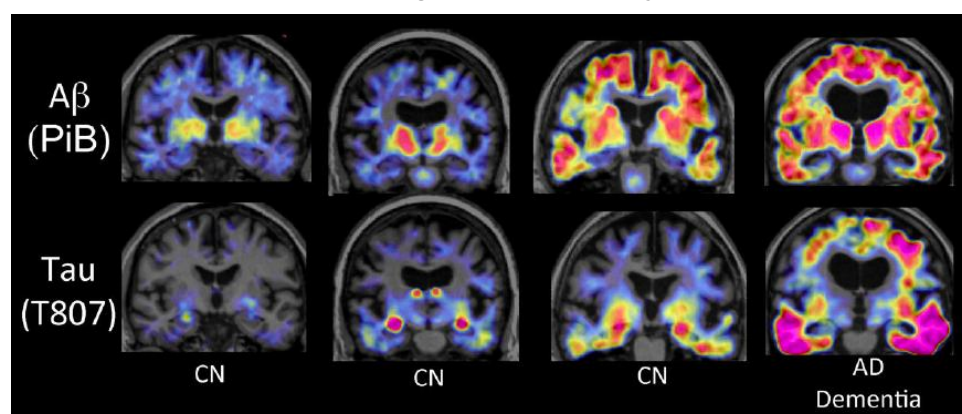


Figura 17 (página anterior). Comparación entre la captación del marcador de amiloide [C-11]-PiB (fila de arriba) y la captación del marcador de tau [F-18]-AV-1451 (fila de abajo) en los mismos sujetos: tres ancianos cognitivamente sanos (CN, columnas 1-3 a la izquierda) y un paciente con demencia tipo EA (AD dementia, columna derecha). En los sujetos controles sin déficit cognitivo se observa como al aumentar la carga de amiloide los niveles de tau también se incrementan, especialmente en la corteza temporal inferior. En el paciente con EA, la captación de amiloide está homogéneamente distribuida por todo el cerebro mientras que la de tau predomina en los lóbulos temporales.

Aquellos individuos portadores del alelo *APOE*  $\epsilon$ 4 tienen una mayor señal de [F-18]-AV-1451 en las cortezas temporales y parietales comparados con no portadores.<sup>196</sup>

### 3.4.3.2.2. Captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 y severidad de la EA

Varias publicaciones han evaluado recientemente la capacidad de [F-18]-AV-1451 para monitorizar *in vivo* la severidad de la EA, concluyendo que la señal regional de este trazador coincide con la distribución topográfica de los agregados neurofibrilares de tau según los estadios de Braak.<sup>210, 212, 213</sup> Schwarz et al. describió los patrones regionales de progresión de [F-18]-AV-1451 en 14 adultos jóvenes, 42 ancianos cognitivamente sanos, 87 sujetos con DCL y 46 pacientes con demencia tipo EA.<sup>212</sup> Se aplicó un algoritmo basado en los estadios histopatológicos de Braak<sup>50</sup> usando siete regiones en el lóbulo temporal anterior y el lóbulo occipital en la PET-[F-18]-AV-1451. Estos análisis produjeron unos perfiles de captación en el PET que reflejaban la progresión de tau en el cerebro y que eran consistentes con los estadios de Braak del 0 al IV, y permitieron clasificar correctamente a un 86% de los sujetos del estudio. Los casos restantes que no pudieron ser clasificados según este algoritmo tenían perfiles consistentes con variantes de la EA. Estos estadios de Braak estimados por la PET-[F-18]-AV-1451 se asociaron significativamente con la categoría diagnóstica (controles vs DCL vs demencia tipo EA), el estatus PET-amiloide del sujeto (positivo vs negativo) y las medidas globales de cognición. No obstante, la prevalencia de casos con estadios Braak mayor de cero (con presencia de tau) fue menor de lo esperado según lo que indican datos poblacionales de autopsia, y esto podría reflejar la menor sensibilidad de la PET comparada con la neuropatología, requiriendo una cantidad sustancial de ONFs para ser visualizados en neuroimagen.

Schöll et al. también describió los patrones de depósito regional de tau con PET-[F-18]-AV-1451 en una cohorte formada por 33 sujetos jóvenes, 5 ancianos cognitivamente

sanos y 15 pacientes con EA.<sup>210</sup> Se analizaron los datos de PET en varias regiones cerebrales a nivel bilateral y crearon un algoritmo que clasificó a los sujetos en 4 grupos: Braak 0, I-II, III-IV y V-VI. Todos los adultos jóvenes estaban en la categoría de Braak 0, mientras que los ancianos cognitivamente sanos claramente mostraron retención del trazador en regiones mediales temporales, la mayoría (76%) siendo clasificados como Braak I-II y un 18% como Braak III-IV. Aquellos con una PET-PiB positiva mostraron una mayor captación del trazador que se extendía a regiones temporales inferiores y laterales. Los pacientes con EA se clasificaron casi en su totalidad (13/15) como Braak V-VI, el resto (2/15) como Braak III-IV. Los sujetos con un mayor estadio de Braak medido con la PET-[F-18]-AV-1451 exhibían una mayor captación de amiloide en la PET- PiB, un mayor porcentaje de alelos ApoE  $\epsilon$ 4, peores puntuaciones en los tests cognitivos y un volumen del hipocampo más reducido en la RMN.

Por último, Cho et al. estudió con PET-[F-18]-AV-1451 y PET-[F-18]-Florbetaben una cohorte de 195 individuos (53 pacientes con EA, 52 con DCL amnésico, 23 con DCL no amnésico y 67 controles cognitivamente normales).<sup>213</sup> Se observaron distintos patrones de propagación de tau y amiloide en la cohorte: la captación de tau se observó con más frecuencia en regiones temporales mediales y desde allí se extendía a regiones temporales basales y laterales, parietales inferiores, cíngulo posterior y otras cortezas asociativas siendo las últimas regiones en afectarse las cortezas primarias, siguiendo los estadios de Braak,<sup>50</sup> mientras que la señal de amiloide se observó con más frecuencia en áreas difusas de la neocorteza y se propagaba finalmente a regiones temporales mediales, reflejando los estadios de Thal.<sup>64</sup>

### 3.4.3.2.2.3. Captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 en variantes atípicas de la EA

La PET-[F-18]-AV-1451 también ha demostrado su potencial utilidad en la evaluación de formas atípicas de EA. Pacientes con estas variantes clínicas tienen una captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 que se corresponde con las regiones cerebrales más atroficas en la RMN, la localización regional de los síntomas y la señal hipometabólica en la PET-FDG.<sup>196, 214</sup> En un estudio que incluyó a 20 pacientes con distintas variantes de la EA (amnésica, atrofia cortical posterior (ACP), DCB, APP, síndrome disejecutivo y alteraciones de la conducta), Ossenkoppele et al. describió como la captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 era más prominente en las regiones cerebrales más afectadas



clínicamente en estos casos:<sup>196</sup> la corteza occipital en la ACP; regiones del hemisferio izquierdo asociadas con el lenguaje en la APP; la corteza temporal basal y estructuras temporales mediales en la variante amnésica; captación difusa respetando la corteza temporal medial en un individuo con síntomas disejecutivos, visuoespaciales y de lenguaje pero sin amnesia; y corteza primaria sensitivomotora derecha en la DCB (**Figura 18**). La señal regional de [F-18]-AV-1451 en estos individuos también se correlacionó negativamente con la captación de glucosa en la PET con fluorodeoxiglucosa (PET-FDG).<sup>196</sup> Además, una peor puntuación en tests neuropsicológicos específicos de un dominio cognitivo se asoció a una mayor señal del trazador en regiones cerebrales claves implicadas en ese dominio específico: captación en lóbulos temporales mediales y memoria; captación en cortezas occipital y temporoparietal derecha y función visuoespacial; y captación en corteza temporoparietal izquierda>derecha y memoria a corto plazo.

**Figura 18. PET-[F-18]-AV-1451 en variantes clínicas de la EA**<sup>196</sup>

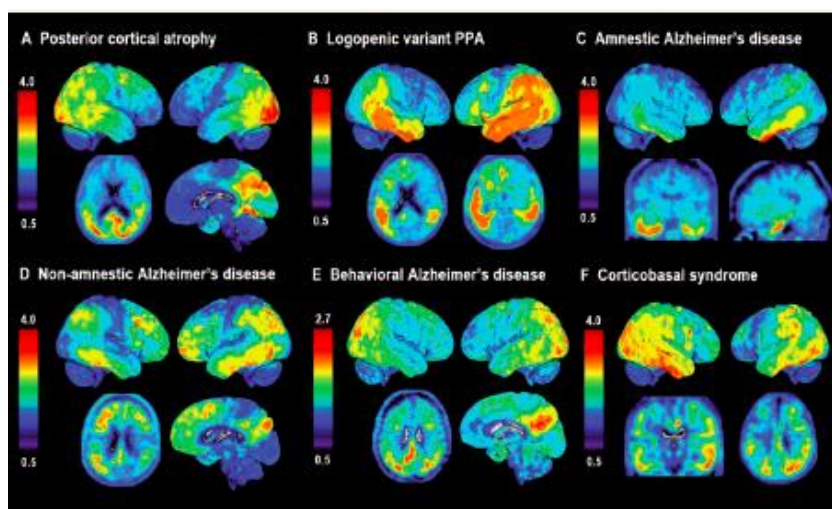


Figura 18 (arriba): Imágenes *in vivo* de PET con [F-18]-AV-1451 mostrando distintos patrones regionales de captación en una mujer de 59 años diagnosticada de ACP (A), una mujer de 77 años con variante logopénica de APP (B), una mujer de 71 años con presentación amnésica de la EA (C), una mujer de 59 años con variante no amnésica de la EA (D), un varón de 59 años con EA con alteraciones de la conducta (E), y una mujer de 60 años con un síndrome corticobasal afectando al hemisferio izquierdo (F).

#### 3.4.3.2.2.4. Captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 y biomarcadores en LCR

Varias publicaciones han demostrado recientemente que existe una correlación significativa entre la captación de [F-18]-AV-1451 en la PET y los biomarcadores para tau y A $\beta$  en LCR. Brier et al. estudió una cohorte de 46 individuos (36 cognitivamente sanos y 10 con EA en fase inicial) con PET-[F-18]-AV-1451, PET-[F-18]-Florbetapir, punción lumbar y evaluación neuropsicológica.<sup>215</sup> La captación PET-[F-18]-AV-1451 consiguió discriminar mejor aquellos sujetos cognitivamente sanos de los que padecían demencia comparado con la PET-amiloide, se correlacionó significativamente con las medidas de tau total y fosfo-tau en LCR (especialmente la captación en la corteza temporal) y se asoció con las medidas neuropsicológicas mejor que la PET-amiloide.

Gordon et al. describió la relación del PET-[F-18]-AV-1451 con los biomarcadores en LCR en 41 ancianos cognitivamente sanos y 11 pacientes con deterioro cognitivo.<sup>207</sup> En toda la cohorte, se halló una relación significativa entre la captación de [F-18]-AV-1451 y la cantidad de tau total, tau-p y A $\beta_{42}$  en LCR. En aquellos sujetos cognitivamente sanos, solo los niveles en LCR de A $\beta_{42}$ , pero no los de tau total o tau-p, se correlacionaron con la señal *in vivo* del trazador en el lóbulo temporal medial. Este hallazgo apunta a que la captación inicial de AV-1451 en estadios presintomáticos de la EA está ligada a marcadores de amiloide, no de tau, en el LCR, y se cree que los niveles disminuidos de A $\beta_{42}$  en el LCR son una de las medidas más precoces del depósito de  $\beta$ -amiloide y de la fisiopatología de la EA.<sup>122</sup>

#### 3.4.3.2.2.5. Captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 en taupatías distintas a la EA

Por otra parte, la utilidad de la PET-[F-18]-AV-1451 en las taupatías distintas a la EA incluyendo varios tipos de DFT como la EPI,<sup>73</sup> la PSP<sup>81</sup> y la DCB<sup>83</sup> está menos establecida y es sujeto de controversia. Algunos grupos han reportado una elevada captación regional *in vivo* de [F-18]-AV-1451 en sujetos diagnosticados de estas taupatías distintas a la EA, incluyendo portadores de mutaciones en el gen *MAPT*, en áreas cerebrales que típicamente contienen agregados de tau en la autopsia.<sup>216-219</sup> Tsai et al. mostró portadores sintomáticos de mutaciones del gen *MAPT* (n=4) con captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 a nivel frontal y temporal; pacientes con variante no fluente de



APP (n=3) con captación en el opérculo frontal, y pacientes con DCB (n=5) en el núcleo dentado, putamen, pálido y la sustancia blanca, en todos ellos la lateralización del trazador era consistente con los síntomas.<sup>216</sup>

En un grupo de 17 pacientes diagnosticados clínicamente de PSP, Schonhaut et al. describió una señal de [F-18]-AV-1451 significativamente más elevada en el núcleo pálido comparado con 31 ancianos controles.<sup>217</sup> En un subgrupo de PSP, la señal también era mayor en el dentado y la unión entre sustancia blanca y corteza en la región frontal. A nivel individual, la retención en los pacientes con PSP era especialmente elevada en el putamen y el mesencéfalo, aunque los controles también mostraron captación de [F-18]-AV-1451 en estas regiones.

Josephs et al. comparó la señal de [F-18]-AV-1451 en 6 sujetos con distintas variantes clínicas de PSP, 101 controles ancianos y 109 pacientes con EA.<sup>218</sup> Los pacientes con PSP mostraron una sutil elevación de [F-18]-AV-1451 comparados con los controles en el mesencéfalo, pálido, área motora suplementaria y corteza del giro precentral. Esta captación del trazador era mucho menos intensa que la de los pacientes con EA excepto en el mesencéfalo, el pálido y el tálamo. La variante de la PSP con mayor señal de [F-18]-AV-1451 fue el Síndrome de Richardson.

Por el contrario, según otros grupos la señal de [F-18]-AV-1451 en la PET en individuos diagnosticados de DFT es mucho menor que en las EA e indistinguible de la de controles cognitivamente sanos.<sup>220</sup> En concreto, Jones et al. estudió con PET-[F-18]-AV-1451 a 5 sujetos con DFT (variante semántica de la APP, portador de mutación en el gen de la progranulina y portadores de mutaciones en el gen *MAPT*), a 21 pacientes con EA y a 120 controles. La captación de [F-18]-AV-1451 en los pacientes con DFT fue mínima, independientemente de si se sospechaba una taupatía como patología subyacente, y en todo caso muy menor de la señal en los pacientes con EA y en un rango similar al de los controles sanos.

Recientemente, Smith et al. estudió a tres miembros de una familia portadores de la mutación del gen de tau *MAPT* R406W con PET-[F-18]-AV-1451 y PET-[F-18]-FDG.<sup>221</sup> Esta mutación está localizada en la región N-terminal del exón 13 del gen *MAPT* y da lugar a agregados de tau que contienen las 6 isoformas de la proteína (3R y 4R)<sup>111</sup> y a nivel estructural están formados mayoritariamente por PHF aunque también algunos

FR,<sup>222</sup> ambas características muy similares a las de los agregados de tau en la EA. En los dos sujetos con menor afectación cognitiva la captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 estaba limitada a los polos temporales, el hipocampo y partes anteriores del giro temporal inferior. En el sujeto de mayor edad y con mayor afectación cognitiva la señal del trazador era más diseminada afectando los lóbulos temporales y frontales y los ganglios basales, pero no los lóbulos parietales y occipitales. Se halló una correlación inversa entre la retención de [F-18]-AV-1451 y el metabolismo cerebral de glucosa medido con [F-18]-FDG en dos de los sujetos del estudio. El individuo de mayor edad falleció dos semanas después de la realización del PET, tras 26 años de afectación cognitiva, permitiendo por primera vez correlacionar la captación *in vivo* del trazador con la patología subyacente en las mismas regiones cerebrales. Su examen neuropatológico mostró abundante patología tau en forma de ONFs y neuritas en regiones temporolímbicas, polo temporal anterior e hipocampo, mientras que en las áreas corticales posteriores la patología era escasa. La captación de [F-18]-AV-1451 en las distintas regiones estudiadas se correlacionó significativamente con la cantidad de patología tau medida con inmunotinciones. La región con mayor captación *in vivo* de este sujeto fue el putamen, que en concordancia mostró abundante patología tau, aunque el lóbulo temporal inferior tenía mayor cantidad de patología con una señal *in vivo* ligeramente menor. No se realizó autorradiografía en este sujeto, pero sí se ha demostrado en otras publicaciones una intensa señal de [F-18]-AV-1451 en autorradiografía con pantalla de fósforo en tejido cerebral de portadores de la mutación *MAPT* R406W.<sup>221, 223</sup>

Estas discrepancias fundamentales en la captación y afinidad de [F-18]-AV-1451 para los agregados de tau no-PHF en casos de taupatías distintas a la EA resaltan la necesidad de estudios radiológico-patológicos con este trazador en muestras de tejido cerebral postmortem de sujetos a los que se les realizó una PET en vida.



## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**



1. El trazador AV-1451, diseñado para detectar patología tau en forma de filamentos helicoidales apareados (PHF) *in vivo* mediante el uso de tomografía por emisión de positrones (PET), tiene una alta afinidad por este tipo de lesiones que caracterizan a la enfermedad de Alzheimer en humanos en comparación con lesiones formadas por agregados de  $\beta$ -amiloide,  $\alpha$ -sinucleína o TDP-43.
2. La diferente composición bioquímica y ultraestructural de los agregados de tau que caracterizan a la enfermedad de Alzheimer y otras taupatías como la enfermedad de Pick, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración corticobasal y demencia frontotemporal asociada a mutaciones del gen *MAPT* en el cromosoma 17 determina que la afinidad de AV-1451 por estas lesiones sea diferente en estos grupos de patologías relacionadas.
3. Los estudios de correlación radiológico-patológicos son fundamentales para interpretar de forma correcta el significado de las imágenes de la PET con este trazador y permiten detectar la posibilidad de señal *off-target*.



## OBJETIVOS





1. Caracterizar los patrones de distribución y los sustratos anatómicos correspondientes al trazador [F-18]-AV-1451 mediante autorradiografía con pantalla de fósforo y de alta resolución, inmunohistoquímica y ensayos de unión, en muestras de cerebro humano procedentes de autopsia en pacientes con enfermedad de Alzheimer, controles y un amplio abanico de patologías neurodegenerativas.
2. Establecer la capacidad de unión de [F-18]-AV-1451 a agregados de tau no-PHF en tejido cerebral de casos de taupatías distintas a la enfermedad de Alzheimer (enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal y portadores de mutaciones del gen *MAPT* en el cromosoma 17), así como en ratones transgénicos rTg4510 (portadores de la mutación P301L).
3. Confirmar la ausencia de unión de [F-18]-AV-1451 a proteínas distintas a tau ( $\beta$ -amiloide,  $\alpha$ -sinucleína y TDP-43) en tejido cerebral de casos de angiopatía amiloide cerebral, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica y demencia frontotemporal con inclusiones TDP-43.
4. Determinar si existe unión *off-target* (a proteínas/moléculas distintas a tau) de [F-18]-AV-1451.
5. Caracterizar las correlaciones radiológico-patológicas de [F-18]-AV-1451 en tres sujetos a los que se realizó una PET-[F-18]-AV-1451 antes de su fallecimiento mediante el estudio de la relación entre la captación regional *in vivo* de [F-18]-AV-1451 en la PET con la inmunohistoquímica de tau, la autorradiografía con pantalla de fósforo y con emulsión nuclear, los ensayos de unión *in vitro* y la cuantificación de las distintas especies de tau con SDD-AGE.



## INVESTIGACIÓN Y RESULTADOS



## 1. Metodología

### 1.1. Primera parte: características de la unión de [F-18]-AV-1451 en tejido cerebral humano

#### 1.1.1. Muestras de tejido

Muestras de tejido cerebral humano de 24 sujetos que donaron su cerebro al banco de cerebros del Centro para la Investigación de la Enfermedad de Alzheimer de Massachusetts (MADRC, por sus siglas en inglés) fueron seleccionadas para este proyecto, así como muestras adicionales de retina y piel. Las autopsias fueron realizadas siguiendo los protocolos del Massachusetts General Hospital (MGH).<sup>224</sup>

Los diagnósticos patológicos de la cohorte de sujetos analizados son los siguientes:

- EA<sup>58</sup> (n=3)
- AAC difusa en portador de la mutación *Iowa D23N* de la PPA<sup>225</sup> (n=1)
- EPI<sup>73</sup> (n=3)
- PSP<sup>81</sup> (n=3)
- DCB<sup>83</sup> (n=2)
- DCLw<sup>7</sup> (n=3)
- AMS<sup>226</sup> (n=2)
- DFT con inclusiones de TDP-43 (transactive response DNA binding protein 43 kDa)<sup>73</sup> (n=1)
- Melanoma metastásico cerebral<sup>227</sup> (n=1)
- Siderosis superficial<sup>228</sup> (n=1)
- Hemorragia cerebral (n=2)
- Controles sanos (n=2)

La evaluación histopatológica se realizó de forma rutinaria en un grupo específico de 19 regiones cerebrales representativas para un espectro de enfermedades neurodegenerativas. Todos los bloques de parafina se tiñeron con Nissl y hematoxilina-eosina, adicionalmente un grupo específico de bloques se analizaron con tinción de plata e inmunotinciones para  $\beta$ -amiloide,  $\alpha$ -sinucleína, TDP-43 y tau-p.

También se analizaron cerebros de ratones adultos Tg4510 (12 meses de edad, n=2) así como ratones no transgénicos de la misma camada (n=2). Tg4510 es un modelo murino de taupatía que sobreexpresa una forma humana mutada de la proteína tau (P301L) relacionada con formas familiares de demencia frontotemporal.<sup>229, 230</sup> Los ratones rTg4510 desarrollan ONFs corticales, formados principalmente por tau en forma de FR, a la edad de 4 meses.<sup>229</sup>

Se seleccionaron bloques de tejido cerebral congelado a -80°C que contenían cortezas frontal, parietal, temporal y occipital, hipocampo, corteza entorrinal, corteza cingular, cerebelo, ganglios basales y mesencéfalo. Estos bloques fueron cortados en secciones de 10 µm de grosor en un criostato (SME Cryostat, Thermo Shandon, Waltham, MA), montados en un portaobjetos (Histobond adhesión slides, Statlab Medical Products, McKinney, Texas) y usados para los experimentos con autorradiografía con pantalla de fósforo con [F-18]-AV-1451 y autorradiografía de alta resolución con emulsión nuclear con [F-18]-AV-1451 y tinciones con distintos anticuerpos. Bloques de tejido congelado adyacentes fueron homogeneizados y usados para los ensayos de unión *in vitro* con [H-3]-AV-1451.

### 1.1.2. Autorradiografía con pantalla de fósforo

El trazador [F-18]-AV-1451 fue sintetizado localmente en el servicio de Medicina Nuclear del MGH unas horas antes de cada experimento.<sup>231</sup> La autorradiografía con pantalla de fósforo se realizó siguiendo una versión ligeramente modificada de un protocolo publicado previamente.<sup>205</sup>

Las secciones de tejido congelado de 10 µm de grosor montadas en portaobjetos se descongelaron y seguidamente se fijaron en metanol al 100% durante aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras fueron transferidas a un baño con [F-18]-AV-1451 en 10 nM de suero salino tamponado con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) con una concentración de radioactividad de aproximadamente 20 µCi/ml. Secciones adyacentes a estas fueron colocadas en un baño idéntico al anterior en todos los aspectos excepto en que se le añadió AV-1451 no radioactivo (sin [F-18]) a una concentración de 1 µM, condición de bloqueo suficiente para saturar todos los sitios de unión específicos de tau disponibles en el tejido.<sup>205</sup> Tras un periodo de incubación

con AV-1451 de 60 minutos, las muestras de tejido se incubaron brevemente en una serie de baños con el objetivo de eliminar cualquier muestra de radiotrazador no unida al tejido. Las soluciones de baño y sus respectivos tiempos de incubación fueron los siguientes: 10 mM PBS durante 1 minuto, etanol al 70%/PBS al 30% durante 2 minutos, etanol al 30%/PBS al 70% durante 1 minuto y por último 10m M PBS durante 1 minuto. Seguidamente, las muestras de tejido se dejaron secar al aire durante unos minutos y se transfirieron a una pantalla de fósforo (Multisensitive phosphor screen; PerkinElmer Life and Analytic Sciences, Shelton, CT). Esta pantalla de fósforo había sido tratada inmediatamente antes siendo expuesta a una luz blanca durante mínimo 15 minutos. Las muestras de tejido colocadas en la pantalla de fósforo se ubicaron dentro de un casete de aluminio, que se dejó en una habitación oscura durante toda la noche, alejada de fuentes de radioactividad durante el periodo de exposición. La mañana siguiente el casete se abrió en una habitación con mínima luz y las muestras de tejido se separaron de la pantalla de fósforo. Seguidamente esta pantalla se montó en el carrusel del sistema de imagen digital (Cyclone Plus Storage Phosphor Scanner, Perkin Elmer Life and Analytic Sciences). El escaneo de la pantalla se realizó con el paquete de software OptiQuant usando la máxima resolución (600dpi, intervalo de muestreo de 42  $\mu$ m aproximadamente). Las imágenes digitales obtenidas se salvaron sin comprimir. Imágenes de las muestras de tejido incubadas con AV-1451 sin bloquear (con alta actividad específica de [F-18]-AV-1451) y AV-1451 bloqueado ([F-18]-AV-1451 junto con 1 $\mu$ m de AV-1451 no radioactivo) fueron comparadas para determinar la unión total y no específica del trazado en el tejido.

### **1.1.3. Autorradiografía de alta resolución con emulsión nuclear**

Secciones de tejido congelado adyacentes a las usadas para autorradiografía con pantalla de fósforo (ver sección 1.1.2.) fueron cubiertas con un revestimiento de emulsión nuclear, con el objetivo de obtener información autorradiográfica con una resolución a nivel celular.

Las muestras de tejido fueron descongeladas, fijadas en metanol al 100% durante 20 minutos a temperatura ambiente, incubadas en una solución de [F-18]-AV-1451 durante 60 minutos, sometidas a una serie de lavados con PBS y etanol y finalmente secadas al aire. Las muestras fueron entonces sumergidas brevemente en una emulsión nuclear fotográfica (dilución del 1:5 en H<sub>2</sub>O, Ilford nuclear research emulsion K.5; Polysciences,



Warrington, PA) en un cuarto oscuro y colocadas de forma horizontal en una caja cerrada durante toda la noche. La mañana siguiente, en el mismo cuarto oscuro las muestras fueron introducidas en una solución de revelado (Ilford Phenisol developer) durante 4 minutos, incubadas en un baño con ácido acético al 1% durante 2 minutos para parar la reacción anterior, transferidas a una solución de fijado durante 4 minutos (Ilford Hypam fixer) y finalmente lavadas con H<sub>2</sub>O destilada dos veces durante 5 minutos.

Posteriormente, se realizaron inmunotinciones en las muestras previamente sumergidas en la emulsión nuclear. Las muestras se lavaron en PBS durante 5 minutos y fueron incubadas con suero normal de caballo al 2.5% durante 20 minutos, seguido por el correspondiente anticuerpo primario: anti tau PHF-1 (dilución 1:100, ratón; obsequio del Dr. Peter Davies), anti  $\beta$ -amiloide (dilución 1:50, conejo; IBL, Spring Lake Park, MN), anti  $\alpha$ -sinucleína (dilución 1:100, ratón; Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) o anti TDP-43 (dilución 1:100, conejo, Protein Tech Group, Chicago, IL) durante 40 minutos a 37°C. Las secciones se lavaron en PBS durante 2 minutos dos veces, y se incubaron seguidamente con el anticuerpo secundario correspondiente (ImmPRESS anticuerpo IgG antiratón [MP-2400, Vector Laboratories, Burlingame, CA] o ImmPRESS anticuerpo IgG anticonejo [MP-7401, Vector Laboratories, Burlingame, CA]) durante 40 minutos a 37°C. Las secciones se lavaron dos veces con PBS durante 2 minutos y seguidamente se procedió al revelado con solución de diaminobenzidina (DAB, SK 4100, Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 4 minutos aproximadamente. Se usó H&E para contratinción en algunas secciones. Las muestras se lavaron dos veces con PBS durante 2 minutos y fueron deshidratadas y purificadas con varios baños de etanol (al 70%, 90% y 100%) y xileno (dimetilbenceno). Por último, los portaobjetos se cubrieron con el medio de montaje Permount (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) y un cubreobjetos. Se tomaron fotografías de las muestras de tejido con un microscopio BX51 (Olympus, Ballerup, Dinamarca).

### **1.1.4. Ensayos de unión in vitro con [H-3]-AV-1451**

Las muestras de tejido congelado se homogeneizaron con un homogeneizador de tejido Polytron (PT 10/35; Brinkman Instruments, Westbury, NY) a temperatura ambiente durante 30 segundos al nivel 6 en PBS a una concentración de 10 mg de cerebro por mililitro. Los homogeneizados se alicuotaron y congelaron a -80°C hasta su uso en un

periodo máximo de 2 semanas. No se han observado cambios significativos de las características de unión en las muestras usadas repetidamente durante este periodo de tiempo. Se descongelaron 10 mg por mililitro de las alícuotas del tejido cerebral homogeneizado, y se diluyeron 10 veces en el buffer de unión hasta 1 mg/ml. Se mezclaron 500  $\mu$ l de AV-1451 no radioactivo con 500  $\mu$ l de [H-3]-AV-1451 (29.7 Ci/mmol; regalo de Avid Radiopharmaceuticals, compañía propiedad de Eli Lilly, Indianapolis, IN) en un volumen de 900  $\mu$ l del buffer de unión. El ensayo empezó con la adición de 100  $\mu$ l de 1 mg/ml del homogeneizado de tejido cerebral previamente preparado, consiguiendo una concentración final de 0.10 mg de tejido/ml. La concentración final de [H-3]-AV-1451 típicamente es de 1-2 nM. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 60 minutos, la mezcla se filtró a través de un filtro de vidrio Whatman (Maidston, UK) GF-B en un recolector de células Brandel M-24R (Brandel, Gaithersburg, MD) y se lavó 5 veces en 3ml del buffer de unión. La radioactividad de los filtros se midió en un Cytoscint-ES, tras su incubación en el cóctel durante toda la noche. La inhibición completa (del 100%) de la unión se definió como el número de contajes desplazados por 3  $\mu$ M de AV-1451 no radioactivo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### **1.2. Segunda parte: estudio de tres individuos a los que se les realizó PET-[F-18]-AV-1451 y examen neuropatológico**

Tres individuos a los que se realizó una PET-[F-18]-AV-1451 como parte de un estudio de investigación en el MGH donaron sus cerebros al fallecer y se realizó un examen neuropatológico.

#### **1.2.1. Adquisición de las imágenes y procesamiento de la PET con [F-18]-AV-1451**

Los datos de la PET fueron adquiridos en un escáner Siemens/CTI (Knoxville, TN) ECAT HR+ (modo 3D; 63 planos de imagen; campo de vista axial de 15.2cm; resolución transaxial de 5.6mm e intervalo entre las imágenes de 2.4mm). Los datos de la PET se adquirieron entre 80 y 100 min tras la inyección de un bolus endovenoso de 9-11mCi de [F-18]-AV-1451 en marcos de 4-5 min. Los datos de la PET fueron

reconstruidos y corregidos por su atenuación, y cada marco fue evaluado para verificar la validez de los contajes estadísticos y la ausencia de movimiento cefálicos. La RMN-T1 se realizó en una 3T Tim Trio (Siemens) y fue procesada usando el programa Freesurfer (FS).<sup>232-234</sup>

La captación específica de [F-18]-AV-1451 se expresó en las regiones de interés (ROI, por sus siglas en inglés) del FS como la ratio del valor de la captación estandarizada (SUVR por sus siglas en inglés) en esa región dividido por la SUVR de la ROI de la corteza cerebelosa, que fue usada como referencia.<sup>1</sup>

### 1.2.2. Muestras de tejido

El protocolo usado para el procesamiento y tinción de las muestras de tejido es idéntico al detallado en la sección 1.1.1. En estos tres individuos se seleccionaron las regiones cerebrales a analizar en este estudio teniendo en cuenta la captación de [F-18]-AV-1451 en las correspondientes imágenes de la PET *in vivo*, eligiendo múltiples áreas con y sin señal del trazador.

### 1.2.3. Correlaciones regionales entre la PET con [F-18]-AV-1451 y los bloques de tejido cerebral

Las imágenes de la PET con [F-18]-AV-1451 fueron coregistradas con la RMN. La correspondencia entre los bloques de autopsia y los datos de imagen se realizó mediante un método semicuantitativo, usando la morfología de los giros y los ventrículos del bloque de tejido histológico para identificar la región correspondiente en la RMN-T1. Las ROIs fueron dibujadas manualmente en la imagen de la RMN usando el software médico AMIDE v.1.0.5 (A Medical Image Data Examiner, <http://amide.sourceforge.net>)<sup>235, 236</sup> expandidas para muestrear una profundidad de 10 mm, y salvadas para representar un objeto de mapa en la RMN. Este objeto de mapa fue usado para muestrear las imágenes de la PET previamente coregistradas con la RMN. Finalmente se obtuvieron los valores medios de AV-1451 (SUVR) en cada ROI.

### 1.2.4. Autorradiografía con pantalla de fósforo

El protocolo utilizado ha sido detallado en la sección 1.1.2.

### 1.2.5. Autorradiografía de alta resolución con emulsión nuclear

El protocolo utilizado ha sido detallado en la sección 1.1.3.

### 1.2.6. Ensayos de unión *in vitro* con [H-3]-AV-1451

El protocolo utilizado ha sido detallado en la sección 1.1.4.

### 1.2.7. Electroforesis en gel de agarosa con detergente semidesnaturalizado

La electroforesis en gel de agarosa con detergente semidesnaturalizado (SDD-AGE por sus siglas en inglés) se realizó siguiendo un protocolo publicado previamente<sup>223, 237</sup> con mínimas modificaciones. Esta técnica es muy útil para detectar y caracterizar priones y especies amiloideas que forman polímeros proteínicos resistentes a la solubilización por el detergente SDS y que no pueden entrar en un gel de poliacrilamida convencional con poros pequeños, en contraste con el gel de agarosa que contiene poros más grandes, permitiendo la separación de los polímeros.<sup>223, 237</sup> Unos 250 mg de tejido congelado de múltiples regiones cerebrales fueron homogeneizados en PBS frío con un cocktail de inhibidores de la proteasa (1x, Roche). El extracto homogeneizado fue centrifugado a 3000 g durante 5 min a 4°C y el sobrenadante fue recolectado y guardado a -80°C. Los lisados se descongelaron en hielo (como máximo se realizaron dos secuencias de congelado-descongelado para asegurar la integridad de las especies de tau de alto peso molecular). Se preparó el gel de agarosa al 1.5% disolviendo agarosa en Buffer G (20mM Base Tris, 200mM glicina) y añadiendo 10% sulfato sódico dodecil (SDS, por sus siglas en inglés) para alcanzar una concentración final de 0.02%. Se incubaron 60 µg de proteína del lisado con 0.02% SDS buffer durante 7 min a temperatura ambiente antes de cargar el gel. El SDD-AGE se corrió en buffer Laemmli (Buffer G con 0.1% SDS) a 35V durante 16h a 4°C. Tras este paso, se transfirió la proteína mediante acción capilar usando 20 hojas de papel Whatmann grueso (GS 005) y 8 hojas de papel Whatmann medio (GB 003) a una membrana de Immobilon polyvinylidene fluoride (PVDF, Millipore) a 4°C durante 16-24h. Las membranas se

bloquearon con leche no grasa 5% en 1X Tris-buffered saline-Tween (TBS-T) durante 1h y se incubaron con un anticuerpo policlonal contra tau total (conejo, 1:4000, Dako) y con un el anticuerpo PHF-1 contra tau-PHF (ratón, 1:4000, obsequio del Dr. Peter Davies) durante toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron cinco veces con TBS-T y seguidamente se incubaron con los anticuerpos secundarios: anticuerpo de cabra contra conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP por sus siglas en inglés, 1:2000, Biorad) y anticuerpo de cabra contra ratón HRP (1:2000, Biorad), respectivamente, durante 1h en NFMD al 5% en Tris Buffered Saline+Tween20 (TBS-T) a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas volvieron a lavarse cinco veces con TBS-T. Finalmente, las membranas se revelaron usando el Enhanced Chemiluminescence Substrate (Pierce) durante 1 min y fueron expuestas a la película (GE Healthcare). Las imágenes se cuantificaron usando el programa Image J (National Institute of Health).

## 2. Resultados

### 2.1. Primera parte: características de la unión de [F-18]-AV-1451 en tejido cerebral humano

En esta parte inicial del trabajo se describirán los experimentos realizados para caracterizar las propiedades de unión de [F-18]-AV-1451 a tau-PHF, tau-FR y otras proteínas en muestras de tejido cerebral humano provenientes del banco de cerebros del MADRC en una cohorte de 24 sujetos, así como en muestras de retina y piel humanas y en cerebros de ratones transgénicos Tg4510 y ratones no transgénicos.

#### 2.1.1. Características de la cohorte

En la **Tabla 12** se resumen las características demográficas y neuropatológicas de los sujetos de los cuales se obtuvieron las muestras de tejido usadas para los experimentos.

**Tabla 12. Información demográfica y neuropatológica de los casos del estudio**

Caso	Diagnóstico clínico	Diagnóstico patológico	Edad al fallecimiento (años), sexo	Intervalo postmortem (horas)	Estadio Braak <sup>50</sup> (ONFs)	CERAD <sup>61</sup> (placas neuríticas)	Criterios NIA-Reagan Institute <sup>58</sup> (probabilidad)
#1	CTL	Cerebro normal	86, M	16	I	no	Baja
#2	CTL	Cerebro normal	73, F	34	I	no	Baja
#3	EA	EA + AAC occipital <sup>58</sup>	64, F	38	VI	C	Elevada
#4	EA	EA <sup>58</sup>	60, M	24	VI	C	Elevada
#5	EA	EA <sup>58</sup>	56, F	-	VI	C	Elevada
#6	Alteración de la memoria, lenguaje y la marcha, temblor	AAC difusa (mutación D23N Iowa de PPA) <sup>225</sup>	45, M	-	I	no	Baja
#7	DFT	EPI <sup>73</sup>	62, M	24	I	A	Baja
#8	DFT	EPI <sup>73</sup>	72, F	-	I	no	Baja

## INVESTIGACIÓN Y RESULTADOS

#9	DFT	<b>EPI</b> <sup>73</sup>	82, M	-	II	A	Baja
#10	PSP/DFT	<b>PSP</b> <sup>81</sup>	63, F	12	II	no	Baja
#11	PSP	<b>PSP</b> <sup>81</sup>	69, M	45	II	no	Baja
#12	PSP	<b>PSP</b> <sup>81</sup>	68, M	80	II	no	Baja
#13	DCB	<b>DCB</b> <sup>83</sup>	80, M	-	I	no	Baja
#14	DFT	<b>DCB</b> <sup>83</sup>	83, M	-	I	A	Baja
#15	DCLw	<b>DCLw</b> <sup>7</sup>	76, M	17	II	no	Baja
#16	DCLw	<b>DCLw</b> <sup>7</sup>	76, M	10	I	no	Baja
#17	EPD	<b>DCLw</b> <sup>7</sup>	83, M	9	III	no	Baja
#18	AMS	<b>AMS</b> , subtipo cerebeloso (AMS-C) <sup>226</sup>	60, F	32	II	no	Baja
#19	AMS	<b>AMS</b> , subtipo parkinsoniano (AMS-P) <sup>226</sup>	80, M	25	I	no	Baja
#20	DFT	<b>DFT-TDP-43</b> , tipo A <sup>73</sup>	69, F	-	I	no	Baja
#21	EA	<b>Melanoma metastásico</b> <sup>227</sup> + EA <sup>58</sup>	75, M	35	V	B	Intermedia
#22	Demencia, ataxia, disfagia, sordera	<b>Siderosis superficial</b> <sup>228</sup>	68, M	12	I	A	Baja
#23	Cefalea	<b>Hemorragia subaracnoidea</b>	92, F	-	IV	A	Intermedia
#24	-	<b>Hemorragia parenquimatosa</b>	75, M	-	I	no	Baja

### 2.1.2. Autorradiografía con pantalla de fósforo

Los experimentos realizaron con autorradiografía con pantalla de fósforo usando [F-18]-AV-1451 (preparado el mismo día para su uso en estudios *in vivo* con PET en sujetos humanos) demostraron una intensa señal del trazador en el hipocampo, corteza entorrinal y cortezas frontal, temporal, parietal y occipital, todas ellas regiones que contenían ONFs, en los casos de EA. Esta señal se bloqueó completamente tras incubar las muestras con 1  $\mu$ M de AV-1451 no radioactivo (**Figura 19A**). En la sustancia blanca de estos mismos casos, así como en otras regiones que no contenían ONFs, no se halló señal radioactiva. La excepción fue la sustancia negra localizada en el bloque de mesencéfalo, donde se evidenció una intensa señal (**Figura 20E**).

El cerebelo (**Figura 19A**), área usada típicamente en los estudios de neuroimagen como región de referencia (libre de señal específica del trazador) y los ganglios basales (**Figura 19B**) no mostraron señal autorradiográfica de [F-18]-AV-1451 en ninguno de los casos estudiados, independientemente del diagnóstico patológico subyacente.

Adicionalmente, tampoco detectamos señal radioactiva en muestras de tejido que contenían lesiones de tau no-PHF, concretamente en casos con un diagnóstico patológico de EPI, PSP y DCB respectivamente (**Figura 19C-E**). El aspecto de estos casos fue indistinguible al de cerebros de controles sanos en la autorradiografía con pantalla de fósforo (**Figura 19A**). Un hecho especialmente interesante fue el hallazgo de señal radioactiva localizada en la corteza entorrinal de casos con un estadio Braak II para ONFs (probablemente asociados con el envejecimiento). Esta señal sirvió como control positivo interno en un caso con un diagnóstico patológico de PSP, que no mostró señal en ninguna otra localización fuera de la corteza entorrinal, pese a la presencia de abundantes lesiones de tau no-PHF (**Figura 19D**, asterisco).

De forma similar, no detectamos señal radioactiva en el tejido cerebral de ratones transgénicos rTg4510 adultos, pese a que contenían incontables lesiones de tau P301L (4R) (**Figura 19F**). La ausencia de señal detectable en las lesiones de tau del modelo murino Tg4510 y de los casos humanos de taupatías distintas a la EA, que comparten la característica de contener lesiones de tau no-PHF en forma de FR, sugiere que el trazador [F-18]-AV-1451 tiene una mayor afinidad y especificidad para las lesiones de tau en la forma de PHF.



**Figura 19. Autorradiografía con pantalla de fósforo en taupatías y controles sanos**

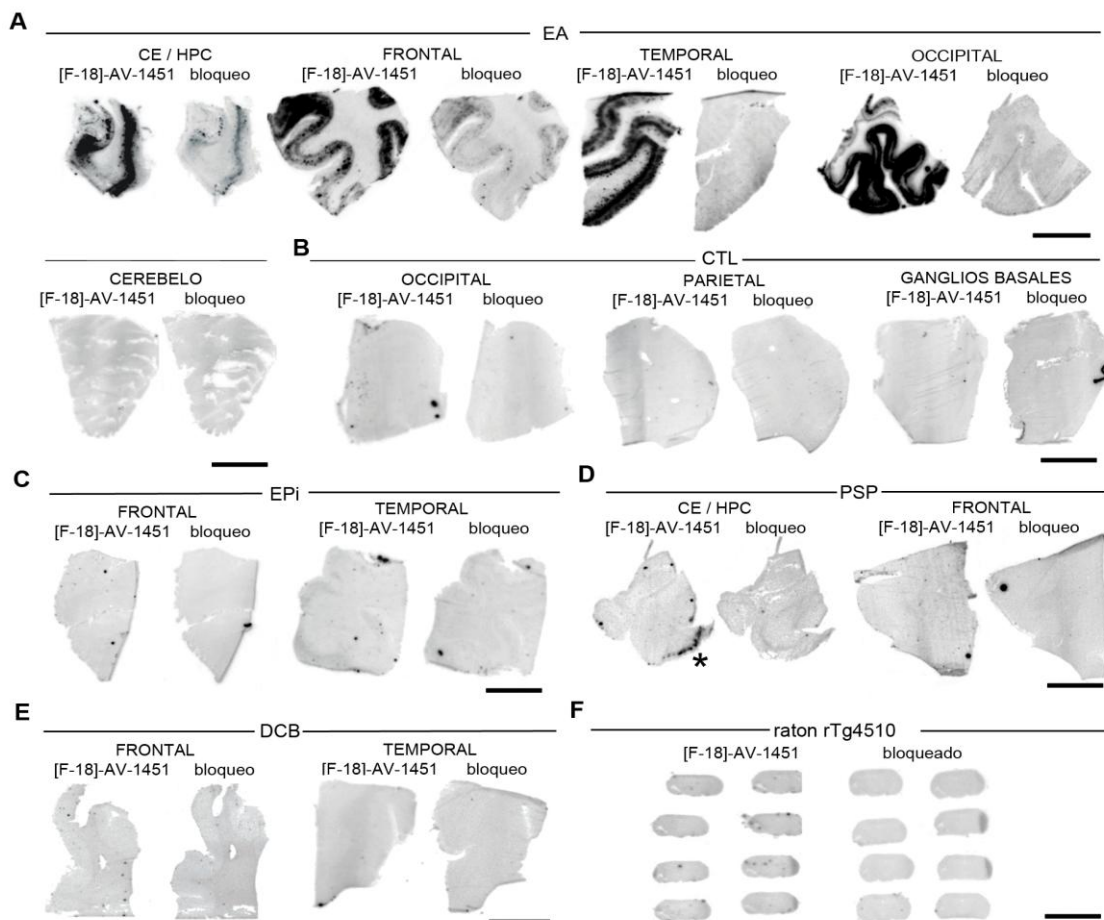


Figura 19 (arriba). Imágenes de autorradiografía con pantalla de fósforo con [F-18]-AV-1451 de sujetos con EA (A), controles cognitivamente sanos (CTL, B), Epi (C), PSP (D), DCB (E) y de un ratón transgénico rTg4510 (F). Una intensa señal de [F-18]-AV-1451 se observó en la corteza cerebral de regiones que contienen ONFs en los casos de EA, y al añadir AV-1451 no radioactivo la señal fue bloqueada (A). Cabe destacar que los casos de EA no se observó señal alguna en el cerebelo (A). En el tejido de un control sano libre de patología no había señal detectable (B). Tampoco se halló señal en tejido de taupatías distintas a la EA incluyendo Epi (C), PSP (D) y DCB (E), todos ellos conteniendo abundantes lesiones de tau no-PHF, ni en el cerebro de un ratón rTg4510 (F). La señal de [F-18]-AV-1451 de un caso de PSP se localizó únicamente en la CE que contenía ONFs asociados con el envejecimiento (D, asterisco). Barra = 1 cm.

**Figura 20. Autorradiografía con pantalla de fósforo en AAC, DFT-TDP-43, DCLw y AMS y en la sustancia negra**

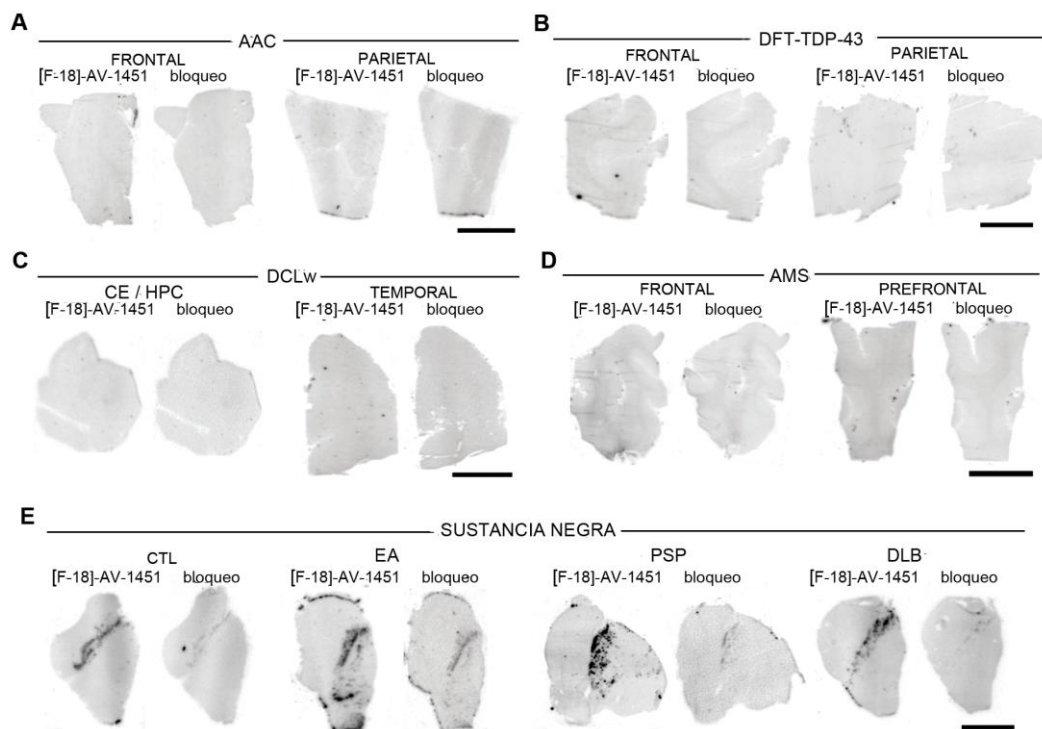


Figura 20 (arriba). Imágenes de autorradiografía con pantalla de fósforo con [F-18]-AV-1451 en tejido cerebral de casos con AAC (A), DFT-TDP-43 (B), DCLw (C) y AMS (D), y muestras de mesencéfalo de CTL y casos con EA, PSP y DCLw (E). No se detectó señal de [F-18]-AV-1451 en tejido que contenía lesiones de AAC (A), inclusiones TDP-43 positivas (B), cuerpos de Lewy (C) o inclusiones gliales de  $\alpha$ -sinucleína (D). En muestras de mesencéfalo se observó una intensa señal del trazador en la región correspondiente a la sustancia negra, independiente del diagnóstico patológico subyacente de cada caso y de la presencia o ausencia de tau en el tejido. Barra = 1 cm.

El tejido de un caso portador de la mutación de la PPA Iowa D23N<sup>225</sup>, que contenía patología AAC muy severa, mostró una falta total de señal radioactiva en autorradiografía (**Figura 20A**), siendo su aspecto indistinguible del de controles sanos. Este hallazgo apoya la idea de que [F-18]-AV-1451 se une con mucha más afinidad y selectividad a las lesiones de tau en forma de PHF que a las de  $\beta$ -amiloide, idea que fue había sido ya sugerida en publicaciones previas.<sup>205</sup>

Muestras de tejido que contenían lesiones distintas a tau en forma de inclusiones de TDP-43 (en un caso de DFT-TDP-43, **Figura 20B**) y lesiones de  $\alpha$ -sinucleína (en casos de DCLw y AMS, **Figura 20C-D**) también mostraron una ausencia de señal radioactiva en la autorradiografía.

La señal radioactiva hallada en las muestras de mesencéfalo, localizada específicamente en la sustancia negra y de forma independiente a la presencia o ausencia de agregados de tau en ese tejido y al diagnóstico patológico subyacente de cada caso, se bloqueaba casi completamente al añadir 1  $\mu$ M de AV-1451 no radioactivo (**Figura 20E**). Este hallazgo apunta a que [F-18]-AV-1451 tiene una fuerte afinidad *off-target* (no relacionada con tau) en la sustancia negra. También hallamos señal radioactiva, pero de menor intensidad, en muestras de tejido que contenían hemorragias cerebrales parenquimatosas y subaracnoideas (**Figura 22F-G**), hecho que sugiere la posibilidad de la existencia de una cierta afinidad de [F-18]-AV-1451 a este tipo de lesiones. Al contrario que en las hemorragias agudas, no se detectó señal radioactiva alguna en tejido de un caso de siderosis superficial, condición que cursa con depósitos de hierro debido a una pérdida crónica de hematíes a través de los vasos sanguíneos (**Figura 22E**).

### 2.1.3. Autorradiografía de alta resolución con emulsión nuclear

Con el objetivo de confirmar los hallazgos anteriores y obtener una mayor resolución a nivel celular, muestras de tejido adyacentes a las utilizadas en los experimentos de autorradiografía con pantalla de fósforo se sumergieron en una emulsión fotográfica nuclear tras ser incubadas con [F-18]-AV-1451. Tras el revelado del tejido, los granos de plata de la emulsión que habían sido golpeados por los positrones emitidos durante la desintegración del isótopo [F-18] cambiaron su composición física, volviéndose de color negro. De esta forma, fue posible identificar aquellas estructuras marcadas por [F-18]-AV-1451 debajo de los granos de plata de color negro al observar el tejido en el microscopio.

Al analizar tejido de casos con un diagnóstico patológico de EA, se visualizó una gran concentración de granos de plata en la corteza cerebral, reflejando la presencia de [F-18]-AV-1451 en esa localización, al contrario que en la sustancia blanca donde no se detectaron granos de plata (**Figura 21A**). La distribución de los granos de plata en la corteza de casos de EA fue muy parecida al patrón de tinción con el anticuerpo anti tau-PHF en muestras de tejido adyacente. La mayor concentración de granos de plata fue identificada en las capas III y V de la corteza. Este hallazgo no es sorprendente ya que es bien conocida la presencia de una mayor densidad de ONFs en esas dos capas de la

corteza en la EA.<sup>238, 239</sup> Por otro lado, la tinción con un anticuerpo anti  $\beta$ -amiloide reveló un patrón cortical de placas más difuso y sin ningún parecido al el de [F-18]-AV-1451.

Adicionalmente, se realizaron tinciones con varios anticuerpos tras la autorradiografía con emulsión nuclear, para visualizar sobre qué estructuras se depositaron los granos de plata modificados por la radioactividad. Esta técnica permitió confirmar que las lesiones marcadas con [F-18]-AV-1451 debajo de los granos de plata de la emulsión contenían tau-PHF, incluyendo principalmente ONFs (tanto intra como extraneuronales) en la corteza de casos de EA, así como neuritas distróficas tau positivas que rodeaban a placas neuríticas (**Figura 21B**). El componente  $\beta$ -amiloide en las placas y de los vasos en forma de AAC (**Figura 21C-D**) no se marcó con granos de plata, confirmando que [F-18]-AV-1451 no se une a  $\beta$ -amiloide.

En tejido de controles sanos sin patología tau no se halló acumulación detectable de granos de plata en ninguna de las regiones analizadas. De forma similar, en las lesiones de tau no-PHF presentes en el cerebro de ratones transgénicos rTg4510 (**Figura 21E**), así como en casos humanos con EPI, PSP y DCB (**Figura 21F-H**) no se hallaron granos de plata. Este hallazgo enfatiza la alta selectividad y afinidad de [F-18]-AV-1451 por los agregados de tau compuestos principalmente por PHF (presentes en la EA) comparados con las lesiones de tau formadas por FR (típicas de taupatías distintas a la EA y ratones rTg4510).

También se analizaron casos con presencia de proteínas distintas a tau, incluyendo TDP-43 y  $\alpha$ -sinucleína. Como era esperable, no se detectaron granos de plata colocalizados con estas proteínas (**Figura 21I-K**).



**Figura 21. Autorradiografía de alta resolución con emulsión nuclear**

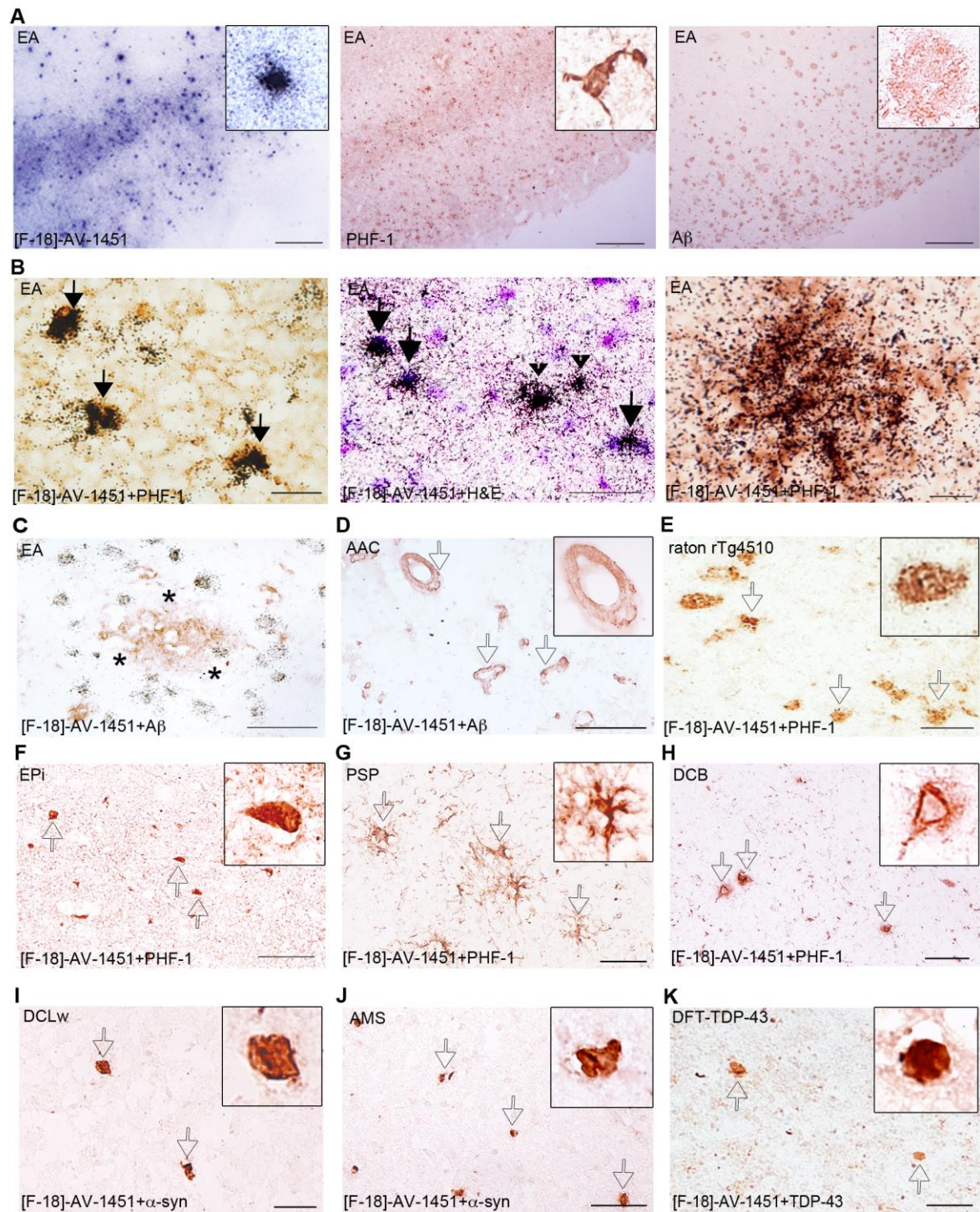


Figura 21 (página anterior): Microfotografías de autorradiografía con emulsión nuclear con [F-18]-AV-1451 de tejido cerebral de casos con EA (A-C), AAC portador de la mutación de APP Iowa D23N (D), ratón transgénico rTg4510 (E), EPI (F), PSP (G), DCB (H), DCLW (I), MSA (J) y DFT-TDP-43 (K). Tras la autorradiografía con emulsión nuclear, se realizaron tinciones con distintos anticuerpos (B, panel izquierdo, C-K) o contra tinción con hematoxilina-eosina (B, panel medio). Los anticuerpos primarios usados fueron: PHF-1 (obsequio del Dr. Peter Davies, A panel medio, B paneles izquierdo y derecho, E-H), anti  $\beta$ -amiloide (A, panel derecho, C, D), anti  $\alpha$ -sinucleína (I, J) y anti TDP-43 (K). La autorradiografía con emulsión nuclear mostró un gran acúmulo de granos de plata modificados en la corteza de casos con EA, especialmente en las capas III y V (A, panel izquierdo), patrón muy similar al de la distribución de los ONF teñidos con PHF-1 (A, panel medio) pero distinto a las placas amiloideas (A, panel derecho). Los granos de plata de la emulsión nuclear se acumularon en los ONFs (B, panel izquierdo, flecha negra), tanto intraneuronales (B, panel medio, flecha negra) como extraneuronales (B, panel derecho, punta de flecha), así como en las neuritis distróficas que rodean a placas densas (B, panel derecho). No se observó ningún acúmulo de granos de plata asociado a las placas amiloideas difusas (C, asteriscos), a vasos con AAC (D, flechas vacías), a ovillos en ratones transgénicos rTg4510 (E, flechas vacías), a cuerpos de Pick en la EPI (F, flechas vacías), a placas astrocíticas en la PSP (G, flechas vacías) o a cuerpos espirales y ovillos globosos en la DCB (H, flechas vacías). Tampoco se observaron granos de plata asociados a cuerpos de Lewy en la DCLW (I, flechas vacías), a inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína en la AMS (J, flechas vacías) o a inclusiones de TDP-43 en la DFT-TDP-43 (K, flechas vacías). Barras = 2 cm (A), 20  $\mu$ m (B), 50  $\mu$ m (C-K).

Por último, se empleó la autorradiografía con emulsión nuclear para clarificar la señal de [F-18]-AV-1451 en la sustancia negra del mesencéfalo. Se observó como los granos de plata de la emulsión marcaban las neuronas que contienen el pigmento neuromelanina de la sustancia negra (**Figura 22A**). Este hallazgo nos llevó a investigar otras regiones con presencia de melanina: el epitelio pigmentado de la retina, la piel y un caso con metástasis cerebrales de un melanoma. En todas estas localizaciones hallamos granos de plata cubriendo las lesiones de melanina y neuromelanina (**Figura 22B-D**), independientemente de la presencia de tau en el tejido. Estos hallazgos nos permitieron confirmar la afinidad *off-target* de [F-18]-AV-1451 por células que contienen melanina y neuromelanina.

En menor grado, también se halló señal radioactiva asociada a hemorragias parenquimatosas y subaracnoideas agudas (**Figura 22F-G**). Este hallazgo apunta a una posible afinidad de [F-18]-AV-1451 por este tipo de lesiones. En un caso de siderosis superficial<sup>228</sup> con abundantes depósitos crónicos de hierro en forma de hemosiderina en el cerebelo, no se evidenció acúmulo de granos de plata sobre estas lesiones (**Figura 22E**), sugiriendo que el tiempo de evolución del sangrado (agudo vs subagudo vs crónico) influye en la afinidad de [F-18]-AV-1451 por estas lesiones.



**Figura 22. Señal *off-target* de [F-18]-AV-1451 en la neuromelanina, la melanina y el hierro**

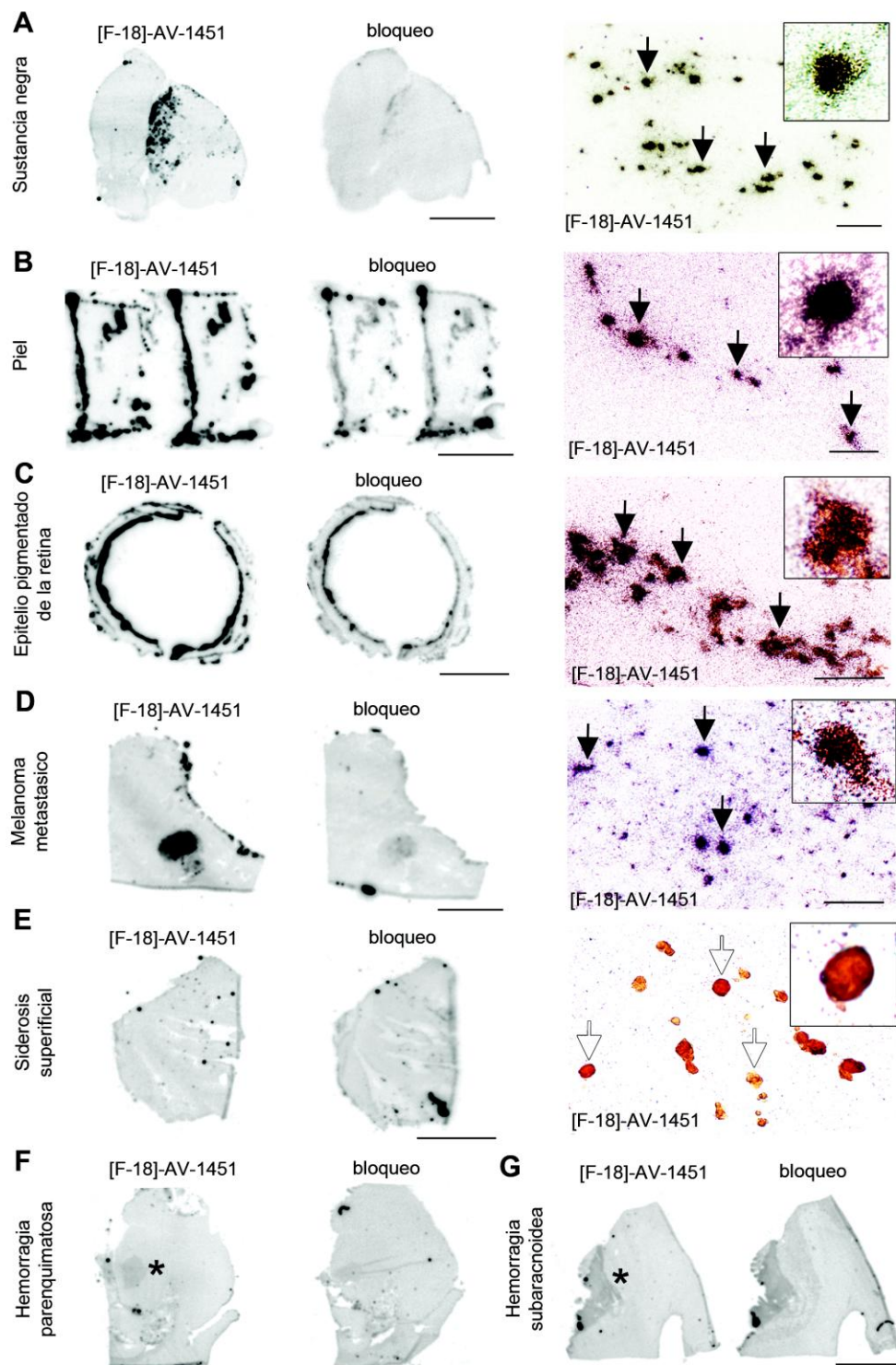


Figura 22 (página anterior). Imágenes de autorradiografía con pantalla de fósforo y emulsión nuclear con [F-18]-AV-1451 en muestras de tejido del mesencéfalo incluyendo la sustancia negra en un caso de PSP (A), piel (B) y epitelio pigmentado de la retina (C) en un caso de EA, un melanoma metastásico (D), el cerebelo en un caso de siderosis superficial (E) y lesiones hemorrágicas parenquimatosas (F) y subaracnoideas (G). Las imágenes de autorradiografía con pantalla de fósforo se muestran en A-E, paneles izquierdos y medios, F y G. Las imágenes de autorradiografía con emulsión nuclear se muestran en A-E, panel derecho. Se observó una intensa señal de [F-18]-AV-1451 en las neuronas que contienen neuromelanina en la sustancia negra del mesencéfalo (A), los melanocitos cutáneos (B), los gránulos llenos de neuromelanina del epitelio pigmentado de la retina (C) y los melanocitos malignos de un caso de melanoma metastásico (D). En el caso de siderosis superficial, se observó una ausencia de señal asociada a los depósitos crónicos de hemosiderina en el cerebelo (E). En lesiones hemorrágicas parenquimatosas (F, asterisco) y subaracnoideas (G, asterisco), el trazador mostró una leve señal. Barras = 1 cm (imágenes de autorradiografía con pantalla de fósforo), 50  $\mu$ m (A, C, D, paneles derechos), 25  $\mu$ m (B, E, paneles derechos).

### 2.1.4. Ensayos de unión in vitro con [H-3]-AV-1451

La **Tabla 13** muestra los niveles de unión de [H-3]-AV-1451 de alícuotas de tejido congelado homogeneizado representativo de múltiples regiones cerebrales y distintas patologías subyacentes.

En general, los resultados obtenidos de los ensayos de unión *in vitro* con [H-3]-AV-1451 coinciden con los de los experimentos con autorradiografía descritos previamente: los niveles más elevados del trazador se identificaron en regiones que contenían ONFs en casos con EA, comparados con controles sanos y casos de taupatías distintas a la EA, AAC y casos que contenían inclusiones de TDP-43 y  $\alpha$ -sinucleína. A destacar el hecho de que con esta técnica, las diferencias numéricas de unión del trazador al tejido entre casos con y sin EA parecen relativamente más estrechas, y el índice señal/ruido es relativamente bajo al compararlo con las diferencias tan robustas halladas al aplicar las técnicas de autorradiografía. Este hecho puede ser debido a las altas concentraciones de etanol (30-70%) utilizadas en los estudios de autorradiografía pero no en los ensayos de unión in vitro, siendo el etanol más efectivo en lavar la señal no específica comparado con el PBS.

Es digno de mención también que la señal más elevada en los ensayos de unión se halló en el caso del melanoma metastásico y en los casos de hemorragias parenquimatosas y subaracnoideas, hecho que apunta a estas lesiones como potenciales dianas de unión de AV-1451 distintas a tau.



## INVESTIGACIÓN Y RESULTADOS

Tabla 13. Ensayos de unión in vitro con [H-3]-AV-1451

Diagnóstico patológico	n	Región cerebral	[H-3]- AV-1451 (pmol/gr)	Diagnóstico patológico	n	Región cerebral	[H-3]- AV-1451 (pmol/gr)
CTL	2	Corteza parietal	132	PSP	2	Sustancia negra	92
		Corteza temporal	180			Tálamo	240
		Corteza occipital	144			Puente	111
		HPC/CE	165			Ganglios basales	205
		Sustancia negra	226	CBD	2	Corteza frontal	106-210
		Cerebelo	238			Corteza temporal	137-177
		Ganglios basales	179	DLB	2	Corteza parietal	152
EA	3	Corteza frontal	198			Corteza occipital	238
		Corteza parietal	258			Sustancia negra	139-238
		Corteza occipital	301			Cerebelo	183
		HPC/CE	299			Ganglios basales	141
		Sustancia negra	88-220	MSA	1	Corteza frontal	168-210
		Cerebelo	219				
		Ganglios basales	124	DFT-TDP-43	2	Corteza frontal	125
AAC	1	Corteza frontal	142			Corteza parietal	208
		Corteza parietal	248	Melanoma metastásico	1	Lóbulo frontal	611
		Corteza occipital	259			Lóbulo parietal	451
EPi	3	Corteza frontal	94-207	Siderosis superficial	1	Cerebelo	270
		Corteza temporal	148				
		HPC/CE	300	Hemorragia subaracnoidea	1	Corteza temporal	652
		Sustancia negra	234			Corteza parietal	434
		Cerebelo	244	Ratón rTg4510	2	Cerebro completo	167-180
		Ganglios basales	162				
				Ratón no transgénico	2	Cerebro completo	145-183

### 2.2. Segunda parte: estudio de tres individuos a los que se les realizó PET con [F-18]-AV-1451 y examen neuropatológico

#### 2.2.1. Casos clínicos

El sujeto 1 era un varón con una historia de 7 años de duración de irritabilidad progresiva, dificultades en el lenguaje y pérdida de memoria a corto plazo de inicio a los 69 años. Fue diagnosticado de APP tipo agramático/aprático.<sup>240, 241</sup> Con el tiempo desarrolló disfagia, inestabilidad de la marcha con caídas frecuentes, temblor en las manos, rigidez en el brazo derecho y limitación de la mirada vertical, con lo que cumplió los criterios clínicos de PSP.<sup>98</sup> Se le realizó una PET con [F-18]-AV-1451 a los 76 años de edad, en ese momento su Clinical Dementia Rating (CDR) scale<sup>242</sup> global era 1, indicando demencia leve, y su CDR suma de casillas era 7.5. El sujeto falleció a los 15 meses de la PET a la edad de 77 años.

El sujeto 2 era un varón que desarrolló temblor en las manos e inestabilidad de la marcha progresivos a los 61 años de edad. El diagnóstico clínico inicial fue enfermedad de Parkinson, pero tuvo una pobre respuesta a la L-Dopa. Posteriormente desarrolló múltiples caídas, disartria, disfagia, diplopía con limitación de la mirada vertical y disautonomía, cumpliendo criterios clínicos de PSP.<sup>98</sup> A los 68 años se realizó una PET-[F-18]-AV-1451, estando en silla de ruedas debido a una marcada inestabilidad postural. En ese momento su CDR<sup>242</sup> global era 1 y su CDR suma de casillas 4.5. El sujeto falleció 5 meses después de la PET.

El sujeto 3 era un varón con un deterioro cognitivo progresivo y alteración de la conducta de inicio a los 53 años. Fue diagnosticado de variante conductual de DFT.<sup>8</sup> Varios miembros de su familia, incluyendo su madre y una tía materna, también tenían síntomas consistentes con esta entidad. Un test genético identificó la mutación P301L en el gen *MAPT*.<sup>243, 244</sup> A los 56 años se realizó una PET-[F-18]-AV-1451, por aquel entonces apenas emitía lenguaje espontáneamente y presentaba también signos leves de parkinsonismo. Su CDR<sup>242</sup> global era 2, indicando demencia moderada, y su CDR suma de casillas 14. El sujeto falleció 8 meses tras la realización de la PET tras una neumonía por aspiración.

### 2.2.2. PET-[F-18]-AV-1451

Las imágenes coroneales de la PET-[F-18]-AV-1451 realizadas en los tres sujetos del estudio se muestran en la **Figura 23**, usando una escala de color para SUVR de 1 a 2.

**Figura 23.** PET-F-18]-AV-1451 en los sujetos del estudio

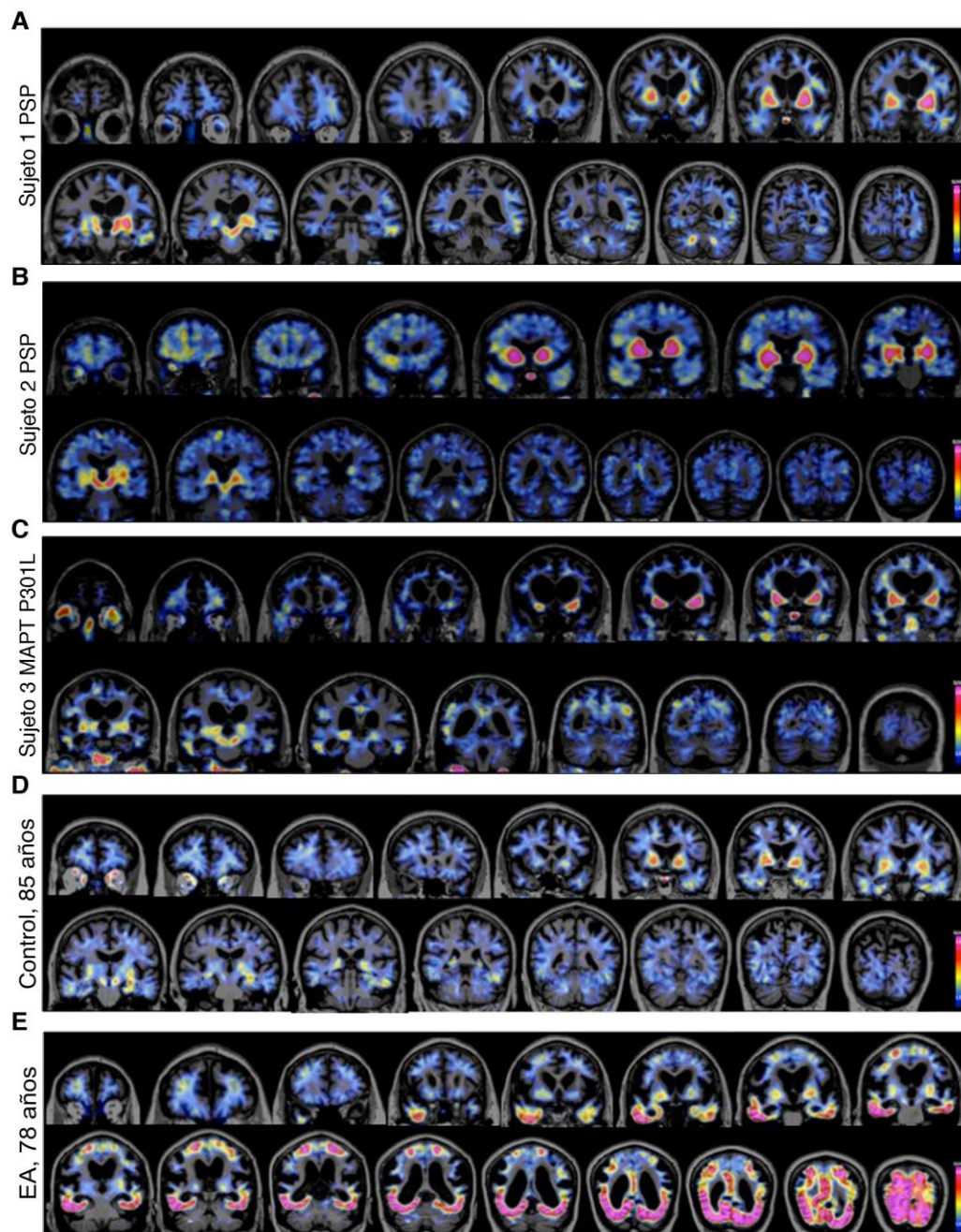


Figura 23 (página anterior). Imágenes de la PET-[F-18]-AV-1451 de los tres sujetos del estudio (A-C) junto con las de un control cognitivamente sano de 85 años de edad (D) y un paciente diagnosticado clínicamente de EA de 78 años de edad (E). La PET del sujeto 1, con un diagnóstico de PSP, muestra una captación significativa de [F-18]-AV-1451 limitada a los ganglios basales y al mesencéfalo, y una menor señal en la sustancia blanca frontal izquierda, lóbulo temporal izquierdo y la sustancia blanca cerebelosa bilateralmente (A). El sujeto 2, también con un diagnóstico de PSP, tiene un patrón muy similar al del sujeto anterior con una retención muy elevada en los ganglios basales y mesencéfalo, y una señal menos intensa en las regiones frontales y temporales de predominio en el hemisferio derecho (B). La PET del sujeto 3, portador de una mutación P301L en el gen *MAPT*, también tiene una señal predominante en los ganglios basales y en el mesencéfalo (C). El sujeto control anciano muestra un patrón de retención de [F-18]-AV-1451 en la PET muy similar a los tres sujetos del estudio, con señal elevada en los ganglios basales y el mesencéfalo, y retención de menor intensidad en las regiones temporales mediales e inferiores (D). Por otra parte, el paciente diagnosticado de EA tiene una PET con [F-18]-AV-1451 con el patrón típico de distribución del trazador descrito en la EA,<sup>1</sup> con una elevada retención en las regiones temporal inferior y lateral, parietal, occipital y en precúneo y cíngulo posterior (E) Nota: la escala de color usada en las imágenes representa una SUVR de 1 a 2.

El escáner del sujeto 1 mostró una intensa captación en los ganglios basales y en el mesencéfalo. También se detectó una señal mucho más leve en el lóbulo frontal izquierdo y en los lóbulos temporales inferiores a nivel bilateral, así como en la sustancia blanca cerebelosa bilateralmente (**Figura 22A**). En los sujetos 2 y 3 la PET también mostró una intensa señal en los ganglios basales y el mesencéfalo, además de una discreta captación en la unión entre la sustancia blanca y corteza en regiones temporales y frontales (**Figuras 22 B y C**, respectivamente).

### 2.2.3. Evaluación neuropatológica

En la **Figura 24** se pueden observar microfotografías del tejido cerebral de los tres individuos del estudio teñido con el anticuerpo PHF-1 (obsequio del Dr. Peter Davies).

Los sujetos 1 y 2 tenían un examen neuropatológico similar, en el que se reveló la presencia de muy abundantes inclusiones tau positivas, principalmente en las células gliales, en forma de astrocitos “en penacho”, cuerpos espirales e hilos de neurópilo (**Figura 24A y B**). Estas inclusiones tau+ estaban distribuidas en el tallo del encéfalo, el cerebelo, el tálamo, el pálido, las regiones límbicas y la neocorteza, y es consistente con un diagnóstico patológico de PSP.<sup>81</sup> Adicionalmente, se hallaron varios ONFs en la CE y la región CA1 de la formación hipocámpal en ambos casos. No se evidenció presencia de patología A $\beta$ , TDP-43 o  $\alpha$ -sinucleína.



El fenotipo patológico del sujeto 3 incluyó múltiples granos tau positivos de pequeño tamaño (**Figura 24C**) en varias regiones cerebrales, en la corteza y sustancia blanca, con una afectación predominante de los ganglios basales con patología glial particularmente en las fibras de Wilson. En la CE se hallaron algunos ONFs, así como varias placas A $\beta$  difusas en la CE y corteza temporal inferior y algunas inclusiones TDP-43+.

**Figura 24. Examen neuropatológico de los sujetos del estudio**

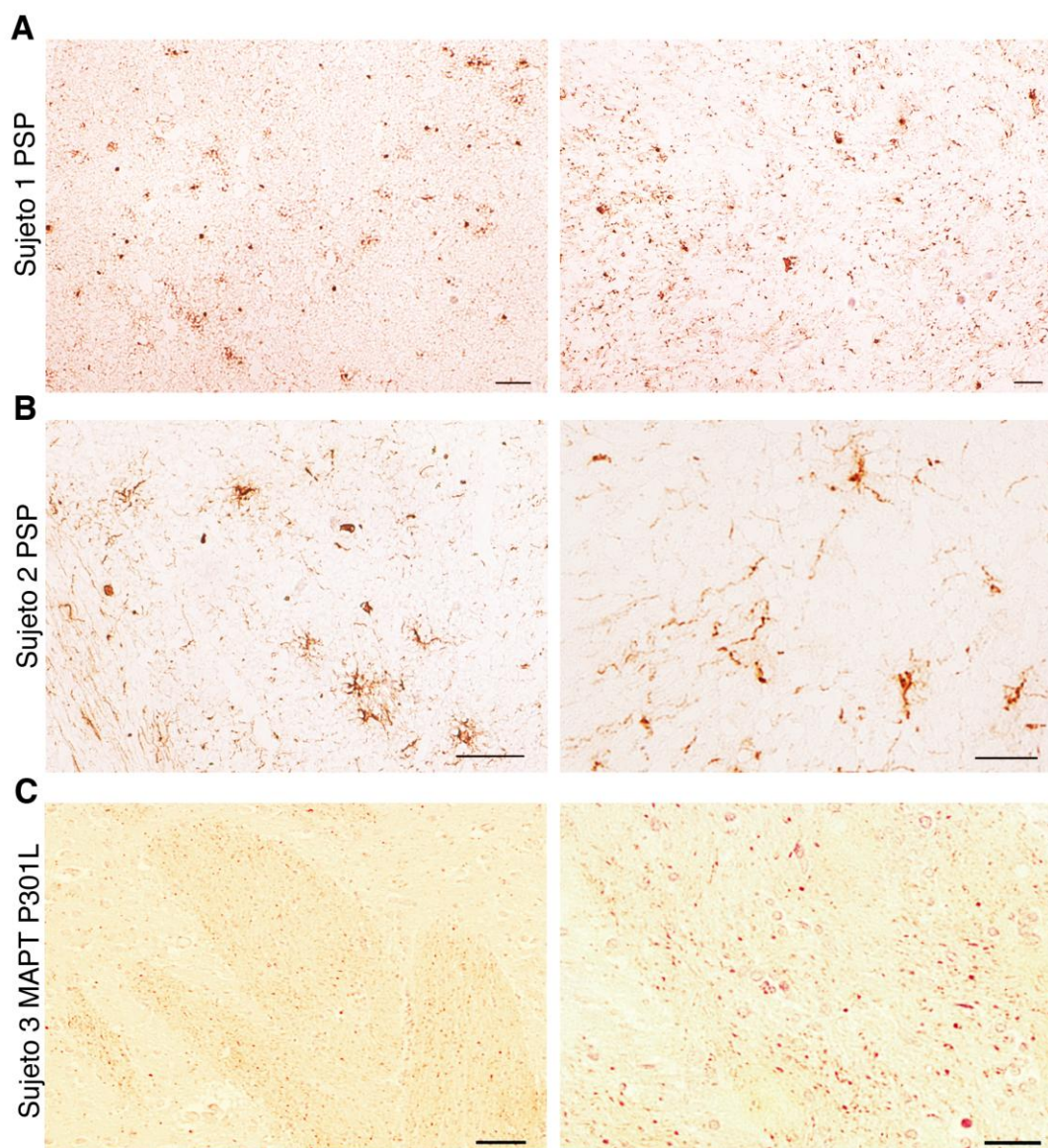


Figura 24 (página anterior). Microfotografías del tejido cerebral de los tres sujetos del estudio teñido con el anticuerpo PHF-1 (1.100, obsequio del Dr. Peter Davies). En los sujetos 1 y 2, ambos con un diagnóstico patológico de PSP, se detectó una elevada carga de inclusiones tau positivas en múltiples regiones cerebrales, en forma de placas astrocíticas (A y B, paneles izquierdos) e hilos de neurópilo (B panel derecho). En el sujeto 3, portador de la mutación P301L en el gen *MAPT*, se hallaron múltiples granos tau positivos de pequeño tamaño, especialmente en los ganglios basales, particularmente en las fibras de Wilson (C). Barras: 50  $\mu$ m (A, B y C, paneles izquierdos), 20  $\mu$ m (A, B y C paneles derechos).

### 2.2.4. Autorradiografía con pantalla de fósforo

Los experimentos con autorradiografía con pantalla de fósforo, usando alicuotas del trazador preparado para su uso en neuroimagen *in vivo* ese mismo día, mostró un patrón idéntico en los tres sujetos del estudio (**Figura 25 A, C y E**). Como era esperable, una intensa señal fue detectada en las cortezas de casos de EA que contenían abundante carga de ONFs. No obstante, no se evidenció señal detectable de [F-18]-AV-1451 en múltiples regiones de los tres casos del estudio, incluyendo corteza y sustancia blanca, que contenían una elevada cantidad de agregados de tau no-PHF, siendo las únicas excepciones la CE (reflejando el hallazgo incidental de ONFs relacionados con el envejecimiento) y el mesencéfalo (reflejando señal *off-target* en las neuronas que contienen neuromelanina). El mesencéfalo del sujeto 1 no pudo ser analizado. En ambas regiones, se halló una señal localizada del trazador que se bloqueaba con AV-1451 no radioactivo. No se halló señal autorradiográfica en el cerebelo, área usada en los estudios de neuroimagen *in vivo* como región de referencia por su ausencia de captación, ni en los ganglios basales, a pesar de la intensa captación de [F-18]-AV-1451 en la PET detectada en estos tres sujetos (**Figura 22A-C**) así como en sujetos ancianos cognitivamente sanos.

**Figura 25. Autorradiografía con pantalla de fósforo y con emulsión nuclear en los sujetos de estudio**

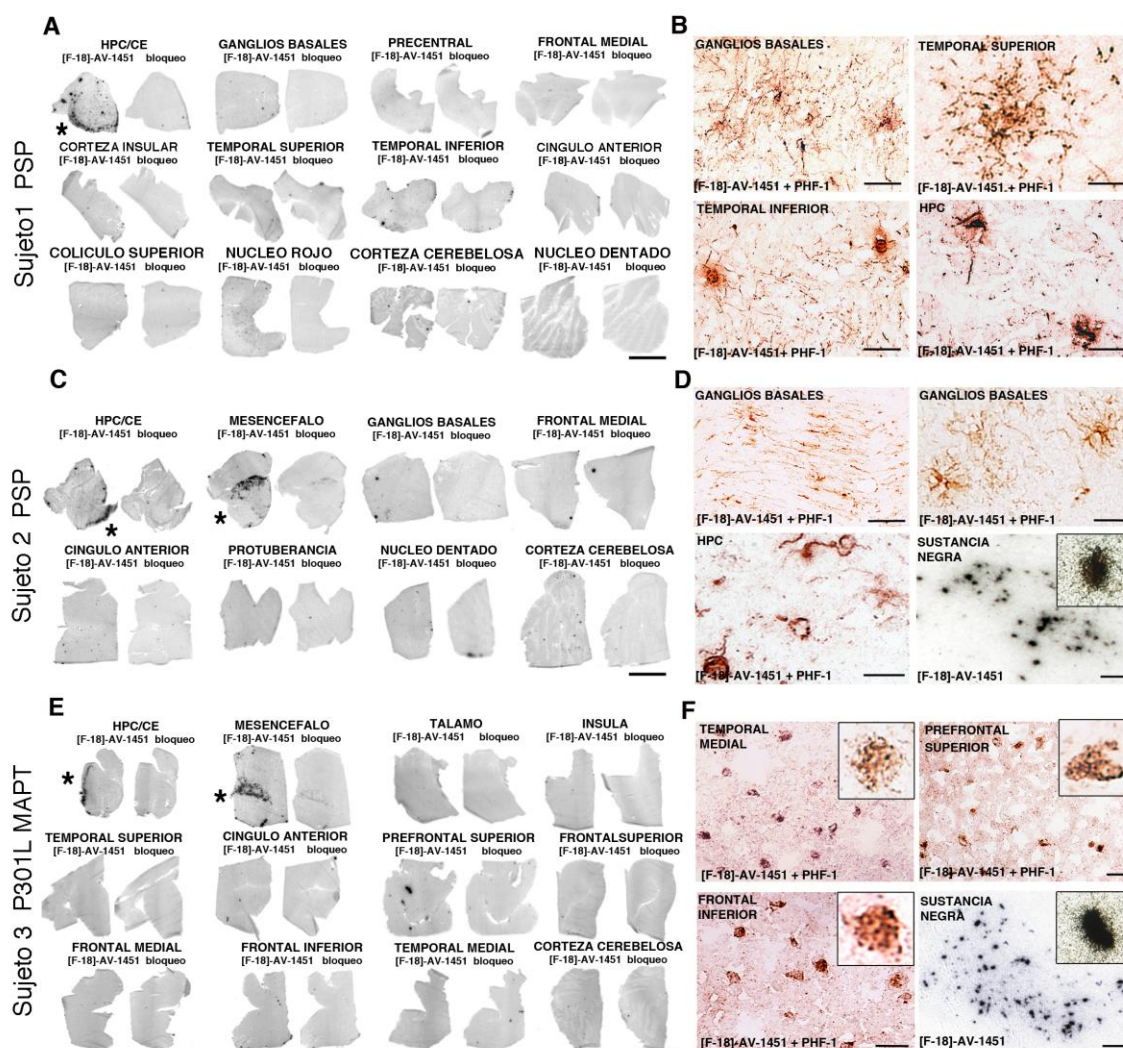


Figura 25 (arriba). Imágenes de autorradiografía con pantalla de fósforo (A, C y E) y autorradiografía con emulsión nuclear (B, D y F) realizadas en muestras de tejido cerebral de los sujetos del estudio. Los tres casos mostraron unos hallazgos similares, con una señal no detectable del trazador en autorradiografía con pantalla de fósforo en múltiples regiones cerebrales que contenían una gran cantidad de lesiones tau positivas, incluyendo los ganglios basales, región que mostró una elevada retención *in vivo* en la PET (A, C y E). Las únicas dos excepciones fueron la corteza entorrinal (asterisco) y el mesencéfalo (asterisco). Las imágenes de microscopía del tejido cerebral tras la realización de autorradiografía con emulsión nuclear y tinción con el anticuerpo PHF-1 (obsequio del Dr. Peter Davies) tampoco mostraron ninguna señal significativa en las distintas inclusiones y granos tau positivos (B, D y F). Se halló una intensa señal de granos de plata sobre las neuronas que contienen neuromelanina de la sustancia negra (D, F). Barras: 20µm (B imagen superior derecha e imágenes inferiores, D imágenes inferiores y F), 50µm (B imagen superior izquierda y D imágenes inferiores), 1 cm (A, C y E).



### 2.2.5. Autorradiografía de alta resolución con emulsión nuclear

Para confirmar las observaciones anteriores y obtener resolución a nivel celular, muestras de tejido adyacente al usado en la autorradiografía con pantalla de fósforo se sumergieron en una emulsión nuclear, seguido por la realización de inmunotinciones con anticuerpos contra tau. La autorradiografía de alta resolución usando emulsión nuclear en los tres individuos estudiados mostró resultados similares y estuvo en concordancia con los resultados de la primera parte de este trabajo. Los depósitos de granos de plata no se depositaron sobre ninguna inclusión o grano tau positivo formado por FR en las múltiples regiones cerebrales analizadas en los tres sujetos del estudio (**Figura 25B, D y F**). Las dos únicas excepciones fueron los ONFs formados por tau-PHF en la CE así como las neuronas que contienen neuromelanina en la sustancia negra en el bloque de tejido de mesencéfalo, que sí fueron marcadas por granos de plata (**Figura 25D y F**). Las placas A $\beta$  difusas y las inclusiones TDP-43, presentes en el sujeto 3, no se colocalizaron con granos de plata de la emulsión.

### 2.2.6. Ensayos de unión *in vitro* con [H-3]-AV-1451

Los ensayos *in vitro* con [H-3]-AV-1451, realizados en alícuotas derivadas del mismo tejido cerebral usado en los experimentos de autorradiografía, no detectaron ninguna correlación significativa entre la captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 en la PET y la unión de [H-3]-AV-1451 en el tejido cerebral en las mismas regiones, como se muestra en la **Figura 26** (sujeto 1:  $R^2=0.025$ ,  $p=0.485$ ; sujeto 2:  $R^2=0.06$ ,  $p=0.299$ ; sujeto 3:  $R^2=0.06$ ,  $p=0.299$ ). Varias regiones cerebrales mostraron unos niveles levemente más elevados de señal *in vitro* que tejido proveniente de controles sin patología tau. No obstante, esas mismas regiones tenían una captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 en la PET ausente o mínima, con la excepción de los ganglios basales (**Figura 26**).



**Figura 26.** Ensayos de unión *in vitro* con [H-3]-AV-1451 y correlación con la captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 en la PET en los sujetos del estudio

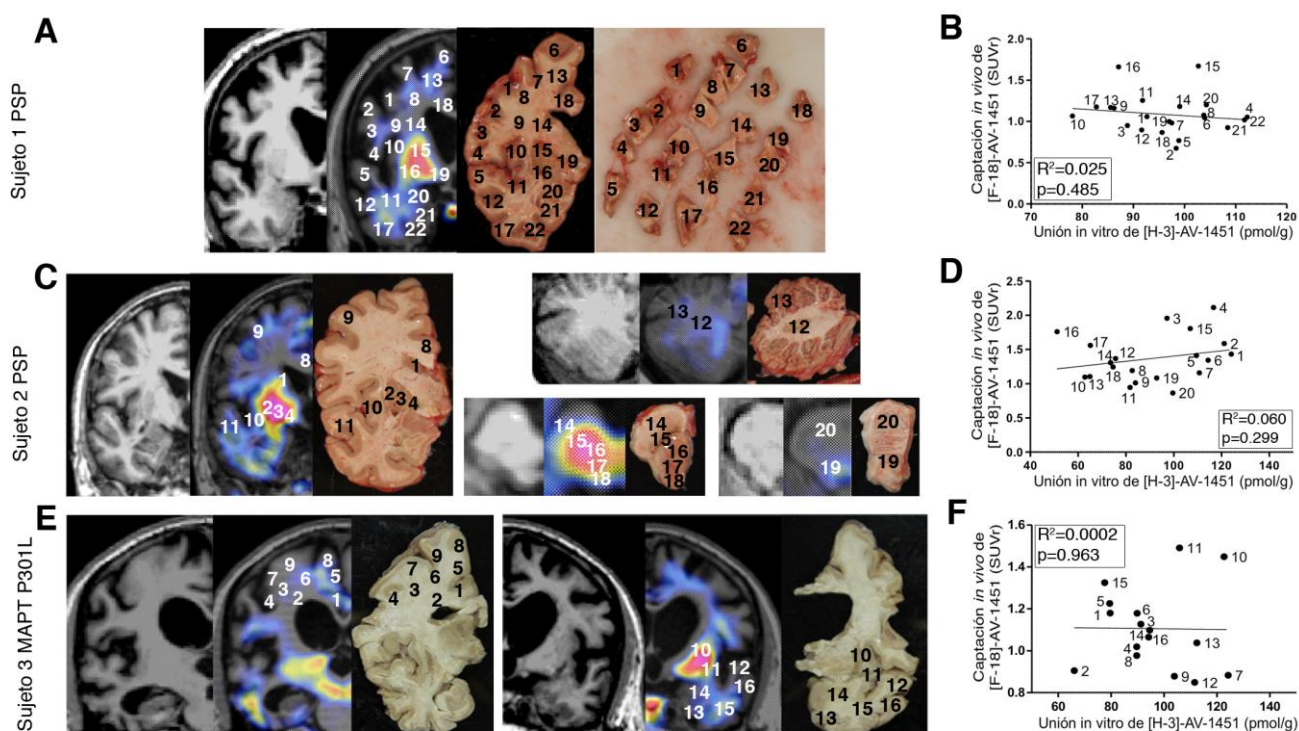


Figura 26 (arriba). Imágenes de secciones coronales de la RMN (izquierda) y sus correspondientes PET-[F-18]-AV-1451 (medio) y bloques de tejido de la autopsia (derecha) (A, C y E), y gráficos de los análisis de correlación entre la captación *in vivo* del trazador con la unión *in vitro* en el tejido de [H-3]-AV-1451 (B, D y F). Nota: los números mostrados en las imágenes de la PET corresponden con las regiones analizadas en los gráficos. No se halló correlación significativa entre la captación *in vivo* en la PET y la unión al tejido cerebral de AV-1451 en ninguno de los casos del estudio.

### 2.2.7. Cuantificaciones bioquímicas de distintas especies de tau con SDD-AGE

La SDD-AGE de la tau inmunoprecipitada se realizó en homogeneizados cerebrales derivados del mismo tejido usado en los experimentos de autorradiografía y ensayos *in vitro* y que contenía regiones idénticas, con el objetivo de cuantificar los niveles de las distintas especies de tau. Esta técnica reveló la presencia de tau en forma de monómeros y múltiples especies de HMW que son probablemente oligómeros. La **Figura 27** muestra imágenes representativas de las membranas derivadas del SDD-AGE que contienen los homogeneizados de tejido cerebral de distintas regiones cerebrales de los tres sujetos del estudio. Como era esperable, los niveles de tau total y

tau-p, particularmente en forma de especies de HMW, fueron sustancialmente inferiores en los tres casos de taupatías no-EA comparado con el tejido cerebral de un caso con EA. En los sujetos 1 y 3 no se detectó ninguna correlación significativa entre los niveles de las diferentes especies de tau en el tejido y la correspondiente captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 en las mismas regiones cerebrales (**Figura 27B y F** respectivamente). El sujeto 2, no obstante, sí mostró una relación significativa entre la cantidad de tau total-HMW postmortem y la señal *in vivo* del trazador ( $R^2=0.369$ ,  $p=0.04$ ), y también entre la cantidad de tau-PHF (HMW y monómeros) y la correspondiente captación *in vivo* ( $R^2=0.383$ ,  $p=0.032$ ;  $R^2=0.599$ ,  $p=0.004$ , respectivamente, **Figura 27D**). A destacar que la correlación significativa en el sujeto 2 estaba liderada por una gran región correspondientes a los ganglios basales, y al excluir esta región del análisis la correlación perdía su significación estadística. Es importante recalcar que varios grupos han detectado una importante captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 en los ganglios basales en una proporción importante de individuos ancianos independientemente de su diagnóstico clínico y abarcando todo el espectro clínico, desde controles cognitivamente sanos hasta pacientes con demencia.<sup>1, 208, 210</sup> Por consiguiente, no está claro si la señal *in vivo* en los ganglios basales representa, al menos en parte, patología tau subyacente o por el contrario refleja una retención no específica del trazador en el tejido cerebral en esta región.

**Figura 27. Cuantificación bioquímica de tau con SDD-AGE y correlación regional con la captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 en la PET en los sujetos del estudio**

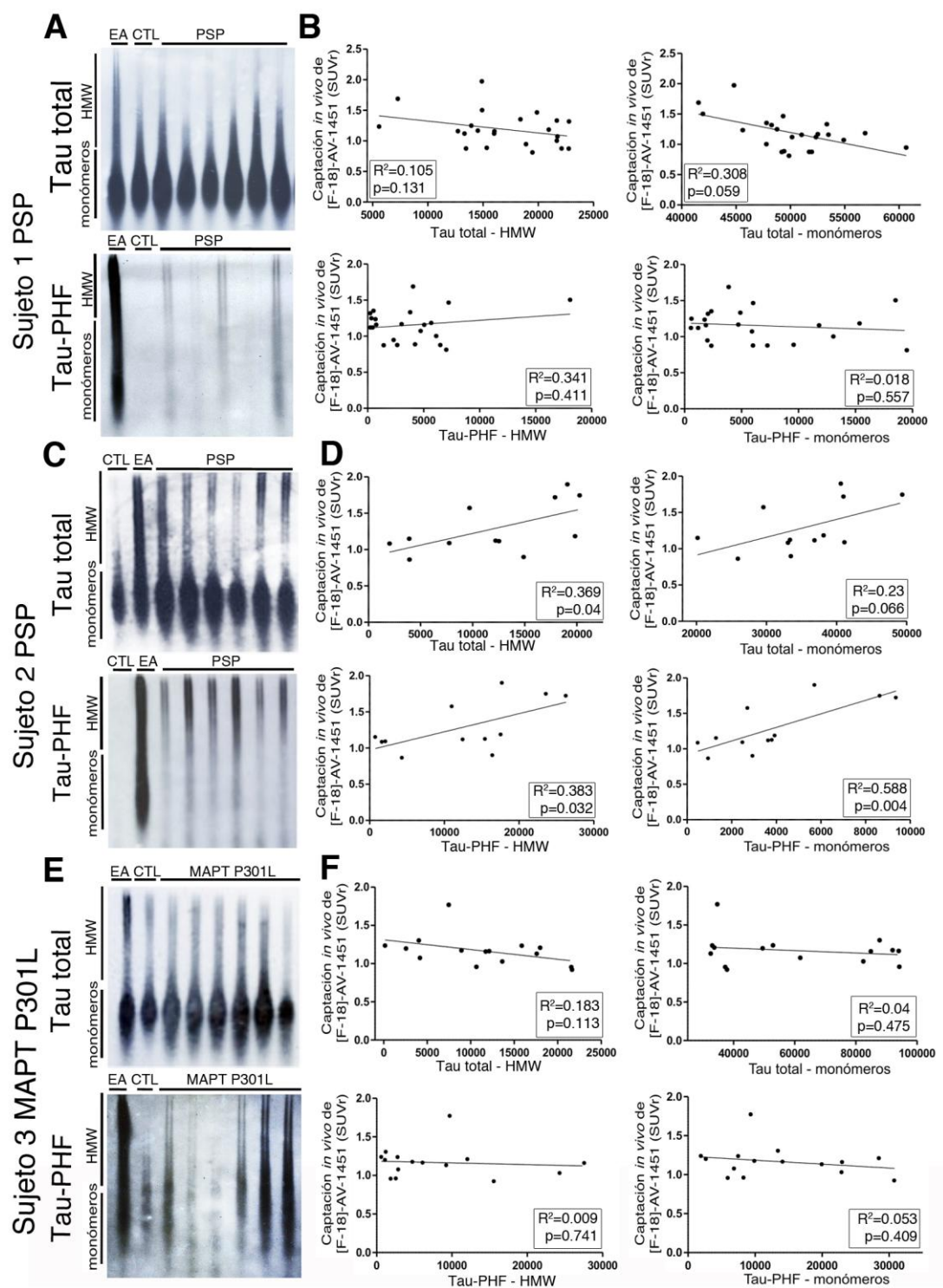


Figura 27 (página anterior). Imágenes de las membranas SDD-AGE teñidas con anticuerpos contra tau total y PHF-1, respectivamente (A, C y E) y gráficos de las correlaciones entre la captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 en la PET y las cuantificaciones bioquímicas de tau total y PHF medidas en las mismas regiones (B, D y F). No se halló ninguna correlación entre la captación *in vivo* en la PET y las medidas postmortem de tau total y PHF en los sujetos 1 y 3. En el sujeto 2, la captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 se correlacionó significativamente con la tau total-HMW ( $R^2=0.369$ ,  $p=0.04$ ), tau-PHF-HWM ( $R^2=0.383$ ,  $p=0.032$ ) y tau-PHF – monómeros ( $R^2=0.588$ ,  $p=0.004$ ). La correlación significativa en el sujeto 2 estaba liderada por varias regiones que representan los ganglios basales y al excluir estas tres regiones de los análisis se perdió la significación.



**DISCUSIÓN**



El trabajo de investigación realizado en esta tesis doctoral tiene como objetivo analizar el sustrato neuropatológico de la captación del nuevo trazador de tau para PET [F-18]-AV-1451 para examinar su afinidad y selectividad hacia los distintos agregados de tau que definen neuropatológicamente la EA y otras taupatías. Con este objetivo, se caracterizaron cuidadosamente los patrones autoradiográficos y de ensayo de unión de [F-18]-AV-1451 en muestras de tejido postmortem representativas de un amplio espectro de patologías neurodegenerativas. Adicionalmente, se tuvo la oportunidad de correlacionar directamente la captación *in vivo* del trazador con la cuantificación de agregados de tau en el tejido cerebral así como la señal en la autorradiografía y los ensayos de unión *in vitro* en tres sujetos a los que se les había realizado una PET-[F-18]-AV-1451 en vida y al fallecer se sometieron a autopsia.

Las observaciones derivadas de este trabajo sugieren que [F-18]-AV-1451 se une fuertemente a lesiones formadas primariamente por tau en forma de PHF en muestras de tejido cerebral en casos de EA (ONFs tanto intra como extraneuronales, así como neuritas distróficas) así como a ONFs asociados con el envejecimiento presentes en la corteza temporal medial de controles, pero por el contrario no se une de forma significativa a inclusiones neuronales y gliales formadas principalmente por FR de tau en muestras de taupatías distintas a la EA, ni a lesiones que contengan  $\beta$ -amiloide,  $\alpha$ -sinucleína o TDP-43. Adicionalmente, se detectó una notable afinidad [F-18]-AV-1451 por células que contienen neuromelanina y melanina y, en menor grado, por lesiones hemorrágicas agudas y subagudas. Estos últimos hallazgos representan una señal *off-target* de [F-18]-AV-1451, y deberían ser considerados detenidamente ya que podrían tener implicaciones importantes en la interpretación de la retención del trazador en la neuroimagen *in vivo* con PET.

AV-1451 fue originalmente seleccionado entre una lista de compuestos químicos evaluados en tejido cerebral humano teniendo como diana a lesiones tau-PHF en forma de ONFs en los cerebros con EA, así como en ONF localizados en la corteza temporal medial y asociados con el envejecimiento que se observan frecuentemente en ancianos cognitivamente sanos.<sup>205</sup> Estudios iniciales de este compuesto sugirieron que tiene una afinidad más de 29 veces mayor para tau-PHF que para  $\beta$ -amiloide, y una unión despreciable a otras proteínas como la monoxidasas.<sup>205</sup> Los filamentos de tau presentes en la EA están formados por las 6 isoformas humanas cerebrales de tau y adoptan una ultraestructura en forma de PHF. Lo mismo ocurre en el caso de los filamentos de tau hallados en la corteza temporal asociados con el envejecimiento en ancianos



cognitivamente sanos y en algunas taupatías distintas a la EA, como la encefalopatía traumática crónica,<sup>245</sup> la taupatía primariamente relacionada con el envejecimiento o PART (primary age-related tauopathy),<sup>246</sup> la enfermedad de Niemann-Pick tipo C,<sup>247</sup> el complejo parkinson-demencia de Guam,<sup>248</sup> casos de enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker<sup>249</sup> y algunos casos de mutaciones en el gen *MAPT* (como la V337M<sup>250</sup> y la R406W<sup>111, 222</sup>). Por el contrario, en otras taupatías como la EPI,<sup>73</sup> la PSP,<sup>81</sup> la CBD<sup>83</sup> y algunas mutaciones del gen *MAPT* (como la P301L<sup>243, 244</sup>), los filamentos de tau están formado por un predominio o bien de 3R o de 4R y adoptan una ultraestructura de FR.

Los datos preliminares derivados de estudios *in vivo* con PET han mostrado una retención significativamente mayor de [F-18]-AV-1451 en los cerebros de individuos diagnosticados clínicamente de DCL y demencia tipo EA comparado con sujetos cognitivamente normales.<sup>1, 207, 209</sup> Nuevos estudios han sugerido que la captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 en la PET de sujetos de edades comprendidas entre los 50 y los 95 años con y sin EA puede ser clasificada en patrones que se asemejan a aquellos que describió Braak en su estadiaje de la patología tau en la EA,<sup>50</sup> aunque la relación entre los estadios de Braak asignados por la neuroimagen de tau *in vivo* y la neuropatología postmortem debe ser confirmada en tejido postmortem. La retención de [F-18]-AV-1451, especialmente en el lóbulo temporal inferior, también se correlaciona con niveles elevados de tau-total y tau-p así como niveles reducidos de A $\beta$ <sub>42</sub> en LCR en individuos normales y con demencia tipo EA.<sup>207, 215</sup> Estas observaciones iniciales tan prometedoras en el campo de la EA deben confirmarse, no obstante, en estudios radiológico-patológicos. Por otro lado, la literatura referente a la neuroimagen con [F-18]-AV-1451 en taupatías no-Alzheimer es todavía escasa, se basa en casos aislados o grupos muy pequeños de sujetos, y los resultados son conflictivos.<sup>216, 220</sup>

[F-18]-AV-1451 está abriéndose camino como herramienta diagnóstica en la investigación clínica, y ha sido incluido en ensayos terapéuticos de nuevos tratamientos para la EA, como el ensayo E4.<sup>131</sup> Por este motivo, es especialmente importante en esta fase inicial realizar un estudio exhaustivo para validar la sensibilidad y especificidad de este nuevo trazador y para definir exactamente la patología subyacente a la que éste se une y que es responsable de la señal detectada en la neuroimagen *in vivo*. Basados en los hallazgos de recientes estudios *in vivo* con PET-[F-18]-AV-1451,<sup>1, 209</sup> la hipótesis de trabajo de este tesis doctoral fue que [F-18]-AV-1451 se uniría con una mayor afinidad y especificidad a los agregados de tau-PHF en forma de ONFs característicos de la EA y

tendría una afinidad nula o mínima por tau en forma de FR y por otros agregados proteicos distintos a tau formados por  $\beta$ -amiloide,  $\alpha$ -sinucleína o TDP-43. Para confirmar o refutar esta hipótesis, se emplearon tres métodos distintos (autorradiografía con pantalla de fósforo usando [F-18]-AV-1451, autorradiografía de alta resolución con emulsión nuclear usando [F-18]-AV-1451 y ensayos de unión *in vitro* con [H-3]-AV-1451) para estudiar una serie de muestras de tejido cerebral obtenidos del banco de cerebros del MADRC provenientes de autopsias de casos con diagnósticos definitivos de EA, AAC, EPI, PSP, DCB, DFT-TDP-43, DCLw y AMS respectivamente, así como cerebros normales libres de patología neurodegenerativa.

Los resultados de los experimentos con autorradiografía con pantalla de fósforo y autorradiografía de alta resolución con emulsión nuclear, ambas técnicas usando el trazador [F-18]-AV-1451 (preparado unas horas antes en el Servicio de Medicina Nuclear del MGH y usado ese mismo día para realizar los estudios de PET *in vivo*), confirmaron que mientras que [F-18]-AV-1451 se une ávidamente a muestras de tejido cerebral de casos con EA que contienen ONFs, éste no marca las muestras de tejido que contienen AAC,  $\alpha$ -sinucleína y TDP-43, ni tampoco el tejido de controles sanos sin patología neurodegenerativa. Un hallazgo importante fue que [F-18]-AV-1451 no se une de forma significativa a agregados de tau no-PHF distintos a los ONFs en cerebros de taupatías no EA (EPI, PSP y DCB) o en ratones transgénicos rTg4510. Por lo tanto, estos datos sugieren que [F-18]-AV-1451 tiene una mayor afinidad para tau-PHF con respecto a agregados de tau formados por FR en estas taupatías distintas a la EA. Además, los experimentos realizados con autorradiografía también mostraron una señal radioactiva inequívoca en ONFs localizados en la CE (correspondiente a un estadio Braak II) en cerebros de sujetos ancianos sin patología tipo Alzheimer, sirviendo este hallazgo como control positivo interno óptimo en nuestros experimentos.

Los patrones autorradiográficos regionales y laminares de la distribución de [F-18]-AV-1451, observados con la combinación de autorradiografía con emulsión nuclear e inmunotinciones, se correlacionaron perfectamente con la localización de los clásicos ONFs en la corteza de cerebros con EA,<sup>238, 239</sup> siendo la unión del trazador especialmente intensa en las capas III y V. Estos experimentos también demostrando una unión despreciable en la sustancia blanca libre de ONFs en tejido cerebral de casos de EA.

Los experimentos con autorradiografía con emulsión nuclear permitieron además confirmar que las estructuras marcadas por [F-18]-AV-1451 debajo de los granos de

plata modificados por la radiación son lesiones tau-PHF positivas, incluyendo ONFs (tanto intra como extraneuronales u “ovillos fantasma”) así como neuritas distróficas que decoran la periferia de las placas neuríticas. Esto apunta a que estos dos tipos de lesiones tau-PHF positivas son el principal sustrato patológico de la señal *in vivo* de [F-18]-AV-1451 detectada en la neuroimagen con PET en los casos de EA.

El examen microscópico de placas difusas, AAC, lesiones tau no-PHF y agregados de  $\alpha$ -sinucleína y TDP-43 confirmaron la ausencia de un acúmulo significativo de granos de plata de la emulsión nuclear en estas lesiones. Este hecho también apunta a la mayor especificidad de [F-18]-AV-1451 por los agregados de tau-PHF en comparación con placas  $\beta$ -amiloide y depósitos de otras proteínas con estructura de hoja  $\beta$  plegada.

En concordancia con los anteriores hallazgos de autorradiografía, los resultados del ensayo de unión *in vitro* con [H-3]-AV-1451 mostraron unos mayores niveles de unión del trazador en las muestras de casos con EA que contenían gran cantidad de ONFs formados por tau-PHF, en comparación con cerebros con agregados de tau no-PHF, AAC o agregados de  $\alpha$ -sinucleína y TDP-43 o controles sanos sin patología. Con este método, no obstante, cabe destacar que las diferencias halladas fueron mucho menos robustas que las observadas con autorradiografía. Posibles hipótesis para explicar este fenómeno son la unión no específica de [H-3]-AV-1451 a componentes de la muestra como la hemoglobina, así como la ausencia de lavados con etanol. Esto podría explicar la mayor señal de fondo y el modesto índice señal/ruido del ensayo de unión *in vitro*.

Estudios recientes con PET-[F-18]-AV-1451 muestran una retención *in vivo* del trazador particularmente elevada en la corteza temporal inferior así como en la corteza de asociación parieto-occipital en pacientes con DCL y demencia tipo EA, y relativamente una menor retención en estructuras temporales mediales como son el hipocampo y la CE.<sup>1</sup> Es bien conocido por estudios neuropatológicos de cerebros con EA que mientras que la densidad de ONFs en la EA es mayor en el lóbulo temporal medial, la carga de placas neuríticas (y consiguientemente de neuritas PHF positivas) es relativamente baja en esta región, y particularmente elevada en las cortezas de asociación temporal, parietal y occipital.<sup>239</sup> El hallazgo de que [F-18]-AV-1451 se une a neuritas distróficas tau-PHF positivas además de a los ONFs podría proporcionar una explicación para este patrón de retención regional visto en la neuroimagen *in vivo* en pacientes con DCL y demencia tipo EA.

Otra observación frecuente en los estudios *in vivo* con PET-[F-18]-AV-1451 es la retención anormalmente elevada del trazador observada en el mesencéfalo y los globos oculares en una proporción importante de sujetos ancianos con distintos diagnósticos clínicos y grado de afectación cognitiva (desde controles sanos hasta pacientes con demencia). Los resultados de los experimentos con autorradiografía con emulsión nuclear aportan una explicación para algunos de estos hallazgos *in vivo* y demuestran que [F-18]-AV-1451 no solamente se une a agregados de tau-PHF sino que también tiene una diana fuera de blanco en estructuras que contienen neuromelanina, incluyendo las neuronas pigmentadas de la sustancia negra y que es independiente de la presencia o ausencia de patología tau en el mesencéfalo. A pesar de que es bien conocido de que la melanina y la neuromelanina tienen estructuras distintas, también se observó de forma incidental una intensa señal de [F-18]-AV-1451 en melanocitos extracutáneos localizados en las leptomeninges. Este hallazgo motivó la investigación del epitelio pigmentario de la retina, la piel y un caso con un melanoma metastásico cerebral, tejidos en los que también se evidenció una fuerte señal del trazador.

Datos de autorradiografía sugieren que [F-18]-AV-1451 también presenta una débil señal *off-target* en hemorragias parenquimatosas y subaracnoideas. Este hallazgo es particularmente relevante para la correcta interpretación de la neuroimagen *in vivo* con [F-18]-AV-1451 en pacientes con hemorragias cerebrales.

En estudios *in vivo* con [F-18]-AV-1451 se ha observado una retención elevada en los ganglios basales de forma bilateral en aproximadamente un 30-50% de sujetos,<sup>1, 208, 210</sup> especialmente aquellos de edad avanzada y abarcando todo el espectro cognitivo, desde individuos cognitivamente sanos hasta pacientes con demencia, por lo que no es un hallazgo específico de casos en los que se sospecha patología tau subyacente. Por el contrario, los experimentos de autorradiografía no mostraron ninguna señal significativa del trazador en tejido de ganglios basales en todos los casos estudiados, a pesar de la presencia de gran cantidad de agregados de tau no-PHF en el tejido de casos de taupatías no-Alzheimer. Este hallazgo sugiere que la señal observada en la neuroimagen *in vivo* en los ganglios basales podría representar una unión no específica del trazador en esta localización influenciada por factores técnicos o biológicos independientes a la presencia de tau en el tejido, pero no podemos descartar totalmente que los lavados con etanol empleados en los experimentos con autorradiografía eliminaran alguna señal muy débil de [F-18]-AV-1451 de las muestras de ganglios basales. No obstante, cuando realizamos los mismos experimentos sin los lavados con

etanol, una señal inespecífica muy intensa se observó en todas las muestras, tanto en la corteza como en la sustancia blanca, haciendo indistinguibles los casos con EA de los controles (datos no mostrados).

Varios estudios, tras la publicación de los datos de la primera parte de esta tesis, han caracterizado la selectividad y afinidad de la unión de AV-1451 en tejido cerebral a las distintas especies de tau y otras proteínas, mostrando resultados similares a la nuestra con algunas distinciones. Sander et al.<sup>251</sup> demostró una intensa señal de [F-18]-AV-1451 en la autorradiografía con pantalla de fósforo en la corteza cerebral en casos de EA, y en menor grado también en tejido proveniente de casos de EPI y en algunos FTD-17, incluyendo un portador de la mutación del gen *MAPT* R406W. Tejido de casos con PSP, DCB y DCL, al contrario, mostró una señal muy baja indistinguible de los controles sanos. No se halló tampoco una correlación significativa entre la señal del trazador y la carga de tau medida por inmunohistoquímica en las distintas entidades. Lowe et al.<sup>252</sup> estudió con autorradiografía con pantalla de fósforo en tejido cerebral de múltiples patologías neurodegenerativas y demostró que en tejido postmortem de casos de EA, [F-18]-AV-1451 se localiza preferentemente en los ONFs comparado con las neuritas distróficas, y se une con más afinidad a los ONFs maduros respecto a los extraneuronales o “fantasma”. En taupatías distintas a la EA (EPI, PSP y CBD), la señal autorradiográfica fue negligible. Adicionalmente, se halló una señal de poca intensidad en casos con inclusiones TDP-43, y se confirmó la presencia de señal en un portador de la mutación del gen *MAPT* R406W. Con respecto a la señal *off-target*, concluyeron que AV-1451 se une a pigmentos (neuronas con neuromelanina en la sustancia negra, neuronas llenas de lipofuscina en el geniculado lateral, y estructuras con melanina subpial), a calcificaciones en los plexos coroideos y al hierro.

En la segunda parte de esta tesis se tuvo la oportunidad única de examinar detalladamente las correlaciones entre la captación regional *in vivo* y los patrones de unión específicos de AV-1451 en tejido cerebral postmortem en los tres primeros individuos que se realizaron una PET con este trazador en vida y al fallecer se sometieron a autopsia en el MGH. Los datos se obtuvieron de la combinación de autorradiografía con [F-18]-AV-1451, ensayos de unión *in vitro* con [H-3]-AV-1451 y cuantificación de la tau inmunoprecipitada en la SDD-AGE en tejido cerebral de autopsia, y el análisis de las correlaciones entre estas medidas postmortem y la captación *in vivo* de AV-1451 en la PET en las mismas regiones cerebrales. Hasta la fecha, solo se ha publicado un estudio de correlación radiológica-patológica con [F-18]-

AV-1451 en un caso de un portador sintomático de la mutación del gen *MAPT* R406W.<sup>221</sup> En este individuo la retención del trazador se localizó en los lóbulos frontales y temporales así como en los ganglios basales y se colocó significativamente con la cantidad de patología tau cuantificada por inmunohistoquímica en estas mismas regiones. Aunque no se realizó autorradiografía en el tejido de este individuo, otras publicaciones han mostrado una fuerte señal autorradiográfica de [F-18]-AV-1451 en portadores de esta misma mutación.<sup>251, 252</sup> Esta mutación en concreto da lugar a agregados de tau que contienen las 6 isoformas de tau (3R+4R)<sup>111</sup> y tienen una ultraestructura de PHF,<sup>222</sup> ambas características compartidas con los clásicos ONFs típicos de la EA.

En concordancia con los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis, los experimentos de autorradiografía demostraron una ausencia de señal detectable de [F-18]-AV-1451 en el tejido cerebral de los tres sujetos, que contenía abundante patología tau en forma de FR. Como excepción, se halló una intensa señal local y selectiva del trazador en la CE en los tres sujetos, reflejando patología tau-PHF en forma de ONFs asociada con el envejecimiento, que sirvió de control positivo interno en estos experimentos, demostrando la selectividad del trazador para los agregados de tau en forma de PHF. Adicionalmente, se evidenció una intensa señal autorradiográfica del trazador en la sustancia negra del mesencéfalo en estos casos, confirmando la señal *off-target* de AV-1451 en la neuromelanina también en estos tres sujetos. Estas observaciones, así como la falta de una correlación robusta y consistente entre la retención regional *in vivo* de AV-1451 y la distribución topográfica de los agregados de tau, los niveles de unión *in vitro* en el tejido o la cuantificación de las distintas especies de tau inmunoprecipitada por SDD-AGE en el tejido postmortem de estos sujetos sugiere que [F-18]-AV-1451 puede no ser lo suficientemente sensible para detectar agregados de tau formados principalmente por FR, reduciendo su potencial utilidad como biomarcador de patología tau en taupatías distintas a la EA como la PSP o portadores de mutaciones en el gen como la P301L.

Algunos autores han reportado una retención elevada de [F-18]-AV-1451 predominantemente en el hipocampo, los ganglios basales y el mesencéfalo en individuos con un diagnóstico clínico de PSP, encefalopatía traumática crónica y algunos portadores de mutación del gen *MAPT* P301L que fue inicialmente atribuida a la presencia de patología tau en estas regiones.<sup>253-255</sup> No obstante, este patrón de

retención *in vivo* de [F-18]-AV-1451, que también presentaban los tres sujetos del estudio, es muy similar al observado en un elevado porcentaje de controles ancianos cognitivamente sanos.<sup>1, 208, 210</sup> Aunque los dos casos de PSP del estudio tenían muy abundante patología tau en el globo pálido, el tálamo y el mesencéfalo, regiones donde la captación *in vivo* del trazador era elevada, también se observaron numerosas inclusiones de tau neuronales y gliales en el cerebelo, regiones límbicas y la neocorteza, áreas donde la captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 estaba alrededor o por debajo del límite de detección en la PET. De forma similar, en el individuo portador de la mutación *MAPT* P301L el examen neuropatológico reveló un predominio de afectación de los ganglios basales con la presencia de múltiples granos tau positivos de pequeño tamaño. No obstante, también se hallaron abundantes granos tau positivos en muchas otras regiones cerebrales, tanto en la corteza como en la sustancia blanca, donde no se evidenció captación elevada del trazador en la PET.

Para explorar con más precisión las correlaciones radiológico-patológicas en estos tres casos, se analizaron las relaciones entre la retención *in vivo* de [F-18]-AV-1451 en la PET y los niveles de unión *in vitro* de [H-3]-AV-1451 en múltiples regiones cerebrales. Estos análisis no detectaron ninguna correlación significativa entre estas medidas en ninguno de los tres casos. Este hallazgo, unido a los resultados de los experimentos con autorradiografía, que muestran una ausencia de señal de [F-18]-AV-1451 en múltiples regiones cerebrales que contienen grandes cantidades de agregados de tau compuestos por FR, sugiere que la mayoría de la señal *in vivo* detectada en estos tres casos con taupatías no-Alzheimer en el lóbulo temporal medial y en el mesencéfalo es secundaria a la presencia de ONFs relacionados con el envejecimiento y a la señal *off-target* en las neuronas que contienen neuromelanina en la sustancia negra, respectivamente, más que a los agregados de tau 4R que caracterizan estas entidades. El sustrato subyacente a la captación de [F-18]-AV-1451 en los ganglios basales en estos tres sujetos así como en otros casos sigue sin estar claro. La elevada retención *in vivo* observada en un porcentaje importante de población anciana con y sin deterioro cognitivo, incluidos los tres sujetos del estudio, contrasta con la ausencia de señal autorradiográfica de [F-18]-AV-1451 en las muestras de tejido de ganglios basales. Adicionalmente, hemos estudiado con autorradiografía con pantalla de fósforo muestras adicionales de ganglios basales de casos del banco de tejidos con una variedad de enfermedades neurodegenerativas confirmadas neuropatológicamente, algunos de ellos conteniendo grandes cantidades de patología tau-FR, observando una ausencia de



señal de [F-18]-AV-1451 en todos los casos, independientemente de la presencia de agregados de tau en el tejido (datos no publicados).

La cuantificación detallada de los acúmulos de tau en múltiples regiones cerebrales con SDD-AGE, una técnica que preserva la ultraestructura de los filamentos de tau en homogeneizados de tejido cerebral, permitió detectar no solamente monómeros de tau sino también agregados de tau de alto peso molecular (HMW), que han sido implicados recientemente en la actividad *seeding* de tau, y comparar las cantidades de las distintas especies de tau en estos tres sujetos con los de cerebros con EA. Se observó, de forma esperada, que los cerebros con taupatías no-Alzheimer contenían cantidades de tau mucho menores que las detectadas en cerebros con EA.<sup>256</sup> Al comparar estas medidas bioquímicas de tau total y tau-PHF con la correspondiente retención *in vivo* de [F-18]-AV-1451 en las mismas regiones cerebrales, no se halló ninguna correlación significativa en los sujetos 1 y 3. Solamente en el sujeto 2 se detectó una correlación significativa entre la señal del trazador *in vivo* y las cantidades de tau total HMW, tau-PHF HMW y tau-PHF monomérica. Hay que interpretar estos resultados de forma muy cauta, ya que la significación no se confirmó en los otros dos casos y era debida exclusivamente a los datos de los ganglios basales, región que suele exhibir, como ya se ha explicado, una elevada captación *in vivo* de [F-18]-AV-1451 independientemente del diagnóstico clínico incluso en ancianos cognitivamente sanos.

Los resultados de este estudio apoyan la idea de que el nuevo trazador para tau AV-1451 se une con una alta afinidad a los agregados de tau en forma de ovillos neurofibrilares que contienen las 6 isoformas de tau (3R+4R) presentes en los cerebros con EA así como en el lóbulo temporal medial en población anciana. Este ligando también exhibe una afinidad relativamente baja para las inclusiones de tau formadas por las isoformas 4R y que adoptan una ultraestructura de filamentos rectos, como aquellas presentes en los casos de PSP y mutación *MAPT* P301L presentados en este estudio. Estos datos enfatizan la importancia de nuevos estudios radiológico-patológicos y sugieren que AV-1451 puede tener una utilidad limitada para detectar la presencia de agregados tau en taupatías distintas a la EA en vida del sujeto.





## CONCLUSIONES



Los resultados obtenidos de este trabajo sugieren que:

1. [F-18]-AV-1451 es un trazador de tomografía con emisión de positrones (PET) que se une con un alta afinidad y selectividad a los agregados de tau con una estructura de filamentos de hélices apareadas (PHF) en forma de ovillos neurofibrilares y neuritas distróficas en muestras de tejido cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Este trazador, sin embargo, no se une de forma detectable a depósitos de otras proteínas, tales como  $\beta$ -amiloide,  $\alpha$ -sinucleína o TDP-43, lo que sugiere que podría ser muy prometedor para la detección *in vivo* de depósitos de tau en la enfermedad de Alzheimer.
2. [F-18]-AV-1451 tiene una relativa menor afinidad para agregados de tau formados por filamentos rectos (FR) en muestras de tejido cerebral de pacientes con otras taupatías distintas a la enfermedad de Alzheimer, tales como la enfermedad de Pick, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración corticobasal o algunas mutaciones del gen *MAPT*.
3. [F-18]-AV-1451 tiene una señal *off-target* en lesiones que contienen neuromelanina y melanina, y en menor medida en lesiones hemorrágicas, en todas las muestras de tejido cerebral estudiadas independientemente del diagnóstico patológico, que será importante tener en cuenta para la correcta interpretación de las imágenes *in vivo*.
4. El estudio detallado de las correlaciones radiológico-patológicas en tres individuos con taupatías distintas a la enfermedad de Alzheimer (dos casos con parálisis supranuclear progresiva y un portador de mutación P301L en el gen *MAPT*, respectivamente) a los que se realizó PET-[F-18]-AV-1451 antes del fallecimiento no pudo demostrar una relación robusta y significativa entre la señal *in vivo* del trazador en múltiples regiones de interés con su unión *in vitro* ni con los niveles de patología tau presentes en esas mismas regiones. Estos datos sugieren que la utilidad clínica de AV-1451 como marcador subrogado para la detección de patología tau en forma de filamentos rectos en estas taupatías distintas a la enfermedad de Alzheimer puede ser muy limitada.

## CONCLUSIONES

---

5. Los datos obtenidos en esta tesis doctoral aportan información importante para la correcta interpretación de los patrones de retención *in vivo* en la PET del nuevo compuesto para tau [F-18]-AV-1451.

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS



### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadios de Braak para lesiones neurofibrilares en la EA	19
Tabla 2. Estadios CERAD para placas neuríticas	21
Tabla 3. Fases de Thal de distribución de lesiones $\beta$ -amiloide en la EA	23
Tabla 4. Clasificación ABC de los cambios neuropatológicos de la EA	24
Tabla 5. Niveles de cambios neuropatológicos de la EA	24
Tabla 6. Características de las taupatías	25
Tabla 7. Criterios para un uso adecuado de la PET-amiloidea	37
Tabla 8. Potenciales aplicaciones de la PET-tau	38
Tabla 9. Dificultades para la identificación de un trazador de PET-tau	38
Tabla 10. Requisitos de un trazador de PET-tau	39
Tabla 11. Características de [F-18]-AV-1451	41
Tabla 12. Información demográfica y neuropatológica de los sujetos del estudio	69
Tabla 13. Ensayos de unión in vitro con [H-3]-AV-1451	80



### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de las seis isoformas de tau	17
Figura 2. Patología tau en la EA	19
Figura 3. Progresión regional de las lesiones neurofibrilares en la EA según los estadios de Braak	20
Figura 4. Patología A $\beta$ en la EA	21
Figura 5. Fases de Thal de distribución de lesiones $\beta$ -amiloide en la EA	22
Figura 6. Ultraestructura de los filamentos de tau en las distintas taupatías	26
Figura 7. Patología tau en la EPI	27
Figura 8. Patología tau en la PSP	28
Figura 9. Patología tau en la DCB	29
Figura 10. Modelo de alteración temporal de los biomarcadores en la EA	31
Figura 11. PET-amiloide en controles sanos y pacientes con enfermedades neurodegenerativa	35
Figura 12. Tinción de PiB en placas amiloideas y AAC	36
Figura 13. Estructuras químicas de T726 y T807	40
Figura 14. Autorradiografía con [F-18]-AV-1451 e inmunotinciones para tau-PHF y A $\beta$	40
Figura 15. PET-[F-18]-AV-1451 en la EA, el DCL y ancianos cognitivamente sanos	42
Figura 16. Contraste de la captación <i>in vivo</i> de [F-18]-AV-1451 entre individuos con deterioro cognitivo y ancianos cognitivamente sanos	42

Figura 17. Comparación entre captación de amiloide en la PET-[C-11]-PiB y la captación de tau en la PET-[F-18]-AV-1451 en ancianos cognitivamente sanos y pacientes con EA	43
Figura 18. PET-[F-18]-AV-1451 en variantes clínicas de la EA	46
Figura 19. Autorradiografía con pantalla de fósforo en taupatías y controles sanos	72
Figura 20. Autorradiografía con pantalla de fósforo en AAC, DFT-TDP-43, DCLw y AMS y en la sustancia negra	73
Figura 21. Autorradiografía de alta resolución con emulsión nuclear	76
Figura 22. Señal <i>off-target</i> de [F-18]-AV-1451 en autorradiografía en la neuromelanina, la melanina y el hierro	78
Figura 23. PET-[F-18]-AV-1451 en los sujetos de estudio	82
Figura 24. Examen neuropatológico en los sujetos de estudio	84
Figura 25. Autorradiografía con pantalla de fósforo y con emulsión nuclear en los sujetos de estudio	86
Figura 26. Ensayos de unión <i>in vitro</i> con [H-3]-AV-1451 y correlación con la captación <i>in vivo</i> de [F-18]-AV-1451 en la PET en los sujetos del estudio	88
Figura 27. Cuantificación bioquímica de tau con SDD-AGE y correlación regional con la captación <i>in vivo</i> de [F-18]-AV-1451 en la PET en los sujetos de estudio	90







Los resultados de la primera parte de esta tesis doctoral fueron publicados en la revista *Annals of Neurology* en Noviembre de 2015:

Ann Neurol. 2015 Nov;78(5):787-800. doi: 10.1002/ana.24517. Epub 2015 Sep 25.

**Validating novel tau positron emission tomography tracer [F-18]-AV-1451 (T807) on postmortem brain tissue.**

Marquié M<sup>1,2,3</sup>, Normandin MD<sup>4</sup>, Vanderburg CR<sup>1,2,5</sup>, Costantino IM<sup>1,2</sup>, Bien EA<sup>1,2,5</sup>, Rycyna LG<sup>1,2,5</sup>, Klunk WE<sup>6</sup>, Mathis CA<sup>7</sup>, Ikonomic MD<sup>8,9</sup>, Debnath ML<sup>6</sup>, Vasdev N<sup>4</sup>, Dickerson BC<sup>2</sup>, Gomperts SN<sup>1,2</sup>, Growdon JH<sup>2</sup>, Johnson KA<sup>2</sup>, Frosch MP<sup>1,2,10</sup>, Hyman BT<sup>1,2,5</sup>, Gómez-Isla T<sup>1,2</sup>.

**Author information**

1 MassGeneral Institute for Neurodegenerative Disease, Charlestown, MA.

2 Department of Neurology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA.

3 Autonomous University of Barcelona, Medicine Doctoral Studies, Barcelona, Spain.

4 Center for Advanced Medical Imaging Sciences, Division of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Department of Radiology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA.

5 Harvard NeuroDiscovery Center, Harvard Medical School, Boston, MA.

6 Department of Psychiatry, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA.

7 Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA.

8 Department of Neurology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA.

9 Geriatric Research Education and Clinical Center, Veterans Administration Pittsburgh Clinical System, Pittsburgh, PA.

10 C. S. Kubik Laboratory for Neuropathology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA.

### **Abstract**

#### **OBJECTIVE:**

To examine region- and substrate-specific autoradiographic and in vitro binding patterns of positron emission tomography tracer [F-18]-AV-1451 (previously known as T807), tailored to allow in vivo detection of paired helical filament-tau-containing lesions, and to determine whether there is off-target binding to other amyloid/non-amyloid proteins.

#### **METHODS:**

We applied [F-18]-AV-1451 phosphor screen autoradiography, [F-18]-AV-1451 nuclear emulsion autoradiography, and [H-3]-AV-1451 in vitro binding assays to the study of postmortem samples from patients with a definite pathological diagnosis of Alzheimer disease, frontotemporal lobar degeneration-tau, frontotemporal lobar degeneration-transactive response DNA binding protein 43 (TDP-43), progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy, cerebral amyloid angiopathy and elderly controls free of pathology.

#### **RESULTS:**

Our data suggest that [F-18]-AV-1451 strongly binds to tau lesions primarily made of paired helical filaments in Alzheimer brains (eg, intraneuronal and extraneuronal tangles and dystrophic neurites), but does not seem to bind to a significant extent to neuronal and glial inclusions mainly composed of straight tau filaments in non-Alzheimer tauopathy brains or to lesions containing  $\beta$ -amyloid,  $\alpha$ -synuclein, or TDP-43. [F-18]-AV-1451 off-target binding to neuromelanin- and melanin-containing cells and, to a lesser extent, to brain hemorrhagic lesions was identified.

#### **INTERPRETATION:**

Our data suggest that [F-18]-AV-1451 holds promise as a surrogate marker for the detection of brain tau pathology in the form of tangles and paired helical filament-tau-containing neurites in Alzheimer brains but also point to its relatively lower affinity for lesions primarily made of straight tau filaments in non-Alzheimer tauopathy cases and to the existence of some [F-18]-AV-1451 off-target binding. These findings provide important insights for interpreting in vivo patterns of [F-18]-AV-1451 retention.

© 2015 American Neurological Association.

PMID: [26344059](#) PMCID: [PMC4900162](#) [Available on 2016-11-01] DOI: [10.1002/ana.24517](#)

## **BIBLIOGRAFÍA**





1. Johnson KA, Schultz A, Betensky RA, et al. Tau positron emission tomographic imaging in aging and early Alzheimer disease. *Annals of neurology* 2016;79:110-119.
2. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 2013;9:63-75 e62.
3. <http://www.who.int> [online].
4. Alzheimer's A. 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 2013;9:208-245.
5. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 2011;7:263-269.
6. Roman GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, et al. Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology* 1993;43:250-260.
7. McKeith IG, Galasko D, Kosaka K, et al. Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology* 1996;47:1113-1124.
8. Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, et al. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain : a journal of neurology* 2011;134:2456-2477.
9. Beach TG, Monsell SE, Phillips LE, Kukull W. Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005-2010. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2012;71:266-273.
10. Rosen C, Hansson O, Blennow K, Zetterberg H. Fluid biomarkers in Alzheimer's disease - current concepts. *Molecular neurodegeneration* 2013;8:20.
11. Villemagne VL, Ong K, Mulligan RS, et al. Amyloid imaging with (18)F-florbetaben in Alzheimer disease and other dementias. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 2011;52:1210-1217.

12. Villemagne VL, Fodero-Tavoletti MT, Masters CL, Rowe CC. Tau imaging: early progress and future directions. *The Lancet Neurology* 2015;14:114-124.
13. Mandelkow EM, Mandelkow E. Tau in Alzheimer's disease. *Trends in cell biology* 1998;8:425-427.
14. Trojanowski JQ, Lee VM. "Fatal attractions" of proteins. A comprehensive hypothetical mechanism underlying Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000;924:62-67.
15. Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Neurofibrillary pathology leads to synaptic loss and not the other way around in Alzheimer disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 2002;4:235-238.
16. Beach TG, Walker R, McGeer EG. Patterns of gliosis in Alzheimer's disease and aging cerebrum. *Glia* 1989;2:420-436.
17. Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D. Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *Journal of neuroimmunology* 1989;24:173-182.
18. Rogers J, Luber-Narod J, Styren SD, Civin WH. 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* 1988;9:339-349.
19. Masliah E, Mallory M, Hansen L, et al. Immunoreactivity of CD45, a protein phosphotyrosine phosphatase, in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* 1991;83:12-20.
20. Esiri MM, Wilcock GK. Cerebral amyloid angiopathy in dementia and old age. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1986;49:1221-1226.
21. Scheff SW, Price DA. Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* 1993;33:190-199.
22. DeKosky ST, Scheff SW, Styren SD. Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration : a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection, and neuroregeneration* 1996;5:417-421.

23. Gomez-Isla T, Hollister R, West H, et al. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* 1997;41:17-24.
24. Knowles RB, Wyart C, Buldyrev SV, et al. Plaque-induced neurite abnormalities: implications for disruption of neural networks in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:5274-5279.
25. Spillantini MG, Goedert M. Tau pathology and neurodegeneration. *The Lancet Neurology* 2013;12:609-622.
26. Lee HG, Perry G, Moreira PI, et al. Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends in molecular medicine* 2005;11:164-169.
27. Giacobini E, Gold G. Alzheimer disease therapy--moving from amyloid-beta to tau. *Nature reviews Neurology* 2013;9:677-686.
28. Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature reviews Neuroscience* 2007;8:663-672.
29. Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 1992;31:10626-10633.
30. Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988;85:4051-4055.
31. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989;3:519-526.
32. Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *The EMBO journal* 1989;8:393-399.

33. Tolnay M, Probst A. The neuropathological spectrum of neurodegenerative tauopathies. *IUBMB life* 2003;55:299-305.
34. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986;83:4913-4917.
35. Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986;83:4044-4048.
36. Li X, Kumar Y, Zempel H, Mandelkow EM, Biernat J, Mandelkow E. Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration. *The EMBO journal* 2011;30:4825-4837.
37. Kirschner DA, Abraham C, Selkoe DJ. X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross-beta conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986;83:503-507.
38. Kidd M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 1963;197:192-193.
39. Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 1992;8:159-168.
40. Crowther RA. Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991;88:2288-2292.
41. Espinoza M, de Silva R, Dickson DW, Davies P. Differential incorporation of tau isoforms in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 2008;14:1-16.
42. Su JH, Cummings BJ, Cotman CW. Identification and distribution of axonal dystrophic neurites in Alzheimer's disease. *Brain research* 1993;625:228-237.

43. Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* 2002;103:26-35.
44. Braak E, Braak H, Mandelkow EM. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta neuropathologica* 1994;87:554-567.
45. Braak H, Braak E, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: a third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neuroscience letters* 1986;65:351-355.
46. Braak H, Braak E. Neuropil threads occur in dendrites of tangle-bearing nerve cells. *Neuropathology and applied neurobiology* 1988;14:39-44.
47. Su JH, Cummings BJ, Cotman CW. Subpopulations of dystrophic neurites [correction of neuritis] in Alzheimer's brain with distinct immunocytochemical and argentophilic characteristics. *Brain research* 1994;637:37-44.
48. Su JH, Cummings BJ, Cotman CW. Plaque biogenesis in brain aging and Alzheimer's disease. I. Progressive changes in phosphorylation states of paired helical filaments and neurofilaments. *Brain research* 1996;739:79-87.
49. Braak H, Braak E. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiology of aging* 1995;16:271-278; discussion 278-284.
50. Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica* 1991;82:239-259.
51. Ingelsson M, Fukumoto H, Newell KL, et al. Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* 2004;62:925-931.
52. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2011;1:a006189.

53. Arriagada PV, Marzloff K, Hyman BT. Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology* 1992;42:1681-1688.
54. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, et al. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2012;71:362-381.
55. Braak H, Braak E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiology of aging* 1997;18:351-357.
56. Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta neuropathologica* 2006;112:389-404.
57. O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual review of neuroscience* 2011;34:185-204.
58. Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 2012;8:1-13.
59. Masliah E, Mallory M, Hansen L, DeTeresa R, Alford M, Terry R. Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* 1994;174:67-72.
60. Pike CJ, Cummings BJ, Cotman CW. Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease. *Experimental neurology* 1995;132:172-179.
61. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1991;41:479-486.
62. Knopman DS, Parisi JE, Salviati A, et al. Neuropathology of cognitively normal elderly. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2003;62:1087-1095.
63. Morris JC, Storandt M, McKeel DW, Jr., et al. Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in "normal" aging: Evidence for presymptomatic and very mild Alzheimer's disease. *Neurology* 1996;46:707-719.

64. Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 2002;58:1791-1800.
65. Chalmers K, Wilcock GK, Love S. APOE epsilon 4 influences the pathological phenotype of Alzheimer's disease by favouring cerebrovascular over parenchymal accumulation of A beta protein. *Neuropathology and applied neurobiology* 2003;29:231-238.
66. Jack CR, Jr., Vemuri P, Wiste HJ, et al. Evidence for ordering of Alzheimer disease biomarkers. *Archives of neurology* 2011;68:1526-1535.
67. Jack CR, Jr., Vemuri P, Wiste HJ, et al. Shapes of the trajectories of 5 major biomarkers of Alzheimer disease. *Archives of neurology* 2012;69:856-867.
68. Jack CR, Jr., Wiste HJ, Lesnick TG, et al. Brain beta-amyloid load approaches a plateau. *Neurology* 2013;80:890-896.
69. Hyman BT, Trojanowski JQ. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 1997;56:1095-1097.
70. Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annual review of neuroscience* 2001;24:1121-1159.
71. Murray ME, Kouri N, Lin WL, Jack CR, Jr., Dickson DW, Vemuri P. Clinicopathologic assessment and imaging of tauopathies in neurodegenerative dementias. *Alzheimer's research & therapy* 2014;6:1.
72. Wolfe MS. The role of tau in neurodegenerative diseases and its potential as a therapeutic target. *Scientifica* 2012;2012:796024.
73. Cairns NJ, Bigio EH, Mackenzie IR, et al. Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta neuropathologica* 2007;114:5-22.
74. Steele JC, Richardson JC, Olszewski J. Progressive Supranuclear Palsy. A Heterogeneous Degeneration Involving the Brain Stem, Basal Ganglia and Cerebellum



with Vertical Gaze and Pseudobulbar Palsy, Nuchal Dystonia and Dementia. *Archives of neurology* 1964;10:333-359.

75. Dickson DW. Neuropathologic differentiation of progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Journal of neurology* 1999;246 Suppl 2:116-15.

76. Foster NL, Wilhelmsen K, Sima AA, Jones MZ, D'Amato CJ, Gilman S. Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference. Conference Participants. *Annals of neurology* 1997;41:706-715.

77. Wischik CM, Novak M, Thogersen HC, et al. Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988;85:4506-4510.

78. Dickson DW. Neuropathology of Pick's disease. *Neurology* 2001;56:S16-20.

79. Kato S, Nakamura H. Presence of two different fibril subtypes in the Pick body: an immunoelectron microscopic study. *Acta neuropathologica* 1990;81:125-129.

80. Richardson JC, Steele J, Olszewski J. Supranuclear Ophthalmoplegia, Pseudobulbar Palsy, Nuchal Dystonia and Dementia. A Clinical Report on Eight Cases of "Heterogenous System Degeneration". *Transactions of the American Neurological Association* 1963;88:25-29.

81. Hauw JJ, Daniel SE, Dickson D, et al. Preliminary NINDS neuropathologic criteria for Steele-Richardson-Olszewski syndrome (progressive supranuclear palsy). *Neurology* 1994;44:2015-2019.

82. Takauchi S, Mizuhara T, Miyoshi K. Unusual paired helical filaments in progressive supranuclear palsy. *Acta neuropathologica* 1983;59:225-228.

83. Armstrong MJ, Litvan I, Lang AE, et al. Criteria for the diagnosis of corticobasal degeneration. *Neurology* 2013;80:496-503.

84. Dickson DW, Bergeron C, Chin SS, et al. Office of Rare Diseases neuropathologic criteria for corticobasal degeneration. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2002;61:935-946.

85. Ksiezak-Reding H, Tracz E, Yang LS, Dickson DW, Simon M, Wall JS. Ultrastructural instability of paired helical filaments from corticobasal degeneration as

examined by scanning transmission electron microscopy. *The American journal of pathology* 1996;149:639-651.

86. McKhann GM, Albert MS, Grossman M, et al. Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Archives of neurology* 2001;58:1803-1809.

87. Kovacs GG, Rozemuller AJ, van Swieten JC, et al. Neuropathology of the hippocampus in FTLD-Tau with Pick bodies: a study of the BrainNet Europe Consortium. *Neuropathology and applied neurobiology* 2013;39:166-178.

88. Graff-Radford NR, Damasio AR, Hyman BT, et al. Progressive aphasia in a patient with Pick's disease: a neuropsychological, radiologic, and anatomic study. *Neurology* 1990;40:620-626.

89. Caso F, Gesierich B, Henry M, et al. Nonfluent/agrammatic PPA with in-vivo cortical amyloidosis and Pick's disease pathology. *Behavioural neurology* 2013;26:95-106.

90. Tsuchiya K, Piao YS, Oda T, et al. Pathological heterogeneity of the precentral gyrus in Pick's disease: a study of 16 autopsy cases. *Acta neuropathologica* 2006;112:29-42.

91. Lang AE, Bergeron C, Pollanen MS, Ashby P. Parietal Pick's disease mimicking cortical-basal ganglionic degeneration. *Neurology* 1994;44:1436-1440.

92. Murayama S, Mori H, Ihara Y, Tomonaga M. Immunocytochemical and ultrastructural studies of Pick's disease. *Annals of neurology* 1990;27:394-405.

93. Sergeant N, David JP, Lefranc D, Vermersch P, Wattez A, Delacourte A. Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. *FEBS letters* 1997;412:578-582.

94. Bigio EH, Brown DF, White CL, 3rd. Progressive supranuclear palsy with dementia: cortical pathology. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 1999;58:359-364.

95. Josephs KA, Boeve BF, Duffy JR, et al. Atypical progressive supranuclear palsy underlying progressive apraxia of speech and nonfluent aphasia. *Neurocase* 2005;11:283-296.
96. Williams DR, Holton JL, Strand K, Revesz T, Lees AJ. Pure akinesia with gait freezing: a third clinical phenotype of progressive supranuclear palsy. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2007;22:2235-2241.
97. Yamada T, McGeer PL, McGeer EG. Appearance of paired nucleated, Tau-positive glia in patients with progressive supranuclear palsy brain tissue. *Neuroscience letters* 1992;135:99-102.
98. Litvan I, Agid Y, Calne D, et al. Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP international workshop. *Neurology* 1996;47:1-9.
99. Katsuse O, Iseki E, Arai T, et al. 4-repeat tauopathy sharing pathological and biochemical features of corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy. *Acta neuropathologica* 2003;106:251-260.
100. Litvan I, Grimes DA, Lang AE, et al. Clinical features differentiating patients with postmortem confirmed progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Journal of neurology* 1999;246 Suppl 2:II1-5.
101. Litvan I, Grimes DA, Lang AE. Phenotypes and prognosis: clinicopathologic studies of corticobasal degeneration. *Advances in neurology* 2000;82:183-196.
102. Kouri N, Murray ME, Hassan A, et al. Neuropathological features of corticobasal degeneration presenting as corticobasal syndrome or Richardson syndrome. *Brain : a journal of neurology* 2011;134:3264-3275.
103. Grimes DA, Lang AE, Bergeron CB. Dementia as the most common presentation of cortical-basal ganglionic degeneration. *Neurology* 1999;53:1969-1974.
104. Kertesz A, Martinez-Lage P, Davidson W, Munoz DG. The corticobasal degeneration syndrome overlaps progressive aphasia and frontotemporal dementia. *Neurology* 2000;55:1368-1375.

105. Rebeiz JJ, Kolodny EH, Richardson EP, Jr. Corticodentatonigral degeneration with neuronal achromasia: a progressive disorder of late adult life. *Transactions of the American Neurological Association* 1967;92:23-26.
106. Ksiezak-Reding H, Morgan K, Mattiace LA, et al. Ultrastructure and biochemical composition of paired helical filaments in corticobasal degeneration. *The American journal of pathology* 1994;145:1496-1508.
107. Kouri N, Whitwell JL, Josephs KA, Rademakers R, Dickson DW. Corticobasal degeneration: a pathologically distinct 4R tauopathy. *Nature reviews Neurology* 2011;7:263-272.
108. Ghetti B, Oblak AL, Boeve BF, Johnson KA, Dickerson BC, Goedert M. Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathology and applied neurobiology* 2015;41:24-46.
109. Spillantini MG, Bird TD, Ghetti B. Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain pathology* 1998;8:387-402.
110. Crowther RA, Goedert M. Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases. *Journal of structural biology* 2000;130:271-279.
111. Hong M, Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, et al. Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* 1998;282:1914-1917.
112. Spillantini MG, Crowther RA, Goedert M. Comparison of the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease and familial presenile dementia with tangles. *Acta neuropathologica* 1996;92:42-48.
113. Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:7737-7741.
114. Yasuda M, Takamatsu J, D'Souza I, et al. A novel mutation at position +12 in the intron following exon 10 of the tau gene in familial frontotemporal dementia (FTD-Kumamoto). *Annals of neurology* 2000;47:422-429.

115. Bird TD, Nochlin D, Poorkaj P, et al. A clinical pathological comparison of three families with frontotemporal dementia and identical mutations in the tau gene (P301L). *Brain : a journal of neurology* 1999;122 ( Pt 4):741-756.
116. Bugiani O, Murrell JR, Giaccone G, et al. Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 1999;58:667-677.
117. Hampel H, Burger K, Teipel SJ, Bokde AL, Zetterberg H, Blennow K. Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 2008;4:38-48.
118. Sabuncu MR, Desikan RS, Sepulcre J, et al. The dynamics of cortical and hippocampal atrophy in Alzheimer disease. *Archives of neurology* 2011;68:1040-1048.
119. Mosconi L. Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 2005;32:486-510.
120. Villemagne VL. Amyloid imaging: Past, present and future perspectives. *Ageing research reviews* 2016.
121. Okamura N, Harada R, Furukawa K, et al. Advances in the development of tau PET radiotracers and their clinical applications. *Ageing research reviews* 2016.
122. Jack CR, Jr., Knopman DS, Jagust WJ, et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *The Lancet Neurology* 2013;12:207-216.
123. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 2011;7:280-292.
124. Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, et al. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* 2012;367:795-804.

125. Mormino EC, Betensky RA, Hedden T, et al. Amyloid and APOE epsilon4 interact to influence short-term decline in preclinical Alzheimer disease. *Neurology* 2014;82:1760-1767.
126. Reiman EM, Quiroz YT, Fleisher AS, et al. Brain imaging and fluid biomarker analysis in young adults at genetic risk for autosomal dominant Alzheimer's disease in the presenilin 1 E280A kindred: a case-control study. *The Lancet Neurology* 2012;11:1048-1056.
127. Doody RS, Thomas RG, Farlow M, et al. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* 2014;370:311-321.
128. Salloway S, Sperling R, Fox NC, et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* 2014;370:322-333.
129. Reiman EM, Langbaum JB, Fleisher AS, et al. Alzheimer's Prevention Initiative: a plan to accelerate the evaluation of presymptomatic treatments. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 2011;26 Suppl 3:321-329.
130. Mills SM, Mallmann J, Santacruz AM, et al. Preclinical trials in autosomal dominant AD: implementation of the DIAN-TU trial. *Revue neurologique* 2013;169:737-743.
131. Sperling RA, Rentz DM, Johnson KA, et al. The A4 study: stopping AD before symptoms begin? *Science translational medicine* 2014;6:228fs213.
132. Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, et al. Reduction of beta-amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Annals of neurology* 1995;38:643-648.
133. Vandermeeren M, Mercken M, Vanmechelen E, et al. Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of neurochemistry* 1993;61:1828-1834.
134. Blennow K, Wallin A, Agren H, Spenger C, Siegfried J, Vanmechelen E. Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for axonal degeneration in Alzheimer disease? *Molecular and chemical neuropathology / sponsored by the International*

Society for Neurochemistry and the World Federation of Neurology and research groups on neurochemistry and cerebrospinal fluid 1995;26:231-245.

135. Mattsson N, Rosen E, Hansson O, et al. Age and diagnostic performance of Alzheimer disease CSF biomarkers. *Neurology* 2012;78:468-476.

136. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *The Lancet Neurology* 2007;6:734-746.

137. Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, et al. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *Jama* 2009;302:385-393.

138. Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2004;1:213-225.

139. Engelborghs S, De Vreese K, Van de Castele T, et al. Diagnostic performance of a CSF-biomarker panel in autopsy-confirmed dementia. *Neurobiology of aging* 2008;29:1143-1159.

140. Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, et al. Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Annals of neurology* 2006;59:512-519.

141. Shoji M. Cerebrospinal fluid Abeta40 and Abeta42: natural course and clinical usefulness. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2002;7:d997-1006.

142. Franz G, Beer R, Kampfl A, et al. Amyloid beta 1-42 and tau in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury. *Neurology* 2003;60:1457-1461.

143. Trysberg E, Hoglund K, Svenungsson E, Blennow K, Tarkowski A. Decreased levels of soluble amyloid beta-protein precursor and beta-amyloid protein in cerebrospinal fluid of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy* 2004;6:R129-136.

144. Papon MA, Whittington RA, El-Khoury NB, Planel E. Alzheimer's disease and anesthesia. *Frontiers in neuroscience* 2011;4:272.

145. Clifford DB. Human immunodeficiency virus-associated dementia. *Archives of neurology* 2000;57:321-324.
146. Holmberg B, Johnels B, Blennow K, Rosengren L. Cerebrospinal fluid Abeta42 is reduced in multiple system atrophy but normal in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2003;18:186-190.
147. Renard D, Castelnovo G, Wacongne A, et al. Interest of CSF biomarker analysis in possible cerebral amyloid angiopathy cases defined by the modified Boston criteria. *Journal of neurology* 2012;259:2429-2433.
148. Formichi P, Parnetti L, Radi E, Cevenini G, Dotti MT, Federico A. CSF Biomarkers Profile in CADASIL-A Model of Pure Vascular Dementia: Usefulness in Differential Diagnosis in the Dementia Disorder. *International journal of Alzheimer's disease* 2010;2010.
149. Mulder C, Verwey NA, van der Flier WM, et al. Amyloid-beta(1-42), total tau, and phosphorylated tau as cerebrospinal fluid biomarkers for the diagnosis of Alzheimer disease. *Clinical chemistry* 2010;56:248-253.
150. Hampel H, Blennow K, Shaw LM, Hoessler YC, Zetterberg H, Trojanowski JQ. Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Experimental gerontology* 2010;45:30-40.
151. Hesse C, Rosengren L, Andreasen N, et al. Transient increase in total tau but not phospho-tau in human cerebrospinal fluid after acute stroke. *Neuroscience letters* 2001;297:187-190.
152. Gomez-Tortosa E, Gonzalo I, Fanjul S, et al. Cerebrospinal fluid markers in dementia with lewy bodies compared with Alzheimer disease. *Archives of neurology* 2003;60:1218-1222.
153. Wang GR, Gao C, Shi Q, et al. Elevated levels of tau protein in cerebrospinal fluid of patients with probable Creutzfeldt-Jakob disease. *The American journal of the medical sciences* 2010;340:291-295.



154. Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, et al. Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neuroscience letters* 2000;285:49-52.
155. Kester MI, Scheffer PG, Koel-Simmelink MJ, et al. Serial CSF sampling in Alzheimer's disease: specific versus non-specific markers. *Neurobiology of aging* 2012;33:1591-1598.
156. Samgard K, Zetterberg H, Blennow K, Hansson O, Minthon L, Londos E. Cerebrospinal fluid total tau as a marker of Alzheimer's disease intensity. *International journal of geriatric psychiatry* 2010;25:403-410.
157. Irwin DJ, Trojanowski JQ, Grossman M. Cerebrospinal fluid biomarkers for differentiation of frontotemporal lobar degeneration from Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience* 2013;5:6.
158. Kaerst L, Kuhlmann A, Wedekind D, Stoeck K, Lange P, Zerr I. Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease, vascular dementia and ischemic stroke patients: a critical analysis. *Journal of neurology* 2013;260:2722-2727.
159. Stefani A, Brusa L, Olivola E, Pierantozzi M, Martorana A. CSF and clinical hallmarks of subcortical dementias: focus on DLB and PDD. *Journal of neural transmission* 2012;119:861-875.
160. Klunk WE, Engler H, Nordberg A, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Annals of neurology* 2004;55:306-319.
161. Clark CM, Pontecorvo MJ, Beach TG, et al. Cerebral PET with florbetapir compared with neuropathology at autopsy for detection of neuritic amyloid-beta plaques: a prospective cohort study. *The Lancet Neurology* 2012;11:669-678.
162. Wolk DA, Grachev ID, Buckley C, et al. Association between in vivo fluorine 18-labeled flutemetamol amyloid positron emission tomography imaging and in vivo cerebral cortical histopathology. *Archives of neurology* 2011;68:1398-1403.
163. Rowe CC, Ackerman U, Browne W, et al. Imaging of amyloid beta in Alzheimer's disease with 18F-BAY94-9172, a novel PET tracer: proof of mechanism. *The Lancet Neurology* 2008;7:129-135.

164. Rowe CC, Ng S, Ackermann U, et al. Imaging beta-amyloid burden in aging and dementia. *Neurology* 2007;68:1718-1725.
165. Quigley H, Colloby SJ, O'Brien JT. PET imaging of brain amyloid in dementia: a review. *International journal of geriatric psychiatry* 2011;26:991-999.
166. Lopera F, Ardilla A, Martinez A, et al. Clinical features of early-onset Alzheimer disease in a large kindred with an E280A presenilin-1 mutation. *Jama* 1997;277:793-799.
167. Fleisher AS, Chen K, Quiroz YT, et al. Florbetapir PET analysis of amyloid-beta deposition in the presenilin 1 E280A autosomal dominant Alzheimer's disease kindred: a cross-sectional study. *The Lancet Neurology* 2012;11:1057-1065.
168. Villemagne VL, Pike KE, Chetelat G, et al. Longitudinal assessment of Aβeta and cognition in aging and Alzheimer disease. *Annals of neurology* 2011;69:181-192.
169. Bacskai BJ, Frosch MP, Freeman SH, et al. Molecular imaging with Pittsburgh Compound B confirmed at autopsy: a case report. *Archives of neurology* 2007;64:431-434.
170. Ikonomic MD, Klunk WE, Abrahamson EE, et al. Post-mortem correlates of in vivo PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology* 2008;131:1630-1645.
171. Sojkova J, Driscoll I, Iacono D, et al. In vivo fibrillar beta-amyloid detected using [11C]PiB positron emission tomography and neuropathologic assessment in older adults. *Archives of neurology* 2011;68:232-240.
172. Leinonen V, Rinne JO, Wong DF, et al. Diagnostic effectiveness of quantitative [(1)(8)F]flutemetamol PET imaging for detection of fibrillar amyloid beta using cortical biopsy histopathology as the standard of truth in subjects with idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Acta neuropathologica communications* 2014;2:46.
173. Driscoll I, Troncoso JC, Rudow G, et al. Correspondence between in vivo (11)C-PiB-PET amyloid imaging and postmortem, region-matched assessment of plaques. *Acta neuropathologica* 2012;124:823-831.

174. Leinonen V, Alafuzoff I, Aalto S, et al. Assessment of beta-amyloid in a frontal cortical brain biopsy specimen and by positron emission tomography with carbon 11-labeled Pittsburgh Compound B. *Archives of neurology* 2008;65:1304-1309.
175. Kadir A, Marutle A, Gonzalez D, et al. Positron emission tomography imaging and clinical progression in relation to molecular pathology in the first Pittsburgh Compound B positron emission tomography patient with Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology* 2011;134:301-317.
176. Murray ME, Lowe VJ, Graff-Radford NR, et al. Clinicopathologic and 11C-Pittsburgh compound B implications of Thal amyloid phase across the Alzheimer's disease spectrum. *Brain : a journal of neurology* 2015;138:1370-1381.
177. Villeneuve S, Rabinovici GD, Cohn-Sheehy BI, et al. Existing Pittsburgh Compound-B positron emission tomography thresholds are too high: statistical and pathological evaluation. *Brain : a journal of neurology* 2015;138:2020-2033.
178. Johnson KA, Gregas M, Becker JA, et al. Imaging of amyloid burden and distribution in cerebral amyloid angiopathy. *Annals of neurology* 2007;62:229-234.
179. Lockhart A, Lamb JR, Osredkar T, et al. PIB is a non-specific imaging marker of amyloid-beta (Aβ) peptide-related cerebral amyloidosis. *Brain : a journal of neurology* 2007;130:2607-2615.
180. Haglund M, Sjöbeck M, Englund E. Severe cerebral amyloid angiopathy characterizes an underestimated variant of vascular dementia. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 2004;18:132-137.
181. Ducharme S, Guiot MC, Nikelski J, Chertkow H. Does a positive Pittsburgh Compound B scan in a patient with dementia equal Alzheimer disease? *JAMA neurology* 2013;70:912-914.
182. Gomperts SN, Rentz DM, Moran E, et al. Imaging amyloid deposition in Lewy body diseases. *Neurology* 2008;71:903-910.
183. Edison P, Rowe CC, Rinne JO, et al. Amyloid load in Parkinson's disease dementia and Lewy body dementia measured with [11C]PIB positron emission tomography. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2008;79:1331-1338.

184. Greenberg SM, Grabowski T, Gurol ME, et al. Detection of isolated cerebrovascular beta-amyloid with Pittsburgh compound B. *Annals of neurology* 2008;64:587-591.
185. Rowe CC, Ellis KA, Rimajova M, et al. Amyloid imaging results from the Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle (AIBL) study of aging. *Neurobiology of aging* 2010;31:1275-1283.
186. Morris JC, Roe CM, Xiong C, et al. APOE predicts amyloid-beta but not tau Alzheimer pathology in cognitively normal aging. *Annals of neurology* 2010;67:122-131.
187. Bennett DA, Schneider JA, Arvanitakis Z, et al. Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology* 2006;66:1837-1844.
188. De Meyer G, Shapiro F, Vanderstichele H, et al. Diagnosis-independent Alzheimer disease biomarker signature in cognitively normal elderly people. *Archives of neurology* 2010;67:949-956.
189. Lim YY, Maruff P, Pietrzak RH, et al. Effect of amyloid on memory and non-memory decline from preclinical to clinical Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology* 2014;137:221-231.
190. Lim YY, Maruff P, Pietrzak RH, et al. Abeta and cognitive change: examining the preclinical and prodromal stages of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 2014;10:743-751 e741.
191. Johnson KA, Minoshima S, Bohnen NI, et al. Appropriate use criteria for amyloid PET: a report of the Amyloid Imaging Task Force, the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, and the Alzheimer's Association. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 2013;9:e-1-16.
192. Johnson KA, Minoshima S, Bohnen NI, et al. Update on appropriate use criteria for amyloid PET imaging: dementia experts, mild cognitive impairment, and education. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 2013;54:1011-1013.
193. Choe YS, Lee KH. PET Radioligands for Imaging of Tau Pathology: Current Status. *Nuclear medicine and molecular imaging* 2015;49:251-257.

194. James OG, Doraiswamy PM, Borges-Neto S. PET Imaging of Tau Pathology in Alzheimer's Disease and Tauopathies. *Frontiers in neurology* 2015;6:38.
195. Shah M, Catafau AM. Molecular Imaging Insights into Neurodegeneration: Focus on Tau PET Radiotracers. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 2014;55:871-874.
196. Ossenkoppele R, Schonhaut DR, Scholl M, et al. Tau PET patterns mirror clinical and neuroanatomical variability in Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology* 2016;139:1551-1567.
197. Harada R, Okamura N, Furumoto S, et al. Characteristics of Tau and Its Ligands in PET Imaging. *Biomolecules* 2016;6:7.
198. Villemagne VL, Okamura N. In vivo tau imaging: obstacles and progress. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 2014;10:S254-264.
199. Wegmann S, Jung YJ, Chinnathambi S, Mandelkow EM, Mandelkow E, Muller DJ. Human Tau isoforms assemble into ribbon-like fibrils that display polymorphic structure and stability. *The Journal of biological chemistry* 2010;285:27302-27313.
200. Martin L, Latypova X, Terro F. Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry international* 2011;58:458-471.
201. Mukaetova-Ladinska EB, Harrington CR, Roth M, Wischik CM. Biochemical and anatomical redistribution of tau protein in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology* 1993;143:565-578.
202. Schafer KN, Kim S, Matzavinos A, Kuret J. Selectivity requirements for diagnostic imaging of neurofibrillary lesions in Alzheimer's disease: a simulation study. *NeuroImage* 2012;60:1724-1733.
203. Pike VW. PET radiotracers: crossing the blood-brain barrier and surviving metabolism. *Trends in pharmacological sciences* 2009;30:431-440.
204. Dishino DD, Welch MJ, Kilbourn MR, Raichle ME. Relationship between lipophilicity and brain extraction of C-11-labeled radiopharmaceuticals. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 1983;24:1030-1038.

205. Xia CF, Arteaga J, Chen G, et al. [(18)F]T807, a novel tau positron emission tomography imaging agent for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 2013;9:666-676.
206. Dani M, Brooks DJ, Edison P. Tau imaging in neurodegenerative diseases. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 2016;43:1139-1150.
207. Gordon BA, Friedrichsen K, Brier M, et al. The relationship between cerebrospinal fluid markers of Alzheimer pathology and positron emission tomography tau imaging. *Brain : a journal of neurology* 2016.
208. Cho H, Choi JY, Hwang MS, et al. Tau PET in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 2016.
209. Chien DT, Bahri S, Szardenings AK, et al. Early clinical PET imaging results with the novel PHF-tau radioligand [F-18]-T807. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 2013;34:457-468.
210. Scholl M, Lockhart SN, Schonhaut DR, et al. PET Imaging of Tau Deposition in the Aging Human Brain. *Neuron* 2016;89:971-982.
211. Sperling R, Mormino E, Johnson K. The evolution of preclinical Alzheimer's disease: implications for prevention trials. *Neuron* 2014;84:608-622.
212. Schwarz AJ, Yu P, Miller BB, et al. Regional profiles of the candidate tau PET ligand 18F-AV-1451 recapitulate key features of Braak histopathological stages. *Brain : a journal of neurology* 2016;139:1539-1550.
213. Cho H, Choi JY, Hwang MS, et al. In vivo cortical spreading pattern of tau and amyloid in the Alzheimer's disease spectrum. *Annals of neurology* 2016.
214. Ossenkoppele R, Schonhaut DR, Baker SL, et al. Tau, amyloid, and hypometabolism in a patient with posterior cortical atrophy. *Annals of neurology* 2015;77:338-342.
215. Brier MR, Gordon B, Friedrichsen K, et al. Tau and Abeta imaging, CSF measures, and cognition in Alzheimer's disease. *Science translational medicine* 2016;8:338ra366.

216. Tsai RB BA, Schonhaut, D, et al. 18F-AV-1451 binding corresponds to disease severity and laterality in non-AD tauopathy syndromes with distinct tau filament strains. Human Amyloid Imaging Conference Abstract Book PP 128, p97. Miami, FL.2016.
217. Schonhaut D BA, Dickerson B et al. Elevated [18F]AV-1451 binding matches the distribution of tau pathology in progressive supranuclear palsy. Human Amyloid Imaging Confernce Abstract Book PP86 p99. Miami, FL. 2016.
218. Josephs K WJ, Tosakulwong N, et al. AV-1451 tau-PET in progressive supranuclear palsy variants. Human Amyloid Conference Abstract Book PE58, p 63. Miami, FL. 2016.
219. Dickerson B MS, Xia C et al. An update on imaging typical and atypical AD and FTLD spectrum tauopathies with [F-18]-AV-1451 PET and PiB PET. Human Amyloid Imaging Conference Abstract Book PE86, p 80. Miami, FL. 2016.
220. Jones D LV, Wiste H, et al. PET tau imaging with AV-1451 in FTD with suspected underlying tauopathies and non-tauopathies relative to Alzheimer's and controls. Human Amyloid Imaging Conference Abstract Book PP119, P 104. Miami, FL. 2016.
221. Smith R, Puschmann A, Scholl M, et al. 18F-AV-1451 tau PET imaging correlates strongly with tau neuropathology in MAPT mutation carriers. *Brain : a journal of neurology* 2016.
222. Reed LA, Grabowski TJ, Schmidt ML, et al. Autosomal dominant dementia with widespread neurofibrillary tangles. *Annals of neurology* 1997;42:564-572.
223. Sanders DW, Kaufman SK, DeVos SL, et al. Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron* 2014;82:1271-1288.
224. Vonsattel JP, Del Amaya MP, Keller CE. Twenty-first century brain banking. Processing brains for research: the Columbia University methods. *Acta neuropathologica* 2008;115:509-532.
225. Van Nostrand WE, Melchor JP, Cho HS, Greenberg SM, Rebeck GW. Pathogenic effects of D23N Iowa mutant amyloid beta -protein. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:32860-32866.

226. Gilman S, Wenning GK, Low PA, et al. Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* 2008;71:670-676.
227. Hamilton R, Krauze M, Romkes M, et al. Pathologic and gene expression features of metastatic melanomas to the brain. *Cancer* 2013;119:2737-2746.
228. Koeppen AH, Michael SC, Li D, et al. The pathology of superficial siderosis of the central nervous system. *Acta neuropathologica* 2008;116:371-382.
229. Santacruz K, Lewis J, Spires T, et al. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 2005;309:476-481.
230. Spires TL, Orne JD, SantaCruz K, et al. Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy. *The American journal of pathology* 2006;168:1598-1607.
231. Shoup TM, Yokell DL, Rice PA, et al. A concise radiosynthesis of the tau radiopharmaceutical, [(18) F]T807. *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals* 2013;56:736-740.
232. Becker JA, Hedden T, Carmasin J, et al. Amyloid-beta associated cortical thinning in clinically normal elderly. *Annals of neurology* 2011;69:1032-1042.
233. Logan J, Fowler JS, Volkow ND, et al. Graphical analysis of reversible radioligand binding from time-activity measurements applied to [N-11C-methyl]-(-)-cocaine PET studies in human subjects. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1990;10:740-747.
234. Fischl B, Salat DH, van der Kouwe AJ, et al. Sequence-independent segmentation of magnetic resonance images. *NeuroImage* 2004;23 Suppl 1:S69-84.
235. Loening AM, Gambhir SS. AMIDE: a free software tool for multimodality medical image analysis. *Molecular imaging* 2003;2:131-137.
236. Yaghoubi SS, Gambhir SS. PET imaging of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1-tk) or mutant HSV1-sr39tk reporter gene expression in mice and humans using [18F]FHBG. *Nature protocols* 2006;1:3069-3075.



237. Halfmann R, Lindquist S. Screening for amyloid aggregation by Semi-Denaturing Detergent-Agarose Gel Electrophoresis. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2008.
238. Lewis DA, Campbell MJ, Terry RD, Morrison JH. Laminar and regional distributions of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in Alzheimer's disease: a quantitative study of visual and auditory cortices. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1987;7:1799-1808.
239. Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cerebral cortex* 1991;1:103-116.
240. Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, et al. Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology* 2011;76:1006-1014.
241. Mesulam M. Primary progressive aphasia: A dementia of the language network. *Dementia & neuropsychologia* 2013;7:2-9.
242. Hughes CP, Berg L, Danziger WL, Coben LA, Martin RL. A new clinical scale for the staging of dementia. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 1982;140:566-572.
243. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 1998;393:702-705.
244. Dumanchin C, Camuzat A, Campion D, et al. Segregation of a missense mutation in the microtubule-associated protein tau gene with familial frontotemporal dementia and parkinsonism. *Human molecular genetics* 1998;7:1825-1829.
245. McKee AC, Stein TD, Kiernan PT, Alvarez VE. The neuropathology of chronic traumatic encephalopathy. *Brain pathology* 2015;25:350-364.
246. Crary JF, Trojanowski JQ, Schneider JA, et al. Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta neuropathologica* 2014;128:755-766.

247. Auer IA, Schmidt ML, Lee VM, et al. Paired helical filament tau (PHFtau) in Niemann-Pick type C disease is similar to PHFtau in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* 1995;90:547-551.
248. Winton MJ, Joyce S, Zhukareva V, et al. Characterization of tau pathologies in gray and white matter of Guam parkinsonism-dementia complex. *Acta neuropathologica* 2006;111:401-412.
249. Ishizawa K, Komori T, Shimazu T, et al. Hyperphosphorylated tau deposition parallels prion protein burden in a case of Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome P102L mutation complicated with dementia. *Acta neuropathologica* 2002;104:342-350.
250. Tanemura K, Akagi T, Murayama M, et al. Formation of filamentous tau aggregations in transgenic mice expressing V337M human tau. *Neurobiology of disease* 2001;8:1036-1045.
251. Sander K, Lashley T, Gami P, et al. Characterization of tau positron emission tomography tracer [18F]AV-1451 binding to postmortem tissue in Alzheimer's disease, primary tauopathies, and other dementias. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 2016.
252. Lowe VJ, Curran G, Fang P, et al. An autoradiographic evaluation of AV-1451 Tau PET in dementia. *Acta neuropathologica communications* 2016;4:58.
253. Mitsis EM, Riggio S, Kostakoglu L, et al. Tauopathy PET and amyloid PET in the diagnosis of chronic traumatic encephalopathies: studies of a retired NFL player and of a man with FTD and a severe head injury. *Translational psychiatry* 2014;4:e441.
254. Gandy S, DeKosky ST. [18F]-T807 tauopathy PET imaging in chronic traumatic encephalopathy. *F1000Research* 2014;3:229.
255. Gandy S, Ikonomic MD, Mitsis E, et al. Chronic traumatic encephalopathy: clinical-biomarker correlations and current concepts in pathogenesis. *Molecular neurodegeneration* 2014;9:37.
256. Flament S, Delacourte A, Verny M, Hauw JJ, Javoy-Agid F. Abnormal Tau proteins in progressive supranuclear palsy. Similarities and differences with the neurofibrillary degeneration of the Alzheimer type. *Acta neuropathologica* 1991;81:591-59