

CEREBRO, LIPIDÓMICA Y ALZHEIMER:

estudio de biomarcadores y neuroimagen en personas sanas.



ANE IRIONDO JUARISTI - 2020

Directores: Pablo Martínez-Lage - Félix María Goñi



**CEREBRO, LIPIDÓMICA Y ALZHEIMER:
estudio de biomarcadores y neuroimagen en
personas sanas.**

ANE IRIONDO JUARISTI - 2020

Directores: Pablo Martínez-Lage y Félix María Goñi

Esta tesis doctoral se ha llevado a cabo gracias a una ayuda predoctoral
del Gobierno Vasco (NºRef.: PRE_2015_1_0231)

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación CITA-Alzheimer y a la Universidad del país Vasco por haberme proporcionado los medios técnicos y humanos necesarios para mi formación investigadora.

A todas las personas voluntarias de CITA por vuestra generosidad, altruismo y compromiso. Sois el pilar de CITA.

A Joaquin Aperribay, por imaginar un mundo con un Alzheimer curable e impulsar la formación de CITA. Por conseguir que tu sueño se convierta en el sueño de toda la sociedad Guipuzcoana. Gracias por tus ánimos, tus sabios consejos, por compartir conmigo tus interminables anécdotas y por depositar tu confianza en mí. Mil gracias de todo corazón.

Al Dr. Felix María Goñi, director de esta tesis, por tu apoyo e interés en esta tesis y por guiarme en los análisis del lipidoma. Gracias por tus aportaciones minuciosas, tu carácter crítico en cada una de las revisiones y tu constante asesoramiento.

Pablo Martínez-Lage doktoreari, lan honetako zuzendaria, ikerkuntza, pazientziaz, tolerantziaz, pertseberantziaz, pentsamendu kritikoz eta kostantziaz osatua dagoela erakustearren eta balore hauek niri helaraztearren. Mila esker zure bihotz onagatik, nire onena ateratzeagatik eta zure konfidantzagatik. Alzheimerren aurkako borroka honekiko daukazun konpromisoa miresgarria da.

Al Dr. Jose Vicente Lafuente, tutor de esta tesis, por adentrarme hace años en el fantástico mundo de la investigación básica y por estar siempre dispuesto a ayudar. Tu carisma y tu buen humor hacen que sea un gusto contar contigo.

Al Servicio Central de Análisis de la UPV, en concreto a la Dra. Beatriz Abad, persona clave en este trabajo. Gracias por tus horas de paciencia enseñándome todos tus conocimientos sobre la lipidómica, pero sobre todo gracias por tu buen humor, tus ánimos, tus consejos y tu optimismo. Hacemos un buen equipo.

A la Dra. Arantzazu Arrospide y al Dr. Javier Mar, por vuestra ayuda metodológica y buena disposición para resolver mis dudas de estadística, a veces interminables. Al equipo de neurociencias del Instituto Biodonostia, y en concreto a la Dra. Ana Gorostidi, por las

determinaciones del genotipado de apolipoproteína E; al equipo de la Unidad de Alzheimer del Hospital Sant Pau, en concreto al Dr. Alberto Lleó, Dr. Daniel Alcolea y Dr. Juan Fortea y al laboratorio de Neurociencias de la Universidad de Gotenburgo, en concreto al Dr. Henrik Zetterberg por las determinaciones de biomarcadores en líquido cefalorraquídeo; a la Universidad de Aston, en concreto a la Dra. Irundika H. K. Dias por las determinaciones de los oxisteroles.

A mi familia de CITA. A Maite M, Maite G, Jon, Andrea, Jorge, Montse, Alazne, Myriam, Naia, Sara, Maria, Fer, Miri, Mikel, Ainara, Amaya, Pablo, Zigor, Marta e Iñaki, por estar encima de esta tesis cada día de estos cuatro años, por vuestro trabajo continuo, y sobre todo porque sois un gran equipo humano. Me gustaría agradecer especialmente a Iñaki, por tu brillante dirección de esta nave y a Maite G, por tu paciencia al enseñarme los entresijos del FSL y ayudarme en todos los análisis de neuroimagen.

A Ana, por tu ayuda en la maquetación, tu buen gusto en el diseño, y por el tiempo robado a Kepa y a Malen.

A Txaro, mi maestra, por ayudarme a conocerme mejor y a encauzar todos los sobresaltos de la tesis y de la vida. Tu sabiduría vital y tu modo de analizar la vida son un ejemplo a seguir.

Nire lagunei eta familiari. Mila esker zuen animo, aholku eta indarreatatik. Eskerrak bereziki nire ama eta aitari, Patxik eta nik gure gustoko ikasketak burutzeko egin duzuen esfortzu eta sakrifizioagatik. Lortzen ari garen guztia zuen lanaren fruitua da.

Xabiri. Nire euskarri emozionala eta bizitzakidea. Zugatik ez balitz izango ez nintzatekeelako tesi honen amaierara iritsiko, tesi hau zuri eskaintzen dizut.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo 1: Introducción general y objetivos

<u>Introducción general</u>	3
1. Enfermedad de Alzheimer	5
1.1 Neuropatología	5
1.2 Mecanismos etiopatogénicos.....	7
1.3 Biomarcadores	9
1.4 Factores de riesgo	14
2. Sustancia blanca en la enfermedad de Alzheimer	18
2.1 Anatomía de la sustancia blanca	18
2.2 Redes cognitivas afectadas en la enfermedad de Alzheimer.....	22
2.3 Microestructura de la sustancia blanca.....	24
<u>Justificación</u>	34
<u>Descripción y objetivos</u>	35
<u>Cohorte de estudio</u>	37
<u>Bibliografía</u>	39

Capítulo 2: Colesterol y triglicéridos en plasma y microestructura de la sustancia blanca

<u>Resumen</u>	55
<u>Introducción</u>	56
1. Lípidos plasmáticos y cognición	56
2. Lípidos plasmáticos y microestructura de la sustancia blanca	58
2.1 APOE, lípidos plasmáticos y microestructura de la sustancia blanca	60
2.2 Tensión arterial, lípidos plasmáticos y microestructura de la sustancia blanca	61
2.3 Estatinas, lípidos plasmáticos y microestructura de la sustancia blanca	62
2.3 Neurofilamento y microestructura de la sustancia blanca	62
<u>Material y métodos</u>	64
1. Sujetos	64
2. Variables objeto de estudio	64
2.1 Variables principales	64
2.2 Covariables	65
3. Análisis estadístico	67

3.1 Lípidos plasmáticos y microestructura de la sustancia blanca	67
3.2 Microestructura de la sustancia blanca de las regiones cognitivas, lípidos plasmáticos y variables de confusión	67
3.3 Análisis de mediación y moderación.....	68
<u>Resultados</u>	70
1. Descriptivos	70
1.1 Datos demográficos y de interés	70
1.2 Lípidos plasmáticos	70
1.3 Descriptivos de la submuestra con LCR disponible.....	71
2. Lípidos plasmáticos y microestructura de la sustancia blanca	72
2.1 Detección de las variables de confusión de la microestructura de la sustancia blanca.....	72
2.2 Colesterol total y microestructura de la sustancia blanca.....	76
2.3 LDL y microestructura de la sustancia blanca	76
2.4 HDL y microestructura de la sustancia blanca	76
2.5 Triglicéridos y microestructura de la sustancia blanca.....	76
3. Efecto de las variables de confusión sobre los lípidos plasmáticos y la difusividad axial de las regiones cognitivas	80
3.1 LDL, difusividad axial de las regiones cognitivas y covariables	81
3.2 HDL, difusividad axial de las regiones cognitivas y covariables.....	85
3.3 Triglicéridos, difusividad axial de las regiones cognitivas y covariables	89
4. Lípidos plasmáticos, difusividad axial y neurofilamento.....	93
4.1 Asociación entre el neurofilamento y la difusividad axial	93
4.2 Efecto del LDL y la difusividad axial sobre el neurofilamento	95
4.3 Efecto del HDL y la difusividad axial sobre el neurofilamento.....	97
4.4 Efecto de los triglicéridos y la difusividad axial sobre el neurofilamento	99
<u>Discusión</u>	101
1. Asociación entre lípidos plasmáticos y microestructura de la sustancia blanca.....	101
2. Covariables, lípidos plasmáticos y microestructura de la sustancia blanca	103
3. Limitaciones y fortalezas.....	106
<u>Conclusiones</u>	107
<u>Bibliografía</u>	108
<u>Anexo I: Manuscrito</u>	116

Capítulo 3: Metabolismo del colesterol cerebral, microestructura de la sustancia blanca y biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer

<u>Resumen</u>	119
<u>Introducción</u>	121
1. Metabolismo del colesterol cerebral y enfermedad de Alzheimer	121
1.1 Metabolismo del colesterol cerebral.....	121
1.2 Oxiesteroles	124
1.3 Metabolismo del colesterol cerebral, oxiesteroles y enfermedad de Alzheimer	127
2. Metabolismo del colesterol cerebral y microestructura de la sustancia blanca.....	136
3. Microestructura de la sustancia blanca y enfermedad de Alzheimer	136
<u>Material y métodos</u>	138
1. Sujetos	138
2. Variables objeto de estudio	138
2.1 Variables principales	138
2.2 Covariables.....	140
3. Análisis estadístico	142
3.1 Oxiesteroles y biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer	142
3.2 Oxiesteroles y microestructura de la sustancia blanca	143
3.3 Oxiesteroles, microestructura de la sustancia blanca y biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer.....	144
3.4 Análisis de mediación y moderación.....	144
<u>Resultados</u>	146
1. Estudio transversal.....	146
1.1 Datos descriptivos	146
1.2 Oxiesteroles en el líquido cefalorraquídeo y biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer	148
1.3 Oxiesteroles en el líquido cefalorraquídeo y microestructura de la sustancia blanca.....	161
1.4 Oxiesteroles en el líquido cefalorraquídeo, biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer y microestructura de la sustancia blanca de las regiones cognitivas ...	167
1.5 Oxiesteroles en el líquido cefalorraquídeo, neurofilamento, difusividad axial y β -amiloide	186
1.6 Oxiesteroles en el líquido cefalorraquídeo y plasma.....	192

2. Estudio longitudinal.....	193
2.1 Datos descriptivos	193
2.2 Oxiesteroles en líquido cefalorraquídeo y cambio longitudinal de los biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer	195
2.3 Microestructura de la sustancia blanca, oxiesteroles en líquido cefalorraquídeo y cambio longitudinal de los biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer.....	199
<u>Discusión</u>	204
1. Población de estudio.....	204
2. Oxiesteroles y etiopatogenia de la enfermedad de Alzheimer	207
3. Oxiesteroles, biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer y microestructura de la sustancia blanca	210
4. Limitaciones y fortalezas.....	214
<u>Conclusiones</u>	217
<u>Bibliografía</u>	218
<u>Anexo I: Manuscrito publicado</u>	232
<u>Anexo II: Manuscrito en revisión</u>	233

Capítulo 4: Optimización del análisis del lipidoma del líquido cefalorraquídeo

<u>Resumen</u>	237
<u>Introducción</u>	238
1. Lípidos	238
2. Lipidómica en el líquido cefalorraquídeo y enfermedad de Alzheimer	239
3. Técnicas de análisis de la lipidómica en el líquido cefalorraquídeo.....	240
<u>Material y métodos</u>	242
1. Obtención de muestra y reactivos.....	242
1.1 Muestra de líquido cefalorraquídeo	242
1.2 Reactivos y estándares.....	242
2. Preparación de muestra y análisis.....	243
2.1 Preparación de muestra para UHPL-MS ^E	244
2.2 Elección del disolvente de resuspensión	244
2.3 Recuperación y reproducibilidad.....	246
2.4 Linealidad	247
2.5 UHPL-MS ^E análisis.....	247

3. Diseño, identificación y procesado de datos	249
3.1 Diseño de análisis	249
3.2 Identificación de lípidos	249
3.3 Procesamiento de datos	250
4. Análisis estadístico	250
4.1 Análisis univariante	250
4.2 Análisis multivariante.....	251
<u>Resultados y discusión</u>	252
1. Elección de disolvente de resuspensión.....	252
2. Preparación de la muestra.....	253
2.1 Seguridad.....	253
2.2 Pipeteo	253
2.3 Economía de costes	253
3. Lípidos detectados	254
4. Reproducibilidad	257
4.1 Análisis univariante	257
4.2 Análisis multivariante.....	258
5. Recuperación	259
6. Linealidad y sensibilidad	261
7. Composición lipídica del líquido cefalorraquídeo.....	263
<u>Conclusiones</u>	265
<u>Bibliografía</u>	266
<u>Anexo I: Composición lipídica del líquido cefalorraquídeo</u>	269
<u>Anexo II: Manuscrito</u>	276

Capítulo 5: Discusión general

<u>Discusión general</u>	279
<u>Resultados principales</u>	281
1. Metabolismo del colesterol y microestructura de la sustancia blanca.....	281
2. Metabolismo del colesterol cerebral y biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer	281
3. Biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer, microestructura de la sustancia blanca y metabolismo del colesterol cerebral	282

4. Técnicas de análisis de la lipidómica	282
<u>Consideraciones metodológicas</u>	283
1. Fortalezas	283
2. Limitaciones	283
<u>Implicaciones</u>	285
1. Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer	285
2. Estudios de prevención.....	286
<u>Líneas futuras</u>	288
<u>Bibliografía</u>	291

Listado de abreviaturas y siglas

ABCA	<i>ATP-binding cassette sub-family A</i>
ACAT1	acetilcoenzima-A:colesterol acetiltransferasa 1
APOE	Apolipoproteína E gene
ApoE	Apolipoproteína E proteína
APP	Proteína precursora de amiloide
AxD	Difusividad axial
APP	Proteína precursora de amiloide
BACE	β -secretasa
BHE	Barrera hematoencefálica
CC	Cuerpo calloso
CDR	<i>Clinical dementia rating</i>
Cer.	Ceramida
CHCl ₃	Cloroformo
CTOT	Colesterol total
CV	Coefficiente de variación
CYP27A1	Colesterol 27-hidroxilasa
CYP46A1	Colesterol 24-hidroxilasa
DCL	Deterioro cognitivo ligero
DG	Diglicérido
DMN	<i>Default mode network</i>
DTI	Imagen de tensor de difusión
EA	Enfermedad de Alzheimer
ESI	Ionización por electrospray
FA	Anisotropía fraccional
FFO	Fascículo fronto-occipital
FLI	Fascículo longitudinal inferior
FLS	Fascículo longitudinal superior
FRNX	Fórnix
FU	Fascículo uncinado
GC	Giro cingulado
GL	Glicerolípido
GlyCer	Glucosilceramida
GP	Glicerofosfolípido
HDL	Lipoproteínas de colesterol de alta densidad

Hipoc	Hipocampo
HSB	Hiperintensidades de la sustancia blanca
IPA	Isopropanol
IC	Intervalo de confianza
IQ	Rango intercuartil
LCR	Líquido ceforraquídeo
LDL	Lipoproteínas de colesterol de baja densidad
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPE	Lisofosfatidiletanolamina
LXR	<i>Liver X receptor</i>
MABP	Tensión arterial media
MD	Difusividad media
MeOH	Metanol
MLG	Modelo lineal generalizado
MMSE	Mini examen del estado mental
NfL	Neurofilamento de cadena ligera
ONF	Ovillos neurofibrilares
PC	Fosfatidilcolina
PCA	Análisis de componentes principales
PE	Fosfatidiletanolamina
PET	Tomografía por emisión de positrones
PET-FDG	PET de fluorodesoxiglucosa
PGA	Proyecto Gipuzkoa Alzheimer
PI	Fosfatidilinositol
PS	Fosfatidilserina
PSe	Placas seniles
p-tau	Tau fosforilada
QC	Control de calidad
RD	Difusividad radial
RM	Resonancia magnética
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rs	Coefficiente correlación Spearman
SB	Sustancia blanca

SG	Sustancia gris
SI	Estándar interno
SM	Esfingomielina
SP	Esfingolípido
SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
ST	Estría terminal
Su	Sulfoglucoesfingolípido
TBSS	<i>Tract-based spatial statistics</i>
TG	Triglicérido
t-tau	Tau total
UHPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
7-KC	7-cetocolesterol
βA	β-amiloide
-OHC	-hidroxicolesterol

CAPÍTULO

01



Introducción general
y objetivos

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las enfermedades que producen demencia son una de las principales causas de discapacidad y dependencia entre las personas mayores de 60 años. La demencia se caracteriza por el declive de la memoria, lenguaje, resolución de problemas y otras habilidades cognitivas en un grado tal que limita la capacidad de la persona para llevar a cabo las actividades de la vida cotidiana de manera autónoma. La demencia afecta a las cualidades más preciosas de la condición humana, por eso decimos que además de ser una enfermedad del cerebro es también una enfermedad de la persona. Debido a su elevada prevalencia, la demencia constituye un gran reto para la economía y el sistema socio-sanitario.

La forma de demencia más frecuente es la producida por la enfermedad de Alzheimer (EA), que es responsable de un 60-70% de los casos y para la cual hoy en día no existe ningún tratamiento curativo efectivo. La EA es una enfermedad neurodegenerativa que afecta al estado cognitivo de forma gradual, a medida que se destruyen sinapsis, las neuronas mueren y diferentes zonas del cerebro se atrofian. El síntoma cardinal de la EA es la pérdida de memoria, sin embargo, la enfermedad no debe entenderse como un proceso que afecta únicamente a la memoria, ya que otras funciones cognitivas también se ven afectadas ¹.

En la EA se producen diversos cambios neurobiológicos y clínicos que de una manera lentamente progresiva evolucionan a lo largo de muchos años. El conocimiento aportado por los estudios neuropatológicos y con biomarcadores ha permitido distinguir tres fases a lo largo de esta evolución. En la primera fase, la fase preclínica, hay cambios patológicos en el cerebro, pero no hay ningún síntoma clínico ^{2,3}. Después de la fase preclínica, pero antes de originar un cuadro de demencia, pérdida de autonomía y dependencia, la EA pasa por una fase en la que hay deterioro cognitivo sin afectación funcional en las actividades de la vida diaria la cual se denomina deterioro cognitivo ligero (DCL) ⁴ o, más concretamente, EA prodrómica. En la última fase, la fase de demencia, los pacientes son dependientes, ya que no se valen por sí solos. En esta fase, según el grado de gravedad de la EA, se diferencian tres estadios de demencia: leve, moderado y severo ⁵

La EA se caracteriza por la presencia de depósitos de β -amiloide (β A) en forma de placas seniles o neuríticas y de ovillos neurofibrilares (ONF) que contienen tau hiperfosforilada (p-tau). No obstante, el puzzle de la patología y la fisiopatología de la enfermedad es complejo y no está definitivamente resuelto. Se conocen numerosos hechos bioquímicos, moleculares o celulares que van más allá de la mera hiperproducción de β A o la fosforilación de tau. Uno de estos procesos biológicos involucrados en la etiopatogenia de la EA es la homeostasis del colesterol cerebral. Por un lado, la hipercolesterolemia es un factor de riesgo de EA ^{6,7}. Por otro, los portadores del alelo 4 del gen de la apolipoproteína E (APOE), responsable de sintetizar la proteína ApoE que transporta el colesterol en el cerebro, tienen mayor riesgo de tener EA ⁸. Además, niveles elevados de colesterol en el cerebro inducen neuroinflamación y neurotoxicidad. Cada vez más estudios demuestran también la importancia del colesterol en las membranas neuronales en los procesos de producción, agregación y eliminación de β A, sugiriendo que el metabolismo alterado del colesterol podría formar parte de los acontecimientos patológicos y participar en la patogénesis de la EA ^{9,10}.

La afectación de la sustancia blanca (SB) en la EA es un hecho bien reconocido desde las descripciones neuropatológicas iniciales de Englund y Brun ¹¹ hasta los más recientes estudios de imagen de tensor de difusión (DTI) por resonancia magnética ¹². El colesterol es un componente muy abundante en la mielina y en las membranas gliales y neuronales, por lo que una alteración en la regulación de su metabolismo podría ser la base de estos cambios en la SB ^{13,14}.

En esta tesis doctoral se estudia la relación de la homeostasis sistémica y cerebral del colesterol con distintos mecanismos etiopatogénicos involucrados en la EA, como la degeneración axonal, la amiloidogénesis, patología tau o neuroinflamación y la microestructura de la SB.

1. Enfermedad de Alzheimer

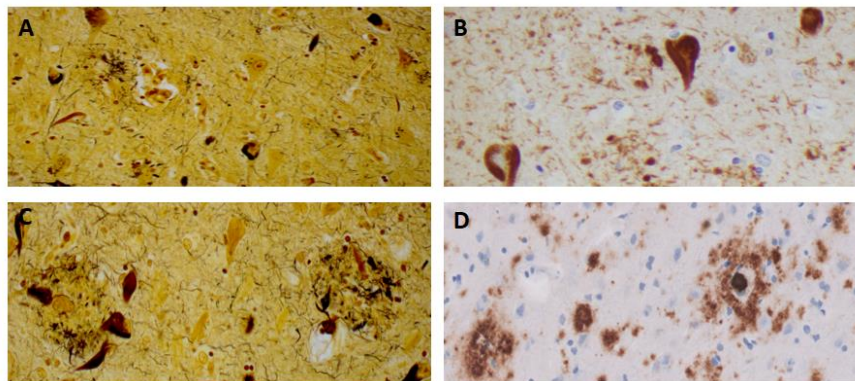
1.1 Neuropatología

Tal como la describió Alois Alzheimer a principios del siglo pasado, la EA se caracteriza por la presencia de atrofia cerebral, placas seniles (PSe) y ONF. La pérdida neuronal, la disfunción y pérdida sináptica, y los cambios en SB son también características ^{15,16}.

1.1.1 Placas seniles/Placas de amiloide

La EA se caracteriza por la presencia de PSe o placas de amiloide en el cerebro ¹⁷ (**Figura 1**). Estas placas fueron descubiertas por primera vez por Alois Alzheimer en 1910. El diagnóstico neuropatológico de la EA exige la presencia de PSe, que son depósitos extracelulares de péptido β A con morfología diversa, según la cual se diferencian las placas de núcleo denso y las placas difusas. Las placas de núcleo denso son depósitos fibrilares de β A con un núcleo compacto que se rodea de neuritas degeneradas distróficas (placas neuríticas), astrocitosis reactiva y activación de células de la microglía. Este tipo de PSe se asocia a pérdida neuronal y disfunción sináptica. Por ello, las placas de núcleo denso son las que marcan el diagnóstico. Las placas difusas, en cambio, son depósitos de β A amorfos formados por estructuras no-neuríticas. No se asocian a la respuesta de las células gliales ni a disfunción sináptica. Este tipo de PSe no se emplea como marcador diagnóstico debido a que su presencia es común en personas cognitivamente sanas. En muchos casos en la pared vascular hay también depósitos de β A conocidos con el nombre de angiopatía amiloide cerebral ^{1,15,17,18}.

Figura 1: Placas amiloide y ovillos neurofibrilares



Nota. A-B, ovillos neurofibrilares; C-D, placas amiloide.

1.1.2 Ovillos neurofibrilares

Los ONF son agregados fibrilares intracelulares de proteína tau hiperfosforilada y anormalmente configurada ^{15,18} (**Figura 1**). Los ONF están presentes en la EA, pero no son lesiones neuropatológicas específicas de la enfermedad ya que existen también en otras enfermedades neurodegenerativas. A estas enfermedades que cursan con ONF se les denomina taupatías ¹⁹. A pesar de no ser una lesión exclusiva de la EA, el número de ONF es un indicador de la gravedad de la enfermedad ²⁰.

1.1.3 Pérdida neuronal y sináptica

La pérdida neuronal es el sustrato patológico de la atrofia cerebral, se asocia a la presencia de ONF y correlaciona positivamente con el grado de deterioro ¹⁸. La pérdida neuronal comienza de forma significativa en la corteza entorrinal y el hipocampo ²¹.

En la EA hay una disfunción sináptica que se ha relacionado con la presencia de oligómeros de β A en las membranas sinápticas y con la densidad de PSe ¹⁹. Se ha demostrado que, además de la disfunción, la EA produce una disminución significativa de la densidad de sinapsis en áreas corticales ²². Según avanza la enfermedad, la disfunción sináptica se agrava hasta llegar a ser desproporcionada respecto a la pérdida neuronal ^{18,19}. Parece, por tanto, que la disfunción sináptica precede y excede a la pérdida neuronal y es la densidad sináptica el cambio neuropatológico que mejor se relaciona con el grado de demencia ¹⁸.

1.1.4 Cambios en la sustancia blanca

Debido a la distribución de las placas seniles y la asociación de estas placas con la neurodegeneración, la EA es típicamente considerada una enfermedad de la sustancia gris (SG). Sin embargo, en los últimos años, las alteraciones de la SB se han relacionado con el riesgo y la progresión de la enfermedad. Los cambios estructurales, bioquímicos y neuropatológicos en la SB se detectan principalmente mediante estudios de imagen y estudios neuropatológicos.

Histopatológicamente, los cambios en la SB consisten en una pérdida parcial pero no total de mielina, células oligodendrogliales y axones, una gliosis fibrilar reactiva leve, la presencia de macrófagos dispersos y cambios en la capa externa de las arterias ^{11,23}. Todos estos cambios, causan infartos incompletos en la SB, sin daño cerebrovascular en la SG. Estos infartos incompletos se localizan selectivamente en la SB, principalmente en la

parte frontal, pero también en la parte central y/o parietooccipital. Los infartos generalmente son simétricos, y no muestran una distribución uniforme por todo el cerebro. Microscópicamente consisten en una pérdida de mielina, células oligodendrogiales y axones, una reacción astrocitaria leve y la aparición de algunos macrófagos. Un mayor número de infartos se asocia a una menor cantidad de fosfolípidos, colesterolos, cerebrosidos y sulfatidos en la SB^{11,23}.

1.2 Mecanismos etiopatogénicos

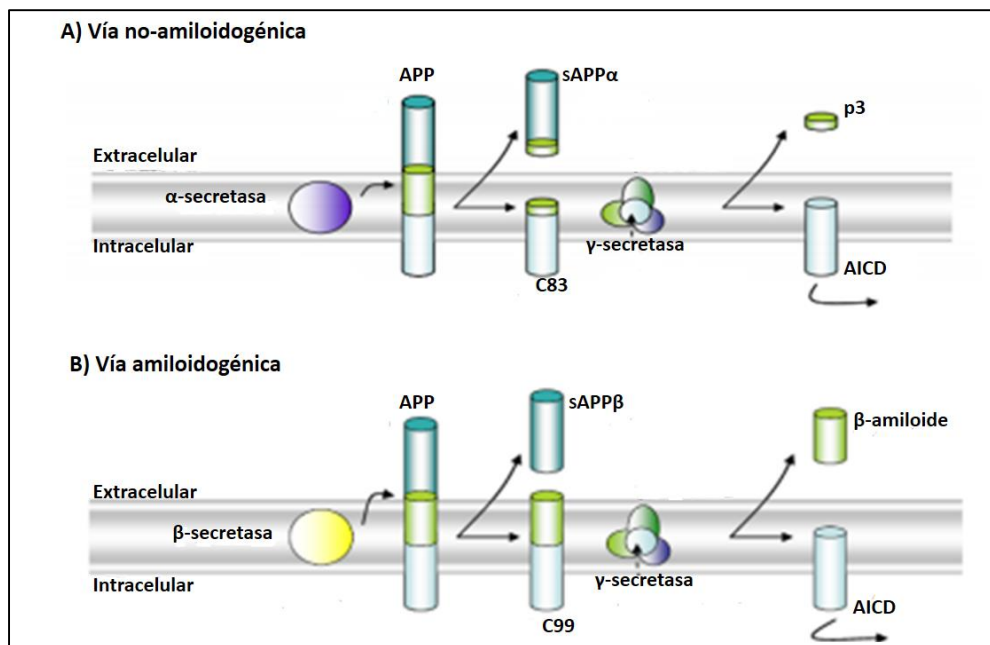
1.2.1 Hipótesis del amiloide

La hipótesis de la cascada amiloide fue propuesta por Hardy y Higgins en 1992²⁴. Según esta hipótesis, el péptido β A juega un papel principal en el desarrollo de la enfermedad. El β A se forma a partir de la proteólisis de la proteína precursora de amiloide (APP), una proteína transmembranal de una familia muy conservada²⁵. En condiciones fisiológicas, la APP se degrada por las enzimas α -, β -, y γ -secretasa²⁶. Existen ciertas diferencias entre estas tres secretasas. La α -secretasa no genera el β A de longitud completa y por eso se conoce como la vía no-amiloidogénica²⁷. La α -secretasa corta la APP entre los residuos Lys16 y Lys17 generando en el extremo N-terminal una APP soluble (sAPP α) y un fragmento de C-terminal (C83) que se queda anclado en la membrana. Este C83 es después catalizado por la enzima γ -secretasa y da lugar al fragmento no amiloidogénico p3 y al APP intracelular de dominio C-terminal (AICD)²⁸. A diferencia de esta vía no amiloidogénica, la amiloidogénica forma el β A a partir de la acción de la β -secretasa (BACE) y la γ -secretasa. La β -secretasa genera en el extremo N-terminal una APP soluble (sAPP β) y un fragmento C-terminal (C99) que se queda anclado en la membrana. Este fragmento es después degradado por la enzima γ -secretasa y se generan la proteína β A y un fragmento AICD (**Figura 2**). Las diferentes escisiones de γ -secretasa generan β A de diferentes tamaños²⁹. La forma más abundante de β A es la β A₁₋₄₀ mientras que la forma β A₁₋₄₂ es la responsable de los depósitos parenquimatosos de amiloide en todas las formas de EA genéticas y esporádicas³⁰. Debido a su capacidad de generar fibrillas, la β A₁₋₄₂ es más tóxica que la β A₁₋₄₀ en las neuronas³¹. Hardy y Higgins propusieron que los depósitos de β A son los que inducen la hiperfosforilación de tau, la muerte neuronal, la disfunción sináptica y el daño vascular que sufre el cerebro²⁴.

La hipótesis amiloide no está definitivamente demostrada ni rechazada. En los últimos años se ha generado cierta controversia^{32,33} que se basa, entre otras razones, en la falta

de una explicación fehaciente de la interacción de βA y tau, la ausencia de correlación entre la carga de βA y cognición o, sobre todo el fracaso de las terapias anti-amiloide. La hipótesis amiloide no termina de explicar cuáles son los mecanismos de acción de algunos factores de riesgo que están bien establecidos para la EA, como la propia edad o los factores vasculares.

Figura 2: Esquema de la vía amiloidogénica y no amiloidogénica.



Nota. APP = proteína precursora de amiloide; AICD = APP intracelular de dominio C-terminal. Adaptado de la tesis doctoral Estrategias terapéuticas en la enfermedad de Alzheimer. Nieves Riera. 2017, Universidad de Sevilla.

1.2.2 Otros hechos patológicos

Está establecido que la acumulación de βA y la hiperfosforilación de tau se acompañan de una serie de fenómenos biológicos a nivel neuronal y glial (inflamación, cambios de expresión génica, daño oxidativo, disfunción mitocondrial, activación de quinasas), que inducen neurodegeneración, disfunción y pérdida sináptica, cambios en la conectividad cerebral, hipometabolismo cortical, disfunción neuronal, muerte neuronal y atrofia cerebral^{19,22,24}. De hecho, estos procesos de disfunción mitocondrial, estrés oxidativo e inflamación explicarían por qué la muerte neuronal es desproporcionada respecto a la presencia de ONF en el cerebro. Sin embargo, hay otras hipótesis que apuntan a que son

la inflamación, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial los que inducen la acumulación de β A y ONF³⁴⁻³⁶.

El β A es muy tóxico para la mitocondria. Inhibe enzimas mitocondriales importantes, como la citocromo C oxidasa. En consecuencia, el transporte de electrones, la producción de ATP, el consumo de oxígeno y el potencial de la membrana mitocondrial se ven dañados. En este contexto, se incrementa la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), causando estrés oxidativo, liberación del citocromo C y apoptosis¹⁹

Además del estrés oxidativo provocado por la disfunción mitocondrial, el β A es un potente generador de ROS y el principal causante del estrés oxidativo. La oxidación de ciertos componentes moleculares, especialmente proteínas y lípidos, da lugar al desequilibrio iónico en las membranas celulares y daña el transporte de la glucosa, agravando el desequilibrio energético¹⁹.

La microglía y los astrocitos se activan por la presencia de β A. Inicialmente la microglía fagocita y degrada el β A, pero la activación crónica de la microglía desencadena una cascada de citoquinas dañinas (interleuquina-1, interleuquina-6 y el factor de necrosis tumoral- α). Los astrocitos también inducen la liberación de proteínas de fase aguda (α -macroglobulina, proteína C reactiva, etc.) que pueden tanto agravar como corregir los efectos del β A¹⁹.

1.3 Biomarcadores

Un biomarcador es una característica o cambio fisiológico, bioquímico o morfológico medible y evaluable a nivel molecular, bioquímico o celular, que actúa como indicador de un proceso biológico o patológico, o como señal de la respuesta a una intervención terapéutica. En el caso de una enfermedad, un biomarcador sería un indicador que se utiliza para valorar el riesgo o la presencia de una enfermedad.

Tradicionalmente, ante un paciente con un cuadro clínico de demencia, el diagnóstico de certeza de la EA sólo podía establecerse mediante el estudio neuropatológico del material cerebral obtenido en la autopsia. Hoy en día, los biomarcadores permiten un diagnóstico clínico de EA durante la vida, ya que reflejan la patología *in vivo*³⁷. La patología de la EA se caracteriza por la acumulación extracelular de los agregados de la proteína β A, llamados PSe o placas de amiloide, la acumulación intracelular de ONF formados por la proteína p-tau^{37,38} y la neurodegeneración.

Los frutos de una intensa investigación han permitido desarrollar biomarcadores bioquímicos y de neuroimagen válidos para la detección de los cambios neuropatológicos. Según los Institutos Nacionales de Envejecimiento Americanos y la *Alzheimer's Association* (NIA-AA) ³⁹, los biomarcadores establecidos para los depósitos de β A son la tomografía por emisión de positrones (PET) con radiofármacos ligados de amiloide (PET-amiloide) y la determinación de niveles de β A en líquido cefalorraquídeo (LCR). Para la presencia de ONF, se dispone de la determinación de niveles de proteína tau fosforilada (p-tau) en LCR y el PET con marcadores de la proteína tau (PET-tau). La neurodegeneración se determina mediante los niveles de proteína tau (t-tau) en LCR, la disfunción sináptica con medidas de metabolismo cerebral cortical mediante PET con fluorodesoxiglucosa (PET-FDG) y la atrofia cerebral con secuencias de la resonancia magnética (RM) estructural.

Los biomarcadores se han clasificado como aquellos propios de la etiopatogenia de la enfermedad (marcadores de amiloide y tau) y aquellos que reflejan fenómenos neurodegenerativos secundarios (atrofia cerebral en RM y disminución de metabolismo cortical en PET-FDG).

Los marcadores genéticos que revelan la presencia de una mutación patogénica causante de EA familiar (mutaciones en el gen APP y en los genes de las presenilinas) adquieren un valor diagnóstico, a diferencia de los marcadores genéticos que únicamente lo son del mayor o menor riesgo, como el polimorfismo del gen APOE y otros polimorfismos de riesgo con menor impacto (puente integrador 1, BIN1; clusterina; transportador ABC-A7; receptor del complemento tipo 1, CR1; proteína de ensamblaje a clatrina, PICALM; y otros) ⁴⁰.

1.3.1 Marcadores de amiloide

La formación de las placas de amiloide se puede medir *in vivo* por la bajada de concentración de la proteína β A₁₋₄₂ en el LCR o por el aumento de retención del marcador de β A en PET. Las pruebas de imagen de PET-amiloide y la determinación de los niveles de β A en LCR correlacionan con la presencia de depósitos fibrilares de β A ⁴¹⁻⁴³. Ambos procedimientos han sido incorporados en los nuevos criterios diagnósticos de la EA propuestos por la NIA-AA y el grupo internacional de trabajo (IWG) ^{39,44,45}.

Se ha investigado el posible papel de las determinaciones de los niveles de β A en plasma como biomarcador para la detección de la EA. Un meta-análisis concluyó que el cociente β A₁₋₄₂/ β A₁₋₄₀ bajo en plasma se asociaba a un riesgo mayor de EA ⁴⁶. En la misma línea un estudio reciente muestra una asociación entre el cociente β A₁₋₄₂/ β A₁₋₄₀ en plasma y amiloidosis cerebral medida por PET y LCR ⁴⁷. Otros estudios en cambio no muestran ninguna asociación. Los datos obtenidos son contradictorios y de momento no permiten otorgarles valor diagnóstico ni de riesgo ⁴⁸.

1.3.1.1 β -amiloide en tomografía por emisión de positrones

La PET se basa en la detección y el análisis de la distribución de un radiofármaco ligando de vida media corta que se inyecta previamente al paciente por vía intravenosa. Actualmente existen diferentes radiofármacos o ligandos para la placa amiloide. La localización y fijación específica de estas sustancias en las placas difusas y neuríticas de β A en el córtex cerebral está extensamente estudiada y validada en estudios neuropatológicos y de seguimiento con comprobación *post-mortem* ^{43,49}. Los radiofármacos ligandos disponibles son el compuesto Pittsburgh B (PiB; 2-[4-metilamino fenil]-1, 3-benzotiazol-6-ol), marcado con el isótopo carbono-11, y el flutemetamol, el florbetaben y el florbetapir, marcados con el isótopo flúor-18 ⁵⁰⁻⁵². Estos tres últimos son los más aplicados en la práctica clínica.

1.3.1.2 β -amiloide en líquido cefalorraquídeo

En los últimos años, se han desarrollado técnicas de determinación de los niveles de β A, en concreto de la forma de 42 aminoácidos (β A₁₋₄₂), en el LCR mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas-ELISA. La obtención de LCR se hace a través de una punción lumbar, procedimiento que, si bien tiene un carácter invasivo, ha demostrado ser una práctica segura en el contexto de la investigación y el diagnóstico de la EA ^{53,54}. Los niveles bajos de β A en LCR reflejan la presencia de depósitos de β A fibrilar en la corteza, ^{55,56}. La sensibilidad de los marcadores de β A en LCR para la detección de depósitos corticales de placas de amiloide es de 96,4% ⁴⁵. Los niveles de β A en LCR reflejan también fielmente la presencia de depósitos de β A en el cerebro en estudios con PET-amiloide con flutemetamol ⁵⁷.

Las limitaciones del uso de los niveles de β A en LCR para el diagnóstico de EA están en relación con su gran sensibilidad a factores preanalíticos y analíticos que determinan una

variabilidad no desdeñable de las determinaciones inter-laboratorio. Esto obliga a cada laboratorio a determinar sus propios puntos de corte ⁵⁸. Así, la literatura ofrece puntos de corte dispares que varían desde los 500 a los 643 pg/ml en series clínicas ^{59,60} o desde los 515 a los 539 pg/ml en series anatomopatológicas ^{41,42}. Se ha investigado también el posible papel de las determinaciones de los niveles de βA en plasma como biomarcadores para la detección de la EA. Los datos obtenidos hasta ahora han sido contradictorios y no permitían otorgarles valor diagnóstico ni de riesgo ⁴⁸, pero los últimos estudios muestran una relación entre la relación $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40}$ en plasma y amiloidosis cerebral medidas por PET y en LCR ⁴⁷.

1.3.2 Marcadores de ovillos neurofibrilares

Se plantea que la formación de los ONF le sigue a la agregación amiloide ⁶¹, y aquéllos también se pueden evaluar midiendo en ese caso el incremento de p-tau en LCR o por PET-tau.

1.3.2.1 Proteína tau en tomografía por emisión de positrones

El desarrollo de radiofármacos ligandos para la detección de depósitos de *tau* es reciente ⁶². Los radiofármacos ligandos estudiados hasta el momento son el compuesto [F-18]THK, el compuesto PBB y los compuestos T808 y [F-18]T807 o también denominado F-AV-1451 o Flortaucipir. Este último, el [18-F]T807, presenta un patrón de retención similar al correspondiente con la distribución de los ONF. Se ha observado que las medidas del marcador de tau [18-F]T807 correlaciona con medidas de LCR de tau y p-tau ⁶³.

1.3.2.2 Proteína tau fosforilada en líquido cefalorraquídeo

El epitopo treonina 181 de p-tau (P-tau181), es el biomarcador más común en LCR ⁶⁴. Las concentraciones de otros epitopos, tales como P-tau231 y P-tau199, se asocian con niveles de P-tau181 y muestran una precisión diagnóstica muy similar ⁶⁵. A diferencia de los niveles de t-tau en LCR, el aumento de los niveles de p-tau en LCR no se observa en otras enfermedades neurodegenerativas que no sean la EA ⁶⁴. Los niveles de p-tau en LCR correlacionan positivamente con la presencia de ONF, y los pacientes con EA muestran niveles elevados en LCR ^{55,66}. Al igual que ocurre con la determinación de los niveles de βA , existe una variabilidad en las determinaciones interlaboratorio que obliga a cada centro a concretar sus propios puntos de corte. Se ha sugerido que los niveles de tau

cambian según la edad y que es necesario utilizar puntos de corte distintos para personas jóvenes y mayores ^{60,67}.

1.3.3 Marcadores de neurodegeneración

Otros cambios neuropatológicos característicos de la EA son los relacionados con la neurodegeneración, como la determinación de los niveles de t-tau en LCR, la presencia de atrofia en pruebas de neuroimagen estructural y el hipometabolismo cerebral en estudios de PET-FDG.

1.3.3.1 Proteína tau en líquido cefalorraquídeo

Al igual que los niveles de p-tau en LCR, los niveles de t-tau en LCR correlacionan positivamente con la presencia de ONF en la EA, y estos pacientes muestran niveles elevados de t-tau en LCR ^{55,66}. La asociación entre los niveles de t-tau en LCR y p-tau en LCR es mucho más alta que la asociación entre los niveles de t-tau en LCR y la atrofia medida por PET-FDG ^{68,69}. En cambio, según el último criterio de NIA-AA, a diferencia de los niveles de p-tau en LCR, la determinación de los niveles de t-tau en LCR no se considera un biomarcador de la patología tau ³⁹. Este criterio se debe al comportamiento divergente de estas dos medidas en otras enfermedades. En la lesión cerebral traumática y en el accidente cerebrovascular existe un aumento temporal de t-tau, sin cambios en la p-tau, que muestra una asociación con la gravedad del daño neuronal ^{70,71}. Es difícil argumentar cómo los cambios en los niveles de t-tau en tales pacientes podrían atribuirse al depósito de tau en ONF. Además, en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, un trastorno caracterizado por una neurodegeneración muy rápida pero no por la acumulación de tau de ONF, hay un aumento muy marcado de la t-tau en LCR (10-20 veces más que en EA), mientras que la p-tau no muestra ningún cambio ^{72,73}. Al igual que con ocurre con la determinación de los niveles de p-tau, se ha sugerido que los niveles de t-tau cambian según la edad y que es necesario utilizar puntos de corte distintos para personas jóvenes y mayores ^{60,67}.

1.3.3.2 Atrofia y pérdida de integridad estructural en resonancia magnética

La atrofia medida a través de RM refleja el grado de disminución del volumen cerebral regional que se produce con la pérdida neuronal, uno de los hechos neuropatológicos fundamentales de la EA.

La atrofia cerebral se puede medir por inspección visual de imágenes de RM y mediante escalas semicuantitativas que cuantifican el grado de atrofia, como la escala de atrofia temporal medial de Scheltens ⁷⁴. Además, se dispone de programas de procesamiento de imágenes automatizados que permiten cuantificar el volumen de las diferentes regiones del cerebro ⁷⁵. Asimismo, hay otros parámetros de estimación de cambios cerebrales estructurales en distintas secuencias de RM, tales como las imágenes de espectroscopia o el tensor de difusión, que se emplean más en investigación que como marcadores diagnósticos establecidos ⁷⁶.

1.3.3.3 Metabolismo cerebral en tomografía por emisión de positrones de Glucosa

El metabolismo cerebral cortical, que refleja la actividad sináptica, puede ser investigado mediante la técnica de PET con la administración de FDG marcada con el isótopo flúor-18 ⁷⁵. En la EA, el hipometabolismo en la región del cíngulo posterior es característico en las fases más iniciales ⁷⁷. En las fases avanzadas, aparece hipometabolismo temporo-parietal bilateral que se extiende a regiones frontales.

1.3.4 Otros biomarcadores

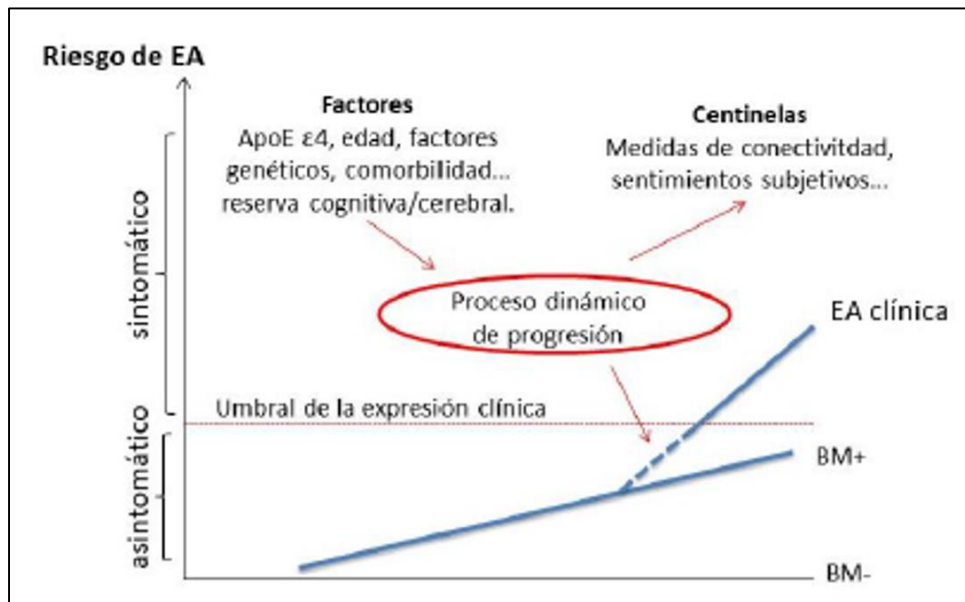
En los últimos años, los biomarcadores de LCR de neurofilamento de cadena ligera (NfL) y YKL40 han evolucionado como biomarcadores prometedores de la EA ⁷⁸⁻⁸⁰, pero todavía se desconoce su papel exacto en la fisiopatología. Concentraciones elevadas de NfL se han relacionado con degeneración axonal, sobre todo en áreas subcorticales del cerebro ⁷⁸ y también con la microestructura de la SB ⁸¹. Se cree que el YKL40 refleja la activación astrogial, una respuesta inflamatoria al proceso neurodegenerativo ⁸². Estos procesos podrían ser consecuencia de la agregación de β A o podrían ser mecanismos paralelos, por lo que es importante generar conocimiento sobre su posible implicación en la EA.

1.4 Factores de riesgo

El concepto de riesgo aplicado a la EA puede entenderse como el punto en el que una persona se encuentra en la patocronia del proceso de la EA que lleva desde el cerebro sano hasta el estado de abundante carga patológica y demencia. Así, la información sobre la presencia o ausencia de determinados factores de riesgo y protección, añadida a la positividad o negatividad de los distintos biomarcadores puede permitir una estimación

aproximada de la probabilidad que una persona tiene de desarrollar síntomas ² (**Figura 3**).

Figura 3: Modelo hipotético de riesgo de progresión de la enfermedad de Alzheimer de preclínica a sintomática.



Nota. Se representa el riesgo de desarrollar síntomas una vez que la patología de la EA está presente en el cerebro. La dinámica del proceso de progresión hacia la aparición de los síntomas puede estar mediada por factores genéticos y/o ambientales que pueden aumentar o disminuir el riesgo. EA= enfermedad de Alzheimer; BM= biomarcadores fisiopatológicos; APOE4= portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E.

Tesis doctoral Caracterización del perfil neuropsicológico de personas con enfermedad de Alzheimer preclínica. Mirian Ecay-Torres. UNED. 2018.

A excepción de los casos de EA causados por mutaciones genéticas, se considera que la EA esporádica es una enfermedad compleja que se desarrollaría como resultado de la interacción de múltiples factores genéticos y ambientales ⁵. Estos factores se pueden clasificar en factores de riesgo modificables y factores de riesgo no modificables ⁸³. Dentro de los factores no modificables se incluyen la edad ⁸⁴, el antecedente familiar de demencia ⁸⁵, el género femenino ⁸⁶ y diversos polimorfismos genéticos entre los que destaca el ser portador del alelo $\epsilon 4$ del gen APOE ⁸. Los factores de riesgo modificables incluyen factores cardiovasculares como la hipertensión ^{87,88}, la hipercolesterolemia ^{6,87,88}, obesidad ^{89,90}, diabetes ⁸⁸ y enfermedades cardiovasculares ⁹¹. También son factores de riesgo modificables el bajo nivel educativo ⁹², el sedentarismo ⁹³ y la dieta ⁹⁴ (

Tabla 1). Todavía no se conoce del todo bien cuáles son los mecanismos por los que cada uno de estos factores de riesgo ejerce su acción y de qué manera interfieren con la biología

propia de la EA. Entender estas relaciones podría aportar conocimiento de gran valor para desarrollar estrategias de prevención primaria y secundaria.

Tabla 1: Factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer.

Factores de riesgo no modificables	Factores de riesgo modificables
Edad	Bajo nivel educativo
Historia familiar de demencia	Baja actividad cognitiva y social
Genética	Factores cardiovasculares
Apolipoproteína E ε4	Hipertensión arterial
Síndrome de Down	Hipercolesterolemia
BIN1, CLU, ABCA7, CR1, PICALM,	Diabetes
SORL-1	Obesidad
	Enfermedades coronarias
	Hábito tabáquico
Sexo femenino	Lesiones cerebrales traumáticas
	Dietas ricas en grasas saturadas y azúcares
	Sedentarismo

Nota: BIN1= puente integrador 1; CLU= clusterin; ABCA7= transportador ABC-A7; CR1= receptor del complemento tipo 1; PICALM= proteína de ensamblaje a clatrina; SORL-1 = receptor-1 de sortilina.

Tesis doctoral Caracterización del perfil neuropsicológico de personas con enfermedad de Alzheimer preclínica. Mirian Ecay-Torres. UNED. 2018.

1.4.1 Hipercolesterolemia y enfermedad de Alzheimer

La bibliografía muestra una asociación significativa entre los niveles de colesterol plasmático y el riesgo de desarrollar EA. En el año 2006, Kivipelto y su equipo analizaron los datos del estudio poblacional en Finlandia, *Cardiovascular Risk Factors, Aging and Dementia (CAIDE)*, para investigar los posibles factores de riesgo de desarrollar demencia⁹⁵. Uno de los factores con efecto un significativo sobre el riesgo de desarrollar demencia al cabo de 20 años fue el colesterol. Según un meta-análisis de 34 estudios sobre la relación entre el colesterol total y el deterioro cognitivo y la demencia, el riesgo relativo de desarrollar EA para un adulto con colesterol alto en la etapa media de la vida respecto aquellos con un nivel normal era de 2.14 (IC 95% [1.33, 3.44])⁹⁶. De la misma manera, un nivel alto de colesterol total aumentaba el riesgo de presentar DCL y deterioro cognitivo años más tarde. Sin embargo, tener el colesterol alto no se asociaba con DCL, EA, demencia vascular u otro tipo de demencia o deterioro cognitivo en mayores de 60 años. Los autores concluyeron que tener colesterol alto en la etapa media de la vida, entre

40 y 60 años, aumentaba el riesgo de EA en etapas posteriores y que se relacionaba con el inicio de la patología de la EA⁹⁶.

1.4.2 Colesterol cerebral y enfermedad de Alzheimer

Cada vez más estudios demuestran que el metabolismo del colesterol cerebral está relacionado con la etiopatogenia de la EA⁹⁷. Por un lado, diversos estudios muestran una asociación entre el metabolismo cerebral del colesterol y la patología amiloide y tau⁹⁸. El colesterol afecta al procesamiento de la APP. La APP tiene un dominio específico de unión del colesterol y éste podría influenciar la localización de la APP en las balsas lipídicas⁹⁹, y favorecer la vía amiloidogénica. El colesterol participa en la síntesis, agregación y eliminación de βA_{1-42} ^{10,100}. Se han descrito diversos mecanismos posibles para el efecto del colesterol en la eliminación de βA_{1-42} . Algunos estudios muestran una asociación entre el colesterol y la actividad de las enzimas encargadas de la degradación de βA_{1-42} ¹⁰¹. Otro estudio, realizado en modelos animales de alzheimer, observó que un nivel alto de colesterol cerebral alteraba la fusión autofagosoma-lisosoma y que esta alteración impedía la degradación de βA_{1-42} ¹⁰². Por otro lado, existen diferentes polimorfismos genéticos relacionados con el metabolismo del colesterol que contribuyen al riesgo de desarrollar EA. El principal es el alelo $\epsilon 4$ del gen APOE (APOE4). La ApoE es la principal proteína de unión del colesterol cerebral y uno de los mayores reguladores de su metabolismo, participando en la redistribución y homeostasis del colesterol¹⁰³.

Los oxisteroles, derivados mono-oxigenados del colesterol, podrían ser el nexo de unión entre el metabolismo del colesterol cerebral y la patología de EA^{97,104-106}. Los procesos de estrés oxidativo y neuroinflamación impulsados por los oxisteroles podrían ser algunos de los mecanismos influyentes en la EA, creando entre todos los mecanismos un *círculo vicioso* donde se afecta cada vez más la patología de la enfermedad^{104,107}

2. Sustancia blanca en la enfermedad de Alzheimer

2.1 Anatomía de la sustancia blanca

La SB corresponde a todos los axones mielinizados de las neuronas en el sistema nervioso central. Existen tres tipos de fibras en la SB: fibras de asociación, fibras comisurales y fibras de proyección (**Figura 4**).

2.1.1 Fibras de asociación

Son fibras intrahemisféricas, conectan objetivos sinápticos dentro de un mismo hemisferio cerebral. Existen dos tipos de fibras: cortas y largas. Las fibras de asociación cortas van por la profundidad de todos los surcos del cerebro y conectan los giros adyacentes. Los tractos de asociación largos son 7 fascículos: 3 fascículos longitudinales (superior, medio e inferior), 2 fronto occipitales (superior e inferior), el cíngulo y el fascículo uncinado.

2.1.1.1 Fascículo longitudinal superior

Conecta áreas temporales posteriores con áreas frontales (corteza premotora y prefrontal). Incluye el fascículo arcuado. Su trayectoria comienza en la porción caudal del giro temporal superior, se arquea posteriormente y luego caudalmente sobre la fisura de Silvio para terminar en el lóbulo frontal. Es el fascículo más largo del cerebro. Se encuentra en ambos hemisferios y se relaciona con la transmisión de palabras y vocabulario. Se han descrito también asociaciones con la memoria, las emociones, lenguaje, procesamiento visuoespacial y procesamiento numérico ¹⁰⁸.

2.1.1.1 Fascículo longitudinal inferior

Es el fascículo más inferior y medial, se encuentra en la cara basal del hemisferio cerebral. Es un tracto de asociación ventral que comunica estructuras de la zona temporal antero inferior con la parte posterior del lóbulo occipital a través del lóbulo temporal y del parietal. La región temporal se encuentra cerca de la amígdala e hipocampo. Se han descrito funciones en el reconocimiento facial y de objetos, la discriminación, y la memoria. Alteraciones en este fascículo se asocian a déficits en el reconocimiento de objetos ¹⁰⁹.

2.1.1.2 Cíngulo

Rodea el cuerpo calloso y conecta la parte medial de los lóbulos frontal, temporal y parietal. Es parte del sistema límbico y de la red DMN. Participa en la regulación de la memoria, emoción y conducta ¹¹⁰.

2.1.1.3 Fascículo uncinado

Tiene forma de “J”, se ancla en la fisura de Silvio y se dirige desde el polo temporal anterior y amígdala hacia el giro orbitofrontal lateral y el lóbulo frontal inferior. Es parte del sistema límbico. Participa en funciones muy diversas como funciones sociopsicológicas, límbicas y cognitivas, tales como la toma de decisiones, la regulación y comprensión emocional, la recuperación de la memoria semántica y el procesamiento del lenguaje ¹¹¹.

2.1.2 Fibras comisurales

Son fibras interhemisféricas, conectan los dos hemisferios cerebrales, horizontales en el neuroeje, y atraviesan la línea media. La principal comisura es el cuerpo calloso pero también existen comisuras de menor tamaño como la hipocampal, habenular, posterior y la tectal.

2.1.2.1 Cuerpo calloso

Es una comisura homotópica, conecta áreas homólogas entre los hemisferios cerebrales. Desde la parte frontal a la posterior se divide en cuatro regiones anatómicas: genu, rostro, cuerpo y esplenio. El genu y rostro conectan la corteza prefrontal, orbito-frontal, giro frontal medial, giro frontal superior y el cíngulo anterior. El cuerpo conecta toda la parte premotora, giros precentral y post centrales, lobulillos parietales, giro temporal superior y el cíngulo posterior. El esplenio conecta los lóbulos occipitales, parte del cíngulo posterior, corteza de asociación temporo occipital y la región temporal inferior, formando un solo segmento con la comisura del hipocampo a través del cual se cruzan las fibras del parahipocampo. Cada región del cuerpo calloso contiene fibras de diferente composición. En la parte posterior del esplenio y el cuerpo se encuentran las fibras de gran diámetro donde las fibras sensoriales interhemisféricas cruzan la comisura e intercambian información, mientras que las fibras más pequeñas que conectan áreas de asociación corticales se encuentran en la parte frontal del cuerpo, rostro y genu. El tamaño del cuerpo

calloso correlaciona positivamente con la inteligencia y su integridad es esencial para un correcto rendimiento cognitivo ¹¹².

2.1.2.2 Comisura hipocampal

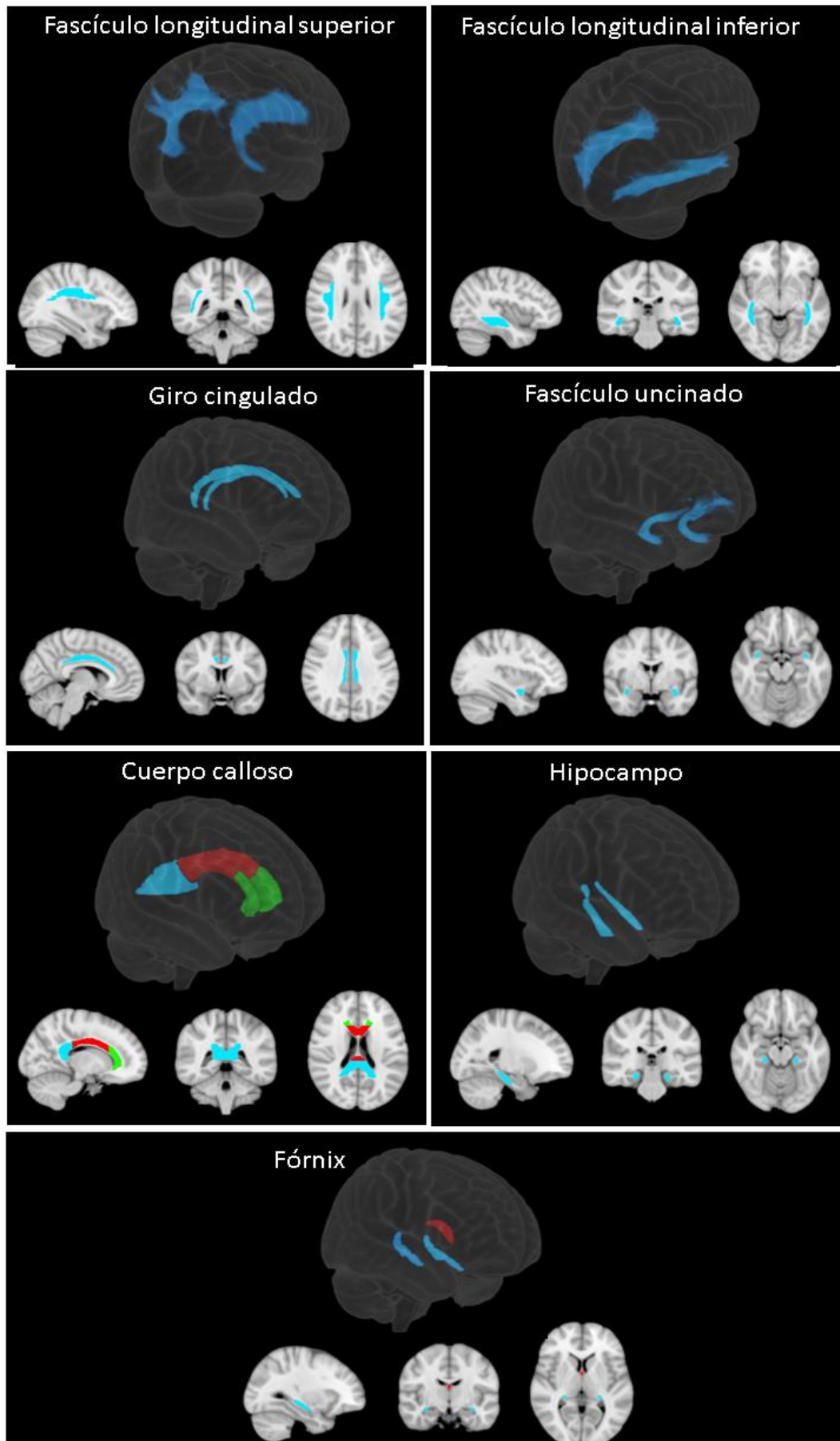
Esta comisura une el hipocampo derecho con el izquierdo. Se encuentra en el borde inferior del cuerpo calloso. Su función se relaciona con el aprendizaje y la memoria ¹¹³.

2.1.3 Fibras de proyección

Estas fibras conectan la corteza cerebral con cualquier tipo de objetivo subcortical, ya sean vías eferentes o aferentes. Las fibras de proyección son la capsula interna, corona radiada, las radiaciones del tálamo, el fórnix y el fascículo subcalloso

2.1.3.1 Fórnix

El fórnix contiene una estructura en la parte media que se denomina cuerpo del fórnix y dos proyecciones anteriores y dos posteriores llamadas columnas. A la región que conecta las respectivas columnas derechas e izquierdas se le denomina comisura. El fórnix conecta áreas corticales anteriores con áreas corticales posteriores contralaterales, es decir, cruza la información y participa así en la unión de todos aquellos elementos del sistema límbico del hemisferio derecho con los del hemisferio izquierdo. Las columnas conectan los cuerpos mamilares con los núcleos o cuerpos amigdalinos. Hacia la parte inferior, el fórnix se continúa con fibras que salen del hipocampo y que constituyen las fimbrias del hipocampo. Estas fimbrias constituyen una prolongación de las columnas posteriores del fórnix ¹¹⁴. Entre los muchos procesos cognitivos que se asocian a esta estructura, su papel vital se encuentra dentro del circuito de la memoria.

Figura 4: Anatomía de la sustancia blanca.

2.2 Redes cognitivas afectadas en la enfermedad de Alzheimer

El cerebro se organiza como un complejo sistema de redes neuronales que operan a niveles múltiples de procesamiento de la información en neuronas individuales, circuitos neuronales locales, columnas, áreas funcionales y sistemas funcionales con conexiones entre áreas cerebrales remotas ¹¹⁵. Tales redes se forman durante el desarrollo y se han de mantener y adaptar a cambios y agresiones que acontecen durante la vida adulta ¹¹⁶. Las alteraciones en estas redes neuronales son detectables mediante técnicas de RM funcional y estructural. Se puede estudiar la activación de las redes neuronales de dos maneras: en estado de reposo o durante la realización de una tarea específica.

Diferentes estudios demuestran que estas redes neuronales se encuentran alteradas en la EA. Una de las redes más estudiadas en la EA es la red por defecto (*default mode network*, DMN). La DMN incluye la corteza cingular posterior, el precúneo, la región parietal lateral, la corteza prefrontal medial y el hipocampo. Se cree que proporciona un estado básico del cerebro que representa la autorreferencia, el procesamiento emocional, la memoria, así como la cognición espontánea y aspectos de la conciencia ¹¹⁷. Los primeros estudios encontraron que las personas con EA mostraban una conectividad disminuida respecto a los controles en dichas regiones y observaron que esta menor conectividad en el cíngulo posterior y en el hipocampo se relacionaba con el hipometabolismo encontrado en las mismas regiones en los estudios con PET-FDG ^{118,119}. Posteriormente, también se observó que los pacientes con EA y DCL mostraban una menor capacidad para desactivar la DMN al salir del estado de reposo, de tal manera que regiones irrelevantes para el desarrollo de tareas específicas seguían activas ¹²⁰. Los hallazgos encontrados en la DMN en pacientes con EA son convincentes ya que la topografía de la DMN se superpone parcialmente a los patrones de depósitos de β A, el hipometabolismo de la glucosa y la disfunción de la red de memoria ¹²¹. Estas mismas alteraciones funcionales se han descrito en sujetos con EA-preclínica. Personas con rendimientos normales en pruebas cognitivas y con presencia de amiloide en PIB-PET muestran una menor conectividad en la DMN entre las regiones posteriores (precúneo, cíngulo posterior) y las anteriores (cíngulo anterior), y entre el precúneo y el hipocampo ^{122,123}, poniendo de manifiesto que antes de que aparezcan las primeras manifestaciones cognitivas y/o conductuales, la proteína β A puede estar produciendo modificaciones funcionales. Nuestro grupo también ha demostrado que aparecen cambios de conectividad estructural relacionados con la amiloidosis ¹²⁴. Un menor nivel de β A en LCR se asocia con una menor densidad de

conectividad global y con cambios en valores específicos de conectividad de áreas del lóbulo temporal medial, del precúneo y del giro frontal medial. Estos resultados sugieren que, en personas sin síntomas, la presencia de β A se relaciona con disfunciones en las redes de la SG. La patología tau también se asocia, de manera independiente del β A, a la aparición de cambios en la activación funcional. Se ha observado que existe una relación significativa entre el nivel de tau en LCR y la disrupción entre la corteza cingular posterior y el lóbulo temporal medial ¹²⁵. Estos estudios sugieren que, durante la fase preclínica de la EA, los cambios neuropatológicos contribuyen a la aparición de una disfunción significativa en la DMN ¹²⁶. Sujetos con riesgo aumentado de EA (APOE4) también tienen alteraciones en las redes neuronales. En personas mayores en riesgo de presentar EA por ser portadoras de APOE4, se ha observado una disminución de conectividad funcional en la DMN ¹²⁷ y un aumento de la conectividad funcional de las regiones frontales ¹²⁸. Incluso en personas jóvenes aparece el mismo patrón ¹²⁹. Durante la realización de una tarea de reconocimiento de escenas con RM funcional en universitarios ¹³⁰ se observó que los portadores del alelo ϵ 4 mostraban una mayor activación de la corteza cingular posterior, el precúneo y la corteza retrosplenial que los no portadores. Estos resultados sugieren que la condición de portador del alelo ϵ 4 puede tener un efecto importante sobre la organización y funcionalidad de las redes neurocognitivas.

Junto a la DMN, en la EA hay también afectación estructural y funcional de otras redes como la red atencional dorsal, la red de control ejecutivo (*executive control network*, ECN1), la red de relevancia (*saliency network*, SaN1) y la red sensorimotora ¹³¹. Tampoco la distribución inicial de los depósitos de β A en la EA se restringe a DMN. Datos neuropatológicos ¹³² y de PET-amiloide ¹³³ muestran depósitos de β A en áreas de asociación heteromodal frontales y parietales en estadios muy iniciales. Estas áreas están conectadas por el fascículo longitudinal superior y constituyen, al igual que las áreas de DMN, verdaderos nodos de conectividad intensa y tasas metabólicas y de demanda energética elevadas.

Parece por tanto que los primeros fenómenos fisiopatológicos de la EA tienen lugar en sistemas de redes neurales de marcada actividad conectiva intrínseca, alta conectividad estructural y elevadas tasas metabólicas. Todavía no está claro si el origen de los cambios en la conectividad cerebral está en fenómenos inicialmente somato-dendríticos en la corteza o bien en cambios axonales o mielínicos de las estructuras de “cableado” que discurren por la SB, o en ambos. Un estudio reciente muestra que el estado de la

microestructura de la SB se relaciona con la falta de desactivación de la DMN asociada con la patología de la EA y que además, alteraciones sutiles en la microestructura de la SB serían suficientes para alterar la funcionalidad de DMN en personas adultas cognitivamente normales ¹³⁴.

2.3 Microestructura de la sustancia blanca

2.3.1 Concepto de DTI

La afectación de la SB en la EA ha sido reconocida desde las descripciones neuropatológicas de Englund y Brun¹¹ hasta los más recientes estudios de DTI por RM ¹². La DTI es una técnica de neuroimagen *in vivo* que sirve para examinar de modo no invasivo alteraciones sutiles en el tejido de la SB midiendo el movimiento de las moléculas de agua ¹³⁵. La DTI se basa en el supuesto de que en las fibras nerviosas de la SB, la difusión del agua en dirección paralela a la orientación de la fibra es relativamente libre, por el contrario, estructuras como la mielina, las membranas axonales y los neurofilamentos del axoplasma restringen el movimiento del agua perpendicularmente al axon ¹³⁶. Además, dentro de la SB, la difusión del agua es mayor en zonas con mayor número de fibras en paralelo, como en el cuerpo calloso ¹³⁷.

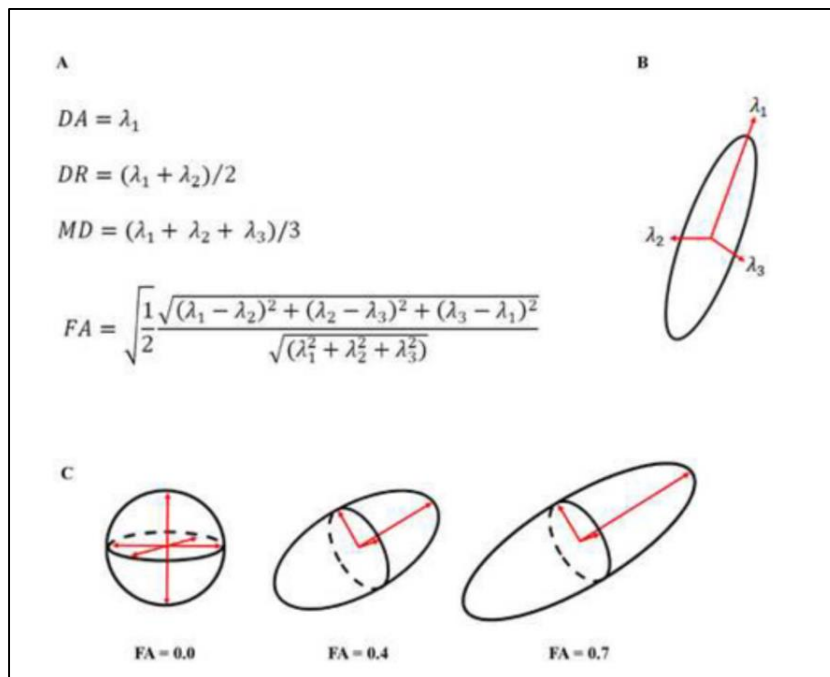
Los estudios de la DTI miden cuatro parámetros: difusividad media (MD), anisotropía fraccional (FA), difusividad paralela o axial (AxD) y difusividad perpendicular o radial (RD). Los cambios en la difusión del agua se reflejan en estos parámetros y la ubicación, el tipo y el alcance de los cambios aporta información relevante sobre la base y los mecanismos de algunas enfermedades neurológicas.

Para calcular cada parámetro se utilizan tres vectores que definen el elipsoide de difusión de cada voxel. La AxD refleja el coeficiente de difusión a lo largo de la dirección de difusión máxima ‘aparente’ (λ_1), mientras que la RD refleja la media de los coeficientes de difusión en las dos direcciones perpendiculares $((\lambda_2+\lambda_3)/2)$. La MD es la media de los tres valores propios del tensor de difusión y la FA se calcula como un valor ponderado de media de los tres valores propios del tensor de difusión con el fin de representar la fracción del tensor definida por la difusión anisotrópica ¹³⁸ (**Figura 5**).

La interpretación de los valores de estos parámetros es compleja y debe hacerse con cuidado. La FA refleja la direccionalidad y da información general sobre la integridad de la SB ¹³⁹. Es posible obtener los mismos valores de FA a partir de diferentes

combinaciones de difusividad a lo largo de los tres ejes. Para conocer la dirección, forma o magnitud del tensor de difusión se necesitan los otros parámetros ¹³⁶. La MD proporciona una visión general de la densidad de la membrana, caracterizando la presencia general de obstáculos a la difusión ¹⁴⁰. Valores bajos de MD indican una difusión restringida y alta densidad de membranas. La información que proporcionan la AxD y RD es más específica. Los valores de RD informan sobre el estado de las vainas de mielina. La desmielinización da lugar a una difusión menos restringida perpendicular al axón y, por lo tanto, a una mayor RD ¹⁴¹. La AxD por el contrario informa sobre la integridad del axón. Se ha asociado una disminución de los valores de AxD con inflamación, fragmentación y acumulación de orgánulos en los axones ¹⁴².

Figura 5: Índices de la DTI.



Nota. Para calcular cada índice se utilizan tres vectores principales ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$) y los vectores asociados. (A) Ecuaciones para calcular el AD, RD, MD y FA. (B) Los tres vectores principales. (C) Representaciones geométricas de los valores bajo, intermedio y alto del FA.

DA=Difusividad Axial; DR=Difusividad Radial; MD=Difusividad Media; FA=Anisotropía Fraccionada.

2.3.2 Microestructura de la sustancia blanca y funciones cognitivas

Diferentes estudios de neuroimagen han identificado asociaciones entre los cambios en la microestructura de la SB y el rendimiento cognitivo asociado al envejecimiento.

2.3.2.1 Velocidad de procesamiento y sustancia blanca

En el estudio de Borghesi y colaboradores se observó que la velocidad de procesamiento mostraba una asociación positiva con la FA y negativa con la MD, AxD y RD del FLS y cíngulo ¹⁴³. En la misma línea, Madden y colaboradores describieron una correlación positiva entre la velocidad de procesamiento y la FA del cuerpo calloso y fascículo longitudinal superior ¹⁴⁴. La FA y MD del cuerpo del cuerpo calloso, junto con la MD del cíngulo y fascículo longitudinal inferior son los índices que mejor se asocian a la velocidad de procesamiento ¹⁴⁵. Además del fascículo longitudinal inferior y superior, cuerpo calloso y cíngulo, un mejor rendimiento en esta función cognitiva se asocia también a una mayor FA en la radiación talámica anterior y posterior, fórceps mayor, fascículo fronto-occipital superior y a una menor MD en la radiación talámica posterior ^{146,147}. Estas asociaciones son independientes del volumen total de la SG y SB ¹⁴⁸. Otros estudios en cambio no encontraron ninguna asociación entre dos tareas relacionados con la velocidad de procesamiento como son el tiempo de reacción y el tiempo de movimiento y la microestructura de la SB ¹⁴⁹

2.3.2.2 Función ejecutiva y sustancia blanca

La función ejecutiva se asocia a las lesiones de la SB de la radiación talámica anterior, tracto corticoespinal, fórceps mayor y fascículo longitudinal superior, siendo esta asociación independiente al volumen total de la SG y SB ¹⁴⁸. Concretamente, al igual que la velocidad de procesamiento, la función ejecutiva muestra una asociación positiva con la FA del fascículo longitudinal inferior, fórceps mayor, fascículo fronto-occipital superior y radiación talámica posterior y negativa con la MD, AxD y RD del cuerpo calloso, fascículo uncinado, fascículo longitudinal inferior y superior y cíngulo ^{143,147}. Davis y colaboradores describieron que las tareas relacionadas con la función ejecutiva mostraban una asociación positiva con la FA y negativa con la RD de los tractos que conectan las regiones frontales, principalmente el genu del cuerpo calloso y el fascículo uncinado ¹⁴⁹, en cambio no mostraron ninguna asociación con la AxD. Sugirieron que la desmielinización podría ser la causa de la relación entre la función ejecutiva y la SB ¹⁴⁹.

En la misma línea, otro estudio mostró una asociación con la FA de la mayoría de las regiones de la SB y con la RD del cuerpo calloso pero no con la AxD ¹⁵⁰.

2.3.2.3 Memoria y sustancia blanca

La memoria episódica muestra una asociación positiva con la FA del fórnix y negativa con la MD del cíngulo del hipocampo, fórnix y fascículo uncinado ¹⁵¹. Según este estudio, la MD del cíngulo del hipocampo es el índice que mejor refleja el rendimiento en memoria episódica. Otro estudio sobre la memoria episódica muestra también una asociación con la MD del cuerpo calloso, cápsula interna y corona radiata, pero esta asociación fue muy débil y se demostró que la microestructura de la SB no mediaba los cambios en la memoria relacionados con la edad ¹⁴⁵. En cuanto a la memoria verbal, existe una asociación positiva con la FA del fascículo arcuado ¹⁴⁶. Esta asociación es independiente a la atrofia y a las hiperintensidades de la SB. En relación a la memoria visual, hay una asociación positiva con la FA y negativa con la RD de los tractos que conectan las regiones posteriores del cerebro, principalmente el fascículo longitudinal inferior y esplenio del cuerpo calloso ¹⁴⁹. Otros estudios en cambio no muestran ninguna asociación significativa entre la memoria y la microestructura de la SB en sujetos adultos sin demencia ^{148,150}.

2.3.2.4 Fluencia verbal y sustancia blanca

Un estudio reciente describió una asociación entre la fluencia verbal y la MD, sobre todo en el lóbulo frontal, temporal y parietal, pero el empeoramiento anual en la fluencia verbal no correlacionó con los valores basales de la MD ¹⁵². En esta línea, otro estudio no encontró ninguna correlación entre la fluencia verbal y la microestructura de la SB ¹⁴⁵.

En resumen, estos trabajos muestran que un peor rendimiento en funciones cognitivas se asocia a menor FA y mayor MD, AxD y RD de muchas regiones de la SB, pero principalmente de las fibras de asociación tales como el fascículo longitudinal inferior y superior, fascículo uncinado y el cíngulo. En menor medida se asocian también a las fibras comisurales, principalmente a las fibras del cuerpo calloso como el fórceps mayor; y a las fibras de proyección de las radiaciones talámicas. La memoria, a diferencia de otras funciones cognitivas, muestra una asociación con el fórnix y el cíngulo del hipocampo.

2.3.3 Microestructura de la sustancia blanca en la enfermedad de Alzheimer

2.3.3.1 ¿Es la afectación de la sustancia blanca independiente de la sustancia gris?

Los estudios de DTI en pacientes con EA muestran una disminución de los índices de FA y un aumento de MD en vías límbicas y comisurales pero no en las vías motoras o visuales^{12,153}. Estos cambios en la SB se han relacionado inicialmente con degeneración walleriana secundaria a pérdida neuronal en áreas corticales de asociación. Pero también puede que diferentes mecanismos causen directamente degradación de la SB, independientemente de la patología de la SG. Estudios de DTI han mostrado que en la EA la atrofia cortical en las estructuras del lóbulo temporal medial y las alteraciones en la microestructura de la SB son acontecimientos independientes¹⁵⁴. En la misma línea, Bosch y colaboradores¹⁵⁵ demostraron que aunque los cambios en FA podían estar relacionados con la atrofia de la SG, los cambios en RD en diferentes regiones eran independientes de la atrofia de la SG, sugiriendo que podrían estar actuando diferentes mecanismos. La asociación entre los cambios en la DTI y la atrofia cortical descrita en la EA no se observa en pacientes recién diagnosticados de DCL^{151,156} pero sí en sujetos con DCL que estaban diagnosticados anteriormente¹⁵¹. Estos hechos sugieren que aunque los cambios en la SG y SB podrían estar relacionados en casos de EA avanzado, por degeneración walleriana por ejemplo, es posible que la degradación de la SB y la atrofia de la SG estén causados en las fases iniciales de la enfermedad por mecanismos diferentes o por un mismo mecanismo que actúe sobre los dos tejidos simultáneamente.

Se ha propuesto que los diversos cambios moleculares y celulares en la EA podrían ocurrir a nivel axonal⁴⁰. Según esta hipótesis, la acumulación de proteínas truncadas por el efecto de estados inflamatorios crónicos asociados a la edad podría inducir cambios en el citoesqueleto y fallos en el transporte axonal. Estas alteraciones podrían favorecer la fosforilación de tau, desestabilización de las estructuras sinápticas, hipercatabolismo de APP, aumento de β A, y en última instancia muerte neuronal.

Bartzokis y colaboradores han propuesto la teoría de la retrogénesis para considerar también el daño de la SB como primer acontecimiento en la EA^{157,158}. De acuerdo con esta teoría, la degeneración de la SB en la EA sería contraria al proceso de mielinización. Áreas mielinizadas más precozmente en el neurodesarrollo, como los axones de las áreas sensoriales primarias, son las menos afectadas y las últimas en afectarse, mientras que las fibras neocorticales de proyección, las cuales son las últimas en mielinizarse, son las

primeras en dañarse en la EA. Además de los oligodendrocitos, Bartzokis y colaboradores proponen el metabolismo del colesterol como factor importante en todo este proceso. Algunos estudios de DTI apoyan esta teoría¹⁵⁹⁻¹⁶¹, pero no todos.¹⁶²

2.3.3.2 Microestructura de la sustancia blanca en enfermedad de Alzheimer y deterioro cognitivo ligero

Un meta-análisis de estudios transversales de DTI en EA y DCL publicado en 2011¹⁶² demostró una disminución de la FA y aumento de la MD en la mayoría de las regiones de la SB en pacientes con EA o DCL en comparación con controles. Concretamente, la disminución de la FA en la EA es muy robusta en el lóbulo temporal, occipital y frontal¹⁶³ y en el caso de aumento de la MD en el hipocampo, y áreas parietal y temporal. Este aumento de la MD y disminución de la FA, especialmente en el cíngulo, fascículo longitudinal inferior y superior, fascículo uncinado y cuerpo calloso se ha confirmado en muchos trabajos^{155,156,164-170}. Muchas de estas áreas están estrechamente relacionadas con funciones cognitivas y se ha demostrado que estas alteraciones correlacionan con disfunciones en función ejecutiva y memoria^{171,172}. Hay que tener en cuenta también los valores de AxD y RD debido a que un aumento de FA podría estar causado por el incremento de la AxD, disminución del RD o la combinación de ambos, y el aumento en MD puede ser debido al incremento de cualquiera de los tres vectores sin que tenga que haber una disminución del otro. En la EA y en DCL la mayoría de los trabajos demuestran un aumento de la RD en las regiones frontal, temporal y parietal^{174,175}. En el caso de la AxD los resultados son contradictorios. Algunos estudios demuestran una disminución de la AxD en la EA y DCL, mientras que otros trabajos observan un aumento^{155,156,170}. Un trabajo reciente demuestra que la AxD es el índice que mejor diferencia sujetos sanos, sujetos con DCL y sujetos con EA¹⁷⁶. Aunque la disminución de AxD se relaciona con daño axonal parece que la trayectoria que sigue después del daño axonal es compleja y heterogénea¹⁴². Todo esto hace que los cambios en la AxD sean más difíciles de interpretar que otros índices.

No son muchos los estudios longitudinales con DTI en EA y DCL. El reciente trabajo publicado con los datos longitudinales del estudio ADNI (Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative) donde se analizan los índices de FA y MD, muestra que sujetos cognitivamente sanos y personas con EA tienen una disminución de la FA y aumento de la MD al cabo de un año en las mismas áreas, exceptuando el cíngulo hipocampal, en el cual no se observa un cambio en personas sanas pero sí en EA¹⁷⁷. Los sujetos con EA

tienen valores menores de FA y superiores de MD, en el momento basal y al cabo de un año, que los controles en el cíngulo del hipocampo, cuerpo calloso, capsula interna y externa, corona radiata, radiación talámica posterior, fascículo longitudinal inferior y superior, fascículo fronto-occipital, fórnix, fascículo uncinado y tapetum ¹⁷⁷. Estos resultados longitudinales obtenidos en sujetos con EA coinciden con los hallazgos descritos en otro trabajo reciente ¹⁷⁸. La disminución de la MD en personas con EA es especialmente notable en el cuerpo y splenium del cuerpo calloso, fascículo longitudinal superior, cíngulo derecho y la parte izquierda del fascículo longitudinal inferior ¹⁷⁹, los cuales sobre todo se centran en la parte posterior del cerebro y son áreas que ya se encuentran dañadas desde el momento de referencia ¹⁸⁰. En otro estudio longitudinal en pacientes con EA, Kitamura y colaboradores describieron una disminución de la FA y aumento de la RD en el fascículo uncinado al cabo de año y medio ¹⁸¹. Los hallazgos de Kitamura y colaboradores se confirmaron en un estudio donde se combinaron datos transversales y longitudinales ¹⁸², y demostraron que la disminución de la FA se debía a que a medida que la enfermedad avanzaba los valores de la AxD se mantenían estables mientras que los de la RD se incrementaban. Se han descrito resultados similares en pacientes con DCL donde bien transversalmente o bien longitudinalmente existen diferencias en los valores de la FA, MD y RD respecto a los controles, mientras que las diferencias en la AxD solo se encuentran transversalmente ¹⁸³. En el caso de DCL, Teipel y colaboradores demostraron la disminución de la FA en el cuerpo calloso al cabo de un año, pero comparando los cambios longitudinales entre personas sanas y DCL no encontraron ninguna diferencia significativa ¹⁸⁴. Otros estudios en cambio demostraron que los sujetos con DCL muestran un mayor incremento de la MD en el fornix que los controles, pero no encontraron ninguna diferencia entre grupos en el caso de la FA ¹⁸⁵.

En conclusión, estudios transversales y longitudinales han demostrado una disminución de la FA, y aumento de la MD y RD. En cambio existe controversia sobre la AxD y parece ser el índice más complejo para interpretar. Esta disminución y/o aumento de los índices se acentúa a medida que la enfermedad avanza, siendo menor en personas con DCL y mayor con EA. Las principales regiones afectadas en la EA se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Principales regiones de la sustancia blanca afectadas en la enfermedad de Alzheimer.

Regiones de la sustancia blanca
Cuerpo calloso
Fórnix
Fascículo longitudinal inferior
Fascículo longitudinal superior
Giro cingulado
Hipocampo
Fascículo uncinado

2.3.3.3 Microestructura de la sustancia blanca en personas con riesgo aumentado de EA

Al igual que se ha descrito la alteración de la microestructura de la SB en EA y DCL, también se ha descrito en fases presintomáticas. Un estudio reciente muestra que los valores de los índices de DTI en personas con quejas subjetivas de memoria, se encuentran entre los valores de las personas sanas y DCL. Habría alteraciones en la difusividad del cíngulo del hipocampo izquierdo en estos sujetos antes de que aparezcan disfunciones cognitivas objetivas ¹⁸⁶. También se han descrito cambios de la microestructura de la SB en asintomáticos con depósitos de β A. Algunos estudios encuentran que personas con valores anormales de amiloide tienen un incremento de la AxD en el cuerpo calloso, corona radiata, capsula interna, fascículo longitudinal superior, fornix izquierdo, fascículo uncinado izquierdo y fascículo fronto-occipital izquierdo, pero no encuentran ninguna diferencia en la FA, MD o RD ¹⁸⁷. Sugieren así que en estadios preclínicos de la enfermedad puede haber cambios axonales sutiles, aunque todavía la integridad de la SB se encuentre preservada. Otros estudios sin embargo muestran una clara afectación de la integridad de la SB en relación a los depósitos de amiloide en personas cognitivamente normales, en especial en el fornix y el fascículo uncinado ¹⁸⁸⁻¹⁹¹. Además, estos sujetos en estadios preclínicos tienen un empeoramiento más rápido de la integridad de la SB independientemente del volumen de la SB, SG y volumen hipocampal ¹⁸⁹. Estos cambios en la microestructura podrían deberse a degeneración axonal relacionada con β A pero también a la inflamación y activación microglial ³⁶. De hecho, la interacción entre neuroinflamación y β A afecta la MD del lóbulo frontal inferior, lóbulo temporal inferior derecho y giro fusiforme izquierdo ¹⁹². El nivel de p-tau en LCR correlaciona también con la microestructura de la SB en sujetos cognitivamente sanos. En concreto, valores altos de p-tau correlacionan positivamente con los cambios longitudinales de MD en múltiples tractos, especialmente en el giro del cíngulo y el hipocampo ¹⁹³. También existe una interacción entre la p-tau y la neuroinflamación asociada al incremento de FA en el giro cingulado, parte derecha de la corona radiata y

parte anterior izquierda de la capsula interna ¹⁹². El índice $\beta A/p\text{-tau}$ correlaciona con la MD del cíngulo ^{194,195} y el FA del fornix, fascículo longitudinal inferior y superior y cuerpo calloso ¹⁹⁰. El nivel de t-tau y el ratio t-tau/ βA también se relaciona con los índices de MD, AxD y RD en regiones de la SB ^{195,196}.

La alteración del índice AxD se ha relacionado con daño axonal. La pérdida axonal se correlaciona con niveles inferiores de la AxD ^{141,197}. La proteína de NfL se ha propuesto también como marcador de daño axonal ⁸⁰. Los niveles de NfL en LCR se encuentran aumentados en sujetos con DCL y esto se relaciona con los cambios en la SB de las regiones relacionadas con la cognición ⁸¹. En sujetos cognitivamente sanos los resultados de los estudios sobre la asociación entre el NfL y la microestructura de la SB son inconsistentes. Mientras que algunos estudios han descrito solo una asociación con el índice MD en los lóbulos temporal, parietal y frontales ¹⁹², otros han descrito solo una asociación positiva entre NfL y la RD en la radiación talámica posterior ⁸¹ y otros estudios no han encontrado ninguna asociación entre el NfL y la SB ¹⁹⁴.

Cada vez hay más estudios que demuestran una asociación entre ser portador del alelo $\epsilon 4$ del APOE (APOE4+) y la microestructura de la SB, aunque la naturaleza de esta asociación sigue siendo objeto de debate. Entre los estudios donde se comparan la microestructura de sujetos APOE4+ frente a los no portadores, existe un amplio consenso en que los portadores tienen una disminución de la FA en varias regiones de la SB, como el giro hipocampal, cuerpo calloso, fascículo fronto-occipital, fascículo longitudinal inferior y fórceps mayor ¹⁹⁸⁻²⁰² y un incremento de la MD, AxD y RD en varias regiones ²⁰¹⁻²⁰⁷. Además, un estudio reciente ha descrito que los portadores homocigotos de APOE $\epsilon 4$ tienen mayores índices de AxD y RD que los heterocigotos en regiones relacionadas con la cognición, y que la afectación es mayor en RD que en AxD, sugiriendo daño en la mielina más que en el propio axón ²⁰⁸. Algunos investigadores han descrito que el daño en la microestructura de la SB relacionada con el genotipo APOE se mantiene estable en el tiempo, es decir que es independiente a la edad ^{198,203,205,209}. Otros en cambio relatan que el APOE modifica el efecto que tiene la edad en la integridad de la SB y que las personas APOE4+ tienen una aceleración del daño en la microestructura a lo largo de la edad adulta ^{206,210}. Analizar la interacción entre la edad y el APOE es complicado sin un estudio longitudinal. No se puede descartar que otros factores de riesgo asociados a la EA puedan potenciar la acción del propio envejecimiento sobre la microestructura de la SB.

En resumen, los estudios demuestran que al igual que en personas con EA, las personas sin síntomas cognitivos y con riesgo aumentado de EA muestran cambios en la microestructura de la SB, principalmente en el fascículo longitudinal inferior y superior, fascículo uncinado, cuerpo caloso, fórnix, giro cingulado e hipocampo. Estos cambios podrían estar relacionados con la desmielinización o con el daño axonal, tal y como muestra el NFL.

JUSTIFICACIÓN

En la EA hay afectación de redes neuronales con intensa conectividad y elevada actividad metabólica. Estas alteraciones se han descrito también en sujetos asintomáticos con marcadores positivos. La pregunta que se plantea es si el origen de los cambios en la conectividad cerebral se encuentra en fenómenos inicialmente somático-dendríticos en la corteza o, alternativamente, en cambios axonales o mielínicos de las estructuras del “cableado” que discurren por la SB, o ambos.

La afectación de la SB en la EA ha sido reconocida en las descripciones neuropatológicas originales y en los estudios más recientes de DTI. Estos cambios de la microestructura de la SB aparecen también en personas asintomáticas con marcadores positivos, pero también en ausencia de β A. Los cambios observados en la DTI en personas asintomáticas en riesgo no se correlacionan siempre con atrofia cortical por lo que no se sustenta la interpretación de que los cambios en la microestructura de la SB sean exclusivamente secundarios a la degeneración walleriana.

Los datos aportados por la DTI no permiten discernir si los cambios en la microestructura de la SB tienen su origen en un proceso primariamente mielínico y oligodendroglial o en un fenómeno primario de la neurona por alteración de la membrana, el transporte o la estructura interna del axón. En cualquier caso, el colesterol es el principal componente de la mielina y las membranas gliales y neuronales. Además, los metabolitos oxidativos de la homeostasis cerebral del colesterol modulan las propiedades de las membranas celulares y se asocian con la gravedad de las hiperintensidades de la SB. Estos metabolitos oxidativos del colesterol podrían estar involucrados en la etiopatogenia de la EA que puede estudiarse a través de los biomarcadores.

En resumen, estudiar la posible relación existente entre la afectación de la microestructura de la SB, la homeostasis lipídica y los biomarcadores de la EA puede proporcionar un mejor conocimiento de los fenómenos fisiopatológicos que acontecen en las fases más incipientes en el cerebro con alzheimer. Este estudio en personas asintomáticas bien fenotipadas sería el contexto ideal para estudiar si el metabolismo lipídico, concretamente el metabolismo del colesterol afecta la microestructura de la SB y si estos fenómenos pueden inducir o abonar el terreno para el inicio de los fenómenos etiopatogénicos de la EA.

DESCRIPCIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es ampliar el conocimiento sobre la fisiopatología de la EA e investigar la posible interrelación existente entre tres hechos biológicos cerebrales que podrían estar involucrados en los mecanismos patológicos de la EA. Estos hechos fisiopatológicos se refieren a cambios en la homeostasis del colesterol, la microestructura de la SB y la amiloidogénesis.

En el **Capítulo 2** el objetivo es analizar si el metabolismo lipídico sistémico está involucrado con cambios en la microestructura de la SB. Se realiza un estudio transversal para analizar si la variabilidad interindividual de los niveles plasmáticos de colesterol total (CTOT), lipoproteínas de colesterol de alta densidad (HDL), lipoproteínas de colesterol de baja densidad (LDL) y triglicéridos (TG) se asocia a la variabilidad en la microestructura de la SB de las regiones relacionadas con la cognición, en sujetos sanos. La hipótesis es que los valores altos de HDL se relacionan con los valores altos de FA y AxD e inferiores de MD y RD y que por el contrario los valores altos de los TG, LDL y CTOT se asocian con niveles inferiores de FA y AxD y superiores de MD y RD. También se plantea la hipótesis de que estas asociaciones estarían influidas por el genotipo APOE, la presión arterial o el uso de las estatinas. Además, se examina también si la posible asociación entre los lípidos plasmáticos y la difusividad axial está relacionada con la pérdida axonal, medida a través de los niveles de NfL en LCR.

En el **Capítulo 3** el objetivo es entender mejor la relación entre el metabolismo del colesterol cerebral, concretamente sus oxisteroles, la microestructura de la SB y los biomarcadores de EA en LCR, especialmente en regiones relacionadas con la cognición. Este estudio se centra en los dos principales oxisteroles sintetizados enzimáticamente, 24-hidroxicolesterol (24-OHC) y 27-hidroxicolesterol (27-OHC); y en otros dos sintetizados no-enzimáticamente en condiciones de estrés oxidativo, 7 β -hidroxicolesterol (7 β -OHC) y 7-cetocolesterol (7-KC). Para ello se realiza primero un estudio transversal para determinar si los metabolitos del colesterol afectan a la microestructura de la SB y si se asocian a los niveles de β A₁₋₄₂, t-tau y p-tau en LCR. Después se investiga si los niveles basales de los metabolitos del colesterol y los índices de difusión en la resonancia magnética determinan posibles cambios longitudinales de los biomarcadores de EA. La hipótesis es que la variabilidad interindividual de los niveles de los oxisteroles en LCR se relaciona con los cambios en los índices de la DTI y se asocia a niveles inferiores de

βA_{1-42} y/o superiores de t-tau o p-tau. Además, para investigar el posible papel de la inflamación y el daño axonal, también se han estudiado biomarcadores como el YKL-40 y NfL.

Con el objetivo futuro de analizar las posibles diferencias en los patrones lipidómicos en el LCR entre pacientes con DCL y personas sanas, en el **Capítulo 4** se comparan dos métodos de preparación de muestras para el análisis de lípidos en LCR mediante cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas (UHPLC-MS). Uno es un método de precipitación de proteínas que utiliza el isopropanol (IPA) como disolvente orgánico y el otro es una extracción líquido-líquido de lípidos con una mezcla de cloroformo-metanol ($CHCl_3$ -MeOH). Mediante un conjunto de criterios de simplicidad, cobertura lipídica, reproducibilidad y recuperación, el objetivo de este estudio es identificar cuál de estos dos métodos es el más robusto y eficiente para utilizar el LCR en la elaboración de perfiles de lípidos a gran escala en trastornos neurológicos. Como resultado de este trabajo se han aportado datos sobre el perfil lipidómico del LCR de individuos sanos.

El último capítulo de esta tesis, **Capítulo 5**, es la discusión general, donde se resumen todos los hallazgos y se discuten las implicaciones de los resultados y las posibles investigaciones futuras.

COHORTE DE ESTUDIO

Los participantes en el presente proyecto de investigación forman parte de la cohorte del Proyecto Gipuzkoa Alzheimer (PGA). El PGA es un estudio longitudinal, sobre personas voluntarias sanas sin demencia. El objetivo principal del estudio PGA es caracterizar la EA en fases preclínica y prodrómica, y aportar conocimiento dirigido a mejorar el diagnóstico precoz y temprano de la EA, así como contribuir a sentar las bases para el diseño y puesta en marcha de estudios y programas sobre la prevención de la enfermedad.

El estudio PGA se puso en marcha por la Fundación CITA-Alzheimer Fundazioa en el año 2010. Entre mayo de 2011 y diciembre de 2012, se llevaron a cabo las visitas basales. La primera visita de seguimiento se realizó entre mayo de 2014 y junio de 2015.

El protocolo del estudio PGA fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Área Sanitaria de Gipuzkoa el 20 de octubre de 2010.

Los criterios de inclusión y exclusión para participar en el PGA se detallan a continuación:

Criterios de inclusión

- Hombres y mujeres sin demencia con edades comprendidas entre 40 y 80 años, inclusive.
- Firma de los correspondientes consentimientos informados del estudio y los específicos para la recogida y almacenamiento de muestras biológicas y genéticas, y para resonancia magnética y punción lumbar.
- Disponibilidad de una persona acompañante/informadora.

Criterios de exclusión

- Demencia leve, moderada o grave de acuerdo con los criterios DSM-IV y estadio CDR ≥ 1 .
- Antecedentes significativos de enfermedad neurológica de cualquier naturaleza que pudiera ser causa de deterioro cognitivo-demencia. El antecedente de ictus sintomático que no haya dejado secuelas cognitivas significativas (afasia, por ejemplo) no es criterio de exclusión.

-Antecedentes de enfermedad psiquiátrica diagnosticada que pudiera ser causa de deterioro cognitivo y/o demencia. No se excluyeron personas con ánimo bajo y síntomas leves de ansiedad que no constituyeran un diagnóstico específico.

-Enfermedad sistémica grave o no controlada que pueda ser causa de deterioro cognitivo y/o demencia o pueda limitar la participación en el seguimiento longitudinal del estudio.

-Limitación sensorial, ceguera o sordera grave, cualquier otra limitación significativa (afasia grave, ansiedad excesiva, falta de fluencia/comprensión suficiente en euskera o castellano) para la administración de las pruebas cognitivas.

-Contraindicación para la resonancia magnética: marcapasos, otras prótesis metálicas, metralla, claustrofobia, tatuajes extensos.

-Negativa a la firma de los consentimientos informados.

La punción lumbar y donación de LCR fue voluntaria en la visita basal y en la primera visita de seguimiento. La negativa a dar consentimiento informado para la punción lumbar no fue criterio de exclusión.

En la visita basal se reclutaron 542 sujetos de los cuales 408 cumplieron con todos los criterios. 218 sujetos dieron su consentimiento para la realización de la punción lumbar en la visita basal y de estos 218, 180 volvieron a dar el consentimiento para la donación del LCR en la primera visita de seguimiento.

Dado que el presente trabajo cuenta con diferentes apartados, en cada capítulo se describen los criterios de inclusión y exclusión oportunos aplicados en cada caso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cummings JL, Cole G. Alzheimer Disease. *JAMA* 2002;287(18):2335.
2. Dubois B, Hampel H, Feldman HH, et al. Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Preclin. State AD* 2016;12(3):292–323.
3. 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 NIH Public Access Author Manuscript. *Alzheimers Dement* 2011;7(3):280–292.
4. Albert MS, Dekosky ST, Dickson D, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011;7(3):270–279.
5. Alzheimer's Association. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers. Dement.* 2016;12(4):459–509.
6. Helzner EP, Luchsinger JA, Scarmeas N, et al. Contribution of Vascular Risk Factors to the Progression in Alzheimer Disease. *Arch. Neurol.* 2009;66(3):343–8.
7. Kivipelto M, Solomon A. Preventive neurology: On the way from knowledge to action. *Neurology* 2009;73(3):168–169.
8. Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009;10(5):333–344.
9. Marin R, Fabelo N, Fernández-Echevarría C, et al. Lipid Raft Alterations in Aged-Associated Neuropathologies. *Curr. Alzheimer Res.* 2016;13(9):973–984.
10. Wang C, Shou Y, Pan J, et al. The relationship between cholesterol level and Alzheimer's disease-associated APP proteolysis/A β metabolism. *Nutr. Neurosci.* 2018;11:1–11.
11. Englund E, Brun A, Alling C. White matter changes in dementia of alzheimer's type. *Brain* 1988;111(6):1425–1439.
12. Acosta-Cabronero J, Nestor PJ. Diffusion tensor imaging in Alzheimer's disease: insights into the limbic-diencephalic network and methodological considerations. *Front. Aging Neurosci.* 2014;6:266.
13. Warstadt NM, Dennis EL, Jahanshad N, et al. Serum Cholesterol and Variant in Cholesterol-Related Gene CETP Predict White Matter Microstructure and for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) *. *Neurobiol Aging* 2014;35(11):2504–2513.
14. Williams VJ, Leritz EC, Shepel J, et al. Interindividual variation in serum cholesterol is associated with regional white matter tissue integrity in older adults. *Hum Brain Mapp* 2013;34(8):1826–1841.
15. 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 Dement.* 2012;8(1):1–13.
16. Caballero MÁA, Suárez-Calvet M, Duering M, et al. White matter diffusion alterations precede symptom onset in autosomal dominant Alzheimer's disease. *Brain* 2018;141(10):3065–3080.

17. Mann DM, Marcyniuk B, Yates PO, et al. The progression of the pathological changes of Alzheimer's disease in frontal and temporal neocortex examined both at biopsy and at autopsy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1988;14(3):177–95.
18. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2011;1(1):a006189–a006189.
19. Querfurth HW, Laferla FM. Alzheimer's Disease. 2010;9:329–344.
20. Serrano-Pozo A, Qian J, Muzikansky A, et al. Thal Amyloid Stages Do Not Significantly Impact the Correlation Between Neuropathological Change and Cognition in the Alzheimer Disease Continuum. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2016;75(6):516–526.
21. Leon MJ De, Braak H. An Atlas of Alzheimer's disease. New York : 1999.
22. Selkoe DJ. Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. *Science.* 2002;298(5594):789–791.
23. Nasrabady SE, Rizvi B, Goldman JE, Brickman AM. White matter changes in Alzheimer's disease: a focus on myelin and oligodendrocytes. *Acta Neuropathol. Commun.* 2018;6(1):22.
24. Hardy J, Higgins G. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992;256(5054):184–185.
25. Tharp WG, Sarkar I. Origins of amyloid- β . *BMC Genomics* 2013;14(1):290.
26. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the Road to Therapeutics. *Science.* 2002;297(5580):353–356.
27. Vassar R. BACE1: The β -Secretase enzyme in Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* 2004;23(1–2):105–114.
28. Vassar R. ADAM10 Prodomain mutations cause late-onset Alzheimer's disease: not just the latest FAD. *Neuron* 2013;80(2):250–253.
29. Takami M, Nagashima Y, Sano Y, et al. GammasSecretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. *J. Neurosci.* 2009;29(41):13042–13052.
30. Coughlan CM, Breen KC. Factors influencing the processing and function of the amyloid beta precursor protein--a potential therapeutic target in Alzheimer's disease? *Pharmacol. Ther.* 2000;86(2):111–45.
31. Hamley IW. The amyloid beta peptide: a chemist's perspective. Role in Alzheimer's and fibrillization. *Chem. Rev.* 2012;112(10):5147–5192.
32. Stomrud E, Minthon L, Zetterberg H, et al. Longitudinal cerebrospinal fluid biomarker measurements in preclinical sporadic Alzheimer's disease: A prospective 9-year study. *Alzheimer's Dement. Diagnosis, Assess. Dis. Monit.* 2015;1(4):403–411.
33. Herrup K. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat. Neurosci.* 2015;18(6):794–799.
34. Guglielmotto M, Giliberto L, Tamagno E, Tabaton M. Oxidative stress mediates the pathogenic effect of different Alzheimer's disease risk factors. *Front. Aging Neurosci.* 2010;2:3.
35. Marques-Aleixo I, Oliveira PJ, Moreira PI, et al. Physical exercise as a possible strategy for brain protection: Evidence from mitochondrial-mediated mechanisms. *Prog. Neurobiol.* 2012;99(2):149–162.

36. Krstic D, Knuesel I. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 2013;9(1):25–34.
37. Blennow K, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer’s disease. *J. Alzheimer’s Dis.* 2009;18(2):413–417.
38. Price JL, Morris JC. Tangles and plaques in nondemented aging and “preclinical” Alzheimer’s disease. *Ann. Neurol.* 1999;45(3):358–68.
39. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, et al. NIA-AA research framework: toward a biological definition of Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Dement.* 2018;14(4):535–562.
40. Dong HK, Gim J-A, Yeo SH, Kim H-S. Integrated late onset Alzheimer’s disease (LOAD) susceptibility genes: Cholesterol metabolism and trafficking perspectives. *Gene* 2017;597:10–16.
41. Le Bastard N, Coart E, Vanderstichele H, et al. Comparison of two analytical platforms for the clinical qualification of Alzheimer’s disease biomarkers in pathologically-confirmed dementia. *J. Alzheimer’s Dis.* 2012;33(1):117–131.
42. Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka S-K, et al. Cerebrospinal fluid β -amyloid 42 and Tau proteins as biomarkers of alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch. Neurol.* 2009;66(3):382–9.
43. Villemagne VL, Chetelat G. Neuroimaging biomarkers in Alzheimer’s disease and other dementias. *Ageing Res.Rev.* 2016;30:4–16.
44. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer’s disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol.* 2007;6(8):734–746.
45. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer’s disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol.* 2014;13(6):614–629.
46. Koyama A, Okereke OI, Yang T, et al. Plasma amyloid-beta as a predictor of dementia and cognitive decline: a systematic review and meta-analysis. *Arch.Neurol.* 2012;69(7):824–831.
47. Bendlin BB, Zetterberg H. Screening with a high-precision blood-based assay for Alzheimer disease. *Neurology* 2019;93(17):737–738.
48. Schneider JA, Aggarwal NT, Barnes L, et al. The neuropathology of older persons with and without dementia from community versus clinic cohorts. *J. Alzheimer’s Dis.* 2009;18(3):691–701.
49. Villemagne VL, Pike KE, Chetelat G, et al. Longitudinal assessment of Abeta and cognition in aging and Alzheimer disease. *Ann.Neurol.* 2011;69(1):181–192.
50. Arbizu J, Garcia-Ribas G, Carrio I, et al. Recommendations for the use of PET imaging biomarkers in the diagnosis of neurodegenerative conditions associated with dementia: SEMNIM and SEN consensus. *Rev.Esp.Med.Nucl.Imagen.Mol.* 2015;34(5):303–313.
51. Ikonovic MD, Klunk WE, Abrahamson EE, et al. Post-mortem correlates of in vivo PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer’s disease. *Brain* 2008;131:1630–1645.
52. Rinne JO, Wong DF, Wolk DA, et al. [(18)F]Flutemetamol PET imaging and cortical biopsy histopathology for fibrillar amyloid beta detection in living subjects with normal pressure hydrocephalus: pooled analysis of four studies. *Acta Neuropathol.* 2012;124(6):833–845.
53. Alcolea D, Martinez-Lage P, Sanchez-Juan P, et al. Amyloid precursor protein metabolism and inflammation markers in preclinical Alzheimer disease. *Neurology* 2015;85(7):626–633.
54. Duits FH, Martinez-Lage P, Paquet C, et al. Performance and complications of lumbar puncture in

- memory clinics: Results of the multicenter lumbar puncture feasibility study. *Alzheimers.Dement.* 2016;12(2):154–163.
55. Le Bastard N, Coart E, Vanderstichele H, et al. Comparison of two analytical platforms for the clinical qualification of Alzheimer's disease biomarkers in pathologically-confirmed dementia. *J.Alzheimers.Dis.* 2013;33(1):117–131.
56. Lleo A, Cavado E, Parnetti L, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in trials for Alzheimer and Parkinson diseases. *Nat.Rev.Neurol.* 2015;11(1):41–55.
57. Palmqvist S, Zetterberg H, Blennow K, et al. Accuracy of brain amyloid detection in clinical practice using cerebrospinal fluid beta-amyloid 42: a cross-validation study against amyloid positron emission tomography. *JAMA Neurol.* 2014;71(10):1282–1289.
58. Mattsson N, Andreasson U, Persson S, et al. CSF biomarker variability in the Alzheimer's Association quality control program. *Alzheimer's Dement.* 2013;9(3):251–261.
59. Hulstaert F, Blennow K, Ivanoiu A, et al. Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology* 1999;52(8):1555–62.
60. Sjögren M, Vanderstichele H, Agren H, et al. Tau and Abeta42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21-93 years of age: establishment of reference values. *Clin. Chem.* 2001;47(10):1776–81.
61. Jack CR. Update on hypothetical model of Alzheimer's disease biomarkers. *Lancet Neurol.* 2013;12(2):207–216.
62. Counts SE, Ikonovic MD, Mercado N, et al. Biomarkers for the early detection and progression of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics.* 2017;14(1):35-53.
63. Chhatwal JP, Schultz AP, Marshall GA, et al. Temporal T807 binding correlates with CSF tau and phospho-tau in normal elderly. *Neurology* 2016;87(9):920–926.
64. Olsson B, Lautner R, Andreasson U, et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2016;15(7):673–684.
65. Hampel H, Buerger K, Zinkowski R, et al. Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study. *Arch. Gen. Psychiatry* 2004;61(1):95–102.
66. Lavados M, Farias G, Rothhammer F, et al. ApoE alleles and tau markers in patients with different levels of cognitive impairment. *Arch.Med.Res.* 2005;36(5):474–479.
67. Hampel H, Blennow K, Shaw LM, et al. Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp.Gerontol.* 2010;45(1):30–40.
68. Vos SJB, Gordon BA, Su Y, et al. NIA-AA staging of preclinical Alzheimer disease: Discordance and concordance of CSF and imaging biomarkers. *Neurobiol. Aging* 2016;44:1–8.
69. Gordon BA, Friedrichsen K, Brier M, et al. The relationship between cerebrospinal fluid markers of Alzheimer pathology and positron emission tomography tau imaging. *Brain* 2016;139(8):2249–2260.
70. Hesse C, Rosengren L, Andreasen N, et al. Transient increase in total tau but not phospho-tau in human cerebrospinal fluid after acute stroke. *Neurosci. Lett.* 2001;297(3):187–90.
71. Öst M, Nylén K, Csajbok L, et al. Initial CSF total tau correlates with 1-year outcome in patients with traumatic brain injury. *Neurology* 2006;67(9):1600–1604.

72. T. S, C. R, F. A, et al. Diagnostic performance of cerebrospinal fluid total tau and phosphorylated tau in Creutzfeldt-Jakob disease: Results from the Swedish Mortality Registry. *JAMA Neurol.* 2014;71(4):476–483.
73. Buerger K, Otto M, Teipel SJ, et al. Dissociation between CSF total tau and tau protein phosphorylated at threonine 231 in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol. Aging* 2006;27(1):10–15.
74. Scheltens P, Leys D, Barkhof F, et al. Atrophy of medial temporal lobes on MRI in “probable” Alzheimer’s disease and normal ageing: diagnostic value and neuropsychological correlates. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 1992;55(10):967–972.
75. Frisoni GB, Scheltens P, Galluzzi S, et al. Neuroimaging tools to rate regional atrophy, subcortical cerebrovascular disease, and regional cerebral blood flow and metabolism: consensus paper of the EADC. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 2003;74(10):1371–1381.
76. Frisoni GB, Fox NC, Jack Jr. CR, et al. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat.Rev.Neurol.* 2010;6(2):67–77.
77. Arbizu J, Prieto E, Martinez-Lage P, et al. Automated analysis of FDG PET as a tool for single-subject probabilistic prediction and detection of Alzheimer’s disease dementia. *Eur.J.Nucl.Med.Mol.Imaging* 2013;40(9):1394–1405.
78. Zetterberg H, Skillbäck T, Mattsson N, et al. Association of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Concentration With Alzheimer Disease Progression HHS Public Access. *JAMA Neurol* 2016;73(1):60–67.
79. Lleó A, Alcolea D, Martínez-Lage P, et al. Longitudinal cerebrospinal fluid biomarker trajectories along the Alzheimer’s disease continuum in the BIOMARKAPD study. *Alzheimer’s Dement.* 2019;15(6):742–753.
80. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 2018;14(10):577–589.
81. Moore EE, Hohman TJ, Badami FS, et al. Neurofilament relates to white matter microstructure in older adults. *Neurobiol. Aging* 2018;70:233–241.
82. Antonell A, Mansilla A, Rami L, et al. Cerebrospinal fluid level of YKL-40 protein in preclinical and prodromal Alzheimer’s disease. *J. Alzheimer’s Dis.* 2014;42(3):901–908.
83. Otaegui-Arrazola A, Amiano P, Elbusto A, et al. Diet, cognition, and Alzheimer’s disease: food for thought. *Eur. J. Nutr.* 2014;53(1):1–23.
84. Solomon A, Kivipelto M, Soininen H. Prevention of Alzheimer’s disease: Moving backward through the lifespan. *J. Alzheimer’s Dis.* 2012;33(s1):S465–S469.
85. Loy CT, Schofield PR, Turner AM, Kwok JB. Genetics of dementia. *Lancet* 2014;383(9919):828–840.
86. Green RC, Cupples LA, Go R, et al. Risk of dementia among white and african american relatives of patients with Alzheimer disease. *JAMA* 2002;287(3):329.
87. de Bruijn RF, Ikram MA. Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer’s disease. *BMC Med.* 2014;12(1):130.
88. Duron E, Hanon O. Vascular risk factors, cognitve decline, and dementia. *Vasc. Health Risk Mang.*

- 2008;4(2):363-81.
89. Anstey KJ, Cherbuin N, Budge M, Young J. Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. *Obes. Rev.* 2011;12(5):e426–e437.
 90. Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, et al. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 2005;62(10):1556–60.
 91. Hasnain M, Vieweg WVR. Possible role of vascular risk factors in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Curr. Pharm. Des.* 2014;20(38):6007–13.
 92. Xu W, Tan L, Wang H-F, et al. Meta-analysis of modifiable risk factors for Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2015;86(12):1299-306.
 93. Kulmala J, Solomon A, Kåreholt I, et al. Association between mid- to late life physical fitness and dementia: evidence from the CAIDE study. *J. Intern. Med.* 2014;276(3):296–307.
 94. Barberger-Gateau P, Raffaitin C, Letenneur L, et al. Dietary patterns and risk of dementia: The Three-City cohort study. *Neurology* 2007;69(20):1921–1930.
 95. Kivipelto M, Ngandu T, Laatikainen T, et al. Risk score for the prediction of dementia risk in 20 years among middle aged people: a longitudinal, population-based study. *Lancet Neurol.* 2006;5(9):735–741.
 96. Anstey KJ, Ashby-Mitchell K, Peters R. Updating the evidence on the association between serum cholesterol and risk of late-life dementia: review and meta-analysis. *J.Alzheimers.Dis.* 2017;56(1):215–228.
 97. Giudetti AM, Romano A, Lavecchia AM, Gaetani S. The role of brain cholesterol and its oxidized products in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2016;13(2):198–205.
 98. Van Der Kant R, Langness VF, Herrera CM, et al. Cholesterol metabolism is a druggable axis that independently regulates Tau and Amyloid- β in iPSC-derived Alzheimer's disease neurons. *Cell Stem Cell* 2018;24:363-375.
 99. Barrett PJ, Song Y, Van Horn WD, et al. The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science.* 2012;336(6085):1168–1171.
 100. Wood WG, Li L, Müller WE, Eckert GP. Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *J. Neurochem.* 2014;129(4):559–572.
 101. Miners JS, Baig S, Palmer J, et al. Clearance of A β from the brain in Alzheimer's disease: A β -degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2008;18(2):240–252.
 102. Barbero-Camps E, Roca-Agüetas V, Bartolessis I, et al. Cholesterol impairs autophagy-mediated clearance of amyloid beta while promoting its secretion. *Autophagy* 2018;14(7):1129–1154.
 103. Zhang J, Liu Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell* 2015;6(4):254–264.
 104. Gamba P, Testa G, Gargiulo S, et al. Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 2015;7:119.
 105. Zarrouk A, Debbabi M, Bezine M, et al. Lipid biomarkers in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2018;15(4):303–312.
 106. Testa G, Staurengi E, Giannelli S, et al. A silver lining for 24-hydroxycholesterol in Alzheimer's disease: The involvement of the neuroprotective enzyme sirtuin 1. *Redox Biol.* 2018;17:423–431.

107. Testa G, Rossin D, Poli G, et al. Implication of oxysterols in chronic inflammatory human diseases. *Biochimie* 2018;153:220–231.
108. Conner AK, Briggs RG, Rahimi M, et al. A connectomic atlas of the human cerebrum—Chapter 10: Tractographic description of the superior longitudinal fasciculus. *Oper. Neurosurg.* 2018;15:S407–S422.
109. Sali G, Briggs R, Conner A, et al. A connectomic atlas of the human cerebrum cerebrum—Chapter 11: Tractographic description of the inferior longitudinal fasciculus. *Oper. Neurosurg.* 2018;1(15):423–428.
110. Briggs RG, Conner AK, Sali G, et al. A connectomic atlas of the human cerebrum—Chapter 17: Tractographic description of the cingulum. *Oper. Neurosurg.* 2018;15(1):S462–S469.
111. Briggs RG, Rahimi M, Conner AK, et al. A connectomic atlas of the human cerebrum—Chapter 15: Tractographic description of the uncinate fasciculus. *Oper. Neurosurg.* 2018;15(1):S450–S455.
112. Fabri M, Pierpaoli C, Barbaresi P, Polonara G. Functional topography of the corpus callosum investigated by DTI and fMRI. *World J Radiol* 2014;6(12):895–906.
113. Postans M, Parker GD, Lundell H, et al. Uncovering a role for the dorsal hippocampal commissure in recognition memory. *Cereb. Cortex* 2019. doi:10.1093/cercor/bhz143.
114. Amaral RSC, Park MTM, Devenyi GA, et al. Manual segmentation of the fornix, fimbria, and alveus on high-resolution 3T MRI: Application via fully-automated mapping of the human memory circuit white and grey matter in healthy and pathological aging. *Neuroimage* 2018;170:132–150.
115. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer’s disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol.* 2013;12(2):207–216.
116. Wu L, Soder RB, Schoemaker D, et al. Resting state executive control network adaptations in amnesic mild cognitive impairment. *J. Alzheimer’s Dis.* 2014;40(4):993–1004.
117. Raichle ME. The brain’s default mode network. *Annu. Rev. Neurosci.* 2015;38(1):433–447.
118. Caroli A, Prestia A, Chen K, et al. Summary metrics to assess Alzheimer disease-related hypometabolic pattern with 18F-FDG PET: Head-to-head comparison. *J. Nucl. Med.* 2012;53(4):592–600.
119. Minoshima S, Giordani B, Berent S, et al. Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer’s disease. *Ann. Neurol.* 1997;42(1):85–94.
120. Celone KA, Calhoun VD, Dickerson BC, et al. Alterations in memory networks in mild cognitive impairment and Alzheimer’s disease: an independent component analysis. *J. Neurosci.* 2006;26(40):10222–10231.
121. Buckner RL, Snyder AZ, Shannon BJ, et al. Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer’s disease: Evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory. *J. Neurosci.* 2005;25(34):7709–7717.
122. Hedden T, Van Dijk KRA, Becker JA, et al. Disruption of functional connectivity in clinically normal older adults harboring amyloid burden. *J. Neurosci.* 2009;29(40):12686–12694.
123. Sheline YI, Raichle ME, Snyder AZ, et al. Amyloid plaques disrupt resting state default mode network connectivity in cognitively normal elderly. *Biol. Psychiatry* 2010;67(6):584–587.

124. Tijms BM, Kate M ten, Wink AM, et al. Gray matter network disruptions and amyloid beta in cognitively normal adults. *Neurobiol. Aging* 2016;37:154–160.
125. Wang L, Brier MR, Snyder AZ, et al. Cerebrospinal fluid amyloid β 42 , phosphorylated tau 181 , and resting state functional connectivity. *JAMA Neurol* 2013;70(10):1242–1248.
126. Brier MR, Thomas JB, Ances BM. Network dysfunction in Alzheimer’s disease: refining the disconnection hypothesis. *Brain Connect.* 2014;4(5):299–311.
127. Sheline YI, Morris JC, Snyder AZ, et al. APOE4 allele disrupts resting state fMRI connectivity in the absence of amyloid plaques or decreased CSF A β 42. *J. Neurosci.* 2010;30(50):17035–17040.
128. Machulda MM, Jones DT, Vemuri P, et al. Effect of APOE ϵ 4 status on intrinsic network connectivity in cognitively normal elderly subjects. *Arch. Neurol.* 2011;68(9):1131.
129. Filippini N, MacIntosh BJ, Hough MG, et al. Distinct patterns of brain activity in young carriers of the *APOE* - ϵ 4 allele. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009;106(17):7209–7214.
130. Shine JP, Hodgetts CJ, Postans M, et al. APOE- ϵ 4 selectively modulates posteromedial cortex activity during scene perception and short-term memory in young healthy adults. *Sci. Rep.* 2015;5(1):16322.
131. Brier MR, Thomas JB, Snyder AZ, et al. Loss of intranetwork and internetwork resting state functional connections with Alzheimer’s disease progression. *J. Neurosci.* 2012;32(26):8890–8899.
132. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 2002;58(12):1791–800.
133. Sepulcre J, Sabuncu MR, Becker A, et al. In vivo characterization of the early states of the amyloid-beta network. *Brain* 2013;136(7):2239–2252.
134. Brown CA, Jiang Y, Smith CD, Gold BT. Age and Alzheimer’s pathology disrupt default mode network functioning via alterations in white matter microstructure but not hyperintensities. *Cortex* 2018;104:58–74.
135. Tournier J-D, Mori S, Leemans A, Morgan RH. Diffusion tensor imaging and beyond. *Magn. Reson. Med.* 2011;65(6):1532–1556.
136. Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Field AS. Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics* 2007;4(3):316–329.
137. Shimony JS, McKinstry RC, Akbudak E, et al. Quantitative diffusion-tensor anisotropy brain MR imaging: Normative human data and anatomic analysis. *Radiology* 1999;212(3):770–784.
138. Gold BT, Johnson NF, Powell DK, Smith CD. White matter integrity and vulnerability to Alzheimer’s disease: Preliminary findings and future directions. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2012;1822(3):416–422.
139. Pierpaoli C, Basser PJ. Toward a quantitative assessment of diffusion anisotropy. *Magn. Reson. Med.* 1996;36(6):893–906.
140. Thomason ME, Thompson PM. Diffusion imaging, white matter, and psychopathology. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 2011;7(1):63–85.
141. Song S-K, Yoshino J, Le TQ, et al. Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain. *Neuroimage* 2005;26(1):132–140.

142. Concha L, Gross DW, Wheatley BM, Beaulieu C. Diffusion tensor imaging of time-dependent axonal and myelin degradation after corpus callosotomy in epilepsy patients. *Neuroimage* 2006;32(3):1090–1099.
143. Borghesani PR, Madhyastha TM, Aylward EH, et al. The association between higher order abilities, processing speed, and age are variably mediated by white matter integrity during typical aging. *Neuropsychologia* 2013;51(8):1435–44.
144. Madden DJ, Spaniol J, Costello MC, et al. Cerebral white matter integrity mediates adult age differences in cognitive performance. *J Cogn Neurosci* 2009;21(2):289–302.
145. Salami A, Eriksson J, Nilsson L-G, Nyberg L. Age-related white matter microstructural differences partly mediate age-related decline in processing speed but not cognition. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2012;1822(3):408–415.
146. Booth T, Bastin ME, Penke L, et al. Brain white matter tract integrity and cognitive abilities in community-dwelling older people: The Lothian birth cohort, 1936. *Neuropsychology* 2013;27(5):595–607.
147. Cremers LGM, de Groot M, Hofman A, et al. Altered tract-specific white matter microstructure is related to poorer cognitive performance: The Rotterdam Study. *Neurobiol. Aging* 2016;39:108–117.
148. Jiang J, Paradise M, Liu T, et al. The association of regional white matter lesions with cognition in a community-based cohort of older individuals. *NeuroImage Clin.* 2018;19:14–21.
149. Davis SW, Dennis NA, Buchler NG, et al. Assessing the effects of age on long white matter tracts using diffusion tensor tractography. *Neuroimage* 2009;46(2):540–541.
150. Mayo CD, Garcia-Barrera MA, Mazerolle EL, et al. Relationship between DTI metrics and cognitive function in Alzheimer’s disease. *Front. Aging Neurosci.* 2019;11:436.
151. Zhuang L, Sachdev PS, Trollor JN, et al. Microstructural white matter changes, not hippocampal atrophy, detect early amnesic mild cognitive impairment. *PLoS One* 2013;8(3):e58887.
152. Power MC, Su D, Wu A, et al. Association of white matter microstructural integrity with cognition and dementia. *Neurobiol. Aging* 2019;83:63–72.
153. Kantarci K, Murray ME, Schwarz CG, et al. White matter integrity on DTI and the pathologic staging of Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging* 2017;56:172–179.
154. Salat DH, Tuch DS, van der Kouwe AJW, et al. White matter pathology isolates the hippocampal formation in Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Aging* 2010;31(2):244–256.
155. Bosch B, Arenaza-Urquijo EM, Rami L, et al. Multiple DTI index analysis in normal aging, amnesic MCI and AD. Relationship with neuropsychological performance. *Neurobiol. Aging* 2012;33(1):61–74.
156. Agosta F, Pievani M, Sala S, et al. White matter damage in Alzheimer disease and its relationship to gray matter atrophy. *Radiology* 2011;258(3):853–863.
157. Bartzokis G, Lu PH, Mintz J. Human brain myelination and amyloid beta deposition in Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Dement.* 2007;3(2):122–125.
158. Bartzokis G. Alzheimer’s disease as homeostatic responses to age-related myelin breakdown. *Neurobiol. Aging* 2011;32(8):1341–1371.

159. Stricker NH, Schweinsburg BC, Delano-Wood L, et al. Decreased white matter integrity in late-myelinating fiber pathways in Alzheimer's disease supports retrogenesis. *Neuroimage*. 2009;1(451):10–16.
160. Benitez A, Fieremans E, Jensen JH, et al. White matter tract integrity metrics reflect the vulnerability of late-myelinating tracts in Alzheimer's disease. *NeuroImage Clin*. 2014;4:64–71.
161. Brickman AM, Meier IB, Korgaonkar MS, et al. Testing the white matter retrogenesis hypothesis of cognitive aging. *Neurobiol Aging* 2012;33(8):1699–1715.
162. Sexton CE, Kalu UG, Filippini N, et al. A meta-analysis of diffusion tensor imaging in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2011;32(12):2322.e5-18.
163. Gerstenecker A, Hoagey DA, Marson DC, Kennedy KM. White matter degradation is associated with reduced financial capacity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis*. 2017;60(2):537–547.
164. Kumar A, Singh S, Verma A, Mishra VN. Proteomics based identification of differential plasma proteins and changes in white matter integrity as markers in early detection of mild cognitive impaired subjects at high risk of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett*. 2018;676:71–77.
165. Li K-C, Luo X, Zeng Q-Z, et al. Distinct patterns of interhemispheric connectivity in patients with early- and late-onset Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci*. 2018;10:261.
166. Li Y, Feng F, Lin P, et al. Cognition-related white matter integrity dysfunction in Alzheimer's disease with diffusion tensor image. *Brain Res. Bull*. 2018;143:207–216.
167. Douaud G, Jbabdi S, Behrens TEJ, et al. DTI measures in crossing-fibre areas: Increased diffusion anisotropy reveals early white matter alteration in MCI and mild Alzheimer's disease. *Neuroimage* 2011;55(3):880–890.
168. Liu Y, Spulber G, Lehtimäki KK, et al. Diffusion tensor imaging and Tract-Based Spatial Statistics in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* 2011;32(9):1558–1571.
169. Serra L, Cercignani M, Lenzi D, et al. Grey and white matter changes at different stages of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis*. 2010;19(1):147–159.
170. Madhavan A, Schwarz CG, Duffy JR, et al. Characterizing white matter tract degeneration in syndromic variants of Alzheimer's disease: A diffusion tensor imaging study. *J. Alzheimer's Dis*. 2015;49(3):633–643.
171. Hirni DI, Kivisaari SL, Monsch AU, Taylor KI. Distinct neuroanatomical bases of episodic and semantic memory performance in Alzheimer's disease. *Neuropsychologia* 2013;51(5):930–937.
172. Sjöbeck M, Elfgrén C, Larsson E-M, et al. Alzheimer's disease (AD) and executive dysfunction. A case-control study on the significance of frontal white matter changes detected by diffusion tensor imaging (DTI). *Arch. Gerontol. Geriatr*. 2010;50(3):260–266.
173. Sasson E, Doniger GM, Pasternak O, et al. White matter correlates of cognitive domains in normal aging with diffusion tensor imaging. *Front. Neurosci*. 2013;7:32.
174. Huang J, Friedland RP, Auchus AP. Diffusion tensor imaging of normal-appearing white matter in mild cognitive impairment and early Alzheimer disease: Preliminary evidence of axonal degeneration in the temporal lobe. *Am. J. Neuroradiol*. 2007;28(10):1943–1948.
175. Zhang Y, Schuff N, Camacho M, et al. MRI markers for mild cognitive impairment: Comparisons

- between white matter integrity and gray matter volume measurements. *PLoS One* 2013;8(6):e66367.
176. Giulietti G, Torso M, Serra L, et al. Whole brain white matter histogram analysis of diffusion tensor imaging data detects microstructural damage in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease patients. *J. Magn. Reson. Imaging* 2018;48(3):767–779.
177. Mayo CD, Mazerolle EL, Ritchie L, et al. Longitudinal changes in microstructural white matter metrics in Alzheimer's disease. *NeuroImage Clin.* 2017;13:330–338.
178. Firbank MJ, Watson R, Mak E, et al. Longitudinal diffusion tensor imaging in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2016;24:76–80.
179. Weiler M, Agosta F, Canu E, et al. Following the spreading of brain structural changes in Alzheimer's disease: A longitudinal, multimodal MRI study. *J. Alzheimer's Dis.* 2015;47(4):995–1007.
180. Elahi FM, Marx G, Cobigo Y, et al. Longitudinal white matter change in frontotemporal dementia subtypes and sporadic late onset Alzheimer's disease. *NeuroImage Clin.* 2017;16:595–603.
181. Kitamura S, Kiuchi K, Taoka T, et al. Longitudinal white matter changes in Alzheimer's disease: A tractography-based analysis study. *Brain Res.* 2013;1515:12–18.
182. Acosta-Cabronero J, Alley S, Williams GB, et al. Diffusion tensor metrics as biomarkers in Alzheimer's disease. *PLoS One* 2012;7(11):e49072.
183. Amlien IK, Fjell AM, Walhovd KB, et al. Mild cognitive impairment: Cerebrospinal fluid tau biomarker pathologic levels and longitudinal changes in white matter integrity. *Radiology* 2013;266(1):295–303.
184. Teipel SJ, Meindl T, Wagner M, et al. Longitudinal changes in fiber tract integrity in healthy aging and mild cognitive impairment: A DTI follow-up study. *J. Alzheimer's Dis.* 2010;22(2):507–522.
185. Mielke MM, Bandaru VVR, McArthur JC, et al. Disturbance in cerebral spinal fluid sphingolipid content is associated with memory impairment in subjects infected with the human immunodeficiency virus. *J. Neurovirol.* 2010;16(6):445–456.
186. Shao W, Li X, Zhang J, et al. White matter integrity disruption in the prodementia stages of Alzheimer's disease: from subjective memory impairment to amnesic mild cognitive impairment. *Eur. J. Neurol.* 2018;
187. Molinuevo JL, Ripolles P, Simó M, et al. White matter changes in preclinical Alzheimer's disease: A magnetic resonance imaging-diffusion tensor imaging study on cognitively normal older people with positive amyloid β protein 42 levels. *Neurobiol. Aging* 2014;35(12):2671–2680.
188. Brown CA, Johnson NF, Anderson-Mooney AJ, et al. Development, validation and application of a new fornix template for studies of aging and preclinical Alzheimer's disease. *NeuroImage Clin.* 2017;13:106–115.
189. Vipin A, Ng KK, Ji F, et al. Amyloid burden accelerates white matter degradation in cognitively normal elderly individuals. *Hum. Brain Mapp.* 2019;40(7):2065–2075.
190. Gold BT, Zhu Z, Brown CA, et al. White matter integrity is associated with CSF markers of AD in normal adults. *Neurobiol Aging* 2014;35(10):2263–2271.
191. Al-Janabi OM, Brown CA, Bahrani AA, et al. Distinct white matter changes associated with

- cerebrospinal fluid amyloid- β 1-42 and hypertension. *J. Alzheimer's Dis.* 2018;66(3):1095–1104.
192. Melah KE, Yuan-Fu Lu S, Hoscheidt SM, et al. CSF markers of Alzheimer's pathology and microglial activation are associated with altered white matter microstructure in asymptomatic adults at risk for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2016;50(3):873–886.
193. Kim WH, Racine AM, Adluru N, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers of neurofibrillary tangles and synaptic dysfunction are associated with longitudinal decline in white matter connectivity: A multi-resolution graph analysis. *NeuroImage Clin.* 2019;21:101586.
194. Racine AM, Merluzzi AP, Adluru N, et al. Association of longitudinal white matter degeneration and cerebrospinal fluid biomarkers of neurodegeneration, inflammation and Alzheimer's disease in late-middle-aged adults. *Brain Imaging Behav.* 2019;13(1):41-52.
195. Hoy AR, Ly M, Carlsson CM, et al. Microstructural white matter alterations in preclinical Alzheimer's disease detected using free water elimination diffusion tensor imaging. 2017;12(3):e0173982.
196. Bendlin BB, Carlsson CM, Johnson SC, et al. CSF T-Tau/A β 42 predicts white matter microstructure in healthy adults at risk for Alzheimer's disease. *PLoS One* 2012;7(6):e37720.
197. Song S-K, Sun S-W, Ramsbottom MJ, et al. Dysmyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water. *Neuroimage* 2002;17(3):1429–36.
198. Honea RA, Vidoni E, Harsha A, Burns JM. Impact of APOE on the healthy aging brain: A voxel-based MRI and DTI study. *J. Alzheimer's Dis.* 2009;18(3):553–564.
199. Persson J, Lind J, Larsson A, et al. Altered brain white matter integrity in healthy carriers of the *APOE* ϵ 4 allele. *Neurology* 2006;66(7):1029–1033.
200. Smith CD, Chebrolu H, Andersen AH, et al. White matter diffusion alterations in normal women at risk of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2010;31(7):1122–1131.
201. Laukka EJ, Lövdén M, Kalpouzos G, et al. Microstructural white matter properties mediate the association between APOE and perceptual speed in very old persons without dementia. *PLoS One* 2015;10(8):e0134766.
202. Cavado E, Lista S, Rojkova K, et al. Disrupted white matter structural networks in healthy older adult APOE ϵ 4 carriers – An international multicenter DTI study. *Neuroscience* 2017;357:119–133.
203. Nierenberg J, Pomara N, Hoptman MJ, et al. Abnormal white matter integrity in healthy apolipoprotein E epsilon4 carriers. *Neuroreport* 2005;16(12):1369–72.
204. Gold BT, Powell DA, Andersen AH, Smith CD. Alterations in multiple measures of white matter integrity in normal women at high risk for Alzheimer's disease. *Neuroimage* 2010;52(4):1487–1494.
205. Westlye LT, Reinvang I, Rootwelt H, Espeseth T. Effects of APOE on brain white matter microstructure in healthy adults. *Neurology* 2012;79(19):1961–1969.
206. Adluru N, Destiche DJ, Yuan-Fu Lu S, et al. White matter microstructure in late middle-age: Effects of apolipoprotein E4 and parental family history of Alzheimer's disease. *Elsevier* 2014;4:730–742.
207. Kljajevic V, Meyer P, Holzmann C, et al. The ϵ 4 genotype of apolipoprotein E and white matter integrity in Alzheimer's disease. *Alzheimers. Dement.* 2014;10(3):401–4.

208. Operto G, Cacciaglia R, Grau-Rivera O, et al. White matter microstructure is altered in cognitively normal middle-aged APOE- ϵ 4 homozygotes. *Alzheimers. Res. Ther.* 2018;10(1):48.
209. Heise V, Filippini N, Ebmeier KP, Mackay CE. The APOE ϵ 4 allele modulates brain white matter integrity in healthy adults. *Mol. Psychiatry* 2011;16(9):908–916.
210. Ryan L, Walther K, Bendlin BB, et al. Age-related differences in white matter integrity and cognitive function are related to APOE status. *Neuroimage* 2011;54(2):1565–1577.

CAPÍTULO

02



Colesterol y triglicéridos en
plasma y microestructura de la
sustancia blanca

RESUMEN

La dislipidemia es un factor de riesgo de deterioro cognitivo. En este capítulo se estudia el efecto de la variabilidad interindividual de los lípidos plasmáticos sobre la microestructura de la sustancia blanca (SB) de las regiones involucradas en la cognición mediante imagen de tensor de difusión (DTI) en 273 adultos cognitivamente sanos. También se investiga el efecto de los lípidos plasmáticos sobre los niveles de neurofilamento de cadena ligera (NfL) en el líquido cefalorraquídeo (LCR), un marcador de daño axonal. Las lipoproteínas de colesterol de baja densidad (LDL) y los triglicéridos (TG) muestran una asociación negativa con la difusividad axial (AxD) en el hipocampo, fascículo longitudinal inferior y superior y cuerpo calloso, mientras que las lipoproteínas de colesterol de alta densidad (HDL) muestra una correlación positiva. La asociación es independiente del genotipo de la Apolipoproteína E (APOE), tensión arterial o toma de estatinas. El NfL muestra una asociación negativa con la AxD de la mayoría de las regiones de la SB. El LDL modera la relación entre el NfL y la AxD del cuerpo del cuerpo calloso ($p = 0.041$), giro cingulado derecho ($p = 0.041$), fórnix/estria terminal derecha ($p = 0.025$) y fascículo longitudinal superior derecho ($p = 0.020$). Los TG moderan esta relación en el fascículo longitudinal inferior derecho ($p = 0.004$) y fórnix/estria terminal izquierda ($p = 0.001$). Se concluye que los lípidos plasmáticos se relacionan con cambios microestructurales en la SB que a su vez se asocian con degeneración axonal. Estos cambios podrían estar involucrados en la transición del envejecimiento saludable a la patología y procesos neurodegenerativos.

INTRODUCCIÓN

1. Lípidos plasmáticos y cognición

Las membranas de las células cerebrales contienen una gran cantidad de colesterol ¹. Se han descrito alteraciones en el metabolismo del colesterol cerebral en enfermedades que producen demencia, especialmente en la enfermedad de Alzheimer (EA) ² y en otras enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson ³. Aunque el metabolismo del colesterol cerebral esté separado del metabolismo periférico por la barrera hematoencefálica (BHE), existe controversia sobre la implicación del metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas en la fisiología del cerebro y en estados patológicos.

Diversos estudios describen una asociación significativa entre niveles plasmáticos y pruebas cognitivas. El estudio reciente llevado a cabo por Stough y colaboradores en 196 sujetos sanos entre 60-75 años, mostró una asociación significativa entre niveles altos de colesterol total (CTOT) y LDL y peor rendimiento en memoria de trabajo y procesamiento y peor velocidad de respuesta en pruebas de memoria de reconocimiento, mientras que no hubo ninguna asociación entre la cognición y el HDL o los TG⁴. Por el contrario, otros trabajos describen el HDL como la principal lipoproteína plasmática debido a su función protectora de la cognición ⁵⁻⁷. Un estudio realizado en 120 sujetos entre 43-85 años, mostró una asociación negativa entre la memoria y TG y positiva entre la memoria y niveles de LDL, pero no hallaron ninguna relación entre los lípidos en plasma y lenguaje o función ejecutiva ⁸, al contrario que el estudio llevado a cabo por Parthasarathy y colaboradores, en el que describieron una asociación entre niveles elevados de TG en plasma y peor rendimiento en funciones ejecutivas, pero no en memoria ⁹. Un estudio realizado en sujetos con demencia demostró paradójicamente que un incremento durante un año en los niveles de LDL se asociaba a una mejora en los índices de la actividad de la vida diaria, mientras que un aumento de HDL se asociaba a un empeoramiento ¹⁰. En esta misma línea, otro estudio de 3467 sujetos de los que 2778 eran cognitivamente normales, 603 tenían DCL y 86 demencia, demostró una asociación inversa entre los niveles plasmáticos de LDL y presencia la demencia, sugiriendo que tener niveles altos de LDL podría ser un factor protector contra el deterioro cognitivo ¹¹. En cuanto al CTOT un trabajo de revisión reciente llega a la conclusión de que no hay evidencia suficiente para afirmar una asociación causal entre sus niveles plasmáticos y la demencia ¹². En este tipo de estudios es muy importante tener en cuenta covariables como

el sexo, la educación o la edad a la hora de analizar el efecto de los niveles plasmáticos del colesterol en el deterioro cognitivo, ya que la edad por ejemplo disminuye o incluso invierte esta asociación ¹³. Existe también controversia en los estudios transversales realizados en sujetos cognitivamente sanos. En un estudio donde se compararon 29 sujetos con niveles elevados de CTOT con 31 sujetos con niveles bajos de CTOT, no se encontraron diferencias en una batería de tests neuropsicológicos ¹⁴. En la misma línea, en el estudio llevado a cabo por Philippou y colaboradores en 640 sujetos mayores de 55 años, no se halló ninguna asociación entre niveles de HDL y TG en plasma y funciones cognitivas ¹⁵.

La controversia resultante de estos estudios transversales no existe en los estudios longitudinales, donde la mayoría de estudios realizados en personas cognitivamente sanas consideran un factor de riesgo de demencia tener niveles alterados de lípidos plasmáticos ^{16,17}. Un estudio longitudinal en 1559 sujetos de una media de edad de 79.4 años, mostró que los sujetos con niveles elevados de LDL y CTOT en la visita basal tenían peor rendimiento en el MMSE al cabo de 5 años ¹⁸. Otro estudio en 9294 sujetos mayores de 65 años demostró que a los 15 años, los sujetos que en la visita basal tuvieron niveles óptimos de factores cardiovasculares, como tener <200mg/dl de colesterol en sangre, tenían menos riesgo de demencia y de deterioro cognitivo ¹⁹. En esta misma línea, el estudio llevado a cabo por Power y colaboradores en 13997 sujetos de una media de edad de 76 años demostró que los sujetos con niveles elevados de CTOT y TG tenían más deterioro cognitivo a los 20 años que sujetos con niveles inferiores de estos lípidos ²⁰. Es más, Mapstone y colaboradores demostraron que los lípidos plasmáticos pueden predecir la conversión de adultos cognitivamente sanos a deterioro cognitivo ligero o EA ²¹. Aunque la mayoría de los trabajos describan una asociación entre niveles alterados de lípidos plasmáticos y riesgo de deterioro cognitivo, existen también trabajos donde no se encuentra asociación entre niveles plasmáticos de LDL, HDL, TG y CTOT y riesgo de desarrollo de deterioro cognitivo a los largo de 20 años ²². De hecho, los ensayos clínicos con medicamentos que bajan los niveles de los lípidos, como es el caso de las estatinas, no han demostrado eficacia ²³. Un estudio longitudinal reciente de 401 sujetos con riesgo de deterioro cognitivo ha demostrado que el uso de las estatinas no reduce ni incrementa el deterioro cognitivo o funcional en 5.7 años ²⁴.

2. Lípidos plasmáticos y microestructura de la sustancia blanca

El colesterol es un lípido estructural esencial en las membranas celulares y en la mielina. Es un componente necesario para mantener las propiedades eléctricas de la neurona, y también para mantener la flexibilidad y permeabilidad de las membranas y la mielina. Para prevenir una acumulación tóxica y mantener constante su concentración, es necesaria la renovación continua del colesterol²⁵. El análisis de la microestructura de la SB permite analizar la integridad del axolema y de la mielina, las cuales dependen de la renovación del colesterol.

La mayoría de los trabajos realizados se centran en analizar el papel del colesterol sobre las hiperintensidades de la sustancia blanca (HSB), debido a su probable origen vascular, y no en la microestructura de la SB. Algunos estudios no han descrito ninguna asociación significativa entre el LDL, el CTOT y las HSB^{26 27}, mientras que otros han observado que los sujetos con HSB en la zona occipital periventricular tenían niveles inferiores de LDL y CTOT que los controles²⁸. Hay estudios donde observan que la hipertensión podría estar influenciando esta asociación periventricular entre niveles bajos de LDL y mayor HSB²⁹. En la misma línea se ha descrito una asociación negativa entre los niveles de TG, LDL y CTOT y las HSB²⁸, mientras que un estudio longitudinal reciente ha descrito que tener niveles elevados de HDL se asociaba a un incremento de las HSB al cabo de 20 años³⁰. Este último estudio está centrado solo en mujeres, por lo que los resultados podrían estar sesgados por el sexo.

La relación entre el colesterol plasmático y la microestructura de la SB se ha estudiado sobre todo de un modo indirecto, analizando las enfermedades relacionadas con el colesterol como son la obesidad o el síndrome metabólico. Algunos estudios han correlacionado la obesidad y el síndrome metabólico con un menor valor del índice de anisotropía fraccional (FA)³¹⁻³⁶, pero un estudio reciente ha descrito una asociación positiva entre obesidad y FA³⁷. En el estudio de Cohen, analizando conjuntamente adultos delgados y obesos, hallaron una asociación negativa entre niveles anormales de colesterol plasmático y la FA en los lóbulos prefrontales. En cambio, al analizar los grupos por separado, esta asociación solo se mantenía significativa en el grupo de los obesos³⁶.

Existen pocos trabajos que analicen si la variabilidad interindividual del colesterol en sujetos sanos afecta a la microestructura de la SB. Estos estudios han demostrado una

asociación entre los lípidos plasmáticos y el índice FA en sujetos jóvenes y adultos ^{38,39}. El trabajo de Warstad en jóvenes de 15.2 años de media de edad mostró que los niveles elevados de CTOT y HDL se asociaban con una mayor FA en muchas regiones, como por ejemplo el cuerpo calloso, fórnix, capsula interna, fascículo longitudinal inferior y fascículo uncinado. Además, también hallaron una asociación negativa entre el CTOT y los índices AD, RD y MD, y una asociación negativa entre el HDL y el RD. No observaron ninguna correlación entre el LDL y FA. ³⁹. Al contrario, el trabajo realizado por Williams y colaboradores en 250 adultos cognitivamente sanos mostró una asociación negativa entre el LDL, HDL, CTOT y TG y el índice FA. Además, a diferencia también del estudio de Warstad, donde no se observó ninguna asociación entre el LDL y la microestructura de la SB, el LDL fue el más robusto de los cuatro compuestos lipídicos analizados a la hora de predecir la integridad de la SB ³⁸. Otro estudio transversal en cambio describió el HDL como el lípido más robusto debido a su papel protector de la integridad de la SB y el sistema de fibras de proyección ³⁵. Recientemente se ha publicado un trabajo longitudinal en 665 sujetos sanos mayores de 50 años donde se analiza la asociación entre el riesgo vascular, incluido el tener niveles altos de colesterol en plasma, y la microestructura de la SB. En el estudio transversal encuentran una asociación negativa entre los niveles de CTOT y la FA en la corona radiata. Sin embargo, en el estudio longitudinal encuentran una asociación entre niveles altos de CTOT y un incremento en los valores de la FA en la corona radiata ⁴⁰.

Todos estos estudios (**Tabla 1**), demuestran que los lípidos plasmáticos afectan a la microestructura de la SB. Una de las razones de las diferencias encontradas en estos estudios podría estar relacionada con las covariables, ya que la relación entre los lípidos plasmáticos y la microestructura de la SB podría estar condicionada por covariables como el genotipo APOE, la hipertensión o la toma de estatinas y ninguno de los estudios anteriormente mencionados tiene en cuenta estas tres variables conjuntamente.

Tabla 1: Resumen de estudios de los lípidos plasmáticos e índices DTI.

Referencia	Muestra	Lípido	Índice DTI	Resultado
Cohen y col., 2011 ³⁶	n= 61 (22 delgados + 39 obesos) (x= 58.3 años)	CTOT, HDL, LDL, TG	FA	LDL>130 mg/dl y HDL<34 mg/dl - ↓FA
Warstadt y col., 2014 ³⁹	n= 403, sanos (x=23.8 años)	CTOT, HDL, LDL	FA, MD, AxD, RD	↑CTOT - ↑FA y ↓MD, AxD, RD ↑HDL - ↑FA y ↓MD, RD
Ryu y col., 2017 ⁴¹	n=139 sanos (x=61.9 años)	CTOT, HDL, LDL, TG	FA, MD, AxD, RD	↓HDL/ ↑TG/↑CTOT/HDL - ↓FA y AxD
Williams y col., 2013 ³⁸	n=125 sanos (x=68 años)	CTOT, HDL, LDL, TG	FA, AxD, RD	↑LDL - ↓FA y ↑AxD y RD ↑CTOT - ↓FA ↑HDL - ↓FA ↑TG - ↓FA
Williams y col., 2019 ⁴⁰	n= 665 (x= 71.6 años)	CTOT	FA, MD	Transversal: ↑CTOT - ↓FA Longitudinal: ↑CTOT - incremento FA

Nota. x=media; CTOT = colesterol total; HDL = lipoproteínas de alta densidad; LDL = lipoproteínas de baja densidad, TG. = triglicéridos; FA = anisotropía fraccional; MD = difusividad media; AxD = difusividad axial; RD = difusividad radial.

2.1 APOE, lípidos plasmáticos y microestructura de la sustancia blanca

La principal función de la proteína ApoE es regular el metabolismo lipídico. Por un lado el genotipo APOE4 se asocia a niveles superiores de LDL y TG plasmáticos⁴² y por otro lado diferentes estudios han demostrado el papel modulador del alelo ε4 de APOE (APOE4) en la microestructura de la SB. La mayoría de los estudios han demostrado que los sujetos cognitivamente sanos portadores del APOE4 tienen niveles inferiores de FA y superiores de RD, MD o AxD que los no portadores en regiones involucradas en los procesos de cognición como son el hipocampo, cuerpo calloso, fascículo uncinado, fascículo longitudinal inferior, fascículo longitudinal superior y giro cingulado⁴³⁻⁵². Algunos de estos trabajos observan que estas alteraciones se mantienen estables durante la vida⁴⁴⁻⁴⁸, mientras que otros observan que los portadores muestran mayores cambios en el FA y la AxD durante la edad adulta y sugieren que la APOE influye en la trayectoria de los cambios en la microestructura relacionados con la edad^{49,50}. Un estudio reciente no encuentra diferencias significativas entre portadores y no portadores, pero sí observan que los portadores muestran una mayor disminución de los valores de FA en el genu y esplenio del cuerpo calloso al cabo de 3.6 años⁴⁰. Otro estudio observó que los sujetos homocigotos de APOE4 tenían valores superiores de MD, AxD y RD que los heterocigotos o no portadores de APOE4 en múltiples regiones. Además encontraron una

correlación entre la cantidad del alelo $\epsilon 4$ y valores de estos tres índices de la DTI ⁵³. Sujetos con riesgo aumentado de EA por ser portadores de APOE4 y tener antecedentes de historia familiar también tienen valores inferiores de FA en múltiples regiones que sujetos sin riesgo aumentado de EA ⁵⁴ y se relacionan con los cambios en el RD y el AxD ⁵⁵. En conclusión, estos estudios demuestran que el genotipo APOE4 afecta a la microestructura de la SB disminuyendo el valor de FA y aumentando el de MD, RD y AxD en diversas regiones.

2.2 Tensión arterial, lípidos plasmáticos y microestructura de la sustancia blanca

Son muchos los trabajos que muestran una asociación entre la hipertensión y niveles plasmáticos de CTOT, LDL, HDL o TG ⁵⁶⁻⁵⁹ y también entre la tensión arterial y la microestructura de la SB. El estudio de Leritz y colaboradores mostró que un mayor nivel de tensión arterial media (*Mean Arterial Blood Pressure*, MABP) se asociaba a un menor valor de FA en la parte anterior del cuerpo calloso pero no en la posterior ⁶⁰. Dos años más tarde, el mismo grupo de investigación describió también una asociación negativa entre MABP y FA y positiva entre MABP y RD en la región parietal y frontal de la SB, mientras que la AxD mostró una asociación positiva menos significativa en regiones más posteriores ⁶¹. En relación a este patrón anteroposterior, un estudio sugiere que la tensión arterial podría estar acentuando la expansión del efecto de la edad en la microestructura de la SB desde las regiones anteriores a las posteriores ⁶². Una mayor tensión arterial se asocia también a valores inferiores de FA y superiores de MD en múltiples regiones involucradas en los procesos de cognición como el cuerpo calloso, fascículo longitudinal inferior, fascículo longitudinal superior, fascículo uncinado, fórceps menor y fascículo fronto-occipital inferior ⁶³⁻⁶⁵. Esta disminución de la FA e incremento de MD se observa en los hipertensos en comparación con los normotensos, pero no al comparar sujetos normotensos con los pre-hipertensos, definidos como sujetos con niveles de tensión arterial justo por debajo del límite ⁶⁴. Estos estudios transversales están en línea con los estudios longitudinales. Un estudio longitudinal en sujetos con tensión arterial en el límite mostró una asociación significativa entre niveles altos de la tensión sistólica y una disminución del FA al cabo de 2 años ⁶⁶. Este efecto de la hipertensión en la microestructura de la SB no varía dependiendo de la duración de la hipertensión ⁶⁷ y es independiente a las hiperintensidades de la SB ⁶⁸. En cambio en sujetos portadores de APOE4 el efecto de la hipertensión en la microestructura de la SB es mayor que en los no portadores ⁶⁷. En cuanto a la relación de la microestructura de la SB, la cognición y la

tensión arterial, parece que la tensión influye en la asociación entre la cognición y la microestructura, pero el efecto es muy pequeño ⁶⁹.

2.3 Estatinas, lípidos plasmáticos y microestructura de la sustancia blanca

Las estatinas son los medicamentos universalmente usados para tratar la dislipidemia. Su efecto en la integridad de la SB se encuentra en discusión. Un estudio llevado a cabo en 945 sujetos con una media de edad de 78 años mostró una asociación significativa entre una terapia prolongada con estatinas y una disminución de FA en el genu del cuerpo calloso. También observaron que la dislipidemia mostraba una mayor asociación con la disminución del FA en el genu del cuerpo calloso en el grupo de los sujetos que no tomaban las estatinas que en toda la muestra en conjunto ⁷⁰. Otro estudio por el contrario no encontró diferencias en el índice FA entre sujetos que tomaban estatinas y los que no. En cambio, al estratificar la muestra teniendo en cuenta la puntuación del MMSE, observaron que sujetos con menor rendimiento cognitivo y tomando estatinas tenían valores superiores de FA que los sujetos con menor rendimiento cognitivo y no tomaban estatinas en regiones como el fascículo longitudinal superior, tracto talámico anterior y genu y esplenio del cuerpo calloso. Al corregir el análisis por el genotipo APOE y el nivel de LDL, solo se mantuvo significativo el genu del cuerpo calloso ⁷¹. En el trabajo realizado por Williams y colaboradores no encontraron ninguna diferencia significativa en la asociación entre el LDL y la microestructura de la SB entre el grupo de sujetos que tomaban estatinas y los que no ³⁸.

En resumen, estos estudios demuestran que el genotipo APOE, la tensión arterial y la toma de estatinas, además de estar estrechamente relacionados con la dislipidemia, afectan a la microestructura de la SB de las regiones involucradas en los procesos de cognición. Sujetos con el genotipo APOE4, tensión arterial alta y sin tratamiento de estatinas en dislipidemias, tienen valores inferiores de FA y superiores de MD, AxD y RD que los sujetos no portadores de APOE4, normotensos y con tratamiento de estatinas.

2.4 Neurofilamento y microestructura de la sustancia blanca

La alteración del índice AxD se ha relacionado con daño axonal. La pérdida axonal se correlaciona con niveles inferiores de la AxD ^{72,73}. La proteína de NfL se ha propuesto también como marcador de daño axonal ⁷⁴. Los niveles de NfL en LCR se encuentran aumentados en sujetos con deterioro cognitivo ligero y esto se relaciona con los cambios en la SB de las regiones involucradas en los procesos cognición ⁷⁵. En sujetos

cognitivamente sanos los resultados de los estudios sobre la asociación entre el NfL y la microestructura de la SB son inconsistentes. Mientras que algunos estudios han descrito solo una asociación con el índice MD en los lóbulos temporal, parietal y frontales ⁷⁶, otros han descrito solo una asociación positiva entre NfL y la RD en la radiación talámica posterior ⁷⁵ y otros estudios no han encontrado ninguna asociación entre el NfL y la SB ⁷⁷.

En conclusión, es importante tener en cuenta el posible efecto de estas variables a la hora de estudiar la asociación entre la variabilidad interindividual de los lípidos plasmáticos y la microestructura de la SB.

Hipótesis

Se plantea la hipótesis de que los valores inferiores de HDL y superiores de LDL, TG y CTOT se asocian a valores inferiores de los índices FA y AxD y superiores de MD y RD. También se plantea la hipótesis de que estas asociaciones están influidas por el genotipo APOE, la presión arterial o el uso de estatinas. Los niveles mayores de NfL se asocian con valores más bajos de AxD.

Objetivo

El objetivo de este capítulo es analizar la asociación entre los niveles plasmáticos de CTOT, LDL, HDL y TG y los índices de DTI que reflejan el estado de la microestructura de la SB, especialmente en las regiones relacionados con la cognición, en sujetos cognitivamente sanos, e investigar si las alteraciones en la microestructura de la SB se asocian con la degeneración axonal y niveles de NfL.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Sujetos

Para este estudio se utilizaron los sujetos de la cohorte del PGA sin deterioro cognitivo definido por una puntuación de 0 en la Escala de Evaluación Clínica de Demencia (*Clinical Dementia Rating*, CDR) en la visita basal (n=374). Se excluyeron 95 sujetos bien por hallazgos incidentales (hidrocefalia, higroma, etc.) y bien por presencia de artefactos (movimiento, etc.) en la resonancia magnética (RM) considerados no válidos para el estudio de la microestructura. La muestra consistió en 279 sujetos adultos sanos. Se excluyeron seis participantes por tener valores extremadamente anormales (*outliers*) de los lípidos en plasma. Finalmente, se introdujeron 273 sujetos en el análisis.

122 participantes contaban con datos de NfL en el LCR.

2. Variables objeto de estudio

2.1 Variables principales

2.1.1 Lípidos plasmáticos

Los niveles de CTOT, LDL, HDL y TG (mg/dl) se analizaron en el laboratorio del Hospital Universitario Donostia por las técnicas habituales a partir de la muestra de sangre extraída en ayunas en la primera sesión de la visita basal.

2.1.2 Microestructura de la sustancia blanca

2.1.2.1 Adquisición de datos

Las imágenes de todo el cerebro se obtuvieron mediante el escáner Siemens 3T Magnetom TrioTim (Siemens, Erlangen, Germany) en combinación con una bobina principal de 32 canales. Se utilizó el programa informático AutoAlign Head LS (Siemens) para aumentar la homogeneidad inter-individual en la adquisición de la imagen. Las imágenes de difusión se obtuvieron utilizando una secuencia de imagen ecoplana (EPI) con las siguientes especificaciones: TR 9300 ms, TE 92 ms, tamaño de vóxel: 1.7-mm isotrópico, 71 cortes consecutivos, matriz de adquisición 122×122 (FOV 208 mm), 6/8 Fourier parcial, 64 direcciones de difusión con valor-b de 1000 s/mm², y una imagen sin difusión. La anchura de banda fue de 1640 Hz/píxel.

2.1.2.2 Procesado de imagen y análisis

Las imágenes DICOM se convirtieron en archivos NIFTI comprimidos en 4D y se extrajeron las direcciones del gradiente de difusión con dcm2nii (parte del paquete MRICron, <http://www.mccauslandcenter.sc.edu/mricro/mricron/>). Después se procesaron y analizaron los cerebros en 4D mediante la herramienta del FSL *Tract-Based Spatial Statistics (TBSS)* (FMRIB Software Library, Version 5.0.5; FMRIB, Oxford, United Kingdom) ⁷⁸⁻⁸⁰. Una vez convertida la imagen, se ajustó un modelo tensor a los datos de difusión en bruto utilizando FDT (FMRIB's Diffusion Toolbox) y se crearon los mapas de DTI (FA, MD, AxD, y RD). Mediante BET (*Brain Extraction Tool*) ⁸¹ se extrajeron del cerebro las imágenes de FA utilizando b=0 como volumen de referencia.

Debido a que la plantilla estándar facilitada por el programa FSL (FMRIB58_FA) se basa en sujetos de entre 20-50 años y los sujetos del presente estudio tienen entre 40-75 años, se creó una plantilla específica para el estudio. Los datos de FA de todos los sujetos se alinearon en esta nueva plantilla usando la herramienta de registro no lineal FNIRT que utiliza una representación en b-spline del campo warp de registro ⁸². Los archivos warp que se obtuvieron se aplicaron a las imágenes de MD, AxD y RD.

Antes del análisis estadístico de los vóxeles, los datos de FA de todos los sujetos se proyectaron en el esqueleto del tracto de la media de los valores de FA que representa los centros de todos los tractos comunes del grupo ⁸³.

2.2 Covariables

2.2.1 Genotipo APOE

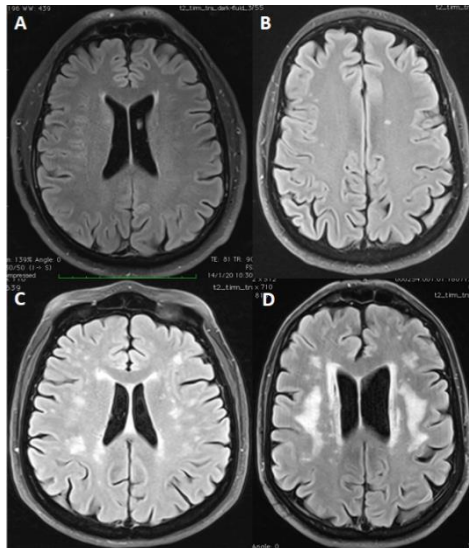
Se analizaron los genotipos de APOE a partir del ADN obtenido de células sanguíneas utilizando procedimientos estándar ⁸⁴. El análisis fue realizado en el laboratorio de neurociencias del Instituto Biodonostia (Dra. Ana Gorostidi) sobre una muestra de ADN previamente almacenada en el Biobanco Vasco. Los participantes se clasificaron como portadores APOE ε4, si tenían al menos un alelo ε4 (APOE4+), y como no portadores si no tenían ninguno (APOE4-).

2.2.2 Hiperintensidades de la sustancia blanca

El neurorradiólogo del equipo (Dr. Jorge Villanúa) aplicó la escala Fazekas para semicuantificar la carga de HSB en secuencias de recuperación de inversión atenuada de fluido (*fluid attenuation inversion recovery, FLAIR*) de RM ⁸⁵. El rango de la escala

Fazekas va de 0 a 3: se otorga una puntuación de 0 en ausencia de hiperintensidades, 1 si se observan lesiones focales, 2 al comienzo de la aparición de lesiones confluentes, y 3 si las lesiones confluentes son difusas (**Figura 1**).

Figura 1: Hiperintensidades de la sustancia blanca



Nota. A = fazekas 0, B = fazekas 1; C = fazekas 2; D = fazekas 3

2.2.3 Tensión arterial

Antes de la toma de tensión, el sujeto permaneció sentado aproximadamente 3 minutos. La medida de la tensión se realizó por duplicado, con tres minutos de diferencia. Se calcularon las medias de la tensión arterial sistólica, como de la diastólica, en mm Hg. Todas las mediciones se realizaron en la misma posición siguiendo un protocolo validado⁸⁶. La MABP se definió mediante la siguiente fórmula: $(\text{Sistólica} + 2 \text{ diastólica})/3$ ³⁸.

2.2.4 Toma de estatinas

En la visita basal del proyecto PGA se recogió información exhaustiva sobre el uso de medicamentos de cada participante. Para este estudio se tuvo en cuenta la toma de estatinas, grupo de fármacos usados para disminuir el colesterol en sus distintas formas. Los participantes se clasificaron como Estatinas+ si tomaban alguna estatina y como Estatinas- si no tomaban ninguna estatina.

2.2.5 Neurofilamento

Los niveles de la proteína de NfL en LCR se determinaron mediante inmunoensayo ELISA (NF-light ELISA kit, UmanDiagnostics AB, Umeå, Sweden). El análisis se

realizó en el laboratorio de Neurociencias de la Universidad de Gotenburgo, Suecia (Dr. Henrik Zetterberg).

3. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba Kolmogorov-Smirnov para confirmar si las variables seguían una distribución normal (K-S, $p > .05$), en cuyo caso los datos descriptivos se mostraban con la media y la desviación estándar. Los datos descriptivos de las variables que no cumplían el supuesto de normalidad se expresaron con la mediana y el rango intercuartil (IQ), percentil 25 y 75. Las variables categóricas se mostraron con la n y el porcentaje.

Con el fin de conocer la asociación entre diferentes variables y analizar cómo la variable independiente predice la variable dependiente, en este estudio se han diseñado modelos lineales generalizados (MLG). Los MLG son una generalización de la regresión lineal de mínimos cuadrados que permite que la variable respuesta siga distribuciones con forma distinta a la normal ⁸⁷.

3.1 Lípidos plasmáticos y microestructura de la sustancia blanca

Con el objetivo de analizar el efecto del CTOT, LDL, HDL y TG sobre la microestructura de la SB medida por los índices de la DTI (FA, MD, RD, AxD), se llevaron a cabo análisis estadísticos TBSS del efecto de cada lípido plasmático sobre los índices de DTI a nivel de vóxel en todo el cerebro mediante interferencia de permutación no paramétrica (aleatorizado, parte de la herramienta FSL). Se generaron 5000 permutaciones y el umbral se determinó mediante TFCE (*Threshold-Free Cluster Enhancement*). Todos los mapas estadísticos fueron corregidos por comparaciones múltiples (FWE, *family wise error*) y el nivel de significatividad se estableció en $p < 0.05$. Solo los clústeres con al menos 100 vóxeles significativos se definieron como clústeres significativos. Los clústeres significativos se etiquetaron mediante el atlas *ICBM-DTI-81 white matter labels atlas*, de la herramienta FSL. Se realizó un estudio del efecto de posibles confundidores sobre la microestructura de la SB y los análisis fueron corregidos para aquellos confundidores que mostraron un efecto significativo.

3.2 Microestructura de la sustancia blanca de las regiones cognitivas, lípidos plasmáticos y variables de confusión

Para profundizar en los hallazgos encontrados en las regiones involucradas en los procesos de cognición, se extrajo la media de los índices de DTI de las regiones de interés

que mostraron una asociación significativa en el análisis de TBSS (FEW corregido $p < 0.05$). Los índices de la DTI fueron multiplicados por 1000 en los análisis ⁸⁸. Según estudios previos sobre las regiones de la SB involucradas en la cognición ⁸⁹⁻⁹⁴, los análisis se centraron en las siguientes regiones: cuerpo calloso, fascículo longitudinal inferior y superior, giro cingulado, hipocampo, fascículo uncinado, fórnix (columna+cuerpo) y fórnix cresta/estría terminal. Estas regiones fueron etiquetadas mediante el atlas de la herramienta FSL (ICBM-DTI-81 white matter labels atlas).

Se utilizó la prueba de U-Mann Whitney para comparar los niveles de los lípidos plasmáticos y los valores de los índices de la DTI de las regiones cognitivas entre los grupos de APOE y estatinas. Se llevó a cabo la correlación Spearman para analizar la asociación entre MABP, lípidos plasmáticos y la microestructura de cada región cognitiva. Las comparaciones y correlaciones múltiples fueron corregidas mediante Bonferroni; el nivel de significatividad se dividió por el número de regiones cognitivas analizadas.

Se diseñaron MLG con el objetivo de explorar el efecto de las covariables potenciales sobre la asociación entre los lípidos plasmáticos y los índices de la DTI de las regiones cognitivas y analizar también el efecto de la interacción entre los lípidos plasmáticos y los índices de la DTI sobre los niveles de NfL en LCR.

3.3 Análisis de mediación y moderación

Si en los modelos lineales generalizados se observaba que alguna de las variables predictivas resultaba significativa, se llevaban a cabo análisis de moderación y de mediación con el fin de entender mejor las asociaciones encontradas.

Para considerar que una variable era un mediador se debían cumplir cuatro condiciones ⁹⁵. En primer lugar, la variable predictiva debía predecir la variable de estudio; en segundo lugar, la variable predictiva debía predecir al mediador; en tercer lugar, el mediador debía predecir la variable de estudio; y por último, el efecto de la variable predictiva sobre la variable de estudio debía ser menor cuando se incluía el mediador en el modelo que cuando no se introducía. Si no se cumplían los supuestos para considerar a la variable como un mediador, se estudiaba la relación de moderación. El análisis de moderación consiste en el efecto de la combinación de dos variables sobre una variable-objetivo y en términos estadísticos es un efecto de interacción.

El nivel de confianza considerado en todos los análisis estadísticos realizados en este proyecto ha sido del 95%. El programa estadístico utilizado ha sido el SPSS versión 21 para Windows. Los análisis de mediación y moderación se realizaron con el complemento PROCESS v2.16.3 de Andrew F. Hayes (<http://www.afhayes.com>) para SPSS.

RESULTADOS

1. Descriptivos

Para el presente capítulo se incluyeron 273 individuos de la cohorte del PGA cognitivamente sanos (CDR = 0). A continuación, se presentan los datos descriptivos de la información demográfica y clínica y de los niveles de los lípidos en plasma. Por último, se muestran las características de la submuestra con información de NfL en el LCR.

1.1 Datos demográficos y de interés

Las características de la muestra se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Características de la muestra.

Variables	Mediana (pc25-pc75) n (%)
Edad	56.15 (52.72 – 61.00)
Género: mujer (%)	175 (64%)
Educación: años	15 (12 – 17)
MMSE	29 (28 – 30)
Genotipo APOE, portador (%)	70 (26%)
Fazekas	
0	157 (58%)
1	103 (38%)
2	9 (3%)
3	4 (1%)
MABP ^a	96.26 (8.56)
Toma de estatinas	33 (12.1%)

Nota: Mediana (rango IQ) de las variables, excepto las variables categóricas n (%). MABP = media de la tensión arterial; MMSE = Miniexamen del estado mental.

^a Variable paramétrica.

1.2 Lípidos plasmáticos

Los niveles de los lípidos plasmáticos se muestran en la **Tabla 3**. 144 participantes (52.7%) mostraron niveles de CTOT superiores a 220 mg/dl, 1 participante (0.4%) tenía HDL hipocolesterolemia, 20 participantes (7.3%) LDL hipercolesterolemia y 19 participantes (7%) hipertrigliceridemia de acuerdo con los puntos de corte del Hospital Universitario de Donostia.

Tabla 3: Niveles de lípidos plasmáticos.

Variables	Mediana (pc25-pc75) Media (DE)
CTOT, mg/dL	226.35 (39.29)
LDL, mg/dL	136.80 (115.60 – 165.00)
HDL, mg/dL	67.88 (17.61)
TG, mg/dL	81 (61-106)

Nota. CTOT = colesterol total; LDL = lipoproteínas de colesterol de baja densidad; HDL = lipoproteínas de colesterol de alta densidad; TG = triglicéridos

1.3 Descriptivos de la submuestra con LCR disponible

122 participantes (44.7%) disponían de datos de NfL en LCR. Según se muestra en la **Tabla 4**, no se observaron diferencias significativas entre aquellos individuos con muestra de LCR disponible y sin ella en ninguna de las características descritas.

La mediana (rango IQ) de los niveles de NfL en LCR fue de 479.36 pg/ml (390.98 – 626.62).

Tabla 4: Comparación de las características de las submuestras según la disponibilidad de NfL en LCR.

Características	NfL LCR		p
	NO (151)	SI (122)	
Edad	55.87 (52.15 – 60.59)	56.70 (53.01 – 61.89)	0.782
Género: mujer (%)	100 (66.22%)	75 (61.48%)	0.448
Educación: años	15 (12 – 17)	14 (11- 17)	0.502
MMSE	29 (28 – 30)	29 (28 – 30)	0.149
Genotipo APOE, portador (%)	41 (27.15%)	29 (23.77%)	0.578
Fazekas			0.073
0	89 (58.9%)	68 (55.7%)	
1	59 (39.1%)	44 (36.1%)	
2	3 (2%)	6 (4.9%)	
3	0 (0%)	4 (3.3%)	
MABP	96.63 (8.06)	95.80 (9.16)	0.432
Toma de estatinas	20 (13.25%)	13 (10.65%)	0.708
Colesterol total, mg/dL	225.66 (40.20)	227.21 (38.28)	0.771
LDL, mg/dL	140.30 (35.58)	141.36 (35.01)	0.880
HDL, mg/dL	67.84 (18.11)	67.94 (17.04)	0.810
Triglicéridos, mg/dL	82 (62 – 106)	81 (61 – 106)	0.944

Nota: Mediana (rango IQ) o Media (DE) de las variables continuas, las variables categóricas n (%). MMSE = Minixamen del estado mental; MABP = media de la tensión arterial; LDL = lipoproteínas de colesterol de baja densidad; HDL = lipoproteínas de colesterol de alta densidad.

2. Lípidos plasmáticos y microestructura de la sustancia blanca

Con el objetivo de estudiar la correlación entre los lípidos plasmáticos y la microestructura de la SB, se realizaron correlaciones a nivel de vóxel en los 273 sujetos sanos. Los mapas de hallazgos significativos ($p < 0.05$) se visualizaron en el modelo estándar del cerebro MINI-152 (1mm).

2.1 Detección de las variables de confusión de la microestructura de la sustancia blanca

Dado que la mayoría de los estudios de la literatura sobre la microestructura de la SB se ajustan por la edad, el sexo, las hiperintensidades de la SB o la educación^{31,76,97}, en este trabajo, se analizó el efecto de estas cuatro variables sobre la microestructura de la SB en nuestra muestra.

Se halló un efecto negativo de la edad sobre la FA y positivo sobre la MD, AxD y RD en la mayoría de las regiones de la SB (**Figura 2**).

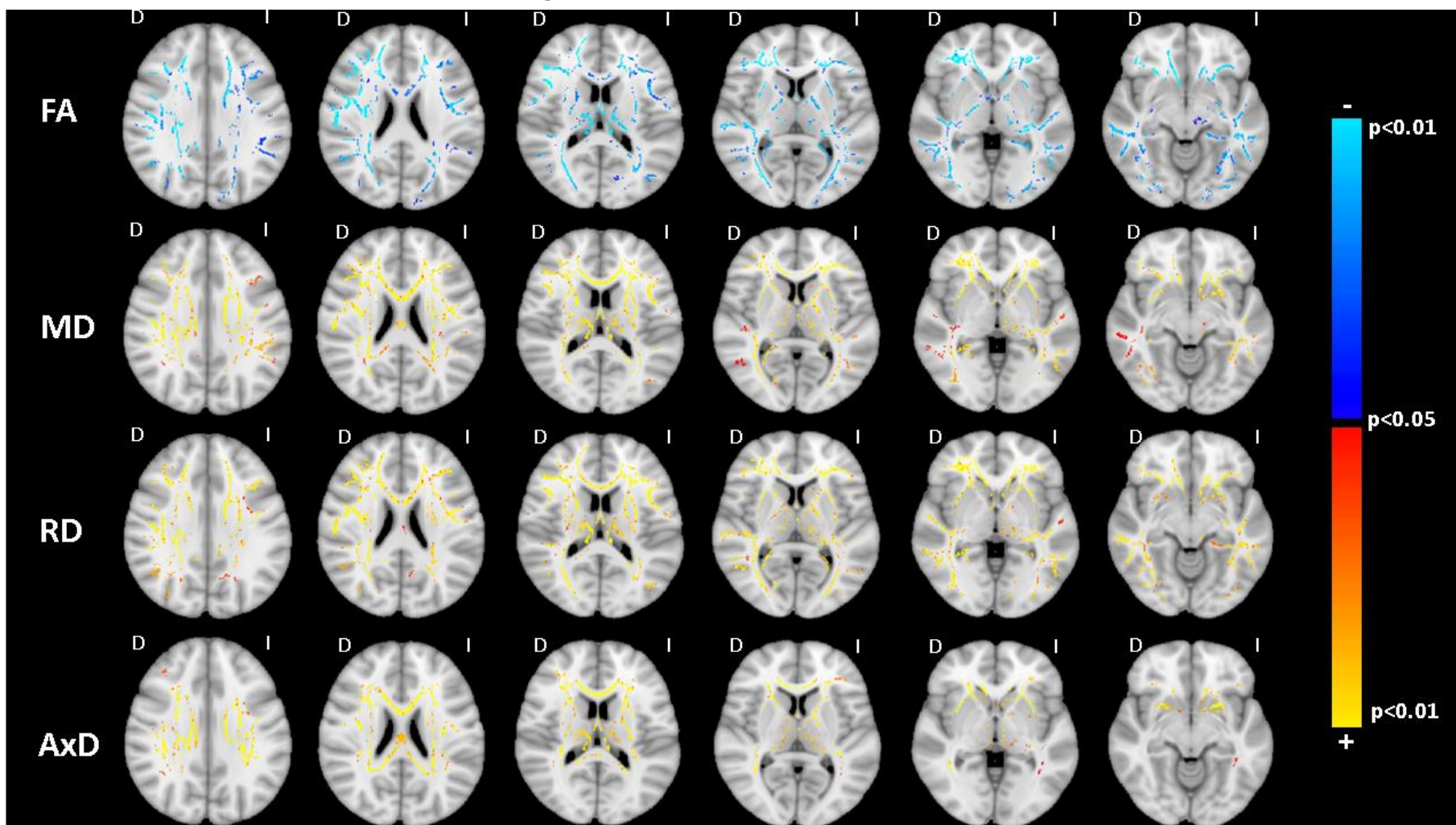
Al comparar las diferencias en la microestructura de la SB entre mujeres y hombres, se observó que las mujeres tenían significativamente menor valor de FA y mayor de MD, AxD y RD que los hombres en muchas de las regiones de la SB (**Figura 3**).

Los sujetos con valores 2 y 3 en la escala de Fazekas, mostraron menor FA en la corona radiata anterior de ambos hemisferios y mayor MD, AxD y RD en la mayoría de las regiones de la SB que los sujetos con valores 0 y 1 (**Figura 4**).

No se observó ningún efecto de la educación sobre la microestructura de la SB.

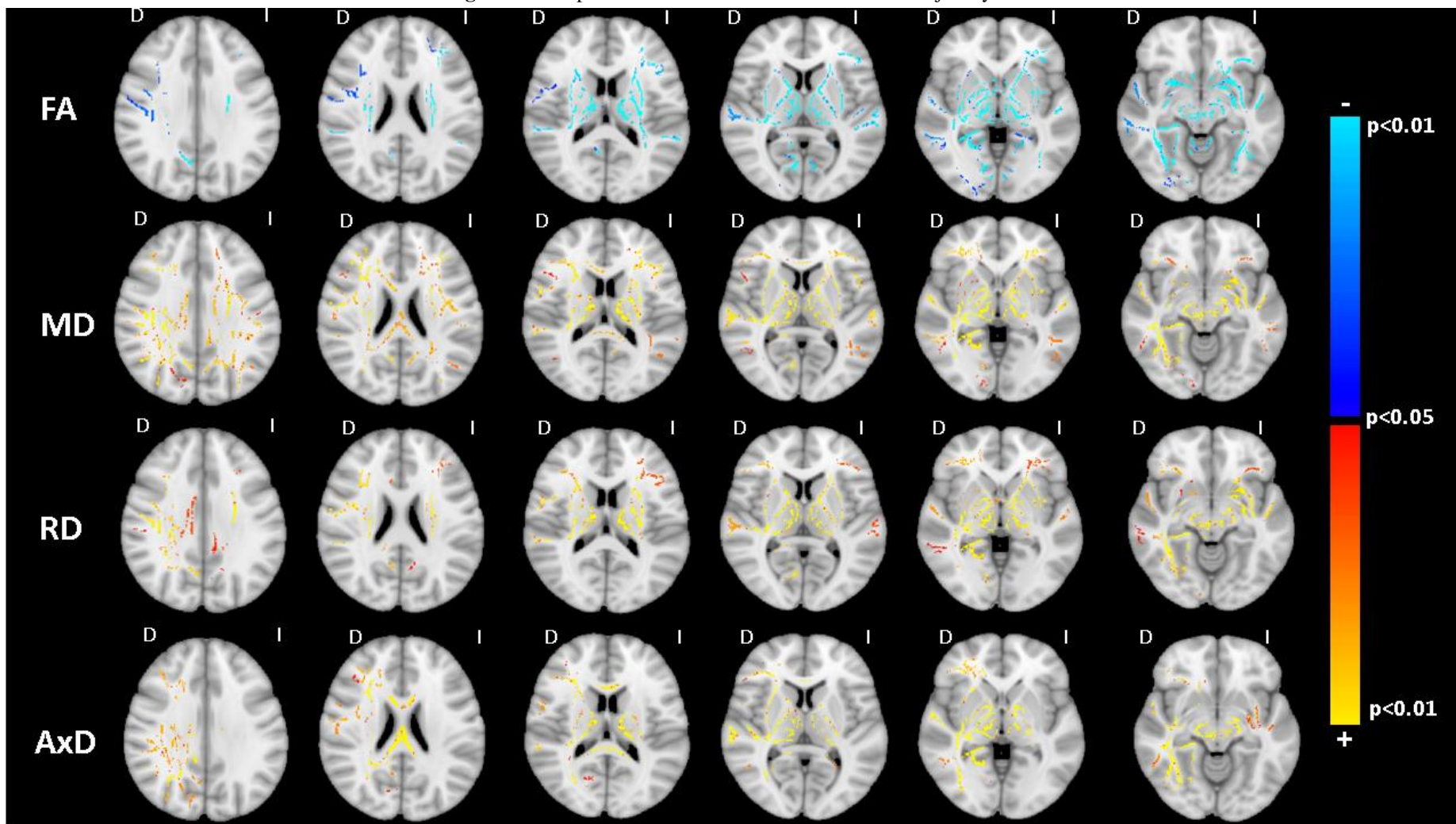
Los análisis del efecto de los lípidos plasmáticos sobre la microestructura de la SB se corrigieron por la edad, género e HSB.

Figura 2: Asociación entre edad e índices de la DTI.



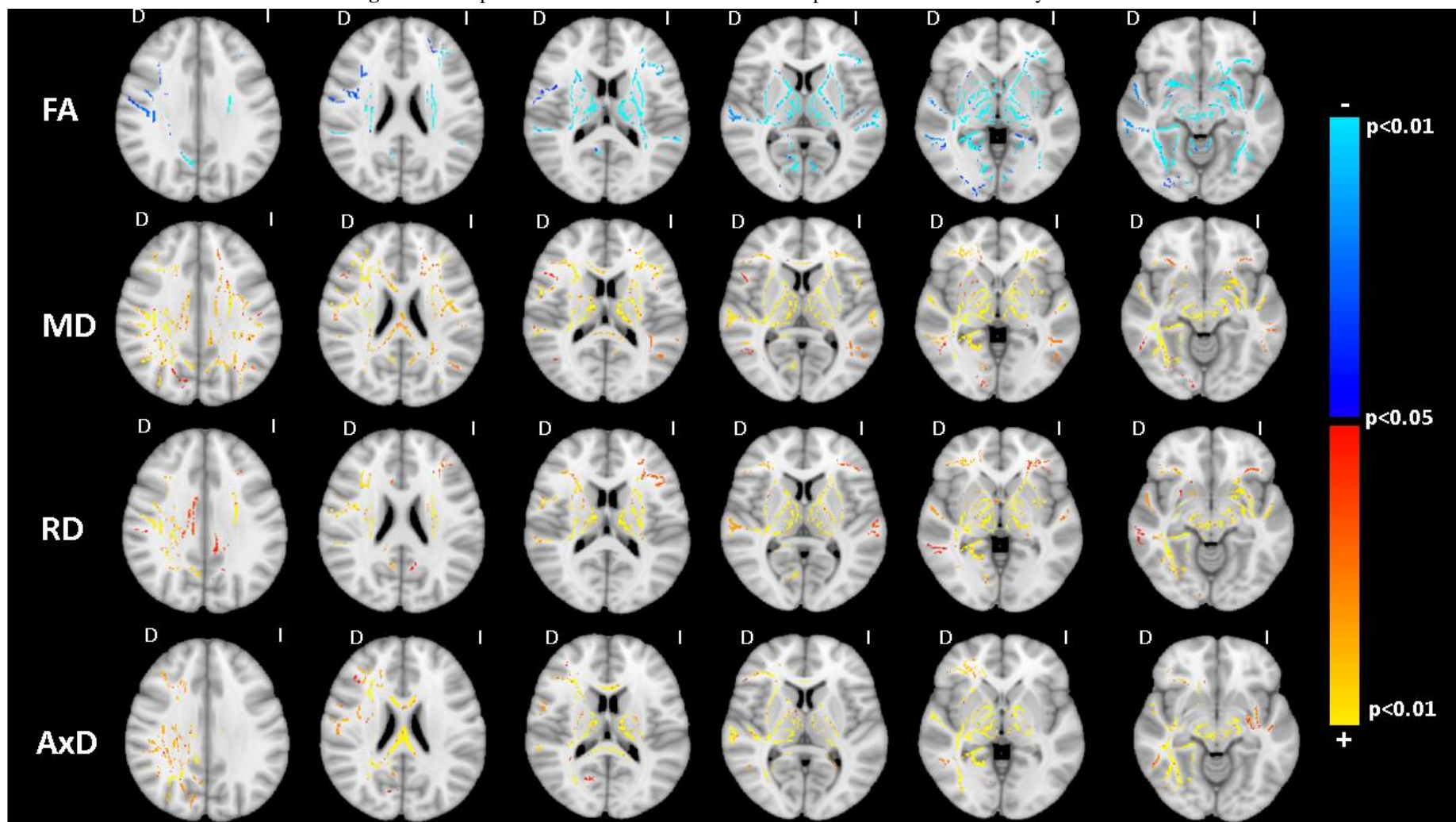
Nota: corregido por *family-wise error*, $p < 0.05$, $n = 273$. Los resultados se muestran sobre el modelo estándar FSL de T1. FA = anisotropía fraccional; MD = difusividad media; RD = difusividad radial; AxD = difusividad axial; D = derecha; I = izquierda.

Figura 3: Comparación de los índices de la DTI entre mujeres y hombres.



Nota: comparación mujeres vs hombres. Corregido por *family-wise error*, $p < 0.05$, $n = 273$. Los resultados se muestran sobre el modelo estándar FSL de T1. FA = anisotropía fraccional; MD = difusividad media; RD = difusividad radial; AxD = difusividad axial; D = derecha; I = izquierda.

Figura 4: Comparación de los índices de la DTI entre personas con Fazekas 0-1 y Fazekas 2-3.



Nota: comparación entre personas con fazekas 2-3 vs fazekas 0-1. Corregido por *family-wise error*, $p < 0.05$, $n = 273$. Los resultados se muestran sobre el modelo estándar FSL de T1. FA = anisotropía fraccional; MD = difusividad media; RD = difusividad radial; AxD = difusividad axial; D = derecha; I = izquierda.

2.2 Colesterol total y microestructura de la sustancia blanca

No se observó ningún efecto significativo del CTOT sobre los índices de la DTI.

2.3 LDL y microestructura de la sustancia blanca

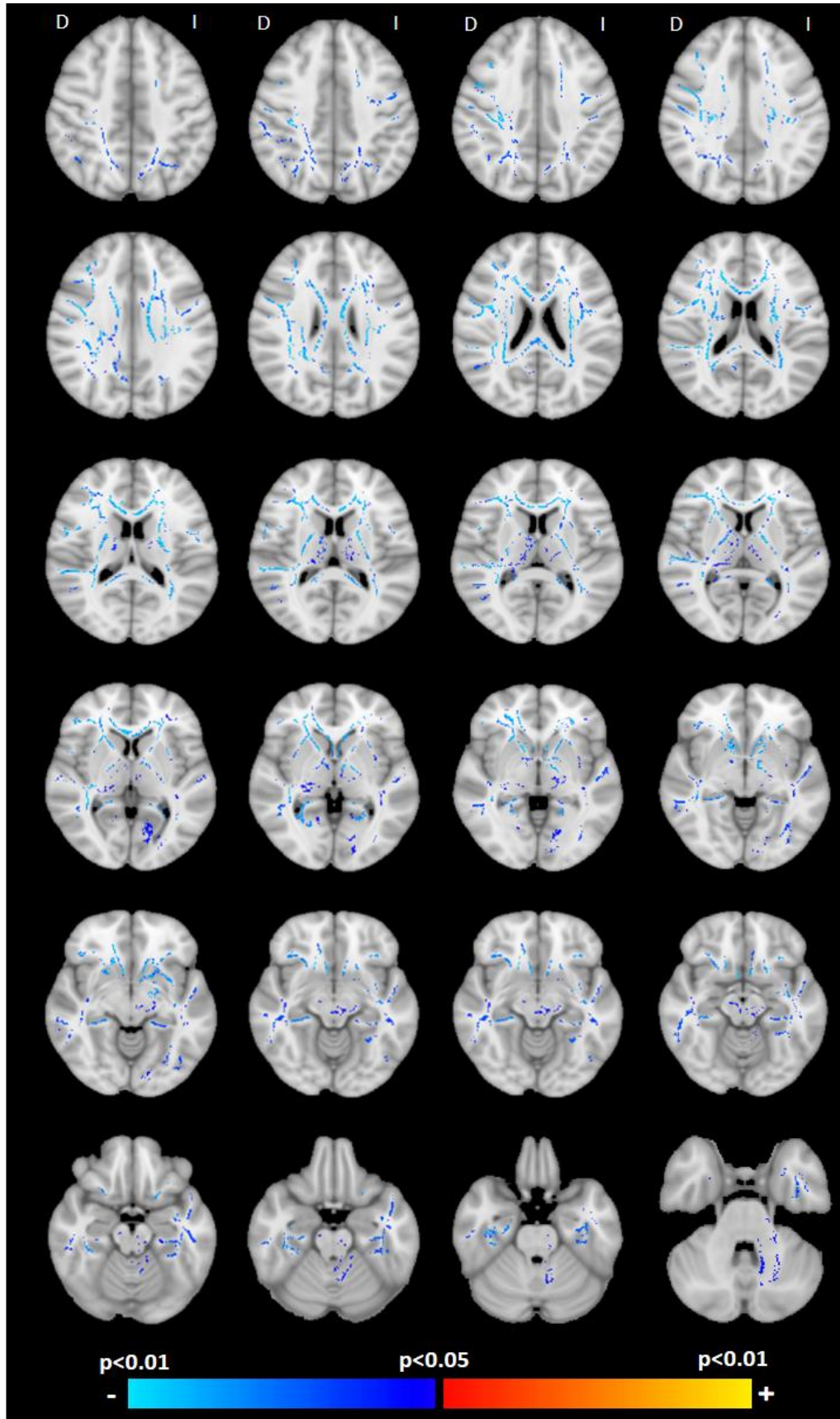
El análisis de TBSS mostró un clúster grande significativo (31103 vóxeles) de asociación negativa entre los niveles de LDL y del índice AxD (a mayor LDL, menor AxD) (**Figura 5**). Aunque los resultados se distribuían por toda la SB en ambos hemisferios, los vóxeles significativos se encontraron sobre todo en el cuerpo calloso, corona radiata, fascículo longitudinal superior y cápsula interna. No se observó ninguna otra asociación entre el LDL y el resto de índices de la DTI en ninguna dirección.

2.4 HDL y microestructura de la sustancia blanca

Los análisis revelaron una correlación positiva significativa entre HDL y el índice AxD (a mayor HDL, mayor AxD) (**Figura 6**). Se observaron dos clústeres significativos, uno con 19227 vóxeles y el otro con 112 vóxeles. Las regiones afectadas de la SB fueron los pedúnculos cerebrales y cerebelosos, esplenio del cuerpo calloso, tracto corticoespinal, lemnisco medial, cápsula interna, corona radiata posterior, radiación talámica posterior, hipocampo y el hemisferio derecho del fascículo longitudinal superior e inferior, fórnix y capsula externa. No se observó ninguna otra asociación entre HDL y el resto de índices de la DTI en ninguna dirección.

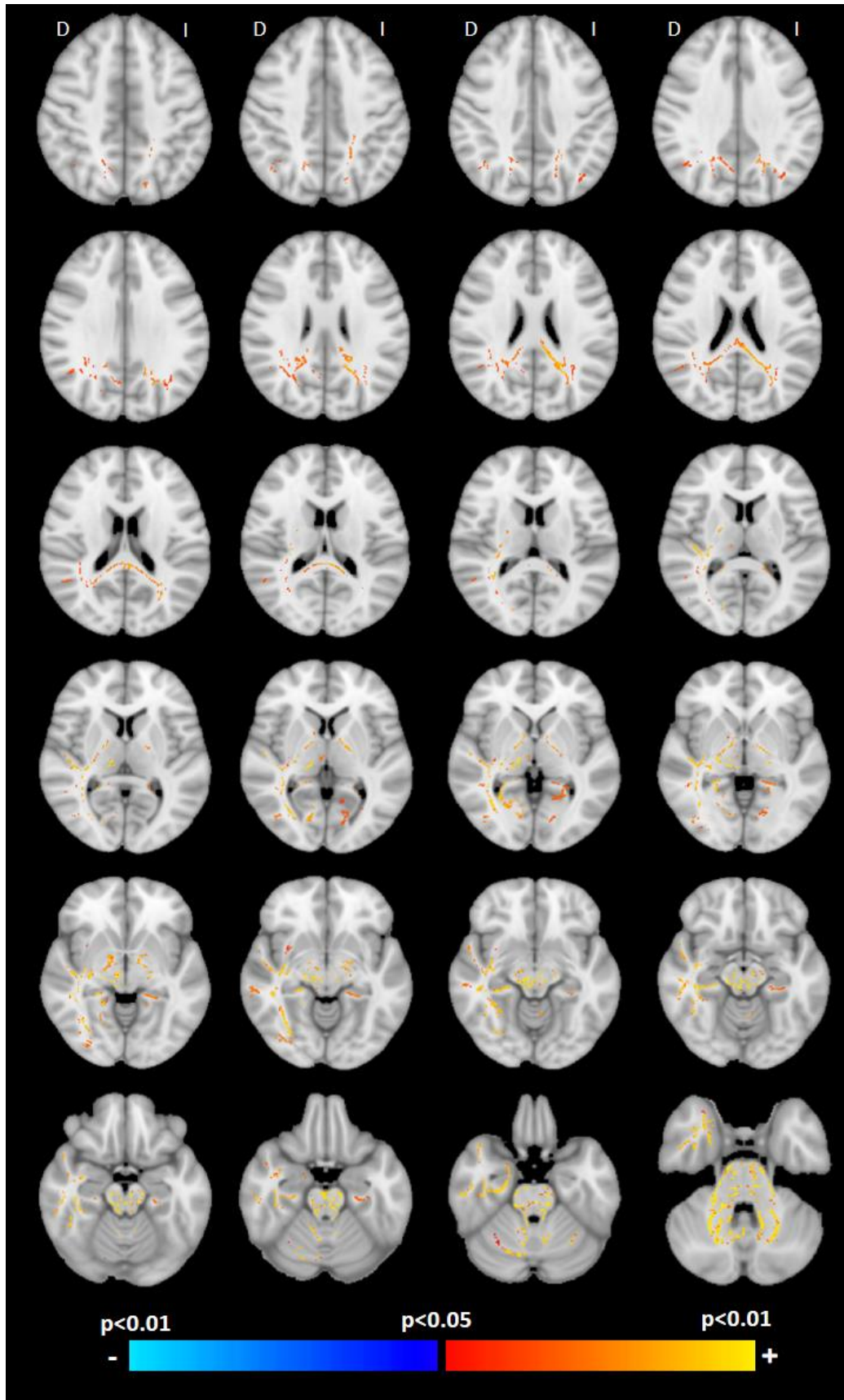
2.5 Triglicéridos y microestructura de la sustancia blanca

Los análisis revelaron cinco clústeres significativos con 23657 vóxeles en total, mostrando una asociación negativa entre TG y AxD (a mayor TG, menor AxD) (**Figura 7**). Las regiones afectadas de la SB incluyeron los pedúnculos cerebrales y cerebelosos, cuerpo y esplenio del cuerpo calloso, tracto corticoespinal, lemnisco medial, cápsula interna, corona radiata, fascículo longitudinal inferior, capsula externa, hipocampo, fórnix, fascículo uncinado, y el hemisferio derecho de la radiación talámica posterior y el fascículo longitudinal superior. El pedúnculo cerebeloso medial y la cápsula interna fueron las regiones con la mayor cantidad de vóxeles significativos. No se observó ninguna otra asociación entre TG y el resto de índices de la DTI en ninguna dirección.

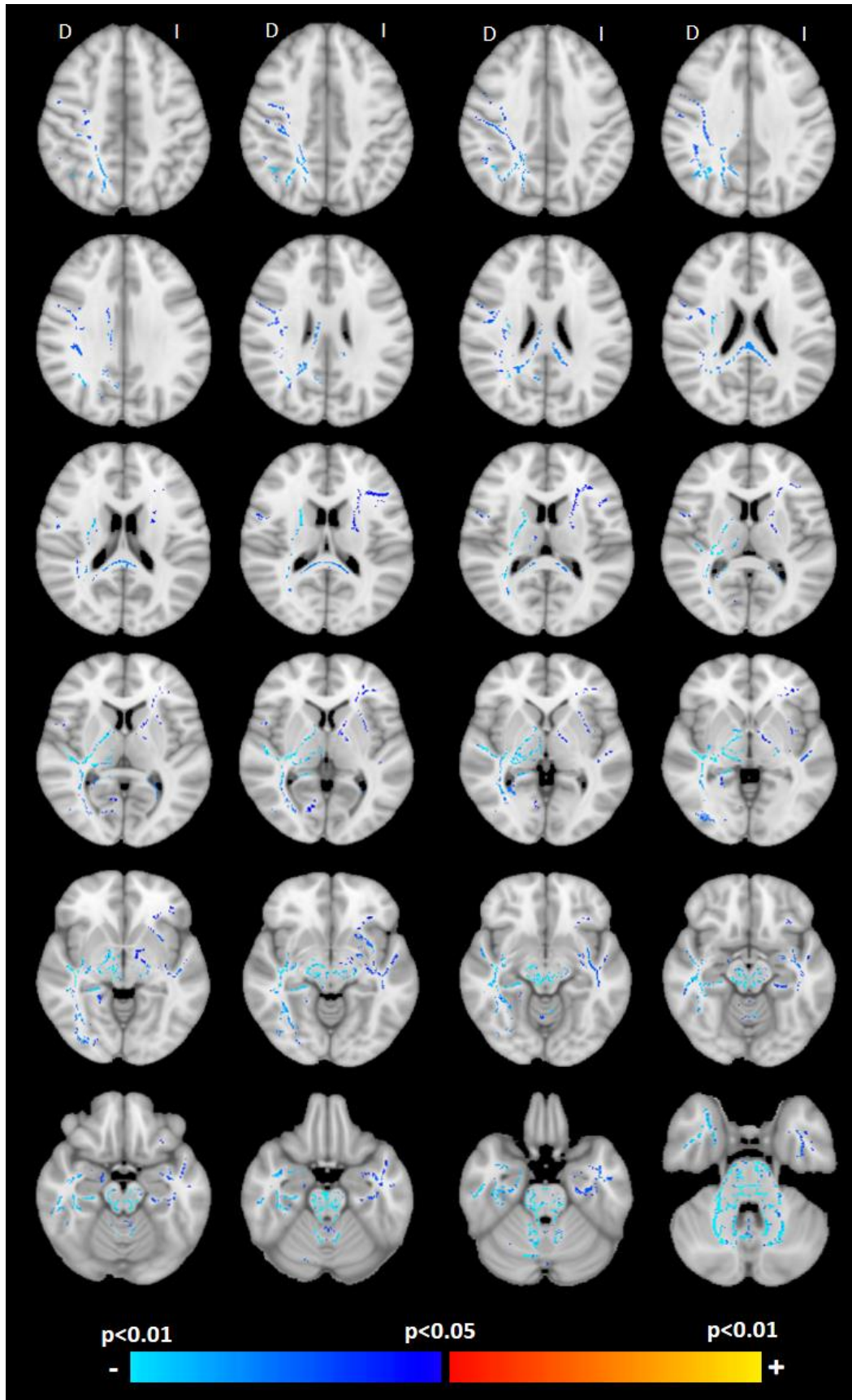
Figura 5: Asociación entre LDL y difusividad axial.

Nota: ajustado por edad, género e hiperintensidades de la sustancia blanca (corregido por *family-wise error*, $p < 0.05$, $n=273$). Los resultados se muestran sobre el modelo estándar FSL de T1. D = derecha; I = izquierda; LDL= lipoproteínas de colesterol de baja densidad.

Figura 6: Asociación entre HDL y difusividad axial.



Nota: ajustado por edad, género e hiperintensidades de la sustancia blanca (corregido por *family-wise error*, $p < 0.05$, $n=273$). Los resultados se muestran sobre el modelo estándar FSL de T1. D = derecha; I = izquierda; HDL= lipoproteínas de colesterol de alta densidad.

Figura 7: Asociación entre triglicéridos y difusividad axial.

Nota: ajustado por edad, género e hiperintensidades de la sustancia blanca (corregido por *family-wise error*, $p < 0.05$, $n = 273$). Los resultados se muestran sobre el modelo estándar FSL de T1. D = derecha; I = izquierda.

3. Efecto de las variables de confusión sobre los lípidos plasmáticos y la difusividad axial de las regiones cognitivas.

La distribución de los vóxeles significativos en la asociación entre los lípidos plasmáticos y el índice AxD de la DTI (corregido por FWE y $p < 0.05$) se muestra en la **Tabla 5**.

En este apartado se analizó el efecto del genotipo APOE, la toma de estatinas y la tensión arterial sobre la asociación entre los lípidos plasmáticos y la microestructura de la SB en los vóxeles en los que el lípido había mostrado un efecto significativo en las regiones relacionadas con la cognición.

Tabla 5: Asociación entre lípidos plasmáticos y la difusividad axial de la sustancia blanca en las regiones cognitivas.

Región (Nº de vóxeles) ^a		N de vóxeles significativos ^b		
		LDL	HDL	TG
CC	Genu (8851)	1139 (12.9%)	0	0
	Cuerpo (13711)	1500 (10.9%)	34 (0.2%)	249 (1.8%)
	Esplenio (12729)	783 (6.2%)	982 (7.7%)	779 (6.1%)
Fórnix	Columna+cuerpo (659)	0	0	0
	Cresta/estria terminal derecho (1124)	28 (2.5%)	21 (1.9%)	41 (3.6%)
	Cresta/estria terminal izquierdo (1125)	0	0	15 (1.3%)
FLI	Derecho (2228)	193 (8.7%)	211 (9.5%)	322 (14.5%)
	Izquierdo (2231)	129 (5.8%)	0	187 (8.4%)
FLS	Derecho (6607)	697 (10.5%)	162 (2.5%)	497 (7.5%)
	Izquierdo (6605)	279 (4.2%)	0	0
GC	Derecho (2342)	40 (1.7%)	0	30 (1.3%)
	Izquierdo (2751)	38 (1.4%)	0	0
Hipoc.	Derecho (1236)	128 (10.4%)	165 (13.3%)	191 (15.5%)
	Izquierdo (1155)	103 (8.9%)	170 (14.7%)	105 (9.1%)
FU	Derecho (380)	0	0	3 (0.8%)
	Izquierdo (376)	19 (5.1%)	0	36 (9.6%)

Nota: Numero de vóxeles significativos (FWE corregido y $p < 0.05$). Ajustado por edad, género e hiperintensidades de la sustancia blanca. CC = cuerpo caloso; FLI = fascículo longitudinal inferior; FLS = fascículo longitudinal superior; GC = giro cingulado; Hipoc. = hipocampo; FU = fascículo uncinado; LDL = lipoproteínas de colesterol de baja densidad; HDL = lipoproteínas de colesterol de alta densidad; TG = triglicéridos.

a. Entre paréntesis, la cantidad de vóxeles de acuerdo al atlas de la sustancia blanca ICBM-DTI-81.

b. Entre paréntesis, la proporción de los vóxeles significativos respecto al total de vóxeles en esta área.

3.1 LDL, difusividad axial de las regiones cognitivas y covariables

3.1.1 Genotipo APOE

Los portadores de APOE4 mostraron niveles de LDL significativamente superiores respecto a los no portadores (APOE+, mediana=144.50, p25-p75=127.8-175.0; APOE-, mediana=133.80; p25-p75=113.6-161.4; p=0.004).

No se hallaron diferencias significativas entre portadores y no portadores de APOE en los valores de AxD en los vóxeles en los que el LDL había mostrado un efecto significativo (**Tabla 6**).

Tabla 6: Comparación de la difusividad axial entre portadores y no portadores del genotipo APOE4

AxD	APOE		
	APOE- (n=203)	APOE+ (n=70)	p
CC-Genu	1.49 (1.44-1.53)	1.47 (1.43-1.50)	0.066
CC-Cuerpo	1.56 (1.52-1.59)	1.55 (1.53-1.59)	0.749
CC-Esplenio	1.52 (1.47-1.56)	1.51 (1.48-1.53)	0.489
FLI Dcho.	1.27 (1.23-1.32)	1.27 (1.22-1.31)	0.784
FLI Izq.	1.33 (1.29-1.38)	1.33 (1.29-1.36)	0.858
FLS Dcho.	1.13 (1.10-1.16)	1.12 (1.09-1.15)	0.137
FLS Izq.	1.11 (1.09-1.14)	1.12 (1.09-1.14)	0.996
GC Dcho.	1.18 (1.13-1.24)	1.18 (1.14-1.22)	0.699
GC Izq.	1.26 (1.19-1.34)	1.25 (1.19-1.31)	0.340
Hipoc. Dcho.	0.91 (0.81-1.00)	0.89 (0.78-0.99)	0.491
Hipoc. Izq.	0.99 (0.90-1.09)	0.97 (0.89-1.06)	0.401
FNX/ST Dcho.	1.20 (1.11-1.27)	1.16 (1.06-1.27)	0.122
FU Izq.	1.29 (1.22-1.36)	1.32 (1.26-1.37)	0.112

Nota. Mediana (p25-p75). AxD = difusividad axial; APOE+ = portador del alelo ε4 de la Apolipoproteína E; APOE- = no portador del alelo ε4 de la Apolipoproteína E; Dcho = derecho; Izq. = izquierdo; CC = cuerpo calloso; FLI = fascículo longitudinal inferior; FLS = fascículo longitudinal superior; GC = giro cingulado; Hipoc. = hipocampo; FNX/ST = fórnix/estría terminal; FU = fascículo uncinado.

3.1.2 Toma de estatinas

Los sujetos en tratamiento con estatinas, mostraron niveles significativamente inferiores de LDL que los sujetos sin tratamiento (Estatinas+, mediana=112.80, p25-p75=98.2-137.0; Estatinas-, mediana=141.60, p25-p75=120.4-166.8; p=0.000)

No se hallaron diferencias significativas en los valores de AxD entre sujetos en tratamiento y sin tratamiento de estatinas (**Tabla 7**).

Tabla 7: Comparación de la difusividad axial entre sujetos en tratamiento y sin tratamiento de estatinas.

AxD	Estatinas		p
	Estatinas – (n=227)	Estatinas + (n=33)	
CC-Genu	1.48 (1.44-1.52)	1.50 (1.44-1.54)	0.218
CC-Cuerpo	1.56 (1.52-1.58)	1.59 (1.53-1.61)	0.109
CC-Esplenio	1.51 (1.48-1.55)	1.52 (1.48-1.57)	0.324
FLI Dcho.	1.27 (1.22-1.31)	1.27 (1.24-1.34)	0.235
FLI Izq.	1.33 (1.29-1.37)	1.34 (1.30-1.37)	0.964
FLS Dcho.	1.13 (1.10-1.16)	1.13 (1.11-1.15)	0.699
FLS Izq.	1.11 (1.08-1.14)	1.13 (1.11-1.15)	0.026
GC Dcho.	1.18 (1.13-1.24)	1.18 (1.13-1.22)	0.668
GC Izq.	1.26 (1.19-1.33)	1.26 (1.18-1.33)	0.656
Hipoc. Dcho.	0.91 (0.81-1.00)	0.88 (0.80-0.99)	0.496
Hipoc. Izq.	0.99 (0.90-1.08)	0.97 (0.89-1.10)	0.785
FNX/ST Dcho.	1.19 (1.10-1.27)	1.20 (1.05-1.28)	0.524
FU Izq.	1.30 (1.22-1.37)	1.30 (1.23-1.35)	0.882

Nota. Mediana (p25-p75). AxD = difusividad axial; Estatinas + = en tratamiento con estatinas; Estatinas- = sin tratamiento con estatinas; Dcho. = derecho; Izq. = izquierdo; CC = cuerpo calloso; FLI = fascículo longitudinal inferior; FLS = fascículo longitudinal superior; GC = giro cingulado; Hipoc. = hipocampo; FNX/ST = fórnix/estría terminal; FU = fascículo uncinado.

3.1.3 Tensión arterial

No se halló ninguna asociación entre la tensión arterial y niveles de LDL ($r_s=0.034$; $p=0.576$).

Se observó una asociación positiva entre la tensión arterial y la AxD del genu del cuerpo calloso. Aunque se halló una asociación con fascículo longitudinal superior izquierdo y fórnix/estría terminal, no superó la corrección de Bonferroni (**Tabla 8**).

Tabla 8: Correlación entre la difusividad axial y tensión arterial.

AxD	MABP	
	r_s	p
CC-Genu	0.182	0.003
CC-Cuerpo	0.104	0.088
CC-Esplenio	0.008	0.891
FLI Dcho.	0.034	0.580
FLI Izq.	0.057	0.353
FLS Dcho.	-0.038	0.533
FLS Izq.	0.146	0.016
GC Dcho.	-0.046	0.452
GC Izq.	-0.028	0.648
Hipoc. Dcho.	-0.110	0.072
Hipoc. Izq.	-0.074	0.228
FNX/ST Dcho.	-0.130	0.032
FU Izq.	-0.071	0.248

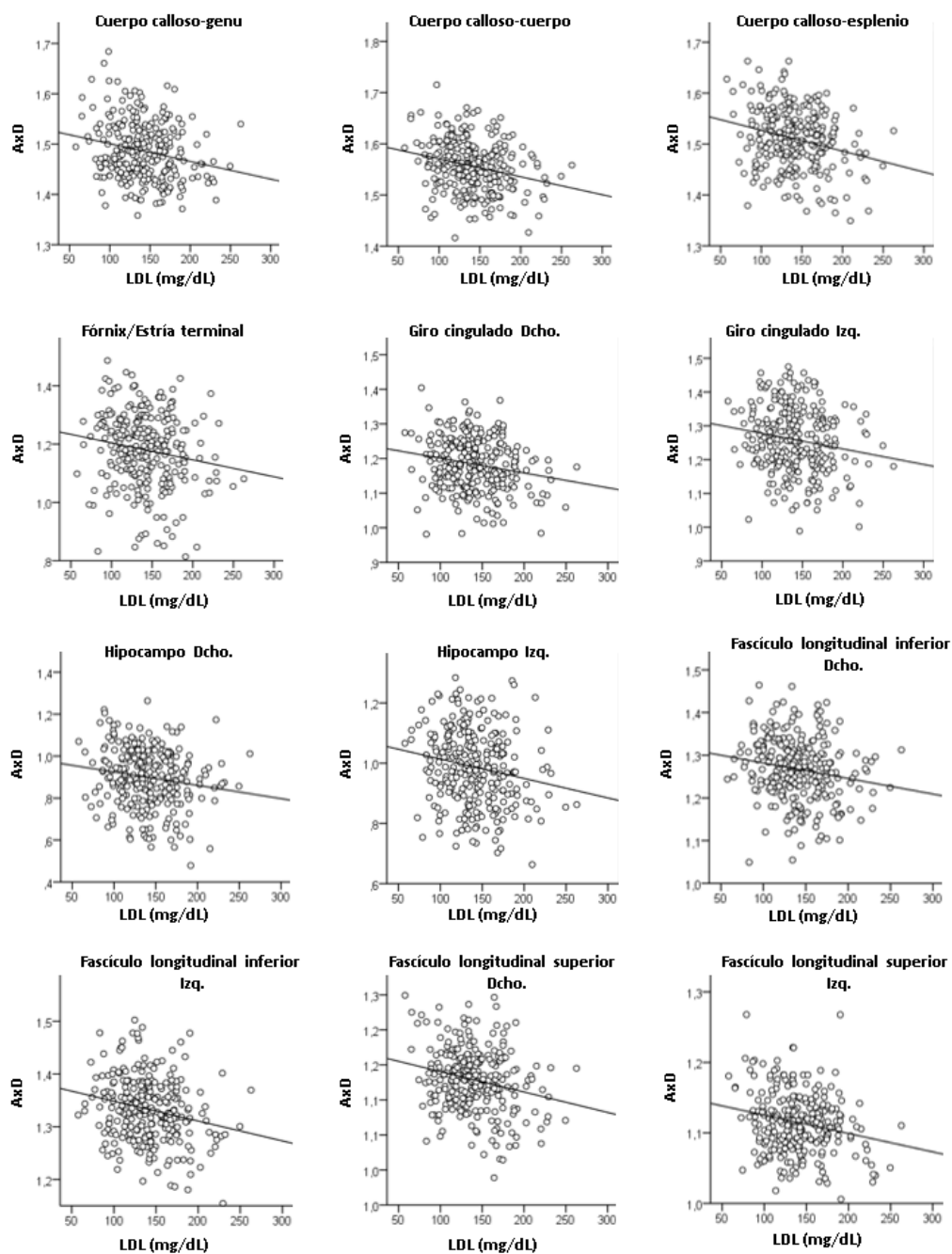
Nota. r_s =correlación Spearman; AxD = difusividad axial; MABP = tensión arterial media; Dcho. = derecho; Izq. = izquierdo; CC = cuerpo calloso; FLI = fascículo longitudinal inferior; FLS = fascículo longitudinal superior; GC = giro cingulado; Hipoc. = hipocampo; FNX/ST= fórnix/estría terminal; FU = fascículo uncinado.

Si $p < 0.004$, el valor se muestra resaltado en negrita.

3.1.4 Modelo lineal generalizado

En el modelo de regresión ajustado por edad, sexo e HSB, no se observó ningún efecto significativo del genotipo APOE, la toma de estatinas y la tensión arterial, excepto en el fascículo uncinado. Se mantuvo la asociación entre la AxD y el LDL en todas las regiones cognitivas excepto en el fascículo uncinado (**Figura 8, Tabla 9**).

Figura 8: Asociación entre difusividad axial de las regiones cognitivas y LDL.



Nota. LDL=lipoproteínas de colesterol baja densidad. Ax D = difusividad axial; Dcho. = derecho; Izq. = izquierdo.

Tabla 9: Efecto de la APOE, estatinas, MABP y LDL sobre la difusividad axial de las regiones cognitivas.

	CC-G		CC-C		CC-E		FNX/ST D			
	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a		
(Intersección)										
LDL	0.000 (-0.001-0.000)	0.000	0.000 (-0.001-0.000)	0.000	0.000 (-0.001-0.000)	0.000	-0.001 (-0.001-0.000)	0.002		
APOE4+	0.010 (-0.005-0.025)	0.210	-0.003 (-0.016-0.010)	0.671	-0.001 (-0.016-0.015)	0.949	0.007 (-0.026-0.040)	0.663		
APOE4-	0 ^b		0 ^b		0 ^b		0 ^b			
MABP	0.001 (0.000-0.001)	0.095	0.001 (0.000-0.001)	0.144	0.000 (-0.001-0.001)	0.833	-0.001 (-0.003-0.001)	0.183		
Estatinas +	0.002 (-0.019-0.022)	0.887	0.001 (-0.017-0.019)	0.923	0.004 (-0.017-0.026)	0.690	0.032 (-0.014-0.078)	0.173		
Estatinas -	0		0		0		0			
	CG D		CG I		Hipoc. D		Hipoc. I			
	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a		
(Intersección)										
LDL	-0.001 (-0.001-0.000)	0.000	0.000 (-0.001-0.000)	0.006	-0.001 (-0.001-0.000)	0.002	-0.001 (-0.001-0.000)	0.004		
APOE4+	-0.011 (-0.032-0.010)	0.304	0.004 (-0.023-0.032)	0.769	-0.008 (-0.045-0.029)	0.661	0.000 (-0.036-0.035)	0.979		
APOE4-	0 ^b		0 ^b		0 ^b		0 ^b			
MABP	0.000 (-0.001-0.001)	0.632	-0.001 (-0.002-0.001)	0.285	0.000 (-0.002-0.002)	0.740	0.000 (-0.002-0.001)	0.622		
Estatinas +	0.025 (-0.004-0.054)	0.089	0.021 (-0.017-0.059)	0.284	0.006 (-0.045-0.057)	0.805	0.018 (-0.031-0.067)	0.480		
Estatinas -	0 ^b		0 ^b		0 ^b		0 ^b			
	FLI D		FLI I		FLS D		FLS I		FU I	
	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a
(Intersección)										
LDL	0.000 (-0.001-0.000)	0.005	0.000 (-0.001-0.000)	0.000	0.000 (0.000-0.000)	0.001	0.000 (0.000-0.000)	0.001	0.000 (-0.001-0.000)	0.093
APOE4+	-0.005 (-0.025-0.015)	0.649	-0.006 (-0.022-0.011)	0.520	0.007 (-0.006-0.019)	0.297	-0.003 (-0.014-0.009)	0.634	-0.039 (-0.069--0.008)	0.014
APOE4-	0 ^b		0 ^b		0 ^b		0 ^b		0 ^b	
MABP	0.001 (0.000-0.002)	0.132	0.000 (-0.001-0.001)	0.987	0.000 (-0.001-0.001)	0.664	0.001 (0.000-0.001)	0.063	0.000 (-0.002-0.001)	0.558
Estatinas +	-0.007 (-0.035-0.021)	0.606	0.013 (-0.010-0.037)	0.257	-0.001 (-0.018-0.016)	0.897	-0.004 (-0.020-0.012)	0.631	-0.005 (-0.047-0.038)	0.834
Estatinas -	0 ^b		0 ^b		0 ^b		0 ^b		0 ^b	

Nota. La difusividad axial se introdujo como variable dependiente. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; LDL=lipoproteínas de colesterol de baja densidad; APOE+ = portador del alelo ε4 de la apolipoproteína E; APOE- = no portador del alelo ε4 de la apolipoproteína; Estatinas + = en tratamiento con estatinas; Estatinas - = sin tratamiento con estatinas; MABP = tensión arterial media; D = derecho; I = izquierdo; CC-G = cuerpo calloso-genu; CC-C = cuerpo calloso-cuerpo; CC-E = cuerpo calloso-espleno; FLI = fascículo longitudinal inferior; FLS = fascículo longitudinal superior; GC = giro cingulado; Hipoc. = hipocampo; FNX/ST = fórnix/estria terminal; FU = fascículo uncinado.

Si p < .05, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Modelo lineal generalizado ajustado por edad, sexo e hiperintensidades de la sustancia blanca.

^b Establecido en 0 ya que este parámetro es redundante.

3.2 HDL, difusividad axial de las regiones cognitivas y covariables

3.2.1 Genotipo APOE

Los portadores de la APOE4 mostraron niveles de HDL significativamente inferiores respecto a los no portadores (APOE+, media=64.17, DE=18.14; APOE-, media=69.17; DE=17.28; p=0.041).

No se hallaron diferencias significativas entre portadores y no portadores de APOE4 en los valores de AxD en los vóxeles en los que el HDL había mostrado un efecto significativo (**Tabla 10**).

Tabla 10: Comparación de la difusividad axial entre portadores y no portadores del genotipo APOE4.

AxD	APOE		
	APOE- (n=203)	APOE+ (n=70)	p
CC-Cuerpo	1.60 (1.55-1.66)	1.59 (1.51-1.65)	0.097
CC-Esplenio	1.50 (1.46-1.54)	1.49 (1.45-1.53)	0.113
FLI Dcho.	1.23 (1.20-1.28)	1.24 (1.19-1.29)	0.826
FLS Dcho.	1.27 (1.23-1.30)	1.26 (1.23-1.29)	0.584
Hipoc. Dcho.	0.92 (0.82-1.00)	0.90 (0.77-1.02)	0.458
Hipoc. Izq.	0.98 (0.90-1.07)	0.98 (0.91-1.08)	0.883
FNX/ST Dcho.	1.23 (1.14-1.34)	1.21 (1.11-1.32)	0.384

Nota. Mediana (p25-p75). AxD = difusividad axial; APOE+ = portador del alelo ε4 de la apolipoproteína E; APOE- = no portador del alelo ε4 de la apolipoproteína E; Dcho. = derecho; Izq. = izquierdo; CC = cuerpo calloso; FLI = fascículo longitudinal inferior; FLS = fascículo longitudinal superior; Hipoc. = hipocampo; FNX/ST= fórnix/estría terminal; FU= fascículo uncinado.

3.2.2 Toma de estatinas

No se observaron diferencias significativas en los niveles de HDL entre los sujetos en tratamiento con estatinas y sin tratamiento (Estatinas+, media=69.39, DE=19.59; Estadinas-, media=67.74, DE=17.35; p=0.615).

No se hallaron diferencias significativas en los valores de AxD entre sujetos en tratamiento y sin tratamiento de estatinas (**Tabla 11**).

Tabla 11: Comparación de la difusividad axial entre sujetos en tratamiento y sin tratamiento de estatinas.

AxD	Estatinas		p
	Estatinas- (n=203)	Estatinas+ (n=70)	
CC-Cuerpo	1.60 (1.54-1.66)	1.63 (1.55-1.66)	0.494
CC-Esplenio	1.50 (1.45-1.53)	1.50 (1.46-1.55)	0.465
FLI Dcho.	1.24 (1.20-1.28)	1.24 (1.18-1.30)	0.415
FLS Dcho.	1.26 (1.23-1.30)	1.28 (1.24-1.33)	0.103
Hipoc. Dcho.	0.92 (0.81-1.01)	0.89 (0.79-0.99)	0.281
Hipoc. Izq.	0.98 (0.91-1.07)	0.94 (0.89-1.03)	0.195
FNX/ST Dcho.	1.23 (1.14-1.33)	1.20 (1.07-1.34)	0.309

Nota. Mediana (p25-p75). AxD = difusividad axial; Estatinas + = en tratamiento con estatinas; Estatinas- = sin tratamiento con estatinas; Dcho. = derecho; Izq. = izquierdo; CC = cuerpo caloso; FLI = fascículo longitudinal inferior; FLS = fascículo longitudinal superior; Hipoc. = hipocampo; FNX/ST = fórnix/estria terminal; FU = fascículo uncinado.

3.2.3 Tensión arterial

Se halló una asociación negativa entre la tensión arterial y niveles de HDL ($r_s = -0.145$; $p = 0.017$)

Se observó una asociación negativa entre la tensión arterial y la AxD del fórnix/estria terminal. Aunque se halló una asociación negativa también con el hipocampo derecho, no superó la corrección de Bonferroni (**Tabla 12**).

Tabla 12: Correlación entre la difusividad axial y tensión arterial.

AxD	MABP	
	r_s	p
CC-Cuerpo	-0.059	0.337
CC-Esplenio	0.000	0.995
FLI Dcho.	0.010	0.868
FLS Dcho.	-0.062	0.311
Hipoc. Dcho.	-0.140	0.022
Hipoc. Izq.	-0.027	0.654
FNX/ST Dcho.	-0.175	0.004

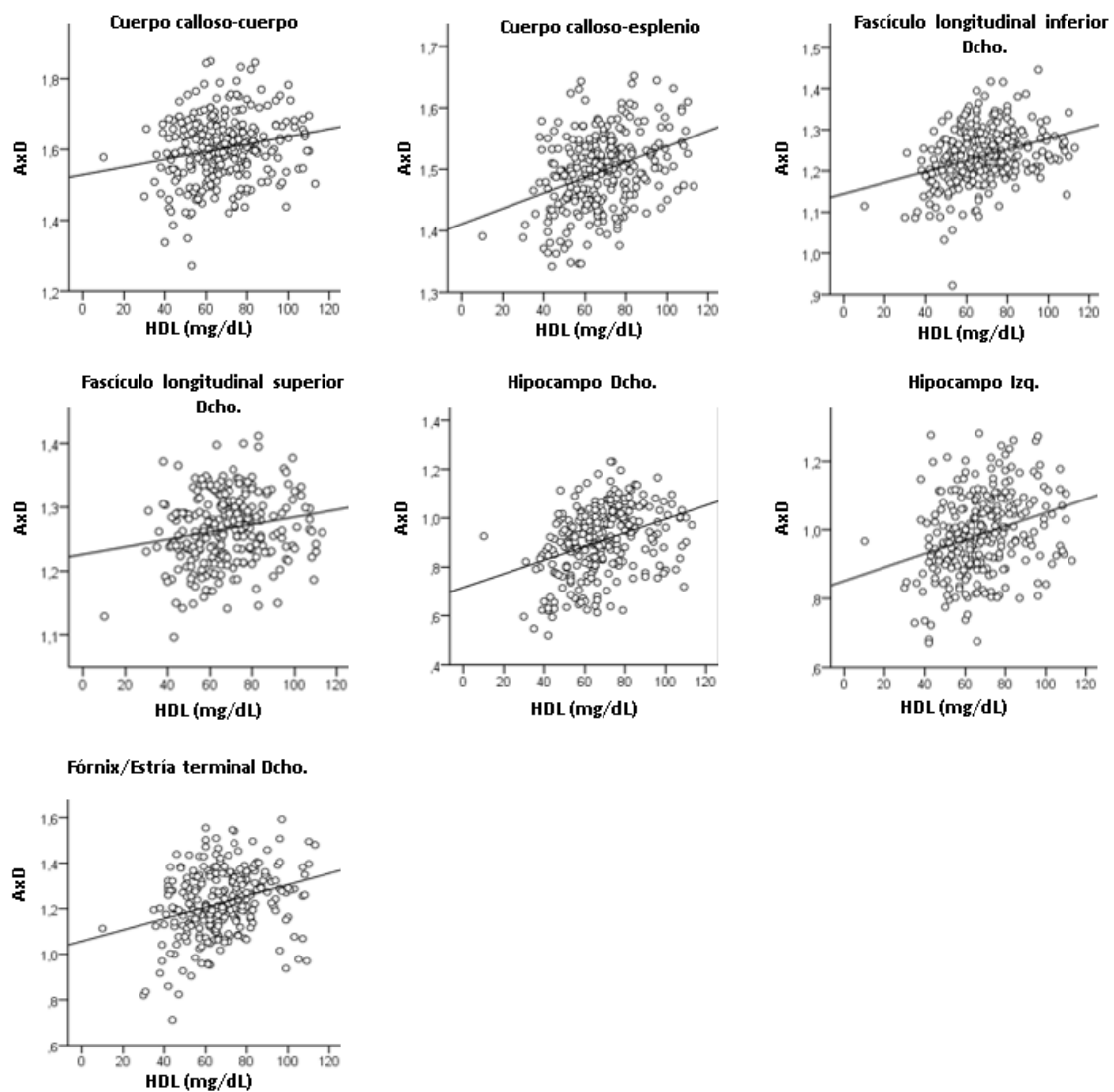
Nota. r_s = correlación Spearman; AxD = difusividad axial; MABP = tensión arterial media; Dcho. = derecho; Izq. = izquierdo; CC = cuerpo caloso; FLI = fascículo longitudinal inferior; FLS = fascículo longitudinal superior; GC = giro cingulado; Hipoc. = hipocampo; FNX/ST = fórnix/estria terminal; FU = fascículo uncinado.

Si $p < 0.007$, el valor se muestra resaltado en negrita.

3.2.4 Modelo lineal generalizado

En el modelo de regresión ajustado por edad, sexo e HSB blanca, no se observó ningún efecto significativo del genotipo APOE, y la tensión arterial (**Figura 9, Tabla 13**). Se mantuvo la asociación entre la AxD y el HDL en todas las regiones involucradas en los procesos de cognición.

Figura 9: Asociación entre difusividad axial de las regiones cognitivas y HDL.



Nota. HDL=lipoproteínas de colesterol de alta densidad. AxD = difusividad axial; Dcho. = derecho; Izq. = izquierdo.

Tabla 13: Efecto del APOE, MABP y HDL sobre la difusividad axial de las regiones cognitivas.

	CC-C		CC-E			
	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a		
(Intersección)	1.565 (1.41-1.72)	0.000	1.324 (1.23-1.42)	0.000		
HDL	0.001 (0.00-0.00)	0.021	0.001 (0.00-0.00)	0.000		
APOE4+	0.020 (0.00-0.05)	0.107	0.007 (-0.01-0.02)	0.386		
APOE4-	0 ^b		0 ^b			
MABP	-0.001 (0.00-0.00)	0.263	0.000 (0.00-0.00)	0.896		
	FLI D		FLS D			
	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a		
(Intersección)	1.051 (0.94-1.16)	0.000	1.229 (1.14-1.32)	0.000		
HDL	0.001 (0.00-0.00)	0.000	0.001 (0.00-0.00)	0.000		
APOE4+	-0.012 (-0.03-0.01)	0.198	0.000 (-0.01-0.01)	0.976		
APOE4-	0 ^b		0 ^b			
MABP	0.001 (0.00-0.00)	0.110	0.000 (0.00-0.00)	0.276		
	Hipoc. D		Hipoc. I		FNX/ST D	
	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a
(Intersección)	0.957 (0.75-1.16)	0.000	0.919 (0.73-1.11)	0.000	1.268 (1.04-1.50)	0.000
HDL	0.002 (0.00-0.00)	0.000	0.002 (0.00-0.00)	0.000	0.002 (0.00-0.00)	0.001
APOE4+	0.001 (-0.03-0.03)	0.945	0.002 (-0.03-0.03)	0.898	0.009 (-0.03-0.05)	0.627
APOE4-	0 ^b		0 ^b		0 ^b	
MABP	-0.001 (0.00-0.00)	0.564	0.000 (0.00-0.00)	0.694	-0.002 (0.00-0.00)	0.135

Nota. La difusividad axial se introdujo como variable dependiente. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; HDL=lipoproteínas de colesterol de alta densidad; APOE+= portador del alelo ε4 de la apolipoproteína E; APOE- = no portador del alelo ε4 de la apolipoproteína; MABP = tensión arterial media; D = derecho; I = izquierdo; CC-C = cuerpo calloso-cuerpo; CC-E = cuerpo calloso-espleno; FLI = fascículo longitudinal inferior; FLS = fascículo longitudinal superior; Hipoc. = hipocampo; FNX/ST= fórnix/estría terminal.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Modelo lineal generalizado ajustado por edad, sexo e hiperintensidades de la sustancia blanca.

^b Establecido en 0 ya que este parámetro es redundante.

3.3 Triglicéridos, difusividad axial de las regiones cognitivas y covariables

3.3.1 Genotipo APOE

Los portadores de APOE4 mostraron niveles significativamente superiores de TG respecto a los no portadores (APOE+, mediana=88.00, p25-p75=66.00-113.00; APOE-, mediana=77; p25-p75=60.00-103.00; p=0.033).

No se hallaron diferencias significativas entre portadores y no portadores de APOE4 en los valores de AxD en los vóxeles en los que los TG habían mostrado un efecto significativo (**Tabla 14**).

Tabla 14: Comparación de la difusividad axial entre portadores y no portadores del genotipo APOE4.

AxD	APOE		
	APOE- (n=203)	APOE+ (n=70)	p
CC-Cuerpo	1.65 (1.61-1.69)	1.65 (1.59-1.68)	0.366
CC-Esplenio	1.52 (1.47-1.57)	1.52 (1.47-1.55)	0.183
FLI Dcho.	1.24 (1.20-1.29)	1.24 (1.21-1.28)	0.815
FLI Izq.	1.31 (1.27-1.35)	1.31 (1.27-1.35)	0.861
FLS Dcho.	1.18 (1.15-1.22)	1.18 (1.13-1.21)	0.200
GC Dcho.	1.25 (1.18-1.30)	1.24 (1.17-1.30)	0.680
Hipoc. Dcho.	0.92 (0.83-1.01)	0.91 (0.77-1.01)	0.439
Hipoc. Izq.	0.98 (0.88-1.07)	0.98 (0.86-1.10)	0.873
FNX/ST Dcho.	1.18 (1.10-1.26)	1.15 (1.03-1.24)	0.114
FNX/ST Izq.	1.35 (1.29-1.42)	1.33 (1.27-1.38)	0.052
FU Dcho.	1.10 (1.05-1.17)	1.09 (1.04-1.16)	0.538
FU Izq.	1.29 (1.21-1.36)	1.32 (1.26-1.37)	0.057

Nota. Mediana (p25-p75). AxD = difusividad axial; APOE+= portador del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E; APOE- = no portador del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E; Dcho.= derecho; Izq. = izquierdo; CC = cuerpo calloso; FLI = fascículo longitudinal inferior; FLS = fascículo longitudinal superior; GC = giro cingulado; Hipoc. = hipocampo; FNX/ST = fórnix/estría terminal; FU = fascículo uncinado.

3.3.2 Toma de estatinas

No se observaron diferencias significativas en los niveles de TG entre los sujetos en tratamiento con estatinas y sin tratamiento (Estatinas+, mediana=91.00, p25-p75=69.00-125.00; Estatinas-, mediana=81.00, p25-p75=60.00-103.00; p=0.078).

No se hallaron diferencias significativas en los valores de AxD entre sujetos en tratamiento y sin tratamiento de estatinas (**Tabla 15**).

Tabla 15: Comparación de la difusividad axial entre sujetos en tratamiento y sin tratamiento de estatinas.

AxD	Estatinas		p
	Estatinas- (n=203)	Estatinas+ (n=70)	
CC-Cuerpo	1.65 (1.61-1.69)	1.63 (1.59-1.71)	1.000
CC-Esplenio	1.52 (1.47-1.56)	1.53 (1.47-1.57)	0.434
FLI Dcho.	1.24 (1.20-1.28)	1.26 (1.19-1.31)	0.306
FLI Izq.	1.31 (1.27-1.35)	1.31 (1.26-1.35)	0.643
FLS Dcho.	1.18 (1.14-1.21)	1.17 (1.15-1.20)	0.457
GC Dcho.	1.25 (1.18-1.30)	1.27 (1.16-1.32)	0.188
Hipoc. Dcho.	0.92 (0.82-1.01)	0.88 (0.74-0.98)	0.340
Hipoc. Izq.	0.98 (0.88-1.07)	0.97 (0.83-1.07)	0.338
FNX/ST Dcho.	1.17 (1.10-1.26)	1.15 (1.03-1.26)	0.383
FNX/ST Izq.	1.35 (1.29-1.41)	1.34 (1.27-1.41)	0.719
FU Dcho.	1.10 (1.05-1.17)	1.09 (1.01-1.16)	0.200
FU Izq.	1.29 (1.22-1.37)	1.29 (1.21-1.35)	0.593

Nota. Mediana (p25-p75). AxD = difusividad axial; Estatinas + = en tratamiento con estatinas; Estatinas- = sin tratamiento con estatinas; Dcho. = derecho; Izq. = izquierdo; CC = cuerpo caloso; FLI = fascículo longitudinal inferior; FLS = fascículo longitudinal superior; GC = giro cingulado; Hipoc. = hipocampo; FNX/ST = fórnix/estría terminal; FU = fascículo uncinado.

3.3.3 Tensión arterial

Se halló una asociación positiva entre la tensión arterial y niveles de TG ($r_s=0.243$; $p=0.000$).

Se observó una asociación negativa entre la tensión arterial y la AxD del fórnix/estría terminal aunque no superó la corrección de Bonferroni (**Tabla 16**).

Tabla 16: Correlación entre la difusividad axial y tensión arterial.

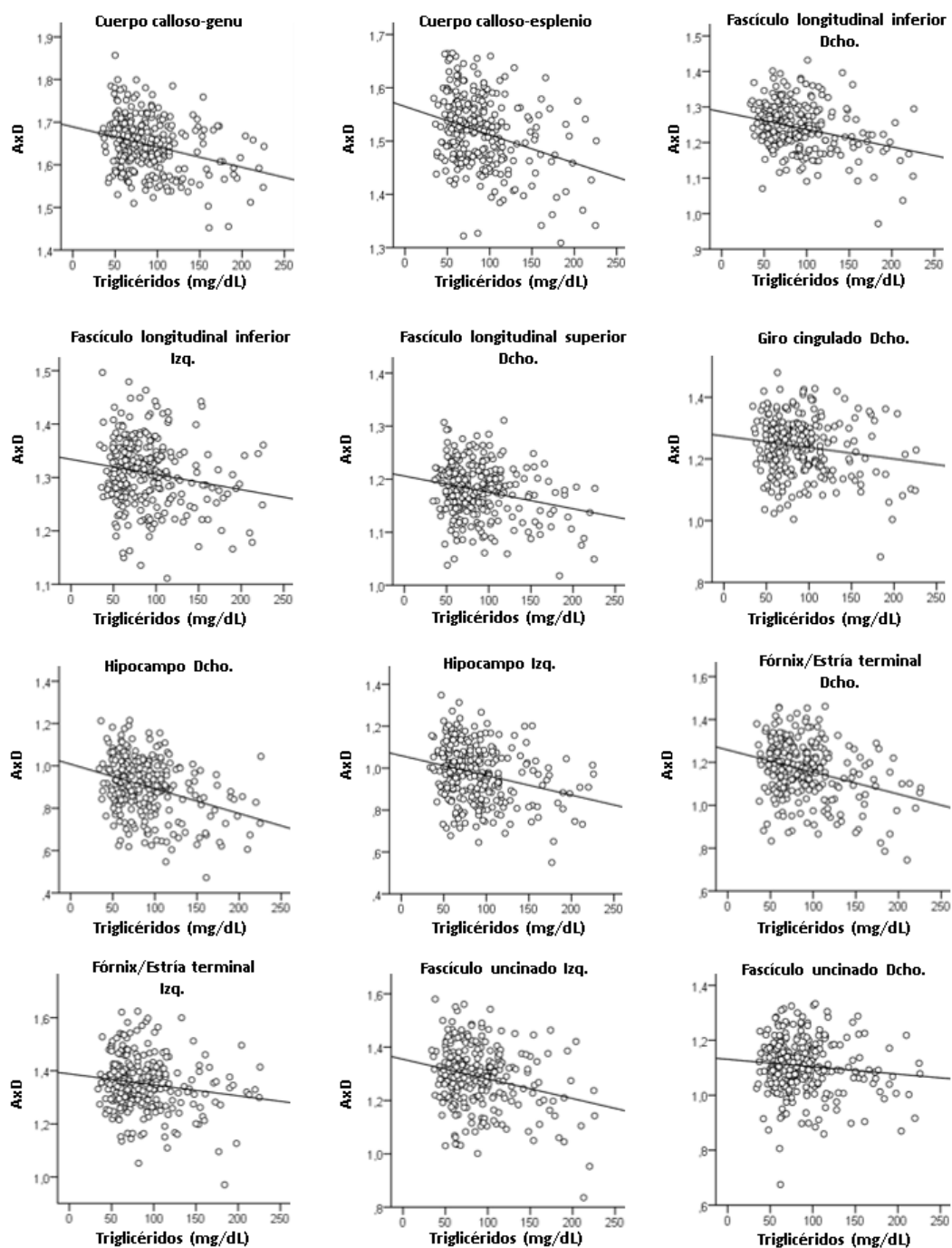
AxD	MABP	
	r_s	p
CC-Cuerpo	-0.056	0.360
CC-Esplenio	-0.045	0.459
FLI Dcho.	-0.005	0.938
FLI Izq.	0.065	0.284
FLS Dcho.	-0.039	0.528
GC Dcho.	-0.004	0.944
Hipoc. Dcho.	-0.143	0.019
Hipoc. Izq.	-0.085	0.164
FNX/ST Dcho.	-0.140	0.022
FNX/ST Izq.	-0.073	0.232
FU Dcho.	0.056	0.357
FU Izq.	-0.099	0.105

Nota. r_s , correlación Spearman; AxD = difusividad axial; MABP = tensión arterial media; Dcho.= derecho; Izq. = izquierdo; CC = cuerpo caloso; FLI = fascículo longitudinal inferior; FLS = fascículo longitudinal superior; GC = giro cingulado; Hipoc. = hipocampo; FNX/ST= fórnix/estría terminal; FU = fascículo uncinado.

3.3.4 Modelo lineal generalizado

En el modelo de regresión ajustado por edad, sexo e HSB, no se observó ningún efecto significativo del genotipo APOE, y la tensión arterial. Se mantuvo la asociación entre la AxD y TG en todas las regiones involucradas con los procesos de cognición, excepto en el fascículo uncinado derecho (**Figura 10, Tabla 17**).

Figura 10: Asociación entre difusividad axial de las regiones cognitivas y triglicéridos.



Nota. AxD = difusividad axial; Dcho. = derecho; Izq. = izquierdo.

Tabla 17: Efecto de la APOE, MABP y triglicéridos sobre la difusividad axial de las regiones cognitivas.

	CC-C		CC-E		FLI D	
	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a
(Intersección)	1.593 (1.50-1.69)	0.000	1.460 (1.36-1.56)	0.000	1.152 (1.05-1.25)	0.000
TG	0.000 (0.00-0.00)	0.000	0.000 (0.00-0.00)	0.000	0.000 (0.00-0.00)	0.000
APOE4+	0.003 (-0.01-0.02)	0.716	0.006 (-0.01-0.02)	0.459	-0.009 (-0.03-0.01)	0.294
APOE4-	0 ^b		0 ^b		0 ^b	
MABP	0.000 (0.00-0.00)	0.989	0.000 (0.00-0.00)	0.955	0.001 (0.00-0.00)	0.083
	FLI I		FLS D		GC D	
	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a
(Intersección)	1.276 (1.18-1.38)	0.000	1.150 (1.07-1.23)	0.000	1.165 (1.02-1.31)	0.000
TG	0.000 (0.00-0.00)	0.000	0.000 (0.00-0.00)	0.000	0.000 (0.00-0.00)	0.028
APOE4+	-0.002 (-0.02-0.02)	0.843	0.006 (-0.01-0.02)	0.378	0.000 (-0.02-0.02)	1.000
APOE4-	0 ^b		0 ^b		0 ^b	
MABP	0.000 (0.00-0.00)	0.438	0.000 (0.00-0.00)	0.547	0.000 (0.00-0.00)	0.955
	Hipoc. D		Hipoc. I		FNX/ST D	
	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a
(Intersección)	1.068 (0.87-1.26)	0.000	1.165 (0.95-1.38)	0.000	1.242 (1.05-1.44)	0.000
TG	-0.001 (0.00-0.00)	0.000	-0.001 (0.00-0.00)	0.001	-0.001 (0.00-0.00)	0.001
APOE4+	0.003 (-0.03-0.04)	0.859	-0.006 (-0.04-0.03)	0.728	0.024 (-0.01-0.06)	0.165
APOE4-	0 ^b		0 ^b		0 ^b	
MABP	0.000 (0.00-0.00)	0.944	0.000 (0.00-0.00)	0.900	-0.001 (0.00-0.00)	0.599
	FNX/ST I		FUD		FU I	
	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a
(Intersección)	1.495 (1.34-1.65)	0.000	0.989 (0.83-1.15)	0.000	1.416 (1.24-1.59)	0.000
TG	0.000 (0.00-0.00)	0.031	0.000 (0.00-0.00)	0.101	-0.001 (0.00-0.00)	0.002
APOE4+	0.027 (0.00-0.05)	0.055	0.009 (-0.02-0.04)	0.524	-0.039 (-0.07--0.01)	0.010
APOE4-	0 ^b		0 ^b		0 ^b	
MABP	-0.001 (0.00-0.00)	0.355	0.001 (0.00-0.00)	0.481	0.000 (0.00-0.00)	0.973

Nota. La difusividad axial se introdujo como variable dependiente. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; APOE+ = portador del alelo ε4 de la apolipoproteína E; APOE- = no portador del alelo ε4 de la apolipoproteína; MABP = tensión arterial media; D = derecho; I = izquierdo; CC-C = cuerpo calloso-cuerpo; CC-E = cuerpo calloso-esplenio; FLI = fascículo longitudinal inferior; FLS = fascículo longitudinal superior; Hipoc. = hipocampo; GC = giro cingulado; FNX/ST = fórnix/estría terminal; FU = fascículo uncinado; TG = triglicéridos.

Si p < .05, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Modelo lineal generalizado ajustado por edad, sexo e hiperintensidades de la sustancia blanca.

^b Establecido en 0 ya que este parámetro es redundante.

4. Lípidos plasmáticos, difusividad axial y neurofilamento

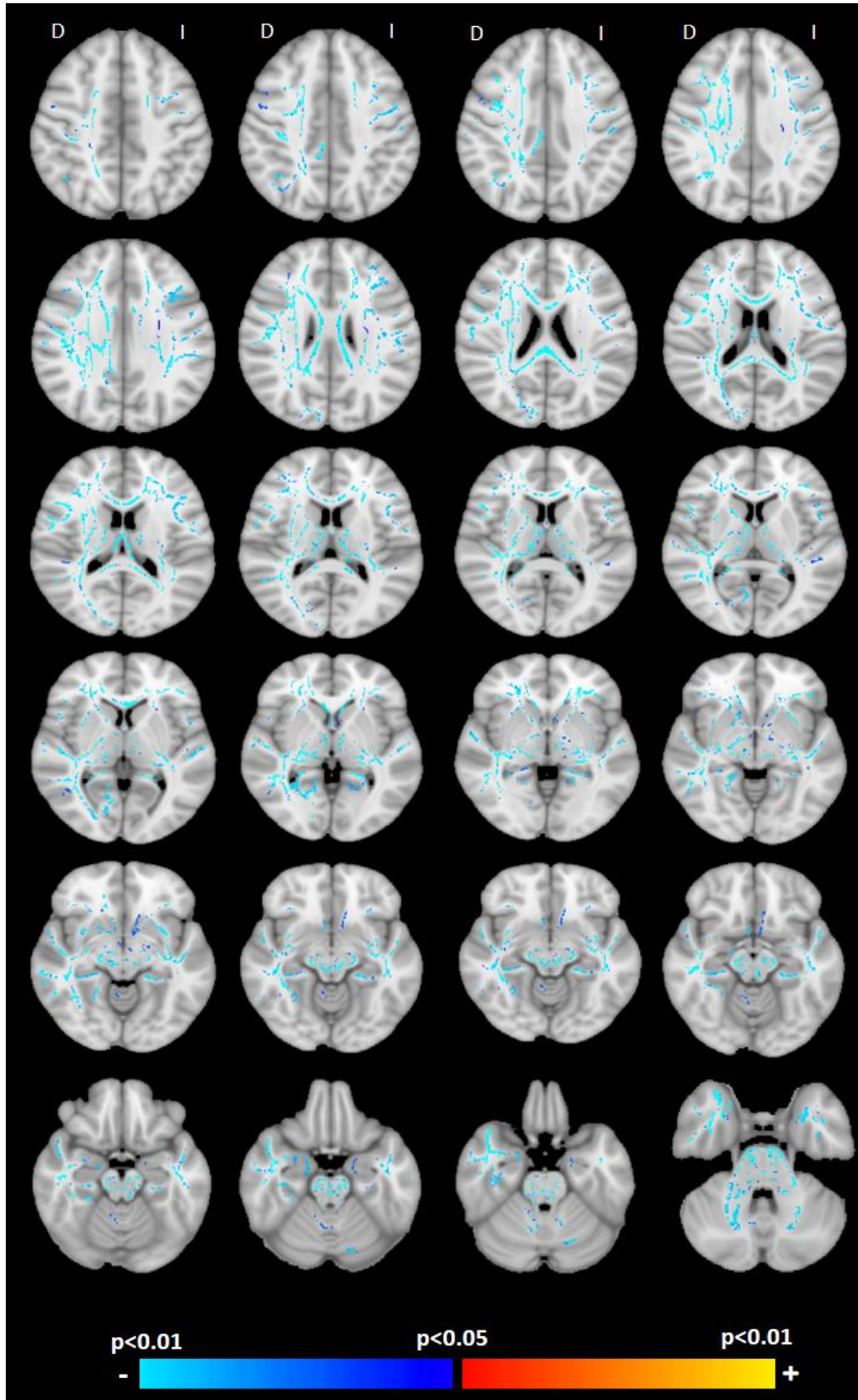
4.1 Asociación entre el neurofilamento y la difusividad axial

Debido a que el índice de la AxD se relaciona con el daño axonal^{72,73}, se analizó el efecto del NfL, marcador de daño axonal, sobre la AxD de la SB. Para ello, se llevaron a cabo análisis estadísticos a nivel de vóxel en todo el cerebro mediante interferencia de permutación no paramétrica. Los análisis se corrigieron por edad, género e HSB.

El análisis reveló dos clústeres significativos con 55089 vóxeles en total, mostrando una asociación negativa entre el NfL y la AxD (a mayor NfL, menor AxD) en todas las regiones de la SB en ambos hemisferios (**Figura 11**).

Como los resultados mostraron una asociación negativa entre el NfL y la AxD, se analizó el efecto de los lípidos plasmáticos sobre la asociación entre la AxD y el NfL en los vóxeles de las regiones cognitivas en los que el lípido plasmático mostró un efecto significativo. Para ello se realizaron MLG corregidos por edad, sexo e HSB.

Figura 11: Asociación entre NfL y difusividad axial.



Nota: ajustado por edad, género e hiperintensidades de la sustancia blanca (corregido por *family-wise error*, $p < 0.05$, $n = 273$). Los resultados se muestran sobre el modelo estándar FSL de T. NfL = neurofilamento de cadena ligera; D = derecho; I = izquierdo.

4.2 Efecto del LDL y la difusividad axial sobre el neurofilamento

El análisis univariante no muestra ninguna asociación significativa entre el LDL y NfL ($r_s = 0.068$; $p = 0.457$)

Al introducir el LDL, AxD y la interacción LDL*AxD en el modelo, se halló un efecto significativo de la interacción LDL*AxD sobre el NfL en el genu y cuerpo del cuerpo calloso y la parte derecha del giro cingulado, fórnix/estría terminal y fascículo longitudinal superior. En estas regiones, excepto en el fascículo longitudinal superior, el LDL y la AxD también mostraron un efecto significativo (**Tabla 18**).

Con el fin de profundizar la asociación entre el LDL, AxD y NfL en estas regiones significativas, se exploró el efecto moderador del LDL. Los análisis de moderación mostraron que el LDL era un moderador de la asociación entre el nivel de NfL y la AxD (a menor nivel de LDL, mayor es la asociación negativa entre el NfL y AxD) en el cuerpo del cuerpo calloso, ($B = 14.706$, IC del 95% [0.636, 28.777], $t = 2.070$, $p = 0.041$), giro cingulado derecho ($B = 9.80$, IC del 95% [0.409, 19.198], $t = 2.067$, $p = 0.041$), fórnix/estría terminal derecha ($B = 6.431$, IC del 95% [0.838, 12.024], $t = 2.277$, $p = 0.025$) y fascículo longitudinal superior derecho ($B = 16.984$, IC del 95% [2.691, 31.276], $t = 2.354$, $p = 0.020$).

Tabla 18: Efecto del LDL y la difusividad sobre el neurofilamento.

	CC-G		CC-C		CC-E		FNX/ST D	
	B (95%CI)	p ^a	B (95%CI)	p ^a	B (95%CI)	p ^a	B (95%CI)	p ^a
(Intersección)	3301.234 (407.44-6195.03)	0.025	4316.956 (1268.54-7365.37)	0.006	2576.012 (688.61-4463.41)	0.007	1003.299 (73.76-1932.84)	0.034
LDL	-19.48 (-38.93--0.03)	0.049	-22.87 (-43.75--1.99)	0.032	-11.87 (-24.69-0.94)	0.069	-7.43 (-13.68--1.18)	0.020
AxD	-2417.19 (-4381.54--452.83)	0.016	-2972.92 (-4940.28--1005.56)	0.003	-1915.97 (-3179.38--652.57)	0.003	-1072.02 (-1858.26--285.79)	0.008
LDL*AxD	13.21 (0.03-26.39)	0.049	14.71 (1.19-28.22)	0.033	7.79 (-0.78-16.37)	0.075	6.43 (1.06-11.80)	0.019
	GC D		GC I		Hipoc. D			
	B (95%CI)	p ^a	B (95%CI)	p ^a	B (95%CI)	p ^a		
(Intersección)	1965.511 (442.74-3488.28)	0.011	1242.841 (-60.20-2545.88)	0.062	-60.916 (-821.09-699.26)	0.875		
LDL	-11.38 (-21.82--0.95)	0.033	-7.87 (-16.56-0.82)	0.076	-0.14 (-4.99-4.72)	0.956		
AxD	-1924.65 (-3252.35--596.95)	0.004	-1174.29 (-2205.86--142.72)	0.026	-135.03 (-916.28-646.22)	0.735		
LDL*AxD	9.80 (0.78-18.83)	0.033	6.37 (-0.65-13.39)	0.075	0.12 (-5.23-5.47)	0.966		
	Hipoc. I		FLI D		FLI I			
	B (95%CI)	p ^a	B (95%CI)	p ^a	B (95%CI)	p ^a		
(Intersección)	240.205 (-648.76-1129.17)	0.596	1052.621 (-658.75-2764.00)	0.228	-47.540 (-2353.24-2258.16)	0.968		
LDL	-1.10 (-6.67-4.46)	0.697	-4.89 (-16.90-7.12)	0.425	1.06 (-14.79-16.90)	0.896		
AxD	-404.61 (-1257.30-448.09)	0.352	-995.16 (-2353.15-362.82)	0.151	-121.67 (-1854.13-1610.80)	0.891		
LDL*AxD	0.99 (-4.62-6.60)	0.730	3.87 (-5.65-13.38)	0.426	-0.82 (-12.82-11.18)	0.893		
	FLS D		FLS I		FU I			
	B (95%CI)	p ^a	B (95%CI)	p ^a	B (95%CI)	p		
(Intersección)	3303.432 (1087.33-5519.53)	0.003	536.728 (-1723.31-2796.77)	0.642	-80.291 (-1317.09-1156.51)	0.899		
LDL	-19.16 (-34.63--3.68)	0.087	-3.76 (-19.43-11.91)	0.096	-0.26 (-8.42-7.90)	0.950		
AxD	-3159.19 (-5128.40--1189.98)	0.015	-672.89 (-2682.91-1337.13)	0.638	-104.08 (-1032.47-824.30)	0.826		
LDL*AxD	16.98 (3.25-30.71)	0.002	3.40 (-10.69-17.49)	0.512	0.26 (-6.07-6.59)	0.936		

Nota. El neurofilamento se introdujo como variable dependiente. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; LDL = lipoproteínas de colesterol de baja densidad; D = derecho; I = izquierdo; CC-G = cuerpo calloso-genu; CC-C = cuerpo calloso-cuerpo; CC-E = cuerpo calloso-esplenio; FLI = fascículo longitudinal inferior; FLS = fascículo longitudinal superior; GC = giro cingulado; Hipoc. = hipocampo; FNX/ST= fórnix/estria terminal; FU = fascículo uncinado; AxD = difusividad axial.

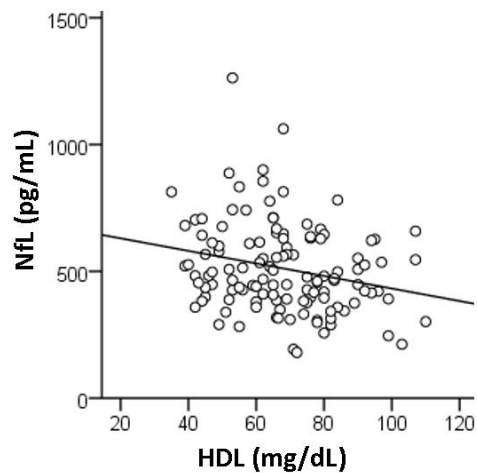
Si p < .05, el valor se muestra resaltado en negrita.

^aModelo lineal generalizado ajustado por edad, sexo e hiperintensidades de la sustancia blanca.

4.3 Efecto del HDL y la difusividad axial sobre el neurofilamento

El análisis univariante mostró una asociación negativa entre el HDL y NfL ($r_s = -0.240$; $p = 0.008$) (**Figura 12**).

Figura 12: Asociación entre HDL y neurofilamento.



Nota. NfL = neurofilamento de cadena ligera; HDL = lipoproteínas de colesterol de alta densidad.

Al introducir el HDL, AxD y la interacción HDL*AxD en el modelo, se halló un efecto significativo de la AxD sobre el NfL en el cuerpo y esplenio del cuerpo calloso y fascículo longitudinal inferior derecho (**Tabla 19**). No se observó ningún efecto significativo del HDL ni de la interacción HDL*AxD en ninguna región cognitiva.

Tabla 19: Efecto del HDL y la difusividad axial sobre el neurofilamento.

	CC-C		CC-E	
	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a
(Intersección)	1762.840 (261.83-3263.85)	0.021	1661.024 (-282.41-3604.46)	0.094
HDL	-17.06 (-40.36-6.23)	0.151	-12.99 (-42.23-16.24)	0.384
AxD	-1256.67 (-2205.68--307.67)	0.009	-1375.83 (-2695.75--55.91)	0.041
HDL*AxD	10.74 (-3.74-25.22)	0.146	9.17 (-10.07-28.41)	0.350
	FLI D		FLS D	
	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a
(Intersección)	1676.085 (-6.24-3358.41)	0.051	696.305 (-1763.71-3156.32)	0.579
HDL	-19.50 (-44.61-5.62)	0.128	-0.77 (-35.53-33.99)	0.966
AxD	-1527.15 (-2873.93--180.37)	0.026	-732.44 (-2695.62-1230.74)	0.465
HDL*AxD	16.05 (-4.21-36.31)	0.121	0.73 (-26.87-28.33)	0.959
	Hipoc. D		Hipoc. I	
	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a
(Intersección)	318.326 (-399.94-1036.59)	0.385	487.961 (-349.16-1325.08)	0.253
HDL	-5.87 (-16.14-4.40)	0.263	-6.03 (-18.03-5.96)	0.324
AxD	-553.75 (-1308.94-201.45)	0.151	-665.01 (-1442.93-112.91)	0.094
HDL*AxD	6.35 (-4.78-17.49)	0.264	6.21 (-5.45-17.88)	0.296
	FNX/ST D			
	B (95% IC)	p ^a		
(Intersección)	584.675 (-245.50-1414.85)	0.167		
HDL	-9.95 (-21.60-1.71)	0.094		
AxD	-622.91 (-1271.98-26.17)	0.060		
HDL*AxD	7.85 (-1.54-17.25)	0.101		

Nota. El neurofilamento se introdujo como variable dependiente. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; HDL = lipoproteínas de colesterol de alta densidad; AxD = difusividad axial; HDL = colesterol-HDL; D = derecho; I = izquierdo; CC-C = cuerpo calloso-cuerpo; CC-E = cuerpo calloso-espleno; FLI = fascículo longitudinal inferior; FLS = fascículo longitudinal superior; Hipoc. = hipocampo; FNX/ST = fórnix/estria terminal.

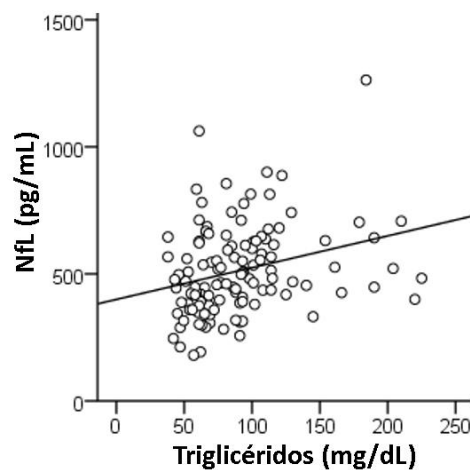
Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Modelo lineal generalizado ajustado por edad, sexo e hiperintensidades de la sustancia blanca.

4.4 Efecto de los triglicéridos y la difusividad axial sobre el neurofilamento

El análisis univariante muestra una asociación positiva entre los TG y NfL ($r_s = 0.349$; $p = 0.000$) (**Figura 13**).

Figura 13: Asociación entre triglicéridos y neurofilamento.



Nota. NfL = neurofilamento de cadena ligera.

Al introducir el TG, AxD y la interacción TG*AxD en el modelo, se halló un efecto significativo de los TG y la interacción TG*AxD sobre el NfL en la parte derecha del fascículo longitudinal inferior y giro cingulado y en ambos hemisferios del fórnix/estría terminal (**Tabla 20**). No se observó ningún efecto de la AxD en ninguna región cognitiva.

Con el fin de profundizar estos hallazgos, se llevó a cabo el análisis de mediación y moderación. Los análisis de mediación no mostraron ningún efecto significativo. Se estudió el papel moderador de los TG sobre la asociación entre el AxD y el NfL en estas regiones. Se halló un efecto moderador (a mayor nivel de TG, mayor es la asociación negativa entre el NfL y AxD) en el fascículo longitudinal inferior derecho ($B = -11.592$, IC del 95% [-19.389, -3.795], $t = -2.945$, $p = 0.004$) y fórnix/estría terminal izquierda ($B = -9.184$, IC del 95% [-14.780, -3.587], $t = -3.250$, $p = 0.001$).

Tabla 20: Efecto de los triglicéridos y la difusividad axial sobre el neurofilamento.

	CC-C		CC-E		FLI-D	
	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a
(Intersección)	24.842 (-1391.84-1441.52)	0.973	76.553 (-1087.02-1240.13)	0.897	-1009.957 (-2050.29-30.38)	0.057
TG	12.54 (-0.37-25.45)	0.057	6.89 (-3.11-16.88)	0.177	13.98 (4.95-23.02)	0.002
AxD	-189.44 (-1037.44-658.55)	0.661	-255.90 (-1004.03-492.24)	0.503	645.89 (-170.84-1462.61)	0.121
TG*AD	-7.99 (-16.00-0.01)	0.050	-4.85 (-11.64-1.94)	0.161	-11.59 (-19.08--4.10)	0.002
	FLI-I		FLS-D		GC-D	
	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a
(Intersección)	-123.318 (-1418.77-1172.13)	0.852	-452.572 (-1735.26-830.11)	0.489	-781.962 (-1512.03--51.89)	0.036
TG	3.76 (-9.21-16.73)	0.570	9.89 (-1.56-21.35)	0.090	9.02 (2.87-15.18)	0.004
AxD	-69.79 (-1067.93-928.36)	0.891	178.41 (-890.00-1246.82)	0.743	439.91 (-129.13-1008.94)	0.130
TG*AD	-2.79 (-12.82-7.24)	0.585	-8.56 (-18.48-1.36)	0.091	-7.43 (-12.56--2.31)	0.004
	Hipoc. D		Hipoc. I		FNX/ST D	
	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a
(Intersección)	-378.641 (-908.59-151.31)	0.161	-114.403 (-647.78-418.97)	0.674	-497.309 (-1083.30-88.68)	0.096
TG	3.35 (-0.75-7.45)	0.110	1.21 (-3.26-5.67)	0.597	4.48 (0.08-8.87)	0.046
AxD	195.90 (-292.47-684.26)	0.432	-48.89 (-514.17-416.38)	0.837	231.69 (-214.74-678.12)	0.309
TG*AxD	-3.79 (-8.64-1.06)	0.126	-1.09 (-5.80-3.63)	0.651	-4.13 (-8.23--0.03)	0.049
	FNX/ST I		FU D		FU I	
	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p ^a	B (95% IC)	p
(Intersección)	-817.776 (-1656.32-20.77)	0.056	-134.092 (-792.97-524.79)	0.690	-487.783 (-1140.98-165.41)	0.143
TG	12.37 (5.15-19.60)	0.001	-1.35 (-7.28-4.58)	0.656	3.44 (-1.92-8.80)	0.208
AxD	440.09 (-127.70-1007.89)	0.129	-75.43 (-649.70-498.85)	0.797	212.16 (-252.96-677.29)	0.371
TG*AxD	-9.18 (-14.56--3.81)	0.001	1.53 (-3.92-6.98)	0.581	-2.59 (-6.94-1.75)	0.242

Nota. El neurofilamento se introdujo como variable dependiente. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; AxD = difusividad axial; D = derecho; I = izquierdo; CC-C = cuerpo caloso-cuerpo; CC-E = cuerpo caloso-esplenio; FLI = fascículo longitudinal inferior; FLS = fascículo longitudinal superior; Hipoc. = hipocampo; GC = giro cingulado; FNX/ST = fórnix/estria terminal; FU = fascículo uncinado; TG = triglicéridos

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Modelo lineal generalizado ajustado por edad, sexo e hiperintensidades de la sustancia blanca.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo muestran una asociación entre los lípidos plasmáticos y la AxD de la SB en múltiples regiones involucradas en los procesos de cognición. La AxD muestra una asociación positiva con LDL y TG y negativa con HDL en la mayoría de las regiones cognitivas estudiadas. El mecanismo biológico de esta asociación está por determinar. Los mecanismos vasculares podrían estar mediando esta asociación ⁹⁸, pero los resultados se mantienen significativos después de corregir según las HSB. Además, la asociación es independiente del genotipo APOE, la toma de estatinas o la tensión arterial. Por otra parte, el LDL y los TG están modulando la asociación entre la AxD y la pérdida axonal, medida por el NfL, en algunas regiones involucradas en la cognición.

1. Asociación entre lípidos plasmáticos y microestructura de la sustancia blanca

Existen muy pocos trabajos sobre el efecto de los lípidos plasmáticos y la microestructura de la SB. Estos estudios describen una asociación negativa entre los lípidos plasmáticos y el índice FA en sujetos jóvenes y adultos ^{36,38,39}. Cohen y colaboradores, analizando conjuntamente personas obesas y delgadas, observaron una asociación negativa entre tener niveles anormales de colesterol (definido por tener LDL>130mg/dl y HDL<34mg/dl) y el índice FA en los lóbulos prefrontales ³⁶. En nuestra muestra, siguiendo el criterio del trabajo de Cohen, solo 2 de los 273 sujetos tenían niveles anormales de colesterol. De acuerdo con nuestros resultados, un trabajo reciente con la mayor muestra estudiada hasta ahora llega a la conclusión de que el efecto del CTOT sobre la microestructura de la SB es muy limitado ⁴⁰. Warstad y colaboradores observaron una asociación positiva entre el CTOT y HDL y FA en la mayoría de las regiones de la SB, incluyendo el cuerpo caloso, fórnix, capsula interna, fascículo inferior fronto-occipital, fascículo uncinado y fascículo longitudinal inferior ³⁹. Además, hallaron una asociación negativa entre el CTOT y los índices AxD, RD y MD y entre el HDL y RD. No encontraron ninguna asociación significativa entre el LDL y la FA, y la relación del LDL con los otros índices de la microestructura de la SB no fue analizada. Debido a que en el trabajo de Warstad y colaboradores la media de edad fue de 15.2 años, sugirieron que un nivel óptimo de colesterol plasmático podría ser crucial para la integridad de la SB en los primeros años de vida. Nuestro estudio incluye una población más envejecida.

Ryu y colaboradores describieron una correlación entre el índice combinado de CTOT, HDL, TG, insulina y creatinina y la FA y AxD. Concretamente tener valores altos de TG, relación HDL/CTOT, insulina y creatinina y bajos de HDL se asociaba a valores inferiores de FA y AxD. Debido a que analizan conjuntamente variables muy diversas, no se puede realizar ninguna conclusión sobre el efecto de la variabilidad interindividual de cada lípido sobre la microestructura de la SB. Teniendo en cuenta la metodología, los análisis realizados, el tamaño de muestra y la edad media, el trabajo realizado por Williams y colaboradores es el más similar al nuestro. A pesar de que al igual que en nuestro trabajo describieron que el LDL era el lípido que afectaba a una mayor cantidad de vóxeles de la SB ³⁸, ellos describieron una asociación positiva entre el LDL y la AxD, es decir a mayor LDL mayor AxD, mientras que nosotros hemos observado una asociación negativa. En el trabajo de Williams y colaboradores, las regiones de la microestructura de la SB alteradas por el efecto del LDL se centraron en el hemisferio derecho (fascículo longitudinal superior y la parte posterior de la capsula interna y externa), mientras que en el nuestro los resultados se extienden a la mayoría de las regiones de la SB (**Figura 5**). Las diferencias descritas entre ambos estudios pueden estar relacionadas con la muestra. Aunque en ambos trabajos los participantes son sujetos cognitivamente sanos, los criterios establecidos para definir estos sujetos son diferentes. En nuestro estudio, todos los participantes realizaron una valoración neuropsicológica muy exhaustiva, definiendo como sujetos cognitivamente sanos aquellos con una puntuación de 0 en el CDR, mientras que Williams y colaboradores solo realizaron el test de MMSE. Además, incluyeron a sujetos con un MMSE ≥ 23 , cuando tener MMSE < 24 se considera demencia ⁹⁹. Estudios recientes ponen en entredicho la validez del MMSE para detectar alteraciones cognitivas ¹⁰⁰.

La AxD representa la tendencia del agua a difundir a lo largo de su dirección de difusión primaria y permite identificar cambios en la integridad del axón ¹⁰¹. Los estudios en modelos animales muestran que la disminución del índice AxD se asocia a degeneración axonal ^{72,73}. En este sentido, nuestros resultados sugieren que niveles superiores de LDL y TG podrían estar involucrados en el daño axonal de las regiones involucradas en los procesos de cognición mientras que el HDL podría participar el mantenimiento de la estructura axonal. Los índices RD, FA y MD no parecen estar alterados por ninguno de los lípidos plasmáticos estudiados. De hecho, diferentes estudios han sugerido que la degeneración axonal se produce como una consecuencia del envejecimiento normal y que

este hecho en las regiones cognitivas podría constituir un evento clave en los mecanismos patológicos que participan en la transición del envejecimiento a la patología¹⁰² ya que hay datos que indican que también es un evento temprano en las enfermedades neurodegenerativas¹⁰³. Sin embargo esta asociación entre la AxD y el daño axonal ha sido cuestionada a la hora de interpretar el cerebro humano¹⁰⁴. Por lo tanto, la especificidad de la AxD de nuestros hallazgos no puede ser utilizada para delinear qué aspectos particulares de los componentes de la SB están alterados. Nuestros resultados muestran la importancia de evaluar los cuatro índices de la DTI.

Los resultados obtenidos muestran que, de los cuatro compuestos lipídicos analizados, el LDL es el que aparentemente tiene un mayor efecto sobre la microestructura de la SB de las regiones involucradas en los procesos de cognición (**Tabla 5**). Hay que tener en cuenta que en el presente estudio, según los puntos de corte del laboratorio, la proporción de sujetos con hipercolesterolemia LDL es mayor a los porcentajes de HDL hipocolesterolemia e hipertrigliceridemia. Esta diferencia es mayor con los criterios de Guallar y colaboradores (hipercolesterolemia LDL [60,8%], hipocolesterolemia HDL [6,2%], hipertrigliceridemia [9,5%]). Los niveles plasmáticos de LDL se han relacionado con disfunción cognitiva^{29,105,106}. En nuestro estudio, los vóxeles significativos se encuentran distribuidos sobre todo en el cuerpo y genu del cuerpo calloso, fascículo longitudinal inferior y superior e hipocampo (**Tabla 5**). El genu, hipocampo y los fascículos longitudinal superior e inferior son considerados regiones de mielinización tardía. Diversos estudios han descrito que las fibras de las regiones de mielinización tardía son más vulnerables que las fibras de las regiones de mielinización temprana¹⁰⁷⁻¹¹⁰. Nuestro estudio sugiere que esta vulnerabilidad podría estar influenciada por los niveles de LDL.

2. Covariables, lípidos plasmáticos y microestructura de la sustancia blanca

Con el objetivo de entender mejor la relación entre los lípidos plasmáticos y la microestructura de la SB, hemos analizado la influencia del genotipo APOE, la toma de estatinas y la tensión arterial. Nuestros resultados muestran que los sujetos portadores de APOE4 tienen niveles superiores de LDL y TG e inferiores de HDL respecto a los no portadores. Varios estudios han descrito el papel modulador del genotipo APOE4 en la microestructura de la SB en sujetos adultos^{53,111}, pero nuestro estudio no ha demostrado

ningún efecto del genotipo APOE sobre la microestructura de la SB de las regiones involucradas en los procesos de cognición (**Tabla 9, 13, 17**). La asociación entre el uso de las estatinas y la integridad de la SB no está clara ^{38,70}. Nuestro estudio no muestra ningún efecto en la asociación entre los lípidos y la microestructura. Estos resultados coinciden con los de Williams y colaboradores ³⁸. En cuanto a la tensión arterial, diversos estudios han demostrado una asociación entre la hipertensión y cambios en la SB, especialmente en las regiones anteriores del cerebro ^{60,61}. Además, la hipertensión puede ayudar a propagar los efectos de la edad en la SB a lo largo de un gradiente anterior-posterior ⁶². Nuestros resultados no han demostrado ningún papel de la tensión arterial en la relación existente entre lípidos plasmáticos y microestructura de la SB.

El NfL se ha propuesto como marcador de daño axonal ⁷⁴. Aunque se ha defendido que la AxD no puede utilizarse para delinear qué componentes de la SB están alterados ¹⁰⁴, dado que en los modelos animales se encuentran asociaciones significativas entre la AxD y el daño axonal ^{72,73}, en este estudio se ha estudiado la asociación entre la AxD y niveles de NfL en LCR. En este sentido, se ha observado una asociación entre valores superiores de NfL e inferiores de AxD en la mayoría de las regiones de la SB (**Figura 11**). En los vóxeles donde el LDL mostró un efecto significativo, el NfL también mostró una asociación significativa con la AxD del cuerpo caloso, giro cingulado, fórnix/estria terminal y fascículo longitudinal superior (**Tabla 18**). Los niveles de NfL en LCR se encuentran aumentados en sujetos con deterioro cognitivo ligero y esto se relaciona con los cambios en la SB de las regiones involucradas en los procesos de cognición ⁷⁵. En sujetos cognitivamente sanos los resultados de los estudios sobre la asociación entre el NfL y la microestructura de la SB son inconsistentes. Mientras que algunos estudios han descrito solo una asociación con el índice MD en los lóbulos temporal, parietal y frontales ⁷⁶, otros han descrito solo una asociación positiva entre NfL y la RD en la radiación talámica posterior ⁷⁵ y otros estudios no han encontrado ninguna asociación entre el NfL y la SB ⁷⁷. Nuestro estudio aporta nuevos conocimientos sobre el papel de la AxD como indicador no invasivo de daño axonal, ya que el aumento de los niveles de NfL se ha asociado significativamente con una menor AxD. Además, hemos podido demostrar el efecto moderador del colesterol LDL y TG en plasma en esta asociación. Cuando los niveles de LDL se encuentran por debajo de la mediana, a mayor nivel LDL mayor es la asociación negativa entre el NfL y la AxD. A partir del nivel de la mediana, el LDL no muestra ningún efecto moderador sobre esta asociación. Este efecto moderador del LDL

hay que analizarlo con precaución ya que según nuestros resultados el LDL solo se asocia débilmente con los niveles de NfL. En cuanto a los TG, a mayor nivel de TG, mayor es la asociación negativa entre el NfL y la AxD, y aquí sí que se ha observado una asociación significativa entre los niveles de TG y NfL, incluso tras ajustar por edad y otras variables. Esta observación sugiere que la dislipidemia puede jugar un papel importante en el mantenimiento de la integridad de los axones.

Múltiples mecanismos como la inflamación, estrés o proteostasis ocurren durante el proceso de envejecimiento y contribuyen a la acumulación de daño axonal, el cual es una característica histopatológica predominante en el cerebro envejecido ¹¹². Nuestro estudio sugiere que algunos factores de riesgo modificables, como el incremento de los niveles de LDL y TG y la disminución de HDL, pueden jugar un papel significativo, quizás potenciando los efectos del envejecimiento, especialmente en regiones de la SB involucradas en los procesos de cognición, y así aumentar la vulnerabilidad a otras patologías como la enfermedad de Alzheimer o la isquemia.

La interpretación de la asociación entre los lípidos plasmáticos y la microestructura de la SB es difícil debido a que el metabolismo del colesterol cerebral está separado por la barrera hematoencefálica del metabolismo del colesterol periférico. Los niveles alterados de colesterol plasmático se relacionan con el estrés oxidativo y la inflamación ¹¹³, las cuales a su vez alteran la integridad de la BHE ^{114,115}. De hecho, la disfunción de la BHE es común en las personas mayores ¹¹⁶. La hipercolesterolemia está relacionada también con la enfermedad de los vasos cerebrales pequeños ¹¹⁷. Puede también que el aumento de los niveles plasmáticos de lípidos y el daño axonal tengan un factor común como podría ser alguno de los polimorfismos genéticos de riesgo que se han descrito para la EA, en concreto el polimorfismo ABCA7 (*ATP-binding cassette A7*) o APOE4. Las proteínas ABCA7 y ApoE se expresan en el cerebro y en el sistema periférico y su principal función es regular el metabolismo lipídico ¹¹⁸. En pacientes con EA, a nivel periférico, el genotipo de riesgo de la proteína ABCA7 se asocia a mayor nivel de LDL y colesterol plasmático ¹¹⁹ y a nivel cerebral se asocia con atrofia hipocampal y cortical ¹²⁰, y con una menor densidad e integridad de la sustancia gris ^{121,122}. Algo similar ocurre con la APOE4. Por un lado, diferentes estudios han demostrado el papel modulador del genotipo APOE4 en la microestructura de la SB ^{111,123}, y por otro lado el genotipo APOE4 se asocia a niveles superiores de LDL y TG⁴². Todos estos mecanismos podrían estar involucrados en la asociación entre los lípidos plasmáticos y la microestructura de la SB.

3. Limitaciones y fortalezas

Este estudio debe interpretarse teniendo en cuenta sus limitaciones. La principal es que los índices de la DTI son una medida indirecta de la microestructura de la SB. La interpretación de la AxD solo está respaldada en los casos de tractos de una sola fibra¹⁰⁴ y la influencia del cruce de fibras hace que la interpretación sea complicada en todos los trabajos de la DTI. No obstante, la fortaleza del estudio es que se realizaron estudios 3T-DWI de alta resolución con 65 direcciones, lo que ha permitido realizar estimaciones robustas de las propiedades del tensor¹²⁴. Este es un trabajo transversal, por lo que no se ha podido caracterizar cómo cambia en el tiempo la asociación entre los lípidos plasmáticos y la microestructura de la SB. Se necesitan más estudios para investigar los procesos que subyacen en el proceso del envejecimiento y su relación con enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer.

CONCLUSIONES

1. Existe una relación entre la variabilidad interindividual de los lípidos plasmáticos y la integridad de la microestructura de la sustancia blanca. Esta asociación podría ser uno de los mecanismos que explicarían el papel de la dislipidemia como factor de riesgo del deterioro cognitivo y demencia.
2. Los cambios en la microestructura de la sustancia blanca que se asocian a la hipercolesterolemia-LDL y la hipertrigliceridemia están relacionados con la degeneración axonal.
3. Dado que la degeneración axonal se produce en el envejecimiento ¹¹² y es también un acontecimiento temprano en las enfermedades neurodegenerativas ¹⁰³, las alteraciones en la regulación de los lípidos plasmáticos podrían estar involucradas en la transición del envejecimiento saludable a la patología y los trastornos neurodegenerativos. En este sentido los lípidos plasmáticos, en concreto el LDL y triglicéridos, pueden ser un factor de riesgo modificable para las enfermedades neurodegenerativas. La promoción de hábitos nutricionales saludables y el desarrollo de nuevos fármacos reductores de lípidos pueden ser una estrategia para mantener la estructura del tejido neuronal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bjorkhem I, Meaney S. Brain Cholesterol: Long Secret Life Behind a Barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004;24(5):806–815.
2. Hughes TM, Rosano C, Evans RW, Kuller LH. Brain cholesterol metabolism, oxysterols, and dementia. *J Alzheimers Dis* 2013;33(4):891–911.
3. Vance JE. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis. Model. Mech.* 2012;5(6):746–55.
4. Stough C, Pipingas A, Camfield D, et al. Increases in total cholesterol and low density lipoprotein associated with decreased cognitive performance in healthy elderly adults. *Metab. Brain Dis.* 2019;34(2):477–484.
5. Chanti-Ketterl M, Andel R, Lerch O, et al. Cholesterol and cognitive performance among community volunteers from the Czech Republic. *Int. Psychogeriatrics* 2015;27(12):2087–2095.
6. Crichton GE, Elias MF, Davey A, et al. Higher HDL cholesterol is associated with better cognitive function: The Maine-Syracuse study. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 2014;20(10):961–970.
7. Hottman DA, Chernick D, Cheng S, et al. HDL and cognition in neurodegenerative disorders. *Neurobiol. Dis.* 2014;72:22–36.
8. Leritz EC, McGlinchey RE, Salat DH, Milberg WP. Elevated levels of serum cholesterol are associated with better performance on tasks of episodic memory. *Metab. Brain Dis.* 2016;31(2):465–473.
9. Parthasarathy V, Frazier DT, Bettcher BM, et al. Triglycerides are negatively correlated with cognitive function in non-demented aging adults. *Neuropsychology* 2017;31(6):682–688.
10. de Oliveira FF, Chen ES, Smith MC, Bertolucci PHF. Longitudinal lipid profile variations and clinical change in Alzheimer's disease dementia. *Neurosci. Lett.* 2017;646:36–42.
11. Solari A, Neurologico Carlo Besta I, Leone MA, et al. High low-density lipoprotein cholesterol inversely relates to dementia in community-dwelling older adults: The Shanghai Aging Study. *Front. Neurol.* 2018;9:952.
12. Kuźma E, Hannon E, Zhou A, et al. Which risk factors causally influence dementia? A systematic review of mendelian randomization studies. *J. Alzheimer's Dis.* 2018;64(1):181–193.
13. Silverman JM, Schmeidler J. Outcome age-based prediction of successful cognitive aging by total cholesterol. *Alzheimer's Dement.* 2018;14(7):952–960.
14. Zhang T, Li H, Zhang J, et al. Impacts of high serum total cholesterol level on brain functional connectivity in non-demented elderly. *J. Alzheimer's Dis.* 2015;50(2):455–463.
15. Philippou E, Michaelides MP, Constantinidou F. The role of metabolic syndrome factors on cognition using latent variable modeling: The neurocognitive study on aging. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 2018;40(10):1030–1043.
16. Kivipelto M, Helkala E-L, Laakso MP, et al. Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. *Ann. Intern. Med.* 2002;137(3):149–55.
17. Sevilla RR, Naranjo IC, Cuenca JCP, et al. Vascular risk factors and white matter hyperintensities

- as predictors of progression to dementia in patients with mild cognitive impairment. *Curr. Alzheimer Res.* 2018;15
18. Ma C, Yin Z, Zhu P, et al. Blood cholesterol in late-life and cognitive decline: a longitudinal study of the Chinese elderly. *Mol. Neurodegener.* 2017;12(1):24.
 19. Samieri C, Perier M-C, Gaye B, et al. Association of cardiovascular health level in older age with cognitive decline and incident dementia. *JAMA* 2018;320(7):657.
 20. Power MC, Rawlings A, Richey Sharrett A, et al. Association of midlife lipids with 20-year cognitive change: a cohort study. *Alzheimers Dement* 2018;14(2):167–177.
 21. Mapstone M, Cheema AK, Fiandaca M, Xiaogang Z. Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nat. Med.* 2014;20(4):415–8.
 22. Tortelli R, Lozupone M, Guerra V, et al. Midlife metabolic profile and the risk of late-life cognitive decline. *J. Alzheimer's Dis.* 2017;59(1):121–130.
 23. Schultz BG, Patten DK, Berlau DJ. The role of statins in both cognitive impairment and protection against dementia: a tale of two mechanisms. *Transl. Neurodegener.* 2018;7(1):5.
 24. Bosch J, O'Donnell M, Swaminathan B, et al. Effects of blood pressure and lipid lowering on cognition. *Neurology* 2019;92(13):e1435–e1446.
 25. Dietschy JM. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol. Chem* 2009;390(4):287–293.
 26. Shibata D, Suchy-Dacey A, Carty CL, et al. Vascular risk factors and findings on brain MRI of elderly adult american indians: The strong heart study. *Neuroepidemiology* 2019;52(3–4):173–180.
 27. Williamson W, Lewandowski AJ, Forkert ND, et al. Association of cardiovascular risk factors with MRI indices of cerebrovascular structure and function and white matter hyperintensities in young adults. *JAMA* 2018;320(7):665.
 28. Duan D, Shen L, Cui C, et al. Association between low-density lipoprotein cholesterol and occipital periventricular hyperintensities in a group of Chinese patients: an observational study. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):48.
 29. Chung C-P, Chou K-H, Peng L-N, et al. Associations between low circulatory low-density lipoprotein cholesterol level and brain health in non-stroke non-demented subjects. *Neuroimage* 2018;181:627–634.
 30. Aljondi R, Szoeki C, Steward C, et al. The effect of midlife cardiovascular risk factors on white matter hyperintensity volume and cognition two decades later in normal ageing women. *Brain Imaging Behav.* 2018. doi.10.1007/s11682-018-9970-5.
 31. Zhang R, Beyer F, Lampe L, et al. White matter microstructural variability mediates the relation between obesity and cognition in healthy adults. *Neuroimage* 2018;172:239–249.
 32. Lou B, Chen M, Luo X, et al. Reduced right frontal fractional anisotropy correlated with early elevated plasma LDL levels in obese young adults. *PLoS One* 2014;9(10):e108180.
 33. Kullmann S, Schweizer F, Veit R, et al. Compromised white matter integrity in obesity. *Obes. Rev.* 2015;16(4):273–281.
 34. Segura B, Jurado MÁ, Freixenet N, et al. White matter fractional anisotropy is related to processing speed in metabolic syndrome patients: a case-control study. *BMC Neurol.* 2010;10:64.

35. Ryu C-W, Coutu J-P, Greka A, et al. Differential associations between systemic markers of disease and white matter tissue health in middle-aged and older adults. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2017;37(11):3568–3579.
36. Cohen J, Cazettes F, Convit A. Abnormal cholesterol is associated with prefrontal white matter abnormalities among obese adults, a diffusion tensor imaging study. *Neuroradiol. J.* 2011;1(21):989–997.
37. Birdsill AC, Oleson S, Kaur S, et al. Abdominal obesity and white matter microstructure in midlife. *Hum. Brain Mapp.* 2017;3344:3337–3344.
38. Williams VJ, Leritz EC, Shepel J, et al. Interindividual variation in serum cholesterol is associated with regional white matter tissue integrity in older adults. *Hum Brain Mapp* 2013;34(8):1826–1841.
39. Warstadt NM, Dennis EL, Jahanshad N, et al. Serum cholesterol and variant in cholesterol-related gene CETP predict white matter microstructure and for the Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). *Neurobiol Aging* 2014;35(11):2504–2513.
40. Williams OA, An Y, Beason-Held L, et al. Vascular burden and APOE ϵ 4 are associated with white matter microstructural decline in cognitively normal older adults. *Neuroimage* 2019;188:572–583.
41. Ryu C-W, Coutu J-P, Greka A, et al. Differential associations between systemic markers of disease and white matter tissue health in middle-aged and older adults. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2017;37(11):3568–3579.
42. Cahua-Pablo G, Cruz M, Del Moral-Hernández O, et al. Elevated levels of LDL-C are associated with ApoE4 but not with the rs688 polymorphism in the LDLR gene. *Clin. Appl. Thromb.* 2016;22(5):465–470.
43. Cavado E, Lista S, Rojkova K, et al. Disrupted white matter structural networks in healthy older adult APOE ϵ 4 carriers - An international multicenter DTI study. *Neuroscience* 2017;357:119–133.
44. Heise V, Filippini N, Ebmeier KP, Mackay CE. The APOE ϵ 4 allele modulates brain white matter integrity in healthy adults. *Mol. Psychiatry* 2011;16(9):908–916.
45. Honea RA, Vidoni E, Harsha A, Burns JM. Impact of APOE on the healthy aging brain: A voxel-based MRI and DTI study. *J. Alzheimer’s Dis.* 2009;18(3):553–564.
46. Nierenberg J, Pomara N, Hoptman MJ, et al. Abnormal white matter integrity in healthy apolipoprotein E epsilon4 carriers. *Neuroreport* 2005;16(12):1369–72.
47. Persson J, Lind J, Larsson A, et al. Altered brain white matter integrity in healthy carriers of the APOE ϵ 4 allele. *Neurology* 2006;66(7):1029–1033.
48. Westlye LT, Reinvang I, Rootwelt H, Espeseth T. Effects of APOE on brain white matter microstructure in healthy adults. *Neurology* 2012;79(19):1961–1969.
49. Adluru N, Destiche DJ, Yuan-Fu Lu S, et al. White matter microstructure in late middle-age: Effects of apolipoprotein E4 and parental family history of Alzheimer’s disease. *Elsevier* 2014;4:730–742.
50. Ryan L, Walther K, Bendlin BB, et al. Age-related differences in white matter integrity and cognitive function are related to APOE status. *Neuroimage* 2011;54(2):1565–1577.
51. Laukka EJ, Lövdén M, Kalpouzos G, et al. Microstructural white matter properties mediate the association between APOE and perceptual speed in very old persons without dementia. *PLoS One* 2015;10(8):e0134766.

52. Kljajevic V, Meyer P, Holzmann C, et al. The $\epsilon 4$ genotype of apolipoprotein E and white matter integrity in Alzheimer's disease. *Alzheimers. Dement.* 2014;10(3):401–4.
53. Operto G, Cacciaglia R, Grau-Rivera O, et al. White matter microstructure is altered in cognitively normal middle-aged APOE- $\epsilon 4$ homozygotes. *Alzheimers. Res. Ther.* 2018;10(1):48.
54. Smith CD, Chebrolu H, Andersen AH, et al. White matter diffusion alterations in normal women at risk of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2010;31(7):1122–1131.
55. Gold BT, Powell DA, Andersen AH, Smith CD. Alterations in multiple measures of white matter integrity in normal women at high risk for Alzheimer's disease. *Neuroimage* 2010;52(4):1487–1494.
56. Hwang Y-C, Fujimoto WY, Kahn SE, et al. Higher high density lipoprotein 2 (HDL2) to total HDL cholesterol ratio is associated with a lower risk for incident hypertension. *Diabetes Metab. J.* 2019;43(1):114-122.
57. Yeom H, Kim HC, Lee J-M, et al. Triglyceride to high density lipoprotein cholesterol ratio among adolescents is associated with adult hypertension: the Kangwha study. *Lipids Health Dis.* 2018;17(1):212.
58. Kunutsor SK, Kieneker LM, Bakker SJL, et al. The inverse association of HDL-cholesterol with future risk of hypertension is not modified by its antioxidant constituent, paraoxonase-1: The PREVENT prospective cohort study. *Atherosclerosis* 2017;263:219–226.
59. Ferrario CM, Smith R, Levy P, Strawn W. The hypertension-lipid connection: insights into the relation between angiotensin II and cholesterol in atherogenesis. *Am. J. Med. Sci.* 2002;323(1):17–24.
60. Leritz EC, Salat DH, Milberg WP, et al. Variation in blood pressure is associated with white matter microstructure but not cognition in African Americans. *Neuropsychology* 2010;24(2):199–208.
61. Salat DH, Williams VJ, Leritz EC, et al. Inter-individual variation in blood pressure is associated with regional white matter integrity in generally healthy older adults. *Neuroimage* 2012;59(1):181–192.
62. Kennedy KM, Raz N. Pattern of normal age-related regional differences in white matter microstructure is modified by vascular risk. *Brain Res.* 2009;1297:41–56.
63. Fuhrmann D, Nesbitt D, Shafto M, et al. Strong and specific associations between cardiovascular risk factors and white matter micro- and macrostructure in healthy aging. *Neurobiol. Aging* 2019;74:46–55.
64. Suzuki H, Bai W, Evangelou E, et al. Abnormal brain white matter microstructure is associated with both pre-hypertension and hypertension. *PLoS One* 2017;12(11):e0187600.
65. Gons RAR, van Oudheusden LJB, de Laat KF, et al. Hypertension is related to the microstructure of the corpus callosum: The RUN DMC Study. *J. Alzheimer's Dis.* 2012;32(3):623–631.
66. Allen B, Muldoon MF, Gianaros PJ, et al. The prospective relationship between prehypertension, race, and whole-brain white matter microstructure. *J. Hum. Hypertens.* 2019. doi:10.1038/s41371-019-0184-0.
67. McEvoy LK, Fennema-Notestine C, Eyer LT, et al. Hypertension-related alterations in white matter microstructure detectable in middle age. *Hypertension* 2015;66(2):317–323.

68. Haight T, Nick Bryan R, Erus G, et al. White matter microstructure, white matter lesions, and hypertension: An examination of early surrogate markers of vascular-related brain change in midlife. *NeuroImage Clin.* 2018;18:753–761.
69. Jacobs HIL, Leritz EC, Williams VJ, et al. Association between white matter microstructure, executive functions, and processing speed in older adults: The impact of vascular health. *Hum. Brain Mapp.* 2013;34(1):77–95.
70. Ramanan VK, Przybelski SA, Graff-Radford J, et al. Statins and brain health: Alzheimer’s and cerebrovascular disease biomarkers in older adults. *J Alzheimers Dis* 2018;65(4):1345–1352.
71. Nadkarni NK, Perera S, Hanlon JT, et al. Statins and brain integrity in older adults: secondary analysis of the Health ABC Study. *Alzheimer’s Dement.* 2015;11(10):1202–11.
72. Song S-K, Yoshino J, Le TQ, et al. Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain. *Neuroimage* 2005;26(1):132–140.
73. Song S-K, Sun S-W, Ramsbottom MJ, et al. Dysmyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water. *Neuroimage* 2002;17(3):1429–36.
74. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 2018;14(10):577–589.
75. Moore EE, Hohman TJ, Badami FS, et al. Neurofilament relates to white matter microstructure in older adults. *Neurobiol. Aging* 2018;70:233–241.
76. Melah KE, Yuan-Fu Lu S, Hoscheidt SM, et al. CSF markers of Alzheimer’s pathology and microglial activation are associated with altered white matter microstructure in asymptomatic adults at risk for Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis* 2016;50(3):873–886.
77. Racine AM, Merluzzi AP, Adluru N, et al. Association of longitudinal white matter degeneration and cerebrospinal fluid biomarkers of neurodegeneration, inflammation and Alzheimer’s disease in late-middle-aged adults. *Brain Imaging Behav.* 2019;13(1):41-52.
78. Jenkinson M, Beckmann CF, Behrens TEJ, et al. FSL. *Neuroimage* 2012;62(2):782–790.
79. Woolrich MW, Jbabdi S, Patenaude B, et al. Bayesian analysis of neuroimaging data in FSL. *Neuroimage* 2009;45(1):S173–S186.
80. Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, et al. Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *Neuroimage* 2004;23:S208–S219.
81. Smith SM. Fast robust automated brain extraction. *Hum. Brain Mapp.* 2002;17(3):143–155.
82. Rueckert D, Sonoda LI, Hayes C, et al. Nonrigid registration using free-form deformations: application to breast MR images. *IEEE Trans. Med. Imaging* 1999;18(8):712–721.
83. Smith SM, Jenkinson M, Johansen-Berg H, et al. Tract-based spatial statistics: Voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *Neuroimage* 2006;31(4):1487–1505.
84. Wenham PR, Price WH, Blandell G. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *Lancet (London, England)* 1991;337:1158–1166.
85. Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, et al. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer’s dementia and normal aging. *AJR Am.J.Roentgenol.* 1987;149(2):351–356.
86. Iniciativa Panamericana Sobre La Hipertensión. Working meeting on blood pressure measurement: suggestions for measuring blood pressure to use in populations surveys. *Rev. Panam. Salud Publica*

- 2003;14(5):300–2, 303–5.
87. J H, J H. Generalized linear models and extensions. Third edit. 2012.
 88. Wang R, Fratiglioni L, Laukka EJ, et al. Effects of vascular risk factors and APOE 4 on white matter integrity and cognitive decline. *Neurology* 2015;84(11):1128–1135.
 89. Borghesani PR, Madhyastha TM, Aylward EH, et al. The association between higher order abilities, processing speed, and age are variably mediated by white matter integrity during typical aging. *Neuropsychologia* 2013;51(8):1435-44.
 90. Madden DJ, Bennett IJ, Song AW. Cerebral white matter integrity and cognitive aging: Contributions from diffusion tensor imaging. *Neuropsychol. Rev.* 2009;19(4):415–435.
 91. Salami A, Eriksson J, Nilsson L-G, Nyberg L. Age-related white matter microstructural differences partly mediate age-related decline in processing speed but not cognition. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2012;1822(3):408–415.
 92. Davis SW, Dennis NA, Buchler NG, et al. Assessing the effects of age on long white matter tracts using diffusion tensor tractography. *Neuroimage* 2009;46(2):540–541.
 93. Mayo CD, Garcia-Barrera MA, Mazerolle EL, et al. Relationship between DTI metrics and cognitive function in Alzheimer’s disease. *Front. Aging Neurosci.* 2019;11:436.
 94. Zhuang L, Sachdev PS, Trollor JN, et al. Microstructural white matter changes, not hippocampal atrophy, detect early amnesic mild cognitive impairment. *PLoS One* 2013;8(3):e58887.
 95. Field A. Moderation, Mediation and More Regression. In: *Discovering statistics using IBM SPSS statistics*. London: SAGE Publications; 2013 p. 392–428.
 96. Guallar-Castillón P, Gil-Montero M, León-Muñoz LM, et al. Magnitud y manejo de la hipercolesterolemia en la población adulta de España, 2008-2010: el estudio ENRICA. *Rev. Española Cardiol.* 2012;65(6):551–558.
 97. Gold BT, Zhu Z, Brown CA, et al. White matter integrity is associated with CSF markers of AD in normal adults. *Neurobiol Aging* 2014;35(10):2263–2271.
 98. Smit RAJ, Trompet S, Sabayan B, et al. Higher visit-to-visit low-density lipoprotein cholesterol variability is associated with lower cognitive performance, lower cerebral blood flow, and greater white matter hyperintensity load in older subjects. *Circulation* 2016;134(3):212–221.
 99. Blesa R, Pujol M, Aguilar M, et al. Clinical validity of the “mini-mental state” for Spanish speaking communities. *Neuropsychologia* 2001;39(11):1150–7.
 100. Piersma D, Fuermaier ABM, de Waard D, et al. The MMSE should not be the sole indicator of fitness to drive in mild Alzheimer’s dementia. *Acta Neurol. Belg.* 2018;118(4):637–642.
 101. Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Field AS. Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics* 2007;4(3):316–329.
 102. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2011;1(1):a006189–a006189.
 103. Adalbert R, Coleman MP. Review: Axon pathology in age-related neurodegenerative disorders. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2013;39(2):90–108.
 104. Wheeler-Kingshott CAM, Cercignani M. About axial and radial diffusivities. *Magn. Reson. Med.* 2009;61:1255–1260.

105. Spielberg JM, Sadeh N, Leritz EC, et al. Higher serum cholesterol is associated with intensified age-related neural network decoupling and cognitive decline in early- to mid-life. *Hum. Brain Mapp.* 2017;38(6):3249–3261.
106. Meusel L-AC, Anderson ND, Parrott MD, et al. Brain function is linked to LDL cholesterol in older adults with cardiovascular risk. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2017;65(2):e51–e55.
107. Benitez A, Fieremans E, Jensen JH, et al. White matter tract integrity metrics reflect the vulnerability of late-myelinating tracts in Alzheimer’s disease. *NeuroImage Clin.* 2014;4:64–71.
108. Bartzokis G, Lu PH, Heydari P, et al. Multimodal magnetic resonance imaging assessment of white matter aging trajectories over the lifespan of healthy individuals. *Biol. Psychiatry* 2012;72(12):1026–1034.
109. Stricker NH, Schweinsburg BC, Delano-Wood L, et al. Decreased white matter integrity in late-myelinating fiber pathways in Alzheimer’s disease supports retrogenesis. *Neuroimage.* 2009;1(451):10–16.
110. Lu PH, Lee GJ, Shapira J, et al. Regional differences in white matter breakdown between frontotemporal dementia and early-onset Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis* 2014;39(2):261–269.
111. Cavado E, Lista S, Rojkova K, et al. Disrupted white matter structural networks in healthy older adult APOE ϵ 4 carriers – An international multicenter DTI study. *Neuroscience* 2017;357:119–133.
112. Salvadores N, Sanhueza M, Manque P, Court FA. Axonal degeneration during aging and its functional role in neurodegenerative disorders. *Front. Neurosci.* 2017;11:451.
113. Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2015;15(2):104–116.
114. Jacob A, Alexander JJ. Complement and blood–brain barrier integrity. *Mol. Immunol.* 2014;61(2):149–152.
115. Griffiths H, Irundika D, Lip G, et al. Oxidised LDL lipids, statins and a blood-brain barrier. *Free Radic. Biol. Med.* 2014;75:S15–S16.
116. Hainsworth AH, Minett T, Andoh J, et al. Neuropathology of white matter lesions, blood-brain barrier dysfunction, and dementia. *Stroke* 2017;48(10):2799–2804.
117. Kraft P, Schuhmann MK, Garz C, et al. Hypercholesterolemia induced cerebral small vessel disease. 2017;12(8):e0182822.
118. Aikawa T, Holm ML, Kanekiyo T. ABCA7 and pathogenic pathways of Alzheimer’s disease. *Brain Sci.* 2018;8(2) pii:E27.
119. Li H, Zhou J, Yue Z, et al. A complex association between ABCA7 genotypes and blood lipid levels in Southern Chinese Han patients of sporadic Alzheimer’s disease. *J. Neurol. Sci.* 2017;382:13–17.
120. Ramirez LM, Goukasian N, Porat S, et al. Common variants in ABCA7 and MS4A6A are associated with cortical and hippocampal atrophy. *Neurobiol. Aging* 2016;39:82–89.
121. Stage E, Duran T, Risacher SL, et al. The effect of the top 20 Alzheimer disease risk genes on gray-matter density and FDG PET brain metabolism. *Alzheimer’s Dement. Diagnosis, Assess. Dis.*

- Monit. 2016;5:53–66.
122. Roshchupkin G V., Adams HH, van der Lee SJ, et al. Fine-mapping the effects of Alzheimer's disease risk loci on brain morphology. *Neurobiol. Aging* 2016;48:204–211.
 123. Westlye LT, Reinvang I, Rootwelt H, Espeseth T. Effects of APOE on brain white matter microstructure in healthy adults. *Neurology* 2012;79(19):1961–9.
 124. Jones DK, Knösche TR, Turner R. White matter integrity, fiber count, and other fallacies: The do's and don'ts of diffusion MRI. *Neuroimage* 2013;73:239–254.

ANEXO I

Manuscrito en revision

Journal: Brain Imaging and Behavior

Title: Plasma LDL is associated to axonal degeneration in white matter areas involved in cognition

Authors: Ane Iriondo, Maite García-Sebastian, Arantzazu Arrospide, Maria Arriba, Sara Aurtenetxe, Myriam Barandiaran, Montserrat Clerigue, Mirian Ecay-Torres, Ainara Estanga, Alazne Gabilondo, Andrea Izagirre, Jon Saldias, Mikel Tainta, Jorge Villanua, Javier Mar, Felix M. Goñi, Pablo Martínez-Lage

Abstract: Dislipidemia is a risk factor for cognitive impairment. We studied the effect of interindividual variability of plasma lipids on white matter (WM) microstructure in cognitive regions, using diffusion tensor imaging (DTI) in 273 healthy adults. We also investigated the effect of plasma lipids on CSF neurofilament (NFL), an axonal degeneration marker. Low density lipoprotein (LDL) and triglycerides levels showed a negative effect on axial diffusivity (AxD) in multiple cognitive regions. High density lipoproteins (HDL) showed a positive effect. The association was independent of ApoE, blood pressure or use of statins. LDL moderated the relation between NFL and AxD in the body of the corpus callosum ($p = 0.041$), right cingulum gyrus ($p = 0.041$), right fornix/stria terminalis ($p = 0.025$) and right superior longitudinal fasciculus ($p = 0.020$). We conclude that LDL induces WM microstructural changes through axonal degeneration and might be a risk factor in the transition from healthy aging to pathology and neurodegenerative disorders.

CAPÍTULO

03



Metabolismo del colesterol cerebral, microestructura de la sustancia blanca y biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer

RESUMEN

El metabolismo anormal del colesterol y la generación de un exceso de sus oxisteroles influyen en la integridad y estructura de la membrana neuronal y pueden interferir con la amiloidogénesis propia de la enfermedad de Alzheimer (EA). Por otro lado, la constante renovación del colesterol es necesaria para el correcto mantenimiento de la microestructura de la sustancia blanca (SB). El objetivo de este trabajo es investigar el efecto del metabolismo oxidativo del colesterol cerebral y sus oxisteroles sobre la amiloidogénesis, neurodegeneración, patología tau, neuroinflamación y la microestructura de la SB, como posible fenómeno patológico temprano en personas asintomáticas.

Para ello, se ha estudiado la asociación de la variabilidad interindividual de los niveles en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de 24-hidroxicolesterol (24-OHC), 27-hidroxicolesterol (27-OHC), 7 β -hidroxicolesterol (7 β -OHC), 7-cetocolesterol (7-KC), β -amiloide (β A), tau total (t-tau), tau fosforilada (p-tau), neurofilamento de cadena ligera (NfL), YKL40, y la microestructura de la SB de las regiones involucradas en los procesos de la cognición, mediante imagen de tensor de difusión (DTI), aplicando modelos lineales generalizados (MLG) y análisis de mediación y moderación en 180 sujetos cognitivamente sanos. El estudio transversal se completa con un estudio longitudinal de cambios en los biomarcadores.

En el estudio transversal, el 7-KC mostró una correlación negativa con el β A₁₋₄₂ ($B = -0.20$; $p = 0.041$). El 7-KC tuvo un efecto negativo sobre la anisotropía fraccional (FA) y positivo sobre la difusividad media (MD), axial (AxD) y radial (RD) de las regiones involucradas en los procesos de cognición. El 7-KC moduló la asociación entre la AxD y el NfL en el esplenio ($B = 5.51$, $p = 0.017$) y genu ($B = 9.61$, $p = 0.000$) del cuerpo caloso y fórnix ($B = 1.53$, $p = 0.000$). El β A mostró una asociación positiva con la FA y negativa con la MD, AxD y RD del fórnix, cuerpo caloso, fascículo longitudinal inferior e hipocampo. En el estudio longitudinal, tras 2.8 años de seguimiento se observó un aumento significativo de los niveles de β A₁₋₄₂ ($p=0.000$). Los niveles superiores de 7 β -OHC en la visita basal se asociaron a un menor aumento del nivel β A ($B = -0.56$, $p = 0.036$) Los niveles superiores de MD y RD en el fascículo longitudinal superior en la visita basal se asociaron a un menor aumento de β A₁₋₄₂. El 7-KC moderó la asociación

entre la MD y el cambio longitudinal de βA_{1-42} en el fascículo longitudinal superior ($p=0.036$).

Este estudio aporta datos clínicos que apoyan la hipótesis de que los oxiesteroles formados por estrés oxidativo se relacionan con cambios en la integridad axonal de las regiones cognitivas de la SB y con el proceso de amiloidogénesis como posible acontecimiento temprano en la patogénesis de la EA.

INTRODUCCIÓN

1. Metabolismo del colesterol cerebral y enfermedad de Alzheimer

1.1 Metabolismo del colesterol cerebral

El cerebro contiene una gran cantidad de colesterol. El colesterol cerebral se encuentra principalmente en su forma no esterificada ¹. La mayor parte, 70%, se encuentra en las vainas de mielina. El resto, el 30%, en las membranas plasmáticas de células gliales y neuronas, manteniendo así su morfología y propiedades fisicoquímicas ². Además, como componente estructural esencial de las membranas celulares, participa en la formación y conexiones sinápticas de las dendritas. También influye en la función celular por sus productos oxidativos ³. En el animal de experimentación, la disminución de los niveles de colesterol cerebral altera la exocitosis de las vesículas sinápticas, la actividad neuronal y la neurotransmisión, y favorece la degeneración de las espinas dendríticas y las sinapsis ⁴. El colesterol cerebral es esencial en la fisiología durante el desarrollo y también en la edad adulta. Su metabolismo defectuoso se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas como la EA y Parkinson (para revisión ver ⁵⁻⁹). Aunque la concentración del colesterol se mantiene estable en el cerebro, es constantemente renovada. Para ello, los procesos de síntesis, almacenamiento y la degradación/eliminación del colesterol se encuentran estrechamente regulados.

1.1.1 Síntesis

Debido a que el metabolismo del colesterol cerebral está separado del resto del cuerpo por la barrera hematoencefálica (BHE) éste se sintetiza *de novo* en el cerebro. La síntesis tiene lugar en el retículo endoplasmático ¹⁰. Una vez sintetizado, el colesterol es transportado rápidamente a las vainas de mielina y membranas plasmáticas, proceso en el que interviene la Apolipoproteína E (ApoE). De hecho, la mayor parte del colesterol se encuentra unida a esta proteína en el citosol.

La síntesis es un proceso que consta de unas 30 reacciones bioquímicas que se pueden dividir en tres fases (**Figura 1**). La primera es la formación de mevalonato a partir de acetil-CoA mediante la enzima HMG-CoA reductasa. La segunda es la conversión de mevalonato a escualeno. En la última fase el escualeno se convierte en colesterol mediante la vía Bloch o la vía Kandutsch-Russel. Las neuronas, mediante la vía

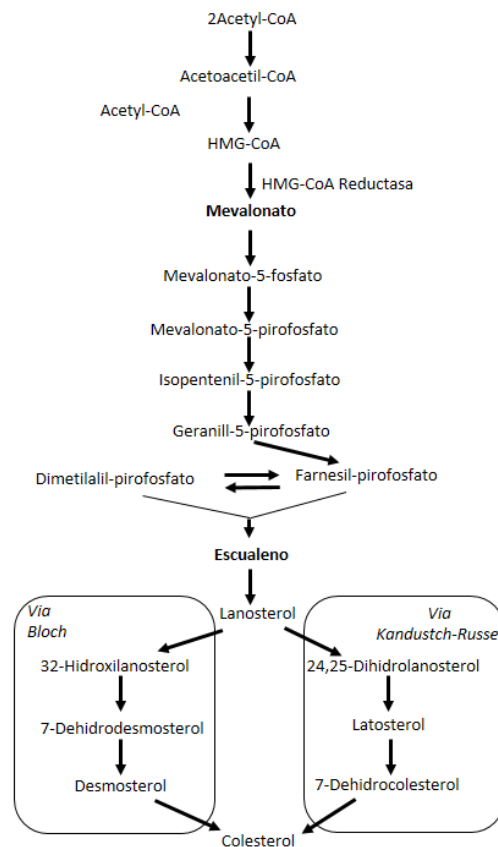
Kandutsch-Russel, tienen el latosterol como precursor del colesterol, mientras que el precursor en los astrocitos es el desmosterol formado por la via Bloch ¹¹. Las neuronas adultas tienen menos capacidad que los astrocitos para sintetizar de novo el colesterol y utilizan el colesterol sintetizado por los astrocitos. Mediante el receptor ABCA1 (*ATP-Binding Cassette A1*) de los astrocitos, se libera el complejo colesterol-ApoE. Este complejo se une a los receptores LDLR que se encuentran en las neuronas y se internaliza en endosomas. Estos endosomas se fusionan con lisosomas que contienen lipasas que hidrolizan el complejo y liberan el colesterol dentro de la neurona ¹².

En el proceso de síntesis, la enzima HMG-CoA reductasa juega un papel importante y se considera limitante de la síntesis del colesterol. De hecho esta enzima es regulada por el *feedback* del propio colesterol mediante la proteína SREBP (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*) que se encuentra en la membrana del retículo endoplasmático. En situación de falta de colesterol, la proteína SREBP juega el papel de factor de transcripción del gen de la enzima HMG-CoA reductasa ⁷.

Entre la etapa perinatal y la adolescencia, la cantidad de colesterol cerebral es mayor. Es cuando tiene lugar la producción de mielina por los oligodendrocitos. Después del proceso de mielinización, la tasa de síntesis disminuye notablemente y el metabolismo se ralentiza ¹³. Si la síntesis del colesterol es deficiente, la mielinización se bloquea ¹⁴.

1.1.2 Almacenamiento

El colesterol excedente se almacena en su forma esterificada. El colesterol se esterifica mediante acetilcoenzima-A:colesterol acetiltransferasa 1 (ACAT1) en el retículo endoplasmático ¹⁵. La concentración de ésteres de colesterol en el cerebro se mantiene en un nivel bajo, y la enzima colesterol hidrolasa puede volver a convertir los ésteres en colesterol no esterificado. La eliminación de ACAT1 lleva a una disminución (en un 86%) del nivel de ésteres de colesterol y algunos estudios plantean su inhibición como estrategia eficaz para la prevención y el tratamiento de la EA ¹⁶. La actividad de esta enzima ACAT1 es mayor en neuronas que en las células gliales ¹⁷. El movimiento del colesterol de las membranas plasmáticas al retículo endoplasmático es mayor en células con mayor cantidad de colesterol, permitiendo así un almacenamiento mayor ¹⁸.

Figura 1. Principales pasos en la biosíntesis del colesterol cerebral.

Nota. Modificado de Sun J-H et al. The role of cholesterol metabolism in Alzheimer's disease. Mol. Neurobiol. 2015;51(3):947-965.

1.1.3 Eliminación/Secreción

Para mantener constante la concentración del colesterol y el correcto funcionamiento de las neuronas, es necesario eliminar del cerebro el colesterol excedente. La degradación depende del hígado ya que las neuronas y las células gliales no son capaces de llevar a cabo este proceso. La BHE dificulta el paso del colesterol a la circulación periférica. Una pequeña cantidad de colesterol pasa al día a la circulación periférica por el LCR (1-2 mg), pero la mayor parte se secreta por otras vías, como son la unión a transportadores tipo ABCA y la formación de oxiesteroles.

La conversión del colesterol a oxiesterol es la mayor vía de secreción. La enzima colesterol 24-hidroxilasa (CYP46A1) convierte el colesterol en 24-hidroxicolesterol (24-OHC). A diferencia del colesterol, los oxiesteroles, como el 24-OHC pueden cruzar la BHE. Experimentos animales en ratones knock-out demuestran que el CYP46A1 es

responsable de cerca del 40% del recambio del colesterol ¹⁹. Estudios en células en cultivo demuestran que la enzima CYP46A1 se encuentra sobre todo en los somas y dendritas de las neuronas pero no en los axones o terminales presinápticos ²⁰. En el caso de los astrocitos, donde se sintetiza sobre todo el colesterol, hay muy poca expresión de CYP46A1²⁰. Esto indica que la secreción del colesterol tiene lugar principalmente en las neuronas.

1.1.4 Homeostasis

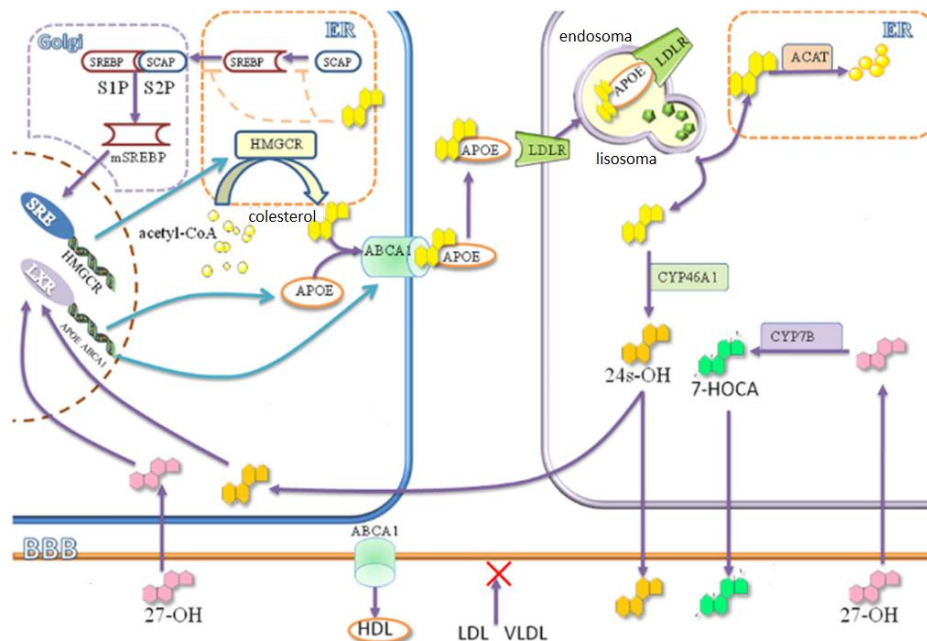
El colesterol periférico no influye en la homeostasis del colesterol cerebral debido a la BHE. Este proceso está regulado por los oxiesteroides. El 24-OHC es la mayor vía de secreción del colesterol del cerebro. Una reducción de 24-OHC se relaciona con la reducción de niveles de colesterol, manteniendo así la homeostasis del cerebro. ¹⁹. Esto sugiere que el 24-OHC puede modular el proceso de biosíntesis del colesterol. En la homeostasis también participa el 27-hidroxicolesterol (27-OHC). En este caso el 27-OHC realiza el camino opuesto al 24-OHC, es decir, pasa desde la circulación periférica al cerebro cruzando la BHE ²¹. La enzima responsable de la formación de 27-OHC es el CYP27A1 y se encuentra en la mayoría de los órganos y tejidos ²¹. El CYP27A1 se expresa también en el cerebro pero en menor cantidad que en la periferia. El 27-OHC entra en la neurona y puede ser metabolizado a ácido 7 α -hidroxi-3-oxo-4-colestenoico (7-HCOA) por la enzima CYP7B ²². Este 7-HCOA puede cruzar también la BHE y ser metabolizado en el hígado ²³. El 24-OHC y el 27-OHC pueden activar los receptores LXR (*liver X receptor*) ²⁴, los cuales inducen la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico, como el APOE y ABCA1 ²⁵. El APOE y el ABCA son los mayores reguladores del metabolismo cerebral y están estrechamente relacionados debido a que la formación del complejo ApoE-colesterol es dependiente de la proteína ABCA1 ²⁶ (**Figura 2**).

1.2 Oxiesteroides

Los oxiesteroides son derivados mono-oxigenados del colesterol y juegan un papel importante en las vías de secreción del colesterol cerebral. Gracias a sus propiedades físicas, los oxiesteroides cruzan las membranas lipofílicas y se redistribuyen en el cuerpo más rápidamente que el colesterol ²⁷. Los oxiesteroides se encuentran junto con el colesterol en la mayoría de las células pero en concentraciones significativamente más bajas que el colesterol (10^4 - 10^5 veces menos) ²⁸. Debido a la baja concentración en los

sistemas biológicos y a sus pobres características de ionización en la espectrometría de masas, el análisis de los oxiesteroles es complicado.

Figura 2: Homeostasis del colesterol cerebral.



Nota. Sun J-H et al. The role of cholesterol metabolism in Alzheimer's disease. Mol. Neurobiol. 2015;51(3):947-965.

La oxidación del colesterol tiene lugar sobre todo en las posiciones 4, 5, 6, 7, 24, 25 y 27. Los oxiesteroles se forman a través de la auto-oxidación del colesterol o mediante la acción de enzimas específicas²⁹. La auto-oxidación espontánea es una reacción no enzimática que puede iniciarse mediante diferentes compuestos, principalmente por especies reactivas de oxígeno (ROS) como son los radicales libres³⁰. Debido a su estructura, el colesterol es vulnerable a la auto-oxidación en diferentes posiciones, pero en particular en la posición C-7, el cual es susceptible a los ataques de los peróxidos radicales. El producto principal de la autooxidación es el 7-hidroperoxicolesterol, que se transforma rápidamente en los tres principales oxiesteroles formados por esta vía: 7-cetocolesterol (7-KC), 7 α -hidroxicolesterol (7 α -OHC), y 7 β -hidroxicolesterol (7 β -OHC)³⁰. La mayoría de los oxiesteroles que se encuentran en la circulación se forman mediante

reacciones enzimáticas. La mayoría de estas enzimas pertenecen a la familia del citocromo P-450 el cual se encuentra en las mitocondrias o retículos endoplasmáticos de las células. Los oxiesteroles más conocidos formados por esta vía son el 7 α -OHC, 27-OHC, 24-OHC, 4 β -hidroxicolesterol (4 β -OHC), y 25-hidroxicolesterol (25-OHC). En el cuerpo existe un equilibrio entre los oxiesteroles formados por la auto-oxidación y mediante reacciones enzimáticas. Además de estas dos vías principales, los oxiesteroles también pueden ser suministrados a través de los alimentos, en particular alimentos ricos en colesterol. Lo más probable es que se generen de forma no enzimática durante el procesamiento y la cocción de los alimentos.

Los oxiesteroles participan en la regulación del metabolismo, influyendo en la proteína SREBP y en receptores nucleares como los LXR³¹. También influyen en la fluidez, estructura y propiedades de las membranas plasmáticas. Debido a sus propiedades químicas, la molécula del colesterol tiene una posición y orientación específica en la membrana plasmática. Al añadir un grupo polar, como en el caso de los oxiesteroles, cambia la configuración y la interacción con otras moléculas membranales^{32,33}. Esta alteración favorece que los oxiesteroles se desplacen a otra posición membranar. Estos cambios hacen que la fluidez de la membrana cambie, afectando así a los dominios lipídicos de la membrana^{34,35}. El efecto de los oxiesteroles sobre los dominios lipídicos podría ser dependiente de la posición del carbono que se oxida en el colesterol.³²

Los oxiesteroles más estudiados son el 27-OHC y 24-OHC, ambos sintetizados por reacciones enzimáticas. El 24-OHC es específico de las neuronas. Una de sus funciones más importantes es la regulación del metabolismo del colesterol cerebral. El 24-OHC es un regulador endógeno del receptor nuclear LXR. Vía LXR, regula la expresión, síntesis y secreción de ApoE y la expresión de los transportadores de esteroides (ABCA) presentes en las membranas de los astrocitos³⁶. Las concentraciones de 24-OHC y CYP46A1 se estabilizan el primer año de vida y se mantienen durante la edad adulta³⁷. El 24-OHC es la forma más abundante del colesterol que pasa a la circulación periférica. De hecho, alrededor de 6-8mg/día de colesterol se secretan a la circulación en forma de 24-OHC, mientras que solo un 1-2mg/día de colesterol sale del cerebro unido a ApoE³⁸. Se estima que el 1% del 24-OHC que se produce en el cerebro pasa a la circulación por el LCR. La enzima CYP46A1 se expresa sobre todo en las neuronas piramidales del hipocampo y cortex, células de Purkinje del cerebelo e interneuronas hipocámpicas y cerebelares²⁰. En ratones *knockout* de CYP46A1 se encuentran alterados los mecanismos que participan en

el metabolismo del colesterol y también otros procesos como la producción de energía o las funciones cognitivas ³⁹. Estos ratones presentan también deficiencias severas en conductas de aprendizaje motora, espacial y asociativa ⁴⁰. El 27-OHC se sintetiza mediante la enzima CYP27A1 en diferentes tipos celulares pero muy poco en el cerebro. De hecho la mayoría de 27-OHC que se encuentra en LCR proviene del plasma ⁴¹. En los últimos años se está dando mucha importancia a los oxisteroles sintetizados mediante la auto-oxidación como son el 7-KC y 7 β -OHC. Los oxisteroles 7-oxigenados se relacionan con el estrés oxidativo, procesos inflamatorios y pro-apoptóticos y muerte celular, sobre todo en el caso del 7-KC ⁴²⁻⁴⁷. Se cree que este efecto citotóxico es debido principalmente a la incorporación de estos oxisteroles en las membranas lipídicas. Diferentes estudios muestran que los oxisteroles cambian la fluidez de la membrana y afectan a la estructura y propiedades de la misma ^{34,35,48}.

1.3 Metabolismo del colesterol cerebral, oxisteroles y enfermedad de Alzheimer

Cada vez más estudios demuestran que el metabolismo del colesterol cerebral está relacionado con la etiopatogenia de la EA ⁴⁹, concretamente con la patología amiloide y tau ⁵⁰. Los oxisteroles podrían ser el nexo de unión entre el metabolismo del colesterol cerebral y la patología de EA ^{49,51-53}. Los procesos de estrés oxidativo y neuroinflamación impulsados por los oxisteroles podrían ser algunos de los mecanismos influyentes en la EA, creando entre todos los mecanismos un *círculo vicioso* donde se afecta cada vez más la patología de la enfermedad ^{51,54}.

1.3.1 Colesterol y factores genéticos de riesgo de la enfermedad de Alzheimer

Existen diferentes polimorfismos genéticos relacionados con el metabolismo del colesterol que contribuyen al riesgo de desarrollar EA como son el alelo ϵ 4 del gen APOE (APOE4) o el transportador ABCA1 ⁵⁵. Entre ellos, la APOE4 es el factor de riesgo genético de mayor peso para la EA esporádica de comienzo tardío.

La ApoE es la principal proteína de unión del colesterol cerebral y uno de los mayores reguladores de su metabolismo, participando en la redistribución y homeostasis del colesterol ⁵. El cerebro, después del hígado, es el segundo órgano con mayor cantidad de ApoE ⁵⁶. Los astrocitos son las células con mayor nivel de expresión de APOE, seguidos por los oligodendrocitos, microglía y células ependimarias ⁵⁷. Las neuronas expresan la APOE en condiciones fisiológicas y patológicas ⁵⁷⁻⁵⁹. La formación del complejo ApoE-colesterol es dependiente de la proteína ABCA1 ²⁶. Este complejo, una vez secretado, se

une a diferentes tipos de receptores neuronales^{60,61}. Ratones *knockout* de ABCA1 tienen una disminución significativa de los niveles de ApoE⁶². Algunos estudios observan niveles normales de colesterol en ratones *knockout* de APOE^{63,64}, mientras que otros muestran una disminución de los niveles de colesterol⁶⁵. Una vez dentro de la neurona, la ApoE participa en la regulación del metabolismo lipídico,⁶⁶ transporte intracelular del colesterol y esterificación del colesterol⁶⁷.

De los tres polimorfismos (APOE2, APOE3, APOE4), APOE4 muestra una capacidad menor para unirse a sus receptores que APOE2 o APOE3. En este sentido, APOE ε2 tiene un efecto protector moderado y APOE4 confiere un riesgo aumentado frente a la EA⁶⁸. Ser portador del alelo ε4 de la APOE se relaciona con una mayor prevalencia de EA y una edad de inicio de los síntomas más temprana⁶⁹. Los resultados de los estudios realizados hasta el momento con personas asintomáticas indican que los portadores de la APOE4 muestran una mayor carga de βA (PET-PiB, LCR), y se encuentran más avanzados en el *continuum* de la enfermedad, pero que ser portador del alelo ε4 no ejerce un efecto sobre la progresión de la EA preclínica a la clínica⁷⁰⁻⁷².

Diferentes trabajos estudian la relación entre el βA₁₋₄₂, la APOE4 y el colesterol. Un estudio transversal de 78 sujetos, donde la mitad eran cognitivamente sanos y la otra mitad tenían deterioro cognitivo ligero (DCL), mostró que un nivel alto de colesterol en plasma y el genotipo APOE4 estaban independientemente relacionados con un aumento de depósitos de amiloide.⁷³ En la misma línea, el estudio longitudinal de Vemuri y colaboradores, donde estudiaron a 942 sujetos (737 cognitivamente sanos, 174 DCL, 24 enfermedad neurodegenerativa y 7 sin diagnóstico), demostraron que el genotipo APOE4 y la dislipidemia eran factores de riesgo independientes de un aumento de depósito de amiloide al cabo del tiempo⁷⁴. Un estudio longitudinal reciente analizó la relación entre niveles basales de colesterol en mujeres asintomáticas de 45-55 años, el genotipo APOE y βA₁₋₄₂ en PET veinte años después. Mostraron que el efecto de la APOE4 sobre el nivel de βA no estaba mediado por el colesterol pero que el riesgo de un incremento de βA₁₋₄₂ era mayor en mujeres portadoras de APOE4 y con niveles de colesterol basal >6.2 mmol/l que en las mujeres portadoras de APOE4 y con niveles inferiores de colesterol⁷⁵. En resumen, estos estudios sugieren que el colesterol y la APOE4 son factores independientes del acúmulo de amiloide y que el efecto del colesterol sobre el incremento de βA₁₋₄₂ podría estar influenciado por la APOE4.

1.3.2 Colesterol, oxisteroles y β -amiloide

Las llamadas balsas lipídicas o *rafts* son nanodominios transitorios de las membranas plasmáticas ⁷⁶. Muestran una composición lipídica específica, con niveles elevados de colesterol, esfingolípidos y ácidos grasos saturados. Gracias a esta composición, tienen una estructura y un empaquetamiento particular que facilita la interacción de algunos lípidos y proteínas en concreto, formando así una plataforma de señalización dinámica esencial para las funciones fisiológicas ⁷⁷. Las balsas lipídicas del cerebro participan en el desarrollo neuronal, sinapsis, crecimiento axonal y exo/endocitosis ⁷⁸. Las alteraciones en la composición lipídica de estos nanodominios se relacionan con EA y se observan ya en fases iniciales de la enfermedad, antes de que aparezcan las placas seniles y los ovillos neurofibrilares ⁷⁹. Cada vez más estudios demuestran la importancia de las balsas lipídicas en los procesos de producción, agregación y eliminación de βA_{1-42} , sugiriendo que el colesterol pudiera estar involucrado en los acontecimientos patológicos de la patogénesis de la EA ^{80,81}.

El colesterol afecta al procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP por sus siglas en inglés) y la producción de βA_{1-42} . La APP se encuentra en muchas fracciones membranales, además de las balsas lipídicas ⁸², en cambio dos de las tres enzimas que participan en el procesamiento de la APP y que pertenecen a la vía amiloidogénica, como son las enzimas β -secretasa (BACE) y γ -secretasa, se encuentran sobre todo en las balsas lipídicas ⁸³. Diferentes estudios sugieren que la APP asociada a las balsas lipídicas genera βA , mientras que la APP que se encuentra en otras fracciones membranales se relaciona con la vía no-amiloidogénica ⁸⁴. Teniendo en cuenta que la APP tiene un dominio específico de unión del colesterol, el colesterol podría estar influenciando la localización de la APP en las balsas lipídicas ⁸³. Durante la progresión de la EA, la enzima BACE se acumula en las balsas lipídicas y muestra una mayor interacción con la APP, mientras que la γ -secretasa no se altera ⁷⁹.

Además de participar en la síntesis de βA_{1-42} , algunos estudios sugieren que el colesterol también influye en la agregación de βA_{1-42} ⁸⁵. La eliminación del colesterol de las neuronas hipocampales en los modelos animales de alzheimer, reduce los niveles de βA_{1-42} en el cerebro, mientras que el aumento del colesterol conduce a su aumento ⁸⁶. No se conoce bien el mecanismo que subyace a este efecto. Algunos estudios sugieren que las alteraciones en la interacción entre colesterol y algunos gangliósidos membranales, lípidos necesarios para la agregación del péptido βA_{1-42} , podría ser el mecanismo ⁸⁷. Un

estudio reciente mostró que el colesterol promueve la agregación de βA_{1-42} aumentando la fase de nucleación primaria hasta veinte veces más ⁸⁸. Cualquiera que sea el mecanismo, como consecuencia de esta agregación, existe también una relación entre el colesterol y la toxicidad de βA_{1-42} . Algunos estudios sugieren que un aumento del colesterol membranal induce una mayor citotoxicidad de βA_{1-42} ⁸⁹.

El colesterol también participa en la eliminación de βA_{1-42} ⁸¹. Se han descrito diferentes mecanismos posibles para este efecto. Un posible mecanismo está relacionado con la asociación entre el colesterol y la actividad de las enzimas encargadas de la degradación de βA_{1-42} ⁹⁰. Otro estudio, realizado en modelos animales de Alzheimer, observó que un nivel alto de colesterol cerebral alteraba la fusión autofagosoma-lisosoma y que esta alteración impedía la degradación de βA_{1-42} ⁹¹. El βA_{1-42} puede ser también eliminado del cerebro cruzando la BHE. Debido a que los solutos polares como el péptido βA_{1-42} no pueden cruzar la BHE, el βA_{1-42} se une a las proteínas transportadoras. Un estudio mostró que una disminución de la expresión de estas proteínas transportadoras en la BHE se asociaba a una reducción del intercambio del colesterol por la BHE y un menor transporte de βA_{1-42} ⁹². La no correcta eliminación del βA_{1-42} afecta a la integridad de la membrana, a la formación de poros y a la homeostasis celular, potenciando así la neuroinflamación ⁹³.

Los oxiesteroles modifican la estructura y propiedades de la membrana. Comparando con el colesterol, los oxiesteroles tienen una orientación diferente en la membrana, afectando así la estructura y propiedades de las balsas lipídicas ⁹⁴. Los oxiesteroles muestran mayor afinidad por los lípidos de las balsas lipídicas, como las esfingomielinas, que el propio colesterol, sugiriendo que el colesterol podría ser parcialmente reemplazado por sus derivados oxidativos ³⁴. La incorporación de los oxiesteroles en las balsas lipídicas podría estar influenciando la patología amiloide en la EA. Un estudio mostró que al sustituir el colesterol por oxiesteroles, la membrana se hacía más sensible a la βA y que la posición del grupo oxigenado influía de diferente forma en la localización membranal de βA_{1-42} ⁹⁵. Al añadir 24-OHC a las células, se observa un incremento de la actividad de la α -secretasa y disminución de β -secretasa, en cambio no se observa ningún cambio al introducir 27-OHC ⁹⁶. Un estudio sugiere que el 24OH suprime la producción de βA_{1-42} inhibiendo el tráfico intracelular de la APP ⁹⁷. En resumen, parece que el 24-OHC favorece la vía no amiloidogénica, mientras que el 27-OHC estimula la vía amiloidogénica ^{98,99}. Además del

24-OHC y el 27-OHC, otros oxisteroles formados también por la vía enzimática, como es el caso del 25-OHC, influyen también en las balsas lipídicas a través del βA_{1-42} ¹⁰⁰.

En los últimos años se están llevando a cabo estudios para investigar el papel de los oxisteroles formados por la autooxidación en las membranas plasmáticas. La mayoría de estos estudios se centran en el papel del 7-KC, el mayor producto oxidativo del colesterol formado por ROS. La sustitución del colesterol por el 7-KC aumenta la interacción entre las moléculas membranales afectando así directamente a las propiedades de la membrana³⁵ y aumenta la nucleación de βA_{1-42} y disminuye su elongación fibrilar manteniendo así el péptido en agregados protofibrilares, la especie más tóxica¹⁰¹.

En resumen, la asociación entre el metabolismo del colesterol cerebral y la fisiopatología de la EA, está estrechamente relacionada con la estructura y las propiedades de la membrana plasmática y más concretamente con las balsas lipídicas.

1.3.3 Oxisteroles en la clínica de la enfermedad de Alzheimer

Con el objetivo de analizar las diferencias entre sujetos con EA y controles, en los últimos años se están llevando a cabo diferentes estudios de cuantificación de oxisteroles en la circulación o en cerebros *post-mortem*.

1.3.3.1 Cerebros post-mortem

En 2009, Hascalovici y colaboradores no encontraron ninguna diferencia significativa en los niveles cerebrales de 7α -OHC, 4β -OHC, 7β -OHC, 7-KC y 24-OHC entre los controles, DCL y EA¹⁰². En cambio, el estudio llevado a cabo por Testa y colaboradores analizó 10 oxisteroles (24-OHC, 27-OHC, 7-KC, 4α -OHC, 4β -OHC, 7β -OHC, α -epoxy-OHC, β -epoxy-OHC, 25-OHC, 7α -OHC) en cerebros post-mortem clasificados según el estadio de Braak. Los sujetos en estadio I y II los clasificaron como estadio temprano y los de estadio IV-V como estadio tardío. Observaron que los niveles de todos los oxisteroles, excepto el 24-OHC, aumentaban durante la progresión de la enfermedad, y que este aumento era significativo entre los sujetos de EA tardía y controles, y en el caso de 7α y 7β -OHC también entre sujetos en estadio temprano y controles. En cuanto al 24-OHC, no observaron diferencias significativas entre el nivel en controles y en sujetos en estadio temprano, en cambio hallaron que el nivel de los sujetos en estadio tardío era significativamente menor que en los controles¹⁰³.

1.3.3.2 Plasma

En la demencia, especialmente en la EA, existe controversia sobre la dirección de la asociación entre los oxiesteroles y EA. Estudios clínicos en pacientes con deterioro cognitivo que no cumplen criterios de demencia, muestran un pequeño incremento no significativo en los niveles plasmáticos de 24-OHC, 7-KC y 7 β -OHC ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶, y un incremento significativo de 27-OHC ^{106,107} con respecto a los controles cognitivamente normales. En el caso de sujetos diagnosticados de EA recientemente, algunos estudios demuestran que los niveles de 24-OHC y 27-OHC están modesta pero significativamente incrementados respecto a los controles ^{105,108-110}. Estos hallazgos no se replicaron en otros estudios ^{104,111,112}. Se han encontrado niveles superiores de 24-OHC en sujetos en estadios tempranos de la enfermedad que en tardíos ^{105,113}. De acuerdo con este resultado, pacientes con EA de larga duración tienen niveles inferiores de oxiesteroles comparados con los sujetos con DCL o con controles cognitivamente sanos ¹¹⁴⁻¹¹⁷. Un estudio longitudinal mostró que los niveles absolutos de 24-OHC y 27-OHC mostraban correlación con el rendimiento cognitivo de la visita basal y longitudinal, pero no con el cambio longitudinal del rendimiento cognitivo ¹¹⁸. En 2012, otro estudio longitudinal demostró que sujetos cognitivamente sanos con niveles superiores de 24-OHC eran más propensos a desarrollar deterioro cognitivo a los 8 años y que esta diferencia en los niveles plasmáticos de oxiesterol ocurría al menos 4 años antes de la aparición del deterioro ¹¹⁹. Se podría argumentar que parte de las controversias encontradas en los estudios transversales se deben a estas observaciones de que los niveles de oxiesterol pueden cambiar longitudinalmente durante la evolución de la enfermedad. No está claro si el aumento de los niveles de oxiesterol en las primeras etapas de la enfermedad refleja que la alteración del metabolismo del colesterol está implicada en la fisiopatología de la EA o es sólo una consecuencia del proceso degenerativo. La disminución en etapas posteriores podría reflejar una pérdida selectiva de células neuronales que expresan la enzima colesterol 24-hidroxilasa, CYP46A1 ¹, responsable de convertir el colesterol en 24-OHC. De todas formas hay que tener en cuenta que los niveles plasmáticos de oxiesterol están bajo el control de múltiples parámetros, especialmente el nivel de colesterol total libre, que también puede explicar las diferencias entre estudios. De hecho, varios estudios analizan la relación oxiesterol/colesterol. Mientras que los niveles absolutos de 24-OHC y 27-OHC en plasma se encuentran incrementados en los estadios tempranos de la EA, la relación 24-OHC/colesterol o 27-OHC/colesterol es menor en

sujetos con DCL y EA respecto a los controles cognitivamente sanos ^{120,121}. Además, la gravedad de la EA podría estar relacionada con la reducción de los valores de la relación 24-OHC/colesterol, ya que los valores más bajos se encontraron en el grupo de EA, los más altos en el grupo de control y los niveles intermedios en el grupo de DCL ^{115,122}. Estos estudios muestran que no hay ninguna asociación significativa entre los niveles de colesterol total y EA por lo que se podría interpretar que la reducción del cociente esterol/colesterol puede representar una disminución del nivel plasmático de 24-OHC en relación con los niveles normales de colesterol en la etapa tardía de la EA. Por el contrario, respecto al rendimiento cognitivo, el estudio de Zuliani y colaboradores mostró que un mayor cociente de 24-OHC/colesterol se asociaba a un peor rendimiento cognitivo obtenido en las pruebas neuropsicológicas. De todas formas este resultado requiere un análisis cuidadoso debido a que en este trabajo se mezclaron sujetos con diferentes patologías ¹⁰⁵. En el proceso del envejecimiento, los cocientes 24-OHC/colesterol y 27-OHC/colesterol no mostraron ninguna relación significativa con el rendimiento cognitivo ¹²³.

Algunos estudios analizan la relación 24-OHC/27-OHC con el objetivo de conocer la proporción entre el metabolismo del colesterol cerebral y el periférico. El estudio transversal de Kolsch y colaboradores demostró que los pacientes con DCL o EA tenían una mayor proporción de 24-OHC/27-OHC que los sujetos cognitivamente sanos ¹²⁰. Estos resultados fueron confirmados mediante un estudio longitudinal donde sujetos cognitivamente sanos con mayor cociente 24-OHC/27-OHC fueron más propensos a desarrollar DCL o EA al cabo de 8 años ¹¹⁹. En resumen, sujetos con DCL o EA muestran niveles más altos de oxidación del colesterol en el cerebro.

En cuanto a la relación entre oxisteroles en plasma y biomarcadores de EA, no se encontró una asociación significativa entre niveles de βA_{1-42} , tau, p-tau en LCR, y niveles plasmáticos de 24-OHC y 27-OHC en sujetos diagnosticados de EA probable ¹²⁴. Un trabajo reciente mostró una asociación positiva entre niveles de 27-OHC y nivel de βA_{1-40} en plasma, pero no con βA_{1-42} ¹⁰⁶. Al estratificar los sujetos con quejas cognitivas de acuerdo a los niveles de los biomarcadores, los sujetos con patología EA, es decir niveles inferiores de βA_{1-42} y superiores de tau, mostraron niveles inferiores de 24-OHC y 27-OHC en plasma ¹²⁵. El cociente 24-OHC/27-OHC se correlaciona con depósitos de amiloide en sujetos con DCL ¹²⁶. Estos resultados sugieren que la posible correlación entre los oxisteroles plasmáticos y los biomarcadores del LCR en las primeras etapas de

la enfermedad desaparece a medida que la enfermedad progresa, cuando los niveles de los oxiesteroles y de biomarcadores se ven completamente alterados. En relación también a la patología de la EA, se observó una asociación positiva entre el nivel de 27-OHC en plasma y nivel de sAPP β en LCR ¹⁰⁹. Dado que sAPP β es un producto final del catabolismo anormal de la APP, estos estudios muestran que, aunque el mecanismo aún no esté claro, puede haber una relación entre los niveles plasmáticos de oxiesteroles y la amiloidogénesis en la EA.

La relación entre los niveles plasmáticos de oxiesteroles y el genotipo APOE tampoco está clara. Mientras que unos estudios muestran que el genotipo APOE es un predictor independiente de la relación 24-OHC/colesterol ^{118,122}, otros no encuentran ninguna asociación significativa entre el genotipo APOE y niveles de los oxiesteroles en plasma ^{108,127}.

Respecto a la neuroimagen estructural, los oxiesteroles en plasma se correlacionan con la atrofia cerebral. Los cocientes más altos de atrofia se asocian con una reducción progresiva de los niveles plasmáticos de 24-OHC ¹¹⁵. Se ha observado también una correlación significativa entre el nivel de 24-OHC y el volumen hipocampal ¹²⁸ o el volumen de toda la sustancia gris en sujetos de mediana o avanzada edad ¹¹⁵.

En resumen, todos estos trabajos muestran que el metabolismo del colesterol cerebral está alterado en EA y que se relaciona con la gravedad de la enfermedad, neurodegeneración y atrofia.

1.3.3.3 Líquido cefalorraquídeo

El 99% de la producción diaria de oxiesteroles cerebrales pasa a la circulación por la BHE, y solo el 1% entra en el LCR ^{37,129}, por tanto, hay una mayor concentración en el plasma que en el LCR. No obstante, dado que los niveles de oxiesteroles plasmáticos pueden estar influenciados por el metabolismo del colesterol de diversos órganos, el LCR es una gran ventana para analizar el metabolismo cerebral del colesterol y la relación de los oxiesteroles con las enfermedades neuronales ⁴¹.

Los sujetos con DCL tienen niveles superiores de 24-OHC y 27-OHC en LCR que los controles cognitivamente normales ^{112,113,130-133}. Además, los sujetos con DCL que progresan a demencia tienen niveles superiores de 24-OHC que sujetos con DCL que no progresan ¹³⁰. Este incremento de 24-OHC también se ha descrito en sujetos con EA respecto a los controles ^{109-111,113,130-133} excepto en el trabajo de Kolsch y colaboradores

¹³⁴. Un trabajo reciente de Griffiths y colaboradores no encuentra diferencias significativas en los niveles de 25-OHC, 24-OHC, 7 α -OHC y 7 β -OHC entre sujetos con EA y controles. ¹³⁵. Este resultado requiere un análisis cuidadoso debido a que en este trabajo los sujetos además de EA también tenían hidrocefalia. Leoni y colaboradores también mostraron que entre el grupo de sujetos con DCL que progresaron a demencia, el porcentaje de sujetos con niveles altos de 24-OHC era incluso mayor que el número de sujetos con niveles patológicos de β A₁₋₄₂, Tau o P-tau. Por el contrario, en enfermos con EA, el número de pacientes con niveles patológicos de 24-OHC fue similar o incluso menor que el número de pacientes con niveles patológicos de Tau, P-tau, y β A₁₋₄₂ ^{130,132}. Este hallazgo podría estar relacionado con la pérdida de neuronas productoras de 24-OHC en las etapas avanzadas de la enfermedad, pero también podría sugerir que el metabolismo del colesterol alterado podría estar involucrado en la fisiopatología de las etapas iniciales. Aunque no se han descrito asociaciones significativas entre los niveles de los oxisteroles en LCR y niveles de A β ₄₂ en personas con DCL, EA o controles ^{109,110,130,132}, las concentraciones de 24-OHC y 27-OHC en LCR de pacientes con EA y en controles muestran una correlación positiva con niveles de sAPP α y sAPP β ¹⁰⁹. Al introducir en el modelo la edad, sexo y el genotipo APOE, la asociación desaparece en controles ¹⁰⁹. Estos resultados sugieren que, aunque los niveles de 24-OHC y 27-OHC pueden no ser marcadores específicos de EA, un metabolismo desequilibrado del colesterol puede facilitar el proceso amiloidogénico y la acumulación de amiloide. Diferentes estudios han descrito una asociación positiva entre los niveles de oxisteroles y niveles de tau y ptau en pacientes con DCL y EA ^{124,130-132}. Además, la disminución de la actividad de la enzima CYP46A1, responsable de la síntesis de 24-OHC, podría estar implicada en la disfunción de memoria que se asocia a la patología tau ¹³⁶. Estos resultados sugieren una correlación entre el nivel de 24-OHC y la muerte neuronal.

Respecto al genotipo APOE, sujetos con deterioro cognitivo y portadores del alelo ϵ 4, tienen niveles superiores de 24-OHC y 27-OHC en LCR que los no portadores ^{113,132,137}. Además, hay una correlación positiva entre los niveles de ApoE y 24-OHC en LCR en sujetos con DCL y EA ^{113,130,131}. Dado que el 24-OHC se transporta por el LCR mediante la proteína ApoE, este hallazgo podría sugerir que los cambios en la eficiencia del sistema de transporte ApoE-24-OHC pudieran estar involucrados en los mecanismos de la enfermedad. Un trabajo de revisión sobre estudios que relacionan la APOE, el metabolismo del colesterol cerebral y la proteína tau, llega a la conclusión de que durante

la neurodegeneración, cuando existe un incremento de la proteína tau, el colesterol acumulado en las neuronas se convierte en 24-OHC. Sugieren que la liberación de 24-OHC de las neuronas induce la secreción de ApoE por los astrocitos, y que ambos están relacionados con la intensidad del proceso neurodegenerativo y la lesión neuronal ¹³⁸. La relación entre niveles de 24-OHC, ApoE y la cantidad de células involucradas en el proceso neurodegenerativo también sugiere que la expresión de APOE regulada por el 24-OHC es un mecanismo de protección de las neuronas frente a la lesión, daño o neurodegeneración ¹³⁹.

Respecto a la neuroimagen estructural y niveles de oxiesterol en LCR, el estudio de Besga y colaboradores mostró que en sujetos con quejas cognitivas y patología EA definida por los biomarcadores en LCR, los niveles de 24-OHC mostraban correlación positiva con la severidad de HSB en todo el cerebro, mientras que el 27-OHC solo lo hacía en áreas frontales y parieto-occipitales. En cambio, en sujetos sin patología EA, los niveles de 24-OHC mostraban correlación negativa con la cantidad de HSB. Sugieren que la asociación positiva hallada en el grupo de los sujetos con patología EA podría entenderse como una mayor eliminación del colesterol a partir de la desmielinización en curso ¹²⁵.

En resumen, y en el contexto de todos estos trabajos, se puede afirmar que los niveles de los oxiesteroles en el LCR reflejan cambios en el metabolismo del colesterol cerebral en EA y pueden proporcionar importantes pistas sobre los mecanismos celulares subyacentes.

2. Metabolismo del colesterol cerebral y microestructura de la sustancia blanca

Diversos estudios han mostrado datos contradictorios respecto a la asociación significativa entre los niveles plasmáticos de colesterol y cambios en la microestructura de la SB (Capítulo 2). En cambio, según nuestro conocimiento, no existe ningún estudio sobre el metabolismo del colesterol cerebral o los oxiesteroles en LCR y su relación con la microestructura de la SB.

3. Microestructura de la sustancia blanca y enfermedad de Alzheimer

La relación entre la microestructura de la SB y EA se ha descrito ampliamente en el Capítulo 1.

Hipótesis

La alteración del metabolismo cerebral del colesterol, y más en concreto la generación de sus oxистерoles, está involucrada en la patogénesis de la EA. Se plantea la hipótesis de que la variabilidad interindividual de los oxистерoles 24-OHC, 27-OHC, 7 β -OHC y 7-KC en LCR se relaciona con cambios en la microestructura de la SB (índices de la DTI) y se asocia a niveles inferiores de β A₁₋₄₂ y/o superiores de t-tau, p-tau o NFL. Además, la asociación entre los oxистерoles y los biomarcadores de EA puede estar relacionada con procesos de neuroinflamación y por tanto con un aumento de los niveles de YKL-40.

Objetivo

El objetivo de este capítulo es analizar la asociación entre los niveles de 24-OHC, 27-OHC, 7 β -OHC y 7-KC en LCR, con los biomarcadores de la EA en LCR y sus cambios a lo largo del tiempo, y con los índices de DTI que reflejan el estado de la microestructura de la sustancia blanca, especialmente en las regiones relacionadas con la cognición, en sujetos cognitivamente sanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Sujetos

Para este estudio se utilizaron los participantes de la cohorte del PGA. Dado que el objetivo del presente capítulo es el estudio transversal y longitudinal de la relación entre la microestructura de la SB, los metabolitos del colesterol y biomarcadores de EA en LCR, se añadieron dos criterios de inclusión adicional: disponibilidad de muestra de LCR de la visita basal y de la primera visita longitudinal y ausencia de deterioro cognitivo definido por una puntuación de 0 en la Escala de Evaluación Clínica de Demencia (*Clinical Dementia Rating*, CDR) en la visita basal. De los 408 participantes del PGA, en 180 se disponía de muestra de LCR en dos visitas (basal y seguimiento). De ellos, 17 tenían un CDR de 0.5 y 10 mostraron hallazgos incidentales en la resonancia magnética. En total se incluyeron 153 sujetos.

En el caso de los análisis de la microestructura de la SB, se excluyeron también los sujetos con artefacto en la imagen de la resonancia magnética (n=26) que impedía un correcto análisis. En total se incluyeron 127 sujetos.

2. Variables objeto de estudio

2.1 Variables principales

2.1.1 Oxiesteroides

2.1.1.1 Preparación de muestras para el análisis de los oxiesteroides

En el caso del LCR, se tomaron 500 µl de LCR y se le añadieron 1000 µl de Metanol. En el caso del plasma, se cogieron 70 µl de plasma y se le añadieron 430 µl de Metanol. Las muestras se agitaron en un agitador Vortex y se dejaron 10 min en hielo. Después se sometieron a ultrasonidos durante 10 min en un baño de agua a temperatura ambiente y se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min. Por último se llevaron a sequedad mediante vacío y se guardaron a -80 °C hasta el análisis.

2.1.1.2 Extracción y análisis de los oxisteroles

Los oxisteroles se extrajeron en fase sólida utilizando metanol. Fueron analizados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en la Universidad de Aston (Birmingham) con la colaboración de la Dra. Irundika H.K. Dias¹⁴⁰.

2.1.2 Biomarcadores en líquido cefalorraquídeo

Las muestras de LCR se analizaron en el laboratorio de Neurociencias de la Universidad de Gothenburg, Suecia, en colaboración con el Dr. Henrik Zetterberg. Este laboratorio participa en el programa de control de calidad de biomarcadores de LCR de la *Alzheimer's Association*. Se determinaron los niveles de los biomarcadores mediante técnicas descritas anteriormente (MSD: $\beta_{A_{1-42}}$, $\beta_{A_{1-40}}$; Fujirebio Europe INNOTEST: t-tau y p-tau)¹⁴¹. Además de los niveles de cada biomarcador, se han calculado las relaciones $\beta_{A_{1-42}}/\beta_{A_{1-40}}$, tau/β_A y $\text{p-tau}/\beta_A$, que serán empleados como análisis complementarios de biomarcadores de EA en LCR.

Se consideraron positivos los biomarcadores de amiloidosis y neurodegeneración en LCR en función del punto de corte definido en el laboratorio de Gothenburg ($\beta_{A_{1-42}}/\beta_{A_{1-40}} \leq 0.08$, t-tau ≥ 400 pg/ml, p-tau ≥ 60 pg/ml en menores de 60 años y ≥ 80 pg/ml en mayores de 60 años). Sujetos con niveles de $\beta_{A_{1-42}}/\beta_{A_{1-40}}$ inferiores a 0.08 se denominan β_A+ , y con niveles superiores, β_A- .

2.1.3 Microestructura de la sustancia blanca

2.1.3.1 Adquisición de datos

Las imágenes de todo el cerebro se obtuvieron mediante el escáner Siemens 3T Magnetom TrioTim (Siemens, Erlangen, Alemania) en combinación con una bobina principal de 32 canales. Se utilizó el programa informático AutoAlign Head LS (Siemens) para aumentar la homogeneidad inter-individual en la adquisición de la imagen. Las imágenes de difusión se obtuvieron utilizando una secuencia de imagen ecoplana (EPI) con las siguientes especificaciones: TR 9300 ms, TE 92 ms, tamaño de vóxel: 1,7-mm, 71 cortes consecutivos, matriz de adquisición 122×122 (FOV 208 mm), 6/8 transformada de Fourier parcial, 64 direcciones de difusión con valor-b de 1000 s/mm², y una imagen sin difusión. El ancho de banda fue de 1640 Hz/píxel.

2.1.3.2 Procesado de imagen y análisis

Las imágenes DICOM se convirtieron en archivos NIFTI comprimidos en 4D y se extrajeron las direcciones del gradiente de difusión con dcm2nii (parte del paquete MRICron, <http://www.mccauslandcenter.sc.edu/mricro/mricron/>). Después se procesaron y analizaron los cerebros en 4D mediante la herramienta del FSL *Tract-Based Spatial Statistics (TBSS)* (FMRIB Software Library, Version 5.0.5; FMRIB, Oxford, United Kingdom) ¹⁴²⁻¹⁴⁴. Una vez convertida la imagen, se ajustó un modelo tensor a los datos de difusión en bruto utilizando FDT (FMRIB's Diffusion Toolbox) y se crearon los mapas de DTI (FA, MD, AD, y RD). Mediante BET (*Brain Extraction Tool*) ¹⁴⁵ se extrajeron del cerebro las imágenes de FA utilizando b=0 como volumen de referencia.

Debido a que la plantilla estándar facilitada por el programa FSL (FMRIB58_FA) se basa en sujetos entre 20-50 años y los sujetos del presente estudio tienen entre 40-75 años, se creó una plantilla específica para el estudio. Los datos de FA de todos los sujetos se alinearon en esta nueva plantilla usando la herramienta de registro no lineal FNIRT que utiliza una representación en b-spline del campo warp de registro ¹⁴⁶. Los archivos warp que se obtuvieron se aplicaron a las imágenes de MD, AxD y RD.

Antes del análisis estadístico de los vóxeles, los datos de FA de todos los sujetos se proyectaron en el esqueleto del tracto de la media de los valores de FA que representa los centros de todos los tractos comunes del grupo ¹⁴⁷.

2.2 Covariables

2.2.1 Variables sociodemográficas

Se tuvieron en cuenta las siguientes variables demográficas: género (mujer/hombre), edad (años) y años de educación.

2.2.2 Genotipo APOE

Se analizaron los polimorfismos de APOE mediante el ADN de las células sanguíneas utilizando procedimientos estándar ¹⁴⁸. El análisis fue realizado en el laboratorio de neurociencias del Instituto Biodonostia (colaboración con la Dra. Ana Gorostidi) sobre una muestra de ADN previamente almacenada en el Biobanco Vasco. Los participantes se clasificaron como portadores APOE ϵ 4, si tenían al menos un alelo ϵ 4 (APOE+), y como no portadores si no tenían ninguno (APOE-).

2.2.3 Hiperintensidades de la sustancia blanca

El neurorradiólogo del equipo (Dr. Jorge Villanúa) aplicó la escala Fazekas para semicuantificar la carga de hiperintensidades en sustancia blanca (HSB) en secuencias de recuperación de inversión atenuada de fluido (*fluid attenuation inversion recovery, FLAIR*) de resonancia magnética (RM)¹⁴⁹. El rango de la escala Fazekas va de 0 a 3: se otorga una puntuación de 0 en ausencia de hiperintensidades, 1 si se observan lesiones focales, 2 al comienzo de la aparición de lesiones confluentes, y 3 si las lesiones confluentes son difusas.

2.2.4 Toma de estatinas

En la visita basal del proyecto PGA se recogieron los medicamentos que tomaba cada participante. Para este estudio se tuvo en cuenta la toma de estatinas, grupo de fármacos usados para disminuir el colesterol en sus distintas formas. Los participantes se clasificaron como Estatinas+ si tomaban alguna estatina y como Estatinas- si no tomaban ninguna estatina.

2.2.5 Lípidos en plasma

Los niveles de colesterol total (CTOT), lipoproteínas de colesterol de baja densidad (LDL), lipoproteínas de colesterol de alta densidad (HDL) y triglicéridos (TG) (mg/dl) se analizaron a partir de la muestra de sangre extraída en ayunas en la primera sesión de la visita basal en el laboratorio del Hospital Universitario Donostia.

2.2.6 Neuroinflamación

Se midieron los niveles de la proteína YKL-40 en LCR como marcador de neuroinflamación. Los niveles de esta proteína se determinaron mediante el inmunoensayo ELISA (R&D)¹⁴¹. El análisis se realizó en el laboratorio de Neurociencias de la Universidad de Gothenburg, Suecia, en colaboración con el Dr. Henrik Zetterberg.

2.2.7 Daño axonal

Para determinar el daño axonal, se midieron los niveles de la proteína NfL en LCR. Los niveles de esta proteína se determinaron mediante inmunoensayo ELISA (UmanDiagnostics)¹⁴¹. El análisis se realizó en el laboratorio de Neurociencias de la Universidad de Gothenburg, Suecia, en colaboración con el Dr. Henrik Zetterberg.

2.2.8 Amiloidosis

2.2.8.1 Beta-Secretasa

Se determinó la actividad de la enzima beta-secretasa (BACE) en LCR mediante técnicas descritas anteriormente¹⁵⁰. Las muestras se analizaron en el laboratorio de Neurociencias del Hospital Sant Pau en Barcelona (Dr. Alberto Lleó).

2.2.8.2 sAPP β de la proteína precursora de amiloide

Se determinaron los niveles del fragmento sAPP β de la proteína precursora de amiloide en LCR mediante inmunoensayo ELISA (sAPPb-w highly sensitive, IBL, Gunma, Japón)¹⁵⁰. Las muestras se analizaron en el laboratorio de Neurociencias del Hospital Sant Pau en Barcelona (Dr. Alberto Lleó).

3. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba Kolmogorov-Smirnov para saber si las variables seguían una distribución normal (K-S, $p > .05$), en cuyo caso los datos descriptivos se mostraban con la media y la desviación estándar. Los datos descriptivos de las variables que no cumplían el supuesto de normalidad se expresaron con la mediana y el rango intercuartil (IQ), percentil 25 y 75. Las variables categóricas se mostraron con la n y el porcentaje.

Con el fin de conocer la asociación entre diferentes variables y analizar cómo la variable independiente predice la variable dependiente, en este estudio se han diseñado MLG. Los MLG son una generalización de la regresión lineal de mínimos cuadrados que permite que la variable respuesta siga distribuciones con forma distinta a la normal¹⁵¹

3.1 Oxiesteroles y biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer

Antes de analizar la asociación entre los oxiesteroles y biomarcadores, se realizó un estudio de covariables. Se estudiaron las variables de confusión de los oxiesteroles y biomarcadores. La comparación entre grupos de las variables paramétricas se realizó mediante el t-test estadístico, y en las no paramétricas mediante el U Mann-Whitney. La correlación entre variables continuas se realizó mediante Spearman. Con el objetivo de analizar la asociación entre los oxiesteroles y biomarcadores de EA se realizaron análisis univariantes de correlación Spearman y se diseñó un modelo lineal generalizado (MLG) para cada oxiesterol (24-OHC, 27-OHC, 7 β -OHC, 7-KC) y cada biomarcador (β A₁₋₄₂, tau, p-tau). En todos los modelos la variable dependiente fue el biomarcador. Los modelos

se ajustaron por edad, género y genotipo APOE. En el caso de los oxisteroles que mostraron un efecto significativo sobre un biomarcador, se investigó el efecto de la toma de estatinas, daño axonal (NfL), la neuroinflamación (YKL40), HSB y amiloidogénesis (sAPP β , BACE) como covariables potencialmente confundidoras entre el biomarcador por un lado y el oxisterol por otro con cada variable confusora. Para ello se realizaron análisis de correlación Pearson en las variables paramétricas y Spearman en el caso de las no-paramétricas. La comparación entre grupos de las variables paramétricas se realizó mediante el t-test estadístico, y mediante el U Mann-Whitney en el caso de las no paramétricas. Se realizaron también MLG. Las covariables significativas en estos análisis fueron introducidas en el MLG final.

Para estudiar el cambio longitudinal en los biomarcadores de EA, se calculó la diferencia entre la visita basal (V_0) y la visita longitudinal (V_1) ($V_1 - V_0$). La comparación entre los niveles de los biomarcadores de la visita basal y longitudinal se realizó mediante el test Wilcoxon de medidas repetidas. Los MLG del estudio longitudinal además de por la edad, género y genotipo APOE se corrigieron por el tiempo transcurrido entre visitas y el nivel de cada biomarcador en la visita basal.

3.2 Oxisteroles y microestructura de la sustancia blanca

Con el objetivo de analizar la asociación entre los oxisteroles y la microestructura de la SB medida por los índices de la DTI (FA, MD, RD, AxD), se llevaron a cabo análisis estadísticos (TBSS: *Tract Based Spatial Statistics*) del efecto de cada oxisterol sobre los índices de DTI a nivel de vóxel en todo el cerebro mediante interferencia de permutación no paramétrica (aleatorizado, parte de la herramienta FSL). Se generaron 5000 permutaciones y el umbral se determinó mediante TFCE (*Threshold-Free Cluster Enhancement*). Todos los mapas estadísticos fueron corregidos por comparaciones múltiples (FWE, family-wise error) y el nivel de significatividad se estableció en $p < 0.05$. Solo los *clusters* con al menos 100 vóxeles significativos se definieron como *clusters* significativos. Los *clusters* significativos se etiquetaron mediante el atlas *ICBM-DTI-81 white matter labels atlas*, de la herramienta FSL. De acuerdo con el análisis de confundidores del capítulo 2, los análisis se corrigieron por edad, sexo e HSB.

Para profundizar en los hallazgos encontrados en las regiones involucradas en los procesos de cognición, se extrajo la media de los índices de DTI de las regiones de interés que mostraron una asociación significativa en el análisis de TBSS (FEW corregido $p < 0.05$). Según estudios previos sobre las regiones de la SB involucradas en la cognición

¹⁵²⁻¹⁵⁷, los análisis se centraron en las siguientes regiones: cuerpo calloso, fascículo longitudinal inferior y superior, giro cingulado, hipocampo, fascículo uncinado, fórnix (columna+cuerpo) y fórnix cresta/estría terminal. Estas regiones fueron etiquetadas mediante el atlas de la herramienta FSL (*ICBM-DTI-81 white matter labels atlas*). Se diseñaron MLG donde la variable dependiente fue la media de los índices de DTI de cada región, y la predictora, el oxiesterol. Los índices de DTI fueron multiplicados por 1000 en los análisis ¹⁵⁸.

3.3 Oxiesteroles, microestructura de la sustancia blanca y biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer

Si un mismo oxiesterol mostraba una asociación significativa con un biomarcador de EA y con un índice de DTI, se analizó el efecto de ese biomarcador sobre dicho índice de DTI en los vóxeles en los que el oxiesterol había mostrado un efecto significativo. Por ejemplo, si el 7-KC mostraba una asociación significativa con la AxD del fórnix por un lado y con los niveles de βA_{1-42} por otro, se investigó la asociación entre los niveles de βA_{1-42} y la media de la AxD del fórnix. Para ello se utilizaron los datos de las medias de cada índice de DTI en las regiones cognitivas que mostraron una asociación significativa entre los índices de la DTI y oxiesteroles en el análisis de TBSS (FEW corregido $p < 0.05$). Se realizaron MLG en los que la variable dependiente fue la media de los índices de DTI de cada región, y la predictora fue el biomarcador.

Para profundizar en el análisis de la asociación entre el oxiesterol, el biomarcador y la microestructura de la SB, se llevaron a cabo nuevos análisis mediante MLG con un doble planteamiento. Por un lado, se diseñaron MLG en los que el biomarcador fue la variable dependiente introduciendo el oxiesterol y el índice de DTI y la interacción entre ambos fueron las variables predictoras. Y, por otro, se diseñaron MLG en los que el índice DTI fue la variable dependiente introduciendo el oxiesterol, el biomarcador y la interacción entre ambos como variables predictoras.

3.4 Análisis de mediación y moderación

Si en los MLG alguna de las interacciones entre las variables predictoras resultaba significativa, se llevaron a cabo análisis de moderación y de mediación con el fin de explicar mejor las asociaciones encontradas.

Para considerar que una variable era un mediador se debían cumplir cuatro condiciones ¹⁵⁹. En primer lugar, la variable predictora debía predecir la variable de estudio; en

segundo lugar, la variable predictora debía predecir el mediador; en tercer lugar, el mediador debía predecir la variable de estudio; por último, el efecto de la variable predictora sobre la variable de estudio debía ser menor cuando se incluía el mediador en el modelo que cuando no se introducía. Si no se cumplían los supuestos para considerar a la variable como un mediador, se estudiaba la relación de moderación. El análisis de moderación consiste en el efecto de la combinación de dos variables sobre una variable objetivo, y en términos estadísticos es un efecto de interacción.

El nivel de confianza considerado en todos los análisis estadísticos realizados en este proyecto ha sido del 95%. El programa estadístico utilizado ha sido el SPSS versión 21 para Windows. Los análisis de mediación y moderación se realizaron con el complemento PROCESS v2.16.3 de Andrew F. Hayes (<http://www.afhayes.com>) para SPSS.

RESULTADOS

1. Estudio transversal

1.1 Datos descriptivos

En el estudio transversal de la relación entre los metabolitos del colesterol, biomarcadores de EA en LCR y microestructura de la SB, se incluyeron 153 individuos de la cohorte del PGA cognitivamente sanos (CDR = 0). A continuación, se presentan los datos descriptivos de la información demográfica, genotipo APOE, HSB, estatinas, metabolitos del colesterol y biomarcadores en LCR.

1.1.1 Características generales

Las características generales de la muestra se describen en la (**Tabla 1**)

Tabla 1: Características de la muestra.

Variables	
Edad	57.86 (6.80)
Género: mujer (%)	67 (43.8%)
Educación: años	14 (11 – 17)
MMSE	29 (28 – 30)
Genotipo APOE (%)	
3/2	16 (10.5%)
3/3	101 (66.0%)
3 /4	34 (22.2%)
4/4	2 (1.3%)
Fazekas (%)	
0	86 (56.6%)
1	52 (34.2%)
2	9 (5.9%)
3	5 (3.3%)
Toma de estatinas (%)	20 (13.1%)

Nota: Variables continuas mediana (pc25-pc75) o media (desviación estándar); variables categóricas n (%). MMSE = Miniexamen del estado mental; APOE = apolipoproteína E.

1.1.2 Oxiesteroles

En la **Tabla 2** se muestran los datos de los niveles de los oxiesteroles en LCR y en plasma de la visita basal.

Tabla 2: Niveles de los metabolitos del colesterol de la visita basal.

Metabolito	LCR	Plasma
24-OHC, ng/dl	1.75 (1.36-2.67)	11.13 (7.67-16.77)
27-OHC, ng/ml	2.28 (1.24)	42.27 (21.48-65.26)
7-KC, ng/dl	13.60 (6.44-24.45)	35.07 (23.03-54.04)
7 β -OHC, ng/dl	2.70 (1.80-4.69)	14.69 (11.02-21.24)

Nota: mediana (pc25-pc75) o media (desviación estándar); LCR = líquido cefalorraquídeo; 24-OHC = 24-hidroxicolesterol; 27-OHC = 27-hidroxicolesterol; 7-KC = 7-cetocolesterol; 7 β -OHC = 7 beta-hidroxicolesterol.

1.1.3 Marcadores en LCR

1.1.3.1 Marcadores de neuroinflamación, daño axonal y amiloidogénesis

Se determinaron los niveles de YKL40, NfL, fracción soluble de la proteína precursora de amiloide β (sAPP β) y la actividad de la β -secretasa (BACE) en LCR de la visita basal. Los niveles se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Niveles de los marcadores de neuroinflamación, daño axonal y amiloidogénesis en LCR.

VARIABLES	Mediana (pc25-pc75)
NfL, pg/ml,	501.86 (397.22-630.78)
YKL40, ng/ml,	121.76 (92.66-153.90)
BACE, UF/mL	989.54 (756.61-1237.75)
sAPP β , ng/mL	8.34 (7.12-10.08)

Nota: pc = percentil; NfL = Neurofilamento cadena ligera; BACE = β -secretasa; sAPP β = fracción s de la proteína precursora amiloide soluble β .

1.1.3.2 Biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer en el líquido cefalorraquídeo

En la **Tabla 4** se muestran los niveles de β A₁₋₄₀, β A₁₋₄₂, t-tau y p-tau y cocientes de β A₁₋₄₂/ β A₁₋₄₀, t-tau/ β A₁₋₄₂ y p-tau/ β A₁₋₄₂ en LCR. Tomando como referencia el punto de corte para cada biomarcador, 25 sujetos (16.6%) fueron positivos para el cociente β A₁₋₄₂/ β A₁₋₄₀ en la visita basal, 23 (15%) para p-tau y 4 (2.6%) para t-tau.

Tabla 4: Niveles de los biomarcadores de EA en LCR.

Variables	Mediana (pc25 – pc75) M (DE)
βA_{1-40} , pg/ml	5091.43 (4343.08-5847.59)
βA_{1-42} , pg/ml	478.73 (152.22)
t-tau, pg/ml	268.40 (201.87-336.76)
p-tau, pg/ml	38.50 (30.00-46.00)
$\beta A_{1-42} / \beta A_{1-40}$	0.10 (0.09-0.10)
t-tau/ βA_{1-42}	0.53 (0.45-0.65)
p-tau/ βA_{1-42}	0.08 (0.07-0.09)

Nota: pc = percentil; M = media; DE = Desviación Estándar; βA = β -amiloide; t-tau = tau total; p-tau = tau fosforilada.

1.2 Oxiesteros en líquido cefalorraquídeo y biomarcadores etiopatogénicos de la EA

1.2.1 Estudio de covariables

1.2.1.1 Detección de las variables de confusión de los oxiesteros

Entre las variables continuas analizadas, se observa una asociación positiva entre el colesterol total, LDL y $7\beta OH-K$ (**Tabla 5**). Entre las variables categóricas no se halló ninguna diferencia significativa en los niveles de los oxiesteros (**Tabla 6**).

Tabla 5: Posibles variables continuas de confusión de los oxiesteros en LCR.

Variables	24-OHC		27-OHC		7-KC		7 β -OHC	
	r_s	p	r_s	p	r_s	p	r_s	p
Edad	0.093	0.255	-0.101	0.215	-0.028	0.737	-0.017	0.834
Educación	0.014	0.863	0.055	0.502	0.087	0.289	-0.106	0.197
MABP	-0.133	0.102	0.013	0.870	0.043	0.604	0.043	0.603
Fazekas	0.052	0.527	-0.084	0.308	-0.071	0.385	0.050	0.548
CTOT	-0.054	0.511	0.012	0.880	-0.096	0.241	0.236	0.004
LDL	-0.011	0.893	0.053	0.522	-0.130	0.111	0.263	0.001
HDL	0.007	0.929	-0.020	0.804	0.082	0.315	-0.117	0.157
TG	-0.049	0.544	0.024	0.770	-0.038	0.646	0.152	0.064

Nota: r_s = coeficiente correlación Spearman; 24-OHC = 24-hidroxicolesterol; 27-OHC = 27-hidroxicolesterol; 7-KC = 7-cetocolesterol; 7 β -OHC = 7 β -hidroxicoolesterol; MABP = media de la tensión arterial; CTOT = colesterol total; LDL= lipoproteínas de colesterol de baja densidad; HDL = lipoproteínas de colesterol de alta densidad; TG = triglicéridos; LCR = líquido cefalorraquídeo.

Si $p < 0.05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

Tabla 6: Posibles variables categóricas de confusión de los oxisteroles en LCR

Variables	24-OHC		27-OHC		7-KC		7 β -OHC	
	Mdn (pc25 – pc75)	p	M (DE)	p	Mdn (pc25 – pc75)	p	Mdn (pc25 – pc75)	p
Genero		0.903		0.346		0.782		0.369
Hombre	1.85 (1.28-2.67)		2.17 (1.10)		13.48 (7.26-25.19)		3.00 (1.92-5.20)	
Mujer	1.68 (1.37-2.67)		2.37 (1.34)		14.68 (6.36-23.35)		2.43 (1.72-4.63)	
Genotipo APOE		0.550		0.684		0.713		0.929
APOE4-	1.69 (1.28-2.59)		2.30 (1.31)		13.40 (7.38-24.47)		2.80 (1.75-4.74)	
APOE4+	1.80 (1.42-2.81)		2.21 (1.00)		15.18 (5.96-24.17)		2.44 (1.87-4.23)	
Hipercolesterol.		0.181		0.593		0.846		0.074
Hipercolesterol. -	1.51 (1.21-2.36)		2.39 (1.80)		13.61 (7.26-23.65)		1.95 (1.41-3.58)	
Hipercolesterol. +	1.79 (1.41-2.67)		2.25 (1.05)		13.42 (6.31-24.45)		2.87 (1.91-4.74)	
Toma de Estatinas		0.058		0.760		0.285		0.520
Estatinas -	1.67 (1.33-2.54)		2.29 (1.29)		13.13 (6.44-22.63)		2.70 (1.82-4.84)	
Estatinas +	2.18 (1.61-3.14)		2.20 (0.83)		17.60 (6.50-41.05)		2.95 (1.21-3.69)	

Nota: Mdn= Mediana; pc = percentil; M = media; DE = desviación estándar; 24-OHC = 24-hidroxicolesterol; 27-OHC = 27-hidroxicolesterol; 7-KC = 7-cetocolesterol; 7 β -OHC = 7 β -hidroxicolesterol; APOE4+ = portador del alelo ϵ 4 de la Apolipoproteína E; APOE4- = no portador del alelo ϵ 4 de la Apolipoproteína E; Hipercolesterol.- = sin hipercolesterolemia; Hipercolesterol.+ = con hipercolesterolemia; Estatinas - = sin tratamiento con estatinas; Estatinas + = en tratamiento con estatinas; LCR, líquido cefalorraquídeo.

Si $p < 0.05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

1.2.1.2 Detección de las variables de confusión de los biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer

Entre las variables continuas analizadas, se observa una asociación positiva entre la edad y t-tau y p-tau (**Tabla 7**). Entre las variables categóricas no se halló ninguna diferencia significativa en los niveles de los biomarcadores (**Tabla 8**).

Tabla 7: Posibles variables continuas de confusión de los biomarcadores de EA.

Variables	β A ₁₋₄₂		t-tau		p-tau	
	r_s	p	r_s	p	r_s	p
Edad	0.012	0.880	0.369	0.000	0.359	0.000
Educación	0.006	0.944	0.015	0.857	0.017	0.831
MABP	0.007	0.937	0.030	0.714	-0.001	0.988
Fazekas	-0.160	0.051	0.133	0.102	0.131	0.109
CTOT	-0.028	0.734	0.089	0.274	0.111	0.172
LDL	-0.030	0.716	0.114	0.163	0.135	0.099
HDL	-0.007	0.932	-0.130	0.110	-0.103	0.205
TG	-0.087	0.287	0.106	0.190	0.079	0.334

Nota: r_s = coeficiente correlación Spearman; β A = β -amiloide; t-tau = tau total; p-tau = tau fosforilada; MABP = media de la tensión arterial; CTOT = colesterol-total; LDL = lipoproteínas de colesterol de baja densidad; HDL = lipoproteínas de colesterol de alta densidad; TG = triglicéridos.

Si $p < 0.05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

Tabla 8: Posibles variables categóricas de confusión de los biomarcadores de EA.

Variables	βA_{1-42}		t-tau		p-tau	
	M (DE)	p	Mdn (Pc25 – Pc75)	p	Mdn (Pc25 – Pc75)	p
Genero		0.928		0.380		0.765
Hombre	480.00 (154.36)		273.63 (204.42-353.01)		38.00 (30.00-47.00)	
Mujer	477.75 (151.44)		263.86 (189.23-334.80)		39.00 (29.00-46.00)	
Genotipo APOE		0.082		0.189		0.231
APOE4-	490.58 (143.49)		264.38 (193.34-329.86)		37.50 (30.00-46.00)	
APOE4+	439.47 (174.69)		276.70 (216.67-380.50)		39.00 (31.50-49.00)	
Hipercolesterol.		0.632		0.325		0.196
Hipercolesterol. -	490.24 (143.02)		251.17 (188.34-332.07)		35.50 (28.50-41.50)	
Hipercolesterol. +	475.64 (155.03)		273.63 (202.94-349.87)		39.00 (30.00-46.50)	
Toma de Estatinas		0.899		0.824		0.876
Estatinas -	478.11 (154.65)		264.38 (199.65-349.87)		39.00 (30.00-46.00)	
Estatinas +	482.77 (138.78)		277.49 (212.77-317.05)		36.00 (30.50-46.00)	

Nota: Mdn= Mediana; pc = percentil; M = media; DE = desviación estándar; βA = β -amiloide; t-tau = tau total; p-tau = tau fosforilada; APOE4+ = portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; APOE4- = no portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; Hipercolesterol.- = sin hipercolesterolemia; Hipercolesterol.+ = con hipercolesterolemia; Estatinas - = sin tratamiento con estatinas; Estatinas + = en tratamiento con estatinas.

1.2.2 Correlación entre los oxiesteroles y biomarcadores etiopatogénicos de la enfermedad de Alzheimer

1.2.2.1 Análisis univariante

En los análisis univariantes no se hallaron correlaciones significativas entre los oxiesteroles, βA_{1-42} , t-tau y p-tau (**Tabla 9**). No se encontró ninguna asociación significativa entre los oxiesteroles y los cocientes $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40}$, t-tau/ βA_{1-42} y p-tau/ βA_{1-42} (datos no mostrados).

Tabla 9: Correlación entre los niveles de los oxiesteroles y biomarcadores de EA.

Variables	βA_{1-42}		t-tau		p-tau	
	r_s	p	r_s	p	r_s	p
24-OHC	-0.015	0.856	0.084	0.301	0.102	0.210
27-OHC	0.061	0.462	-0.042	0.609	0.022	0.790
7-KC	-0.117	0.153	-0.052	0.526	-0.087	0.288
7 β -OHC	0.047	0.572	-0.027	0.744	0.012	0.882

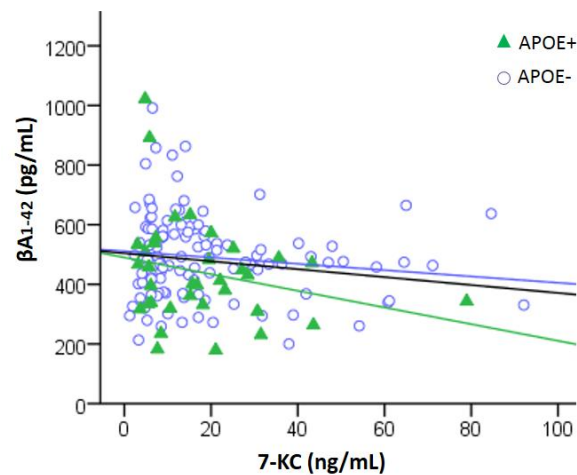
Nota: r_s = coeficiente correlación Spearman; βA = β -amiloide; t-tau = tau total; p-tau = tau fosforilada; 24-OHC = 24-hidroxicoolesterol; 27-OHC = 27-hidroxicoolesterol; 7-KC = 7-cetocoolesterol; 7 β -OHC = 7beta-hidroxicoolesterol.

1.2.2.2 Análisis multivariante

Debido a que no se encontraron resultados significativos contundentes en el análisis de las variables confusoras, los MLG se ajustaron por edad, sexo y genotipo APOE, tal y como muestra la bibliografía. Se halló una asociación negativa entre el nivel de 7-KC y βA_{1-42} , a mayor nivel de 7-KC menor nivel de βA_{1-42} en LCR (**Figura 3, Tabla 10** Modelo 3). Ningún otro oxisterol mostró un efecto significativo sobre βA_{1-42} , t-tau o p-tau (**Tabla 10**).

Ningún oxisterol mostró una asociación significativa con los cocientes $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40}$, t-tau/ βA_{1-42} y p-tau/ βA_{1-42} (datos no mostrados).

Figura 3: Relación entre βA_{1-42} y 7-KC según el genotipo APOE.



Nota. 7-KC = 7-cetocolesterol; βA_{1-42} = β -amiloide₁₋₄₂; APOE+= portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; APOE- = no portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E.

Tabla 10: Regresiones lineales generalizadas de los oxiesteroles y biomarcadores de EA.

	βA_{1-42}		t-tau		p-tau	
	B (95%IC)	p	B (95%IC)	p	B (95%IC)	p
Modelo 1						
(Intersección)	373.39 (158.88-587.89)	0.001	-89.81 (-235.87-56.26)	0.228	-3.03 (-20.76-14.71)	0.738
24-OHC	-6.50 (-23.62-10.62)	0.457	-1.35 (-13.02-10.32)	0.821	0.06 (-1.35-1.47)	0.939
Edad	1.35 (-2.23-4.92)	0.460	6.76 (4.33-9.19)	0.000	0.77 (0.48-1.07)	0.000
Género: H	4.39 (-43.84-52.61)	0.858	7.42 (-25.42-40.26)	0.658	-0.08 (-4.06-3.89)	0.967
Género: M	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
APOE4-	52.10 (-4.70-108.91)	0.072	-21.37 (-59.88-17.14)	0.277	-2.58 (-7.23-2.07)	0.277
APOE4+	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
Modelo 2						
(Intersección)	344.80 (117.38-572.22)	0.003	-96.30 (-250.56-57.97)	0.221	-6.20 (-24.86-12.47)	0.515
27-OHC	5.86 (-13.85-25.57)	0.560	1.98 (-11.43-15.39)	0.772	0.91 (-0.70-2.53)	0.266
Edad	1.31 (-2.29-4.90)	0.476	6.78 (4.34-9.22)	0.000	0.80 (0.50-1.09)	0.000
Género: H	5.68 (-43.38-54.74)	0.820	6.52 (-26.84-39.89)	0.702	-0.06 (-4.09-3.96)	0.975
Género: M	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
APOE4-	54.15 (-3.74-112.04)	0.067	-23.42 (-62.63-15.78)	0.242	-2.82 (-7.54-1.89)	0.241
APOE4+	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
Modelo 3						
(Intersección)	378.82 (166.14-591.50)	0.000	-86.30 (-232.28-59.68)	0.247	-2.39 (-20.08-15.29)	0.791
7-KC	-1.41 (-2.77--0.05)	0.041	-0.46 (-1.39-0.48)	0.338	-0.08 (-0.19-0.03)	0.170
Edad	1.44 (-2.08-4.96)	0.422	6.79 (4.38-9.20)	0.000	0.79 (0.50-1.08)	0.000
Género: H	3.17 (-44.76-51.10)	0.897	6.33 (-26.57-39.23)	0.706	-0.17 (-4.14-3.80)	0.934
Género: M	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
APOE4-	54.87 (-1.51-111.25)	0.056	-19.96 (-58.51-18.58)	0.310	-2.42 (-7.06-2.23)	0.308
APOE4+	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
Modelo 4						
(Intersección)	382.18 (162.57-601.78)	0.001	-94.03 (-242.13-54.07)	0.213	-2.97 (-20.99-15.04)	0.746
7 β -OHC	1.57 (-6.00-9.13)	0.685	-1.97 (-6.91-2.97)	0.435	-0.25 (-0.85-0.35)	0.417
Edad	0.75 (-2.87-4.37)	0.685	6.96 (4.52-9.40)	0.000	0.80 (0.50-1.09)	0.000
Género: H	5.33 (-43.99-54.64)	0.832	9.79 (-23.59-43.17)	0.566	0.22 (-3.82-4.27)	0.913
Género: M	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
APOE4-	58.87 (1.04-116.71)	0.046	-24.78 (-63.68-14.11)	0.212	-2.88 (-7.58-1.83)	0.231
APOE4+	0 ^a		0 ^a		0 ^a	

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; βA = β -amiloide; t-tau = tau total; p-tau = tau fosforilada; 24-OHC = 24-hidroxicolesterol; 27-OHC = 27-hidroxicolesterol; 7-KC = 7-cetocolesterol; 7 β -OHC = 7beta-hidroxicolesterol; APOE4+ = portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; APOE4- = no portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; H = hombre; M = mujer.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^aEstablecido en 0 ya que este parámetro es redundante.

1.2.3 Oxiesteroles, amiloidogénesis, procesos de neuroinflamación, toma de estatinas y daño axonal.

Dado que se halló una asociación significativa entre el 7-KC y el βA_{1-42} se estudió su asociación con marcadores de neuroinflamación, daño axonal, amiloidogénesis, HSB y toma de estatinas. Si alguna de estas variables fue significativa en el análisis univariante, se introdujo en el MLG.

1.2.3.1 Toma de estatinas

Según la bibliografía, las estatinas modulan los niveles de los oxiesteroles ¹⁴⁰. Además aunque no exista un consenso, ¹⁶⁰ experimentos animales y celulares sugieren que las estatinas podrían disminuir las placas de amiloide ¹⁶¹. Por consiguiente se analizó si la toma de estatinas podría tener algún efecto sobre los niveles de 7-KC y βA_{1-42} .

En el análisis univariante no se observaron diferencias significativas en el nivel de 7-KC entre sujetos en tratamiento con estatinas y sin tratamiento (Estatinas+, mediana = 17.60, p25-p75 = 6.50-41.05; Estadinas-, mediana = 13.13, p25-p75 = 6.44-22.63; U = 1124.00; p = 0.285). Tampoco se observaron diferencias significativas en el nivel de βA_{1-42} entre sujetos en tratamiento con estatinas y sin tratamiento (Estatinas+, media = 482.77, DE = 138.78; Estadinas-, media = 478.11, DE = 154.65; t = -0.127; p = 0.899).

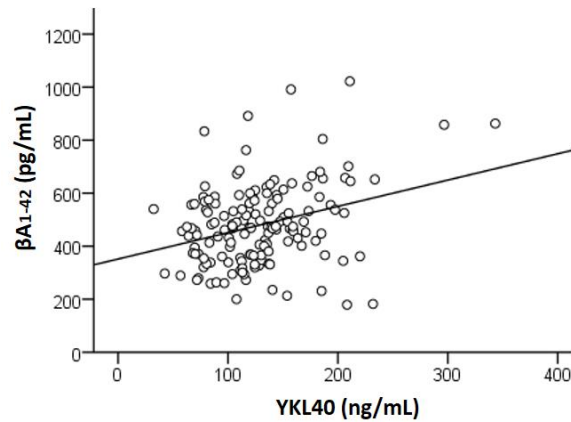
1.2.3.2 Neuroinflamación

Se ha descrito que los cambios en los niveles de los oxiesteroles se asocian a un incremento de la inflamación y a un aumento de los niveles de sus biomarcadores ¹⁰³. Además la neuroinflamación se asocia al βA_{1-42} ¹⁶². Por consiguiente, se analizó si en nuestra muestra la neuroinflamación podría tener algún efecto sobre los niveles de 7-KC y βA_{1-42} . Se analizó la proteína YKL40 en LCR como marcador de la neuroinflamación ¹⁶³

En el análisis univariante no se halló una correlación significativa entre el YKL40 y el 7-KC ($r_s = -0.005$; p = 0.949), pero sí entre el nivel de βA_{1-42} y YKL40 ($r_s = 0.244$; p = 0.003) (**Figura 4**).

En el MLG, el 7-KC y el YKL40 mostraron un efecto significativo sobre el nivel de βA_{1-42} (**Tabla 11**).

Figura 4: Relación entre βA_{1-42} e YKL40.



Nota. βA_{1-42} = β -amiloide₁₋₄₂.

Tabla 11: Regresión lineal generalizada del nivel de YKL40, 7-KC y βA_{1-42} .

Variables	βA_{1-42}	
	B (95%IC)	p
(Intersección)	462.00 (257.71-666.29)	0.000
7-KC	-1.34 (-2.65--0.04)	0.044
YKL40	1.22 (0.68-1.76)	0.000
Edad	-2.67 (-6.47-1.14)	0.169
Género: H	-5.67 (-51.28-39.94)	0.807
Género: M	0 ^a	
APOE4-	56.87 (3.62-110.13)	0.036
APOE4+	0 ^a	

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; βA = β -amiloide; 7-KC = 7-cetocolésterol; APOE4+ = portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; APOE4- = no portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; H = hombre; M = mujer.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^aEstablecido en 0 ya que este parámetro es redundante.

1.2.3.3 Hiperintensidades de la sustancia blanca

Se ha publicado la relación existente entre los niveles de oxisteroles, las HSB y la patología de la EA ¹²⁵. Por consiguiente se exploró la correlación del 7-KC y βA_{1-42} con las HSB.

En el análisis univariante, los resultados no mostraron correlación significativa entre el 7-KC y las HSB ($r_s = -0.071$; $p = 0.385$), pero sí entre el nivel de βA_{1-42} y las HSB ($r_s = -0.160$; $p = 0.049$).

En el MLG, el 7-KC y las HSB mostraron un efecto significativo sobre el nivel de βA_{1-42} (**Tabla 12**).

Tabla 12: Regresión lineal generalizada de las hiperintensidades de la sustancia blanca, 7-KC y βA_{1-42} .

Variables	βA_{1-42}	
	B (95%IC)	p
(Intersección)	305.12 (92.86-517.39)	0.005
7-KC	-1.35 (-2.67--0.03)	0.045
HSB	-49.121 (-81.931--16.312)	0.003
Edad	3.26 (-0.36-6.89)	0.078
Género: H	4.62 (-42.14-51.38)	0.846
Género: M	0 ^a	
APOE4-	48.11 (-7.01-103.22)	0.087
APOE4+	0 ^a	

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; βA = β -amiloide; 7-KC = 7-cetocolesterol; HSB = hiperintensidades de la sustancia blanca; APOE4+ = portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; APOE4- = no portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; H = hombre; M = mujer. Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^aEstablecido en 0 ya que este parámetro es redundante.

1.2.3.4 Daño axonal

El colesterol es un lípido abundante en la mielina y en la membrana plasmática de las neuronas, incluidos los axones. Cabe suponer que la homeostasis del colesterol se relacione con el daño axonal de la SB. Además de ser bien conocida la importancia del daño axonal en la patología de EA, un estudio reciente muestra que el daño axonal predice la progresión de la EA en sujetos presintomáticos ¹⁶⁴. Por consiguiente se exploró la correlación del 7-KC y βA_{1-42} con el daño axonal. El daño axonal se determinó por niveles del NfL en LCR ¹⁶⁵.

En el análisis univariante, los resultados no mostraron correlación significativa entre el 7-KC y el NfL ($r_s = -0.005$; $p = 0.626$), ni entre el nivel de βA_{1-42} y el NfL ($r_s = 0.118$; $p = 0.150$).

1.2.3.5 7-KC, βA_{1-42} , neuroinflamación e hiperintensidades de la sustancia blanca

Para profundizar en la asociación entre el nivel de 7-KC y βA_{1-42} se creó un MLG introduciendo conjuntamente las variables que mostraron un efecto significativo sobre el βA_{1-42} en los MLG.

Como muestran los resultados (**Tabla 13**), el 7-KC mantuvo un efecto significativo sobre el nivel de βA_{1-42} , y las HSB y el YKL40 fueron significativos en el modelo.

Tabla 13: Regresión lineal generalizada del nivel de βA_{1-42} , 7-KC y covariables

Variables	βA_{1-42}	
	B (95%IC)	p
(Intersección)	390.81 (186.01-595.62)	0.000
7-KC	-1.28 (-2.55--0.01)	0.049
HSB	1.16 (0.63-1.69)	0.000
YKL40	-45.58 (-76.71--14.44)	0.004

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; LI = límite inferior; LS = límite superior; 7-KC= 7-cetocolesterol; βA_{1-42} = β -amiloide₁₋₄₂; HSB = hiperintensidades de la sustancia blanca.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^aAjustado por edad, género y genotipo APOE.

1.2.4 Oxiesteroles, neuroinflamación y amiloidogénesis

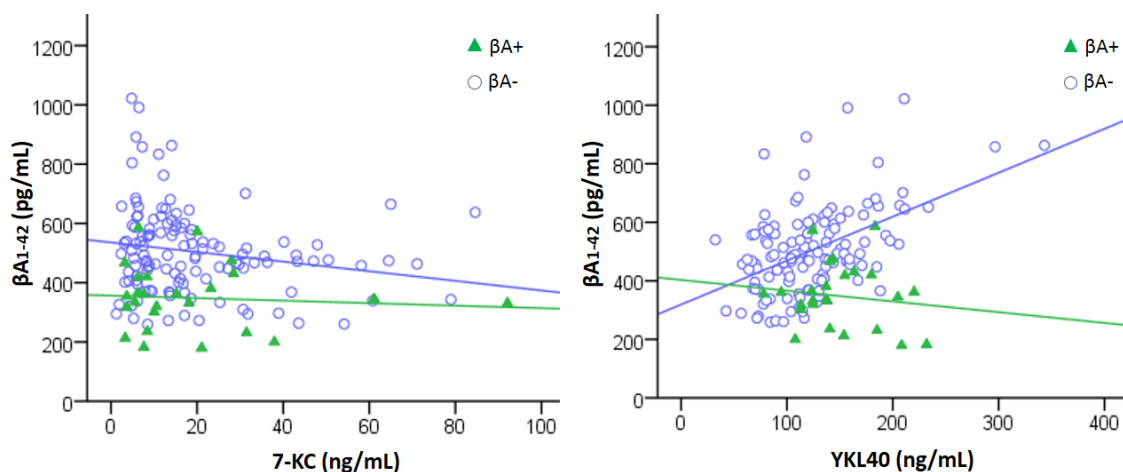
El objetivo de este apartado fue profundizar la relación entre los procesos de neuroinflamación, metabolismo del colesterol y amiloidogénesis. Para ello se crearon dos MLG. En el primer modelo, se analizó el efecto del 7-KC sobre el nivel de βA_{1-42} , sAPP β y la actividad de BACE. En el segundo modelo se analizó el efecto del YKL40 sobre βA_{1-42} , BACE y sAPP β . En el caso en el que ambos, 7-KC y YKL40, mostraron un efecto significativo, se creó un tercer modelo para analizar el efecto de la interacción 7-KC *YKL40. Los análisis se llevaron a cabo en toda la muestra y en grupos $\beta A+$ y $\beta A-$ por separado. Los análisis fueron corregidos por edad, sexo, genotipo APOE e HSB.

Al analizar toda la muestra conjuntamente, se halló que, aunque el 7-KC y YKL40 mostraron una asociación significativa con el βA_{1-42} , la interacción entre ambos no fue significativa. El YKL mostró también una asociación positiva con el sAPP β (**Tabla 14**).

En sujetos $\beta A-$ (n=126), se observaron los mismos resultados que en el análisis de toda la muestra (**Figura 5, Tabla 15**).

En sujetos $\beta A+$ (n=25), no se observó ningún efecto significativo del 7-KC y YKL40 sobre βA_{1-42} , BACE o sAPP β (**Figura 5, Tabla 16**).

Figura 5: Relación entre βA_{1-42} y 7-KC y βA_{1-42} e YKL40 según la positividad del cociente $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40}$.



Nota. 7-KC = 7-cetocolésterol; βA_{1-42} = β -amiloide $_{1-42}$; $\beta A+$ = sujetos con niveles $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40} \leq 0.08$; $\beta A-$ = sujetos con niveles $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40} > 0.08$.

Tabla 14: Regresiones lineales generalizadas del efecto del YKL40 y 7-KC sobre βA_{1-42} , BACE y sAPP β .

	βA_{1-42}		BACE		sAPP β	
	B (95%IC)	p	B (95%IC)	p	B (95%IC)	p
Modelo 1						
(Intersección)	305.12 (92.86-517.39)	0.005	6.27 (3.29-9.24)	0.000	396.15 (-130.31-922.60)	0.140
7-KC	-1.35 (-2.67--0.03)	0.045	0.02 (0.00-0.03)	0.094	-0.78 (-4.07-2.50)	0.640
Edad	3.26 (-0.36-6.89)	0.078	0.04 (-0.01-0.09)	0.141	12.08 (3.10-21.06)	0.008
Género: H	4.62 (-42.14-51.38)	0.846	-0.05 (-0.71-0.61)	0.876	-139.00 (-255.59--22.41)	0.019
Género: M	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
APOE4-	48.11 (-7.01-103.22)	0.087	0.02 (-0.76-0.79)	0.968	66.27 (-71.54-204.08)	0.346
APOE4+	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
HSB	-49.12 (-81.93--16.31)	0.003	-0.12 (-0.58-0.34)	0.613	-51.57 (-133.20-30.05)	0.216
Modelo 2						
(Intersección)	382.53 (175.66-589.40)	0.000	6.67 (3.63-9.71)	0.000	635.69 (134.52-1136.85)	0.013
YKL	1.16 (0.63-1.70)	0.000	0.004 (-0.003-0.01)	0.263	3.14 (1.84-4.44)	0.000
Edad	-1.09 (-5.02-2.85)	0.589	0.03 (-0.03-0.08)	0.380	0.70 (-8.86-10.26)	0.886
Género: H	-0.63 (-45.61-44.35)	0.978	-0.12 (-0.78-0.54)	0.724	-154.00 (-263.39--44.61)	0.006
Género: M	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
APOE4-	48.17 (-4.56-100.89)	0.073	0.03 (-0.75-0.81)	0.948	69.80 (-58.74-198.34)	0.287
APOE4+	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
HSB	-46.02 (-77.45--14.59)	0.004	-0.07 (-0.54-0.39)	0.753	-39.86 (-116.15-36.44)	0.306
Modelo 3						
(Intersección)	403.26 (191.21-615.31)	0.000				
7-KC	-2.31 (-7.07-2.45)	0.342				
Edad	-0.70 (-4.64-3.24)	0.728				
Género: H	-3.98 (-48.76-40.81)	0.862				
Género: M	0 ^a					
APOE4-	49.61 (-2.65-101.88)	0.063				
APOE4+	0 ^a					
HSB	-47.34 (-79.44--15.25)	0.004				
YKL40	403.26 (191.21-615.31)	0.000				
7-KC*YKL40	-2.31 (-7.07-2.45)	0.342				

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; βA = β -amiloide; BACE = β -secretasa; sAPP β = fracción β de la proteína precursora amiloide soluble; 7-KC = 7-cetocolesterol; APOE4+ = portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; APOE4- = no portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; H = hombre; M = mujer; HSB = hiperintensidades de la sustancia blanca. Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^aEstablecido en 0 ya que este parámetro es redundante.

Tabla 15: Regresiones lineales generalizadas del efecto del YKL40 y 7-KC sobre βA_{1-42} , BACE y sAPP β en sujetos βA_{-} .

	βA_{1-42}		BACE		sAPP β	
	B (95%IC)	p	B (95%IC)	p	B (95%IC)	p
Modelo 1						
(Intersección)	236.40 (17.05-455.76)	0.035	6.89 (3.70-10.07)	0.000	562.77 (-19.36-1144.90)	0.058
7-KC	-1.65 (-3.09--0.22)	0.024	0.01 (-0.01-0.03)	0.460	-1.85 (-5.66-1.96)	0.342
Edad	5.44 (1.65-9.22)	0.005	0.03 (-0.03-0.08)	0.316	9.87 (-0.17-19.91)	0.054
Género: H	0.00 (-49.69-49.69)	1.000	0.10 (-0.62-0.83)	0.777	-144.31 (-276.18--12.44)	0.032
Género: M	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
APOE4-	1.35 (-62.87-65.57)	0.967	0.20 (-0.73-1.13)	0.677	54.15 (-116.28-224.58)	0.533
APOE4+	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
HSB	-20.76 (-60.42-18.91)	0.305	-0.56 (-1.13-0.02)	0.057	-42.47 (-147.73-62.80)	0.429
Modelo 2						
(Intersección)	310.73 (108.13-513.33)	0.003	7.25 (4.04-10.45)	0.000	771.60 (229.89-1313.31)	0.005
YKL	1.48 (0.96-2.01)	0.000	0.004 (-0.004-0.01)	0.297	3.47 (2.06-4.87)	0.000
Edad	0.51 (-3.35-4.36)	0.796	0.02 (-0.05-0.08)	0.618	-1.59 (-11.90-8.72)	0.763
Género: H	-16.41 (-62.27-29.45)	0.483	0.04 (-0.68-0.77)	0.906	-177.54 (-300.16--54.93)	0.005
Género: M						
APOE4-	-8.15 (-66.96-50.67)	0.786	0.12 (-0.81-1.05)	0.793	30.29 (-126.96-187.54)	0.706
APOE4+						
HSB	-7.49 (-43.92-28.93)	0.687	-0.51 (-1.08-0.07)	0.083	-14.43 (-111.83-82.97)	0.772
Modelo 3						
(Intersección)	355.23 (148.47-561.99)	0.001				
7-KC	-3.15 (-7.96-1.66)	0.200				
Edad	0.78 (-3.02-4.58)	0.688				
Género: H	-18.47 (-63.72-26.78)	0.424				
Género: M						
APOE4-	-10.11 (-67.68-47.45)	0.731				
APOE4+						
HSB	-12.25 (-48.58-24.09)	0.509				
YKL40	1.30 (0.52-2.07)	0.001				
7-KC *YKL40	0.01 (-0.02-0.05)	0.521				

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; βA = β -amiloide; BACE = β -secretasa; sAPP β = fracción β de la proteína precursora amiloide soluble; 7-KC = 7-cetocolesterol; APOE4+ = portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; APOE4- = no portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; H = hombre; M = mujer; HSB = hiperintensidades de la sustancia blanca. Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^aEstablecido en 0 ya que este parámetro es redundante.

Tabla 16: Regresiones lineales generalizadas del efecto del YKL40 y 7-KC sobre βA_{1-42} , BACE y sAPP β en sujetos βA_{+} .

	βA_{1-42}		BACE		sAPP β	
	B (95%IC)	p	B (95%IC)	p	B (95%IC)	p
Modelo 1						
(Intersección)	374.76 (-93.18-842.71)	0.116	4.66 (-4.64-13.96)	0.326	-616.80 (-2054.19-820.59)	0.400
7-KC	0.10 (-1.96-2.17)	0.921	0.03 (-0.01-0.08)	0.101	2.17 (-4.18-8.51)	0.503
Edad	0.66 (-7.12-8.45)	0.868	0.05 (-0.10-0.21)	0.493	27.15 (3.22-51.08)	0.026
Género: H	-31.10 (-108.71-46.51)	0.432	-0.14 (-1.72-1.45)	0.868	-111.38 (-356.94-134.19)	0.374
Género: M						
APOE4-	3.37 (-74.19-80.93)	0.932	0.07 (-1.53-1.67)	0.934	52.16 (-194.80-299.12)	0.679
APOE4+						
HSB	-54.49 (-94.76--14.21)	0.008	0.37 (-0.43-1.17)	0.368	-79.31 (-203.52-44.89)	0.211
Modelo 2						
(Intersección)	344.49 (-114.23-803.21)	0.141	2.22 (-7.43-11.88)	0.652	-738.67 (-2165.52-688.18)	0.310
YKL	-0.24 (-1.48-1.00)	0.702	-1.19E-4 (-0.03-0.03)	0.993	0.33 (-3.64-4.30)	0.870
Edad	1.83 (-7.11-10.76)	0.689	0.10 (-0.09-0.29)	0.300	28.66 (0.37-56.94)	0.047
Género: H	-35.00 (-113.80-43.81)	0.384	-0.29 (-2.03-1.44)	0.739	-115.31 (-371.55-140.93)	0.378
Género: M						
APOE4-	-1.47 (-82.54-79.60)	0.972	0.33 (-1.49-2.14)	0.725	77.84 (-190.15-345.83)	0.569
APOE4+						
HSB	-54.97 (-94.93--15.01)	0.007	0.46 (-0.38-1.31)	0.283	-72.03 (-197.06-53.00)	0.259

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; βA = β -amiloide; BACE = β -secretasa; sAPP β = fracción β de la proteína precursora amiloide soluble; 7-KC = 7-cetocolesterol; APOE4+ = portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; APOE4- = no portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; H = hombre; M = mujer; HSB = hiperintensidades de la sustancia blanca. Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^aEstablecido en 0 ya que este parámetro es redundante.

1.3 Oxiesteroles en líquido ceforraquídeo y microestructura de la sustancia blanca

1.3.1 Datos descriptivos de la submuestra con imagen de resonancia magnética disponible

127 participantes (83%) disponían de una imagen de RM adecuada para el análisis. Según se muestra en la **Tabla 17**, no se observaron diferencias significativas en las variables descriptivas entre aquellos individuos que se introdujeron en los análisis de DTI y los que no, excepto en el género.

Tabla 17: Comparación de las características de las submuestras según la disponibilidad de imagen para el análisis de DTI.

Características	DTI		p
	NO (26)	SI (127)	
Edad	58.1 (5.63)	57.80 (7.03)	0.805
Género: mujer	8 (30.8%)	78 (61.4%)	0.005
Educación: años	12.50 (12.00-19.00)	14.00 (11.00-17.00)	0.525
MMSE	29.00 (28.00-30.00)	29.00 (28.00-30.00)	0.719
Genotipo APOE, portador	9 (34.6%)	27 (21.3%)	0.202
Fazekas			0.953
0	15 (57.7%)	71 (55.9%)	
1	8 (30.8%)	44 (34.6%)	
2	1 (3.8%)	8 (6.3%)	
3	1 (3.8%)	4 (3.1%)	
Toma de estatinas	5 (19.2%)	15 (11.8%)	0.339
Marcadores en LCR			
YKL40, pg/ml,	128.08 (104.83-156.18)	119.80 (88.46-153.79)	0.536
NfL, pg/ml	514.26 (448.01-640.13)	501.86 (391.12-630.78)	0.730
BACE	8.63 (7.43-10.15)	8.26 (7.01-10.08)	0.649
sAPP β	1012.22 (711.19-1125.30)	986.69 (759.64-1240.51)	0.431
Oxiesteroles en LCR			
24-OHC, ng/dl	1.80 (1.36-2.67)	1.73 (1.36-2.67)	0.973
27-OHC, ng/ml	2.26 (1.84)	2.29 (1.10)	0.924
7-KC, ng/dl	23.76 (8.93-31.47)	13.12 (6.36-20.46)	0.066
7 β -OHC, ng/dl	2.53 (1.60-3.89)	2.75 (1.80-4.84)	0.653
Oxiesteroles en plasma			
24-OHC, ng/dl	1.80 (1.36-2.67)	1.73 (1.36-2.67)	0.973
27-OHC, ng/ml	2.26 (1.84)	2.29 (1.10)	0.924
7-KC, ng/dl	23.76 (8.93-31.47)	13.12 (6.36-20.46)	0.066
7 β -OHC, ng/dl	2.53 (1.60-3.89)	2.75 (1.80-4.84)	0.653
Biomarcadores de EA			
β A ₁₋₄₀ , pg/ml	4957.22 (4502.35-5782.54)	5158.14 (4340.84-6079.63)	0.349
β A ₁₋₄₂ , pg/ml	480.93 (145.43)	478.31 (154.02)	0.939
t-tau, pg/ml	257.98 (202.82-307.83)	270.87 (194.24-353.65)	0.451
p-tau, pg/ml	38.00 (35.00-41.00)	39.00 (30.00-47.00)	0.678
β A ₁₋₄₂ / β A ₁₋₄₀	0.10 (0.09-0.10)	0.09 (0.08-0.10)	0.261
t-tau/ β A ₁₋₄₂	0.54 (0.46-0.63)	0.53 (0.45-0.65)	0.972
p-tau/ β A ₁₋₄₂	0.08 (0.07-0.09)	0.08 (0.07-0.09)	0.420

Nota: Mediana (pc25-pc75) o Media (Desviación Estándar) de las variables continuas, las variables categóricas n (%). MMSE = Miniexamen del estado mental; LCR = líquido ceforraquídeo; 24-OHC = 24-hidroxicoolesterol; 27-OHC = 27-hidroxicoolesterol; 7-KC = 7-cetocolesterol; 7 β -OHC = 7beta-hidroxicoolesterol; NfL = Neurofilamento cadena ligera; BACE = β -secretasa; sAPP β = proteína precursora amiloide soluble β ; β A = β -amiloide; t-tau = tau total; p-tau = tau fosforilada.

Si $p < 0.05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

1.3.2 Efecto de los oxiesteroles sobre la microestructura de la sustancia blanca

1.3.2.1 Anisotropía fraccional

Se observó una asociación significativa entre un mayor nivel de 7-KC y una menor FA (**Figura 6**). Se identificaron 2001 vóxeles significativos en el atlas *ICBM-DTI-81 white matter labels atlas*. La mayor parte de estos vóxeles se localizaron en el cuerpo calloso. También se vieron asociaciones significativas en las siguientes regiones: parte anterior izquierda y posterior derecha de la corona radiata, parte izquierda de la capsula externa, hipocampo derecho y fascículo longitudinal superior derecho.

No se halló ningún efecto significativo del 24-OHC, 27-OHC y 7 β -OHC sobre la FA.

1.3.2.2 Difusividad media

Se observó una asociación significativa entre un mayor nivel de 7-KC y una mayor MD (**Figura 7**). Se identificaron 12258 vóxeles significativos en el atlas. Los resultados se hallaron en todas las regiones de la SB.

No se halló ningún efecto significativo del 24-OHC, 27-OHC y 7 β -OHC sobre la MD.

1.3.2.3 Difusividad axial

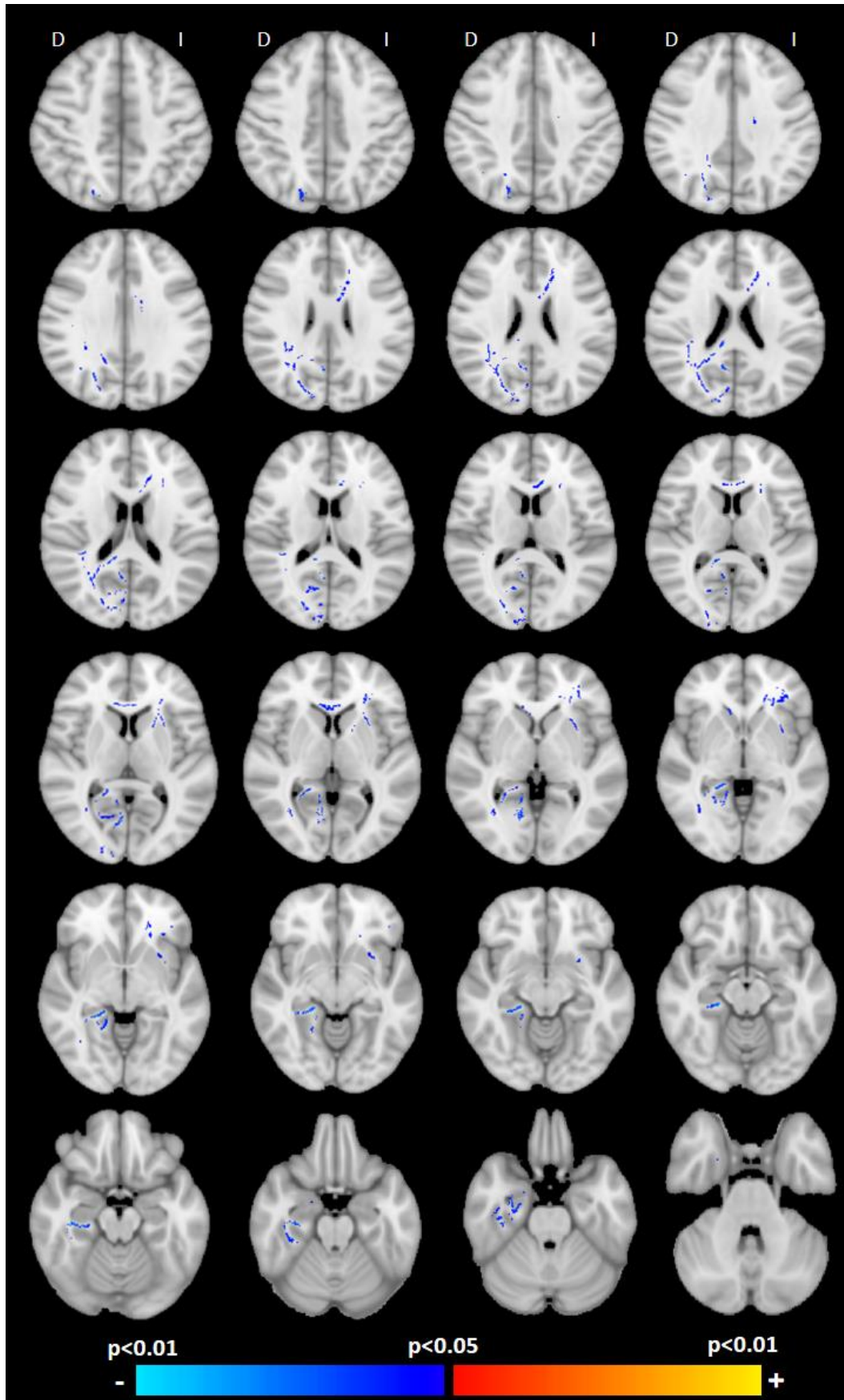
Se observó una asociación significativa entre un mayor nivel de 7-KC y una mayor AxD (**Figura 8**). Se identificaron 8676 vóxeles significativos en el atlas. Los vóxeles se localizaron en todas las regiones de la SB excepto en el cuerpo del cuerpo calloso, giro cingulado y fascículo uncinado.

No se halló ningún efecto significativo del 24-OHC, 27-OHC y 7 β -OHC sobre la AxD.

1.3.2.4 Difusividad radial

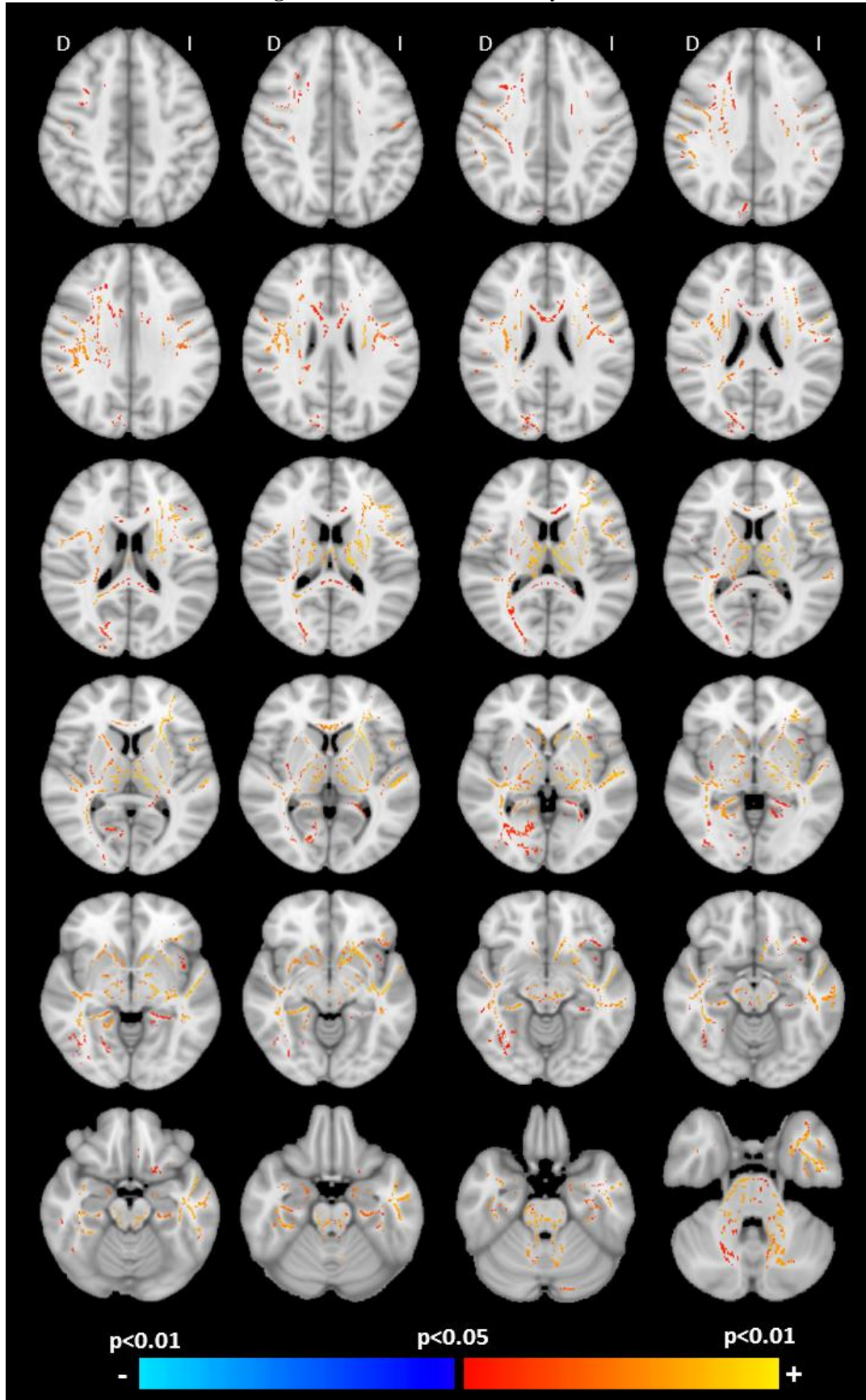
Se observó una asociación significativa entre un mayor nivel de 7-KC y una mayor RD (**Figura 9**). Se identificaron 7468 vóxeles significativos en el atlas. Los vóxeles se localizaron en todas las regiones de la SB excepto en el giro cingulado y fascículo uncinado.

No se halló ningún efecto significativo del 24-OHC, 27-OHC y 7 β -OHC sobre la RD.

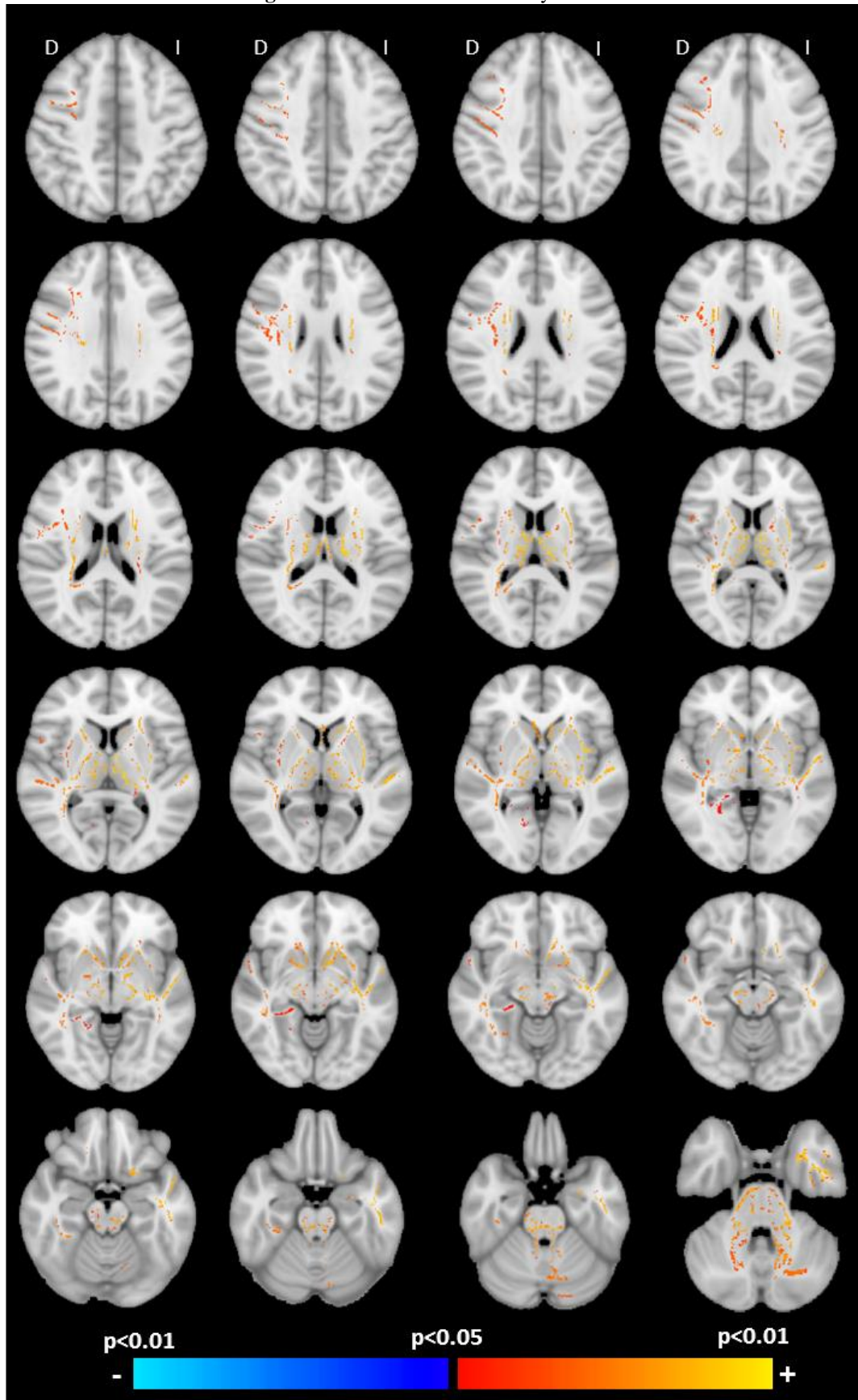
Figura 6: Asociación entre 7-KC y FA.

Nota. Ajustado por edad, género e hiperintensidades de la sustancia blanca (corregido por *family-wise error*, $p < 0.05$, $n=127$). Los resultados se muestran sobre el modelo estándar FSL de T1. D = derecha; I = izquierda; 7-KC = 7-cetocolésterol; FA = anisotropía fraccional.

Figura 7: Asociación entre 7-KC y MD.

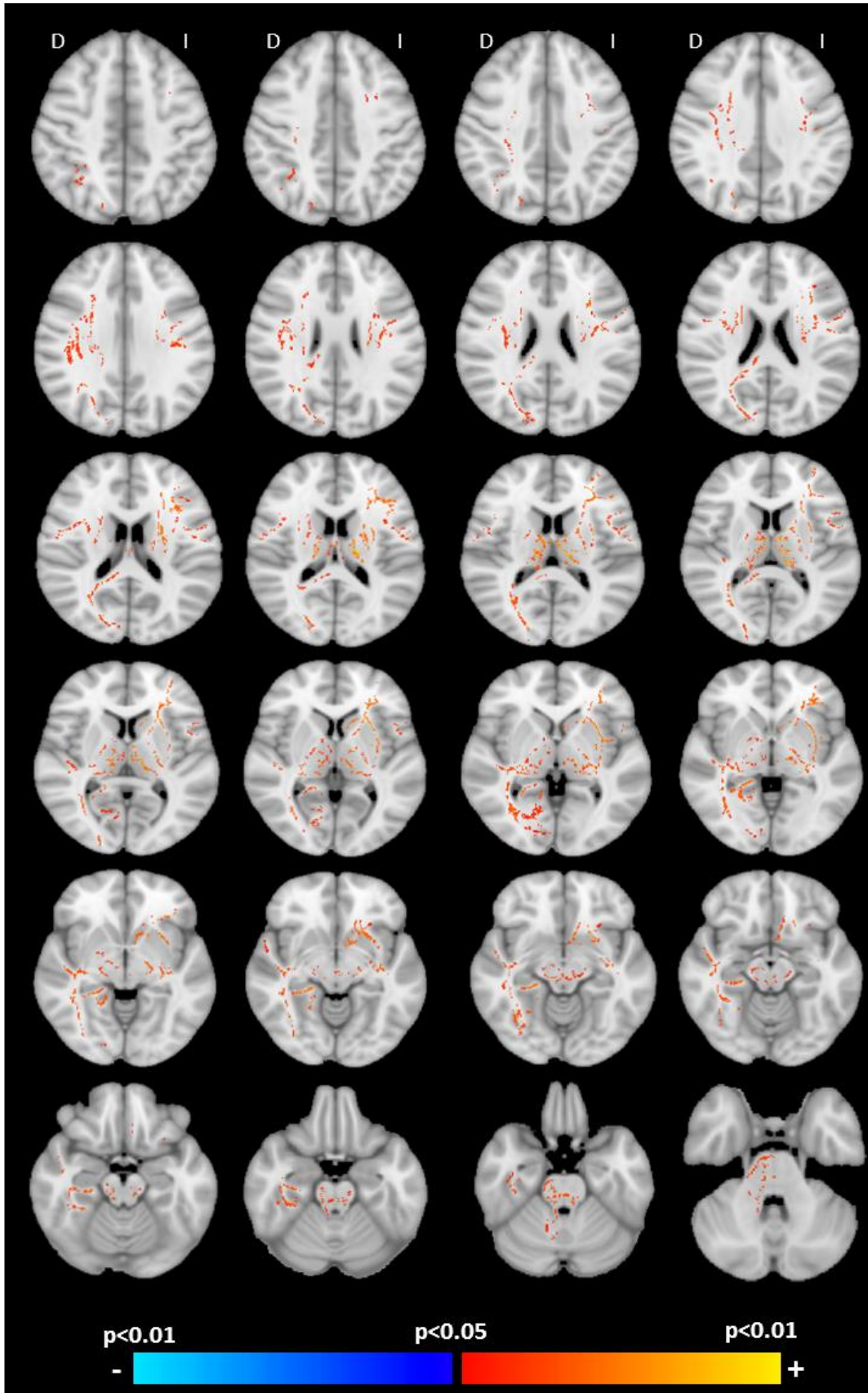


Nota. Ajustado por edad, género e hiperintensidades de la sustancia blanca (corregido por *family-wise error*, $p < 0.05$, $n = 127$). Los resultados se muestran sobre el modelo estándar FSL de T1. D = derecha; I = izquierda; 7-KC = 7-cetocolesterol; MD = difusividad media.

Figura 8: Asociación entre 7-KC y AxD.

Nota. Ajustado por edad, género e hiperintensidades de la sustancia blanca (corregido por *family-wise error*, $p < 0.05$, $n = 127$). Los resultados se muestran sobre el modelo estándar FSL de T1. D = derecha; I = izquierda; 7-KC = 7-cetocolésterol; AxD = difusividad axial.

Figura 9: Asociación entre 7-KC y RD.



Nota. Ajustado por edad, género e hiperintensidades de la sustancia blanca (corregido por *family-wise error*, $p < 0.05$, $n=127$). Los resultados se muestran sobre el modelo estándar FSL de T1. D = derecha; I = izquierda; 7-KC = 7-cetocolésterol; RD = difusividad radial.

1.4 Oxiesteroles en líquido cefalorraquídeo, biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer y microestructura de la sustancia blanca de las regiones cognitivas

1.4.1 Regiones cognitivas

El análisis se centró en las siguientes regiones involucradas en los procesos de cognición del atlas *JHU-DTI-81-label*: cuerpo calloso, fascículo longitudinal inferior y superior, giro del cíngulo, hipocampo, fascículo uncinado, fórnix (columna+cuerpo), fórnix (cresta)/estría terminal.

El número de vóxeles significativos del análisis del efecto del 7-KC sobre la microestructura de la SB de las regiones cognitivas, se muestra en la **Tabla 18** y **Figura 10**. El índice con mayor número de vóxeles significativos en las regiones cognitivas fue el MD. El hipocampo derecho fue la región con mayor porcentaje de área afectada en los índices FA, MD y RD. En el caso de AxD, el fascículo longitudinal inferior izquierdo fue el área con mayor número de vóxeles significativos.

Tabla 18: N° de vóxeles significativos identificados por el atlas JHU-DTI-81-label del efecto del 7-KC en los índices FA, MD, AxD, RD de las regiones cognitivas.

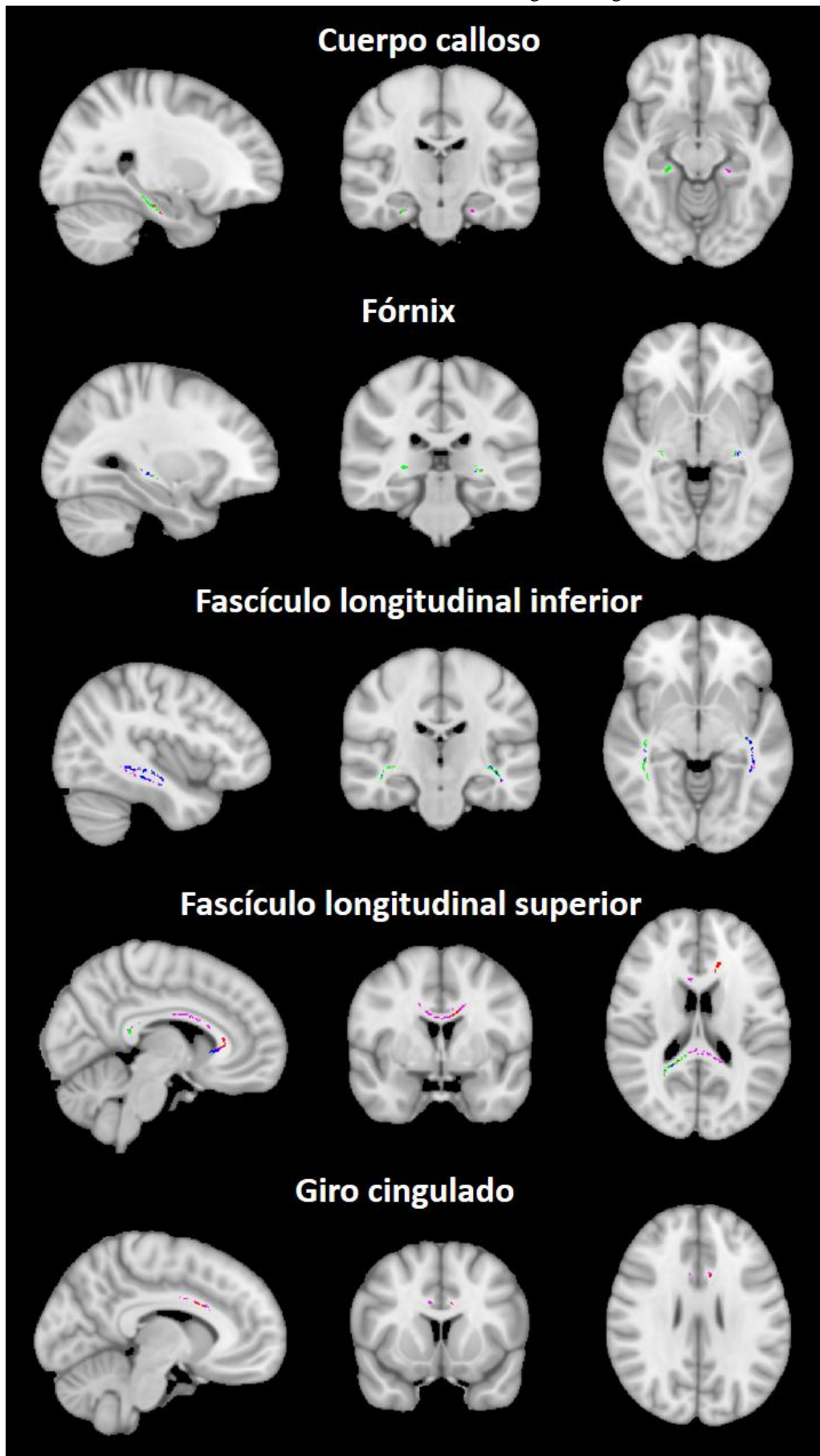
Regiones (N°) ^a		N° vóxeles significativos ^b			
		FA	MD	AxD	RD
CC	Genu (8851)	429 (4.85%)	470 (5.31%)	98 (1.11%)	2 (0.02%)
	Cuerpo (13711)	247 (1.80%)	658 (4.80%)	0	21 (0.15%)
	Espleno (12729)	223 (1.75%)	524 (4.12%)	116 (0.91%)	387 (3.04%)
FRNX	Cuerpo+columna (659)	0	50 (7.59%)	53 (8.04%)	47 (7.13%)
	Cresta/ST (1124)	0	36 (3.20%)	16 (1.42%)	42 (3.74%)
	Cresta/ST (1125)	0	68 (6.04%)	55 (4.89%)	61 (5.42%)
FLI	Dcho.(2228)	0	298 (13.38%)	231 (10.37%)	255 (11.45%)
	Izq.(2231)	0	258 (11.56%)	240 (10.76%)	35 (1.57%)
FLS	Dcho.(6607)	118 (1.79%)	578 (8.75%)	332 (5.02%)	617(9.34%)
	Izq.(6605)	0	447 (6.77%)	4 (0.06%)	397 (6.01%)
GC	Dcho.(2342)	0	31 (1.32%)	0	0
	Izq.(2751)	16 (0.58%)	42 (1.53%)	0	0
Hipoc.	Dcho.(1236)	239 (19.34%)	229 (18.53%)	28 (2.27%)	247 (19.98%)
	Izq.(1155)	0	120 (10.39%)	0	0
FU	Dcho.(380)	0	38 (10.00%)	0	0
	Izq.(376)	0	0	0	0

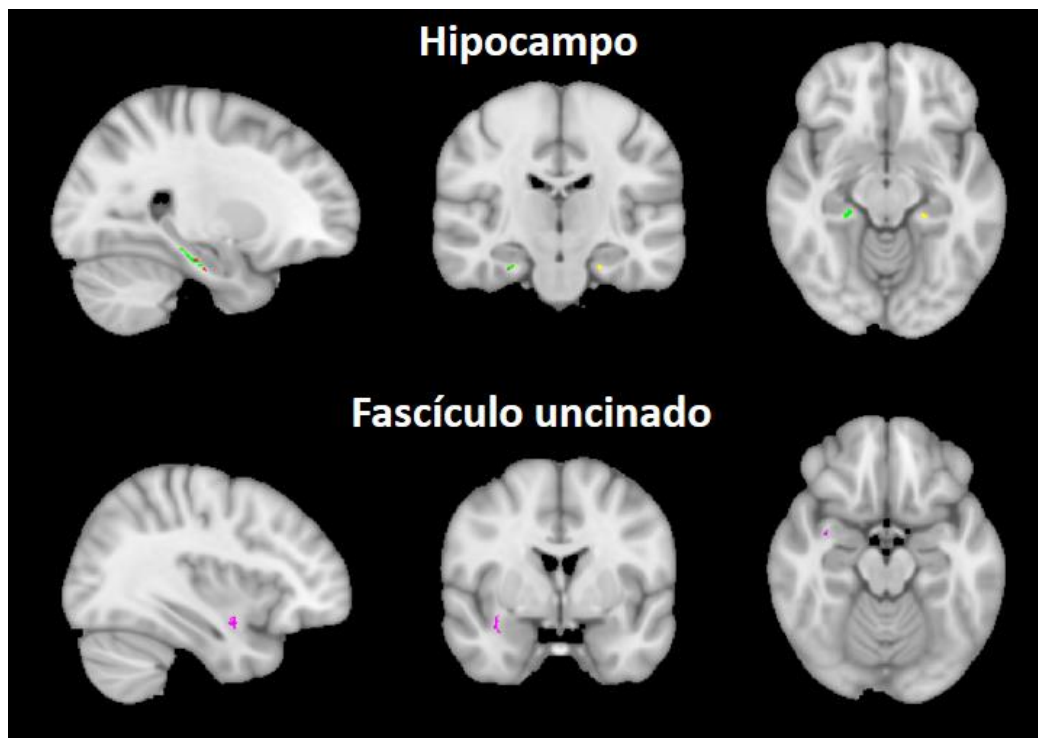
Nota. Porcentaje respecto al número de vóxeles en base al atlas JHU-DTI-81-label. FA = anisotropía fraccional; MD = difusividad media; AxD = difusividad axial; RD = difusividad radial; Dcho. = derecho; Izq. = izquierdo; CC = cuerpo calloso; FRNX = fórnix; ST= estría terminal; FLI = fascículo longitudinal inferior; FLS = fascículo longitudinal superior; GC = giro cingulado; Hipoc. = hipocampo; FU = fascículo uncinado.

^a En paréntesis el número de vóxeles en base al atlas JHU-DTI-81-label.

^b En paréntesis el porcentaje respecto al número total de vóxeles.

Figura 10: Vóxeles significativos identificados por el atlas JHU-DTI-81-label del efecto del 7-KC en los índices FA, MD, AxD, RD de las regiones cognitivas.





Nota. La FA se muestra en rojo; la MD se muestra en rosa; la AxD se muestra en azul; la RD se muestra en verde. FA = anisotropía fraccional; MD = difusividad media; AxD = difusividad axial; RD = difusividad radial.

1.4.2 Efecto de los oxiesteroles y βA_{1-42} sobre la microestructura de la sustancia blanca de las regiones cognitivas.

Se extrajo la media de la FA, MD, AxD y RD de los vóxeles significativos de cada región cognitiva del análisis de correlación TBSS entre el 7-KC y los índices de DTI (**Tabla 18**). Por un lado se analizó la relación entre el 7-KC y los índices de la DTI en cada región mediante MLG. Por otro lado, se analizó la relación entre el nivel de βA_{1-42} y la media de los índices de DTI en los vóxeles donde el 7-KC mostró un efecto significativo. En los casos en los que se observó una asociación significativa entre el βA_{1-42} y la DTI, se compararon los valores de los índices de la DTI entre sujetos $\beta A+$ y $\beta A-$. Los MLG se ajustaron por la edad, el género, las HSB y el genotipo APOE.

1.4.2.1 Anisotropía fraccional

Como cabía esperar, se halló una asociación significativa entre un mayor nivel de 7-KC y menor valor de FA en todas las regiones relacionadas con la cognición que mostraron vóxeles significativos (**Figura 11 a-f**).

También se observó una asociación significativa entre un mayor nivel de βA_{1-42} y mayor valor de FA en el esplenio del cuerpo calloso (**Figura 11 c**). En las demás regiones no se encontró ninguna asociación significativa.

No se observaron diferencias significativas en los valores de la FA del esplenio entre sujetos $\beta A+$ y $\beta A-$ (**Figura 12 a**).

1.4.2.2 Difusividad media

Se confirmó también, la relación entre un mayor nivel de 7-KC y mayor valor de MD en todas las regiones cognitivas que mostraron vóxeles significativos (**Figura 13 a-j**).

También se observó una asociación significativa entre un mayor nivel de βA_{1-42} y menor valor de MD en el cuerpo del cuerpo calloso, fórnix (cuerpo+columna) y fascículo longitudinal inferior izquierdo (**Figura 13 b, d, f**). En las demás regiones no se encontró ninguna asociación significativa.

Los sujetos $\beta A+$ mostraron valores significativamente superiores del índice MD del fórnix que los $\beta A-$ (**Figura 12 b**).

1.4.2.3 Difusividad axial

Como cabía esperar, se halló una relación significativa entre un mayor nivel de 7-KC y mayor valor de AxD en todas las regiones cognitivas que mostraron vóxeles significativos excepto en el fascículo longitudinal superior izquierdo (**Figura 14 a-g**).

También se observó una asociación significativa entre un mayor nivel de βA_{1-42} y menor valor de AxD en el genu y esplenio del cuerpo calloso, fórnix (cuerpo+columna) e hipocampo derecho (**Figura 14 a-d**). En las demás regiones no se encontró ninguna asociación significativa.

Los sujetos $\beta A+$ mostraron valores significativamente superiores del índice AxD del fórnix que los $\beta A-$ (**Figura 12 c**).

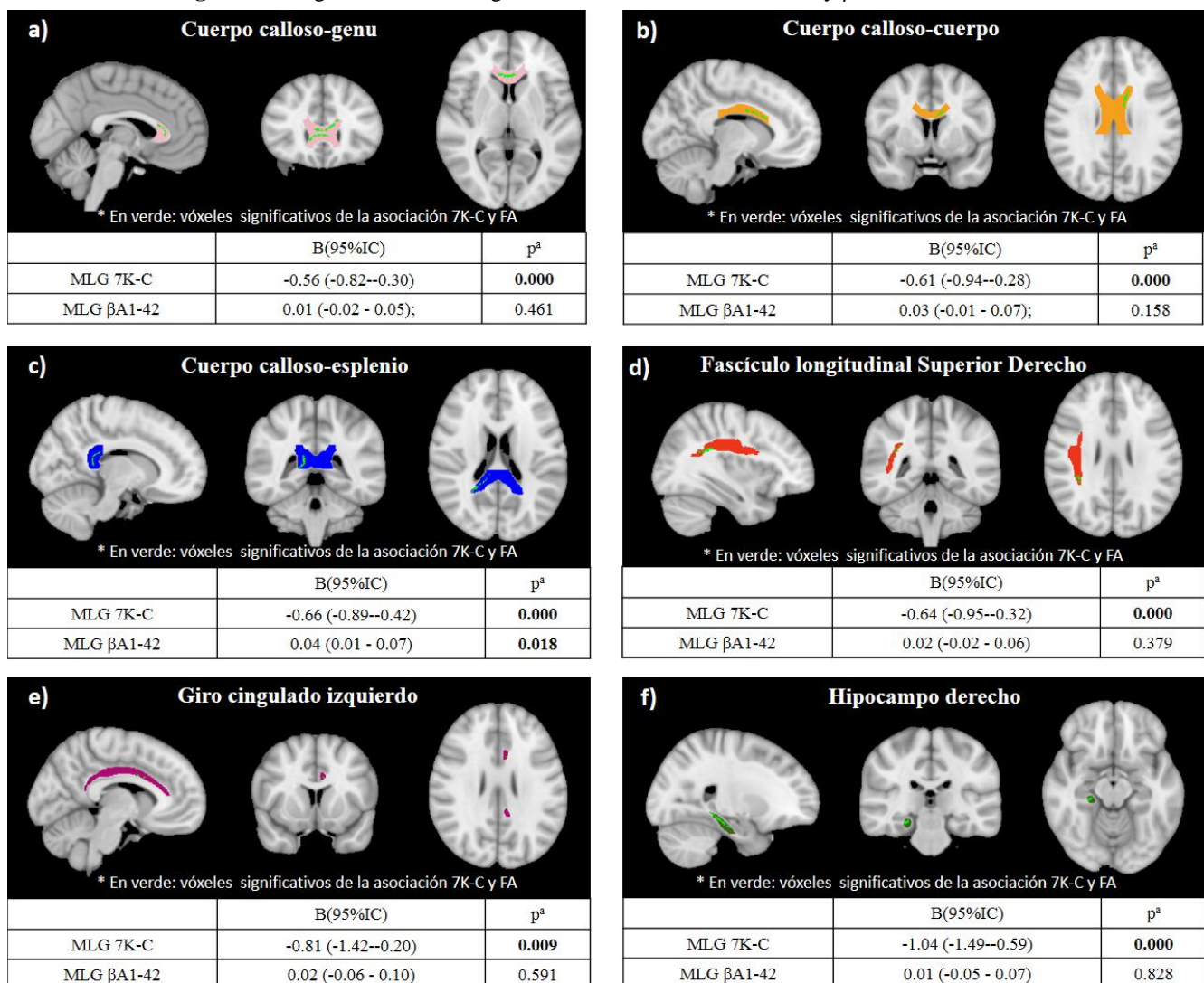
1.4.2.4 Difusividad radial

De acuerdo con los análisis de TBSS, se halló una relación significativa entre un mayor nivel de 7-KC y mayor valor de RD en todas las regiones cognitivas que mostraron vóxeles significativos excepto en el genu del cuerpo calloso (**Figura 15 b-h**).

También se observó una asociación negativa entre el nivel de β A y valores RD del fórnix (cuerpo+columna) (**Figura 15 d**). En las demás regiones no se encontró ninguna asociación significativa.

Los sujetos β A+ mostraron valores significativamente superiores del índice RD del fórnix que los β A- (**Figura 12 d**).

Figura 11: Regresiones lineales generalizadas del efecto del 7-KC y β A1-42 sobre la FA.

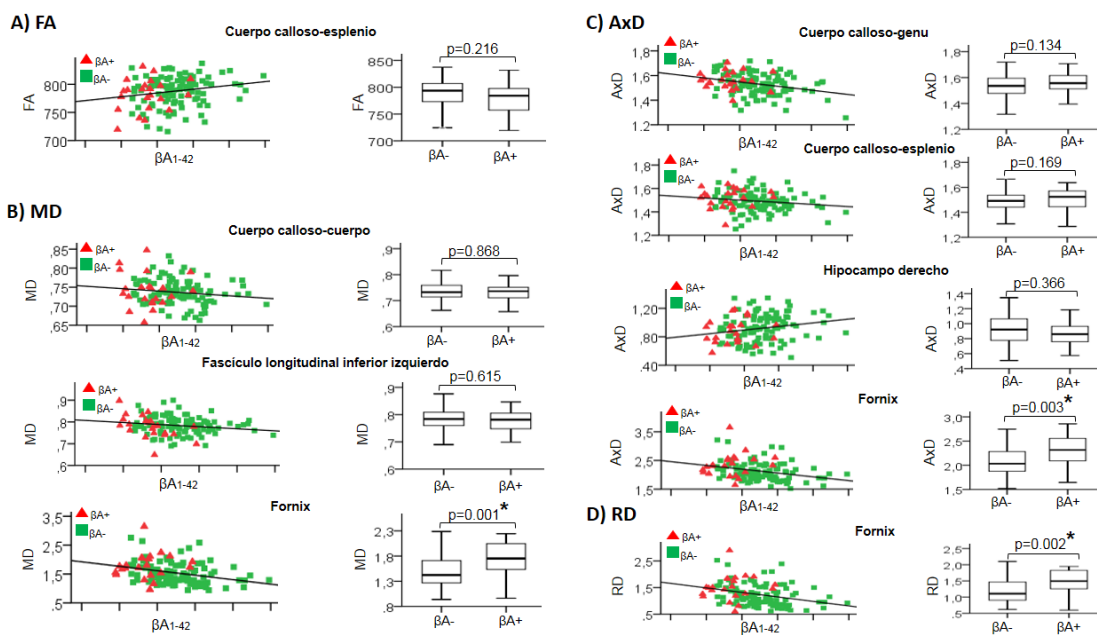


Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; 7-KC= 7-cetocolésterol; β A₁₋₄₂ = β -amiloide₁₋₄₂; FA = anisotropía fraccional; D = derecho; I = izquierdo;

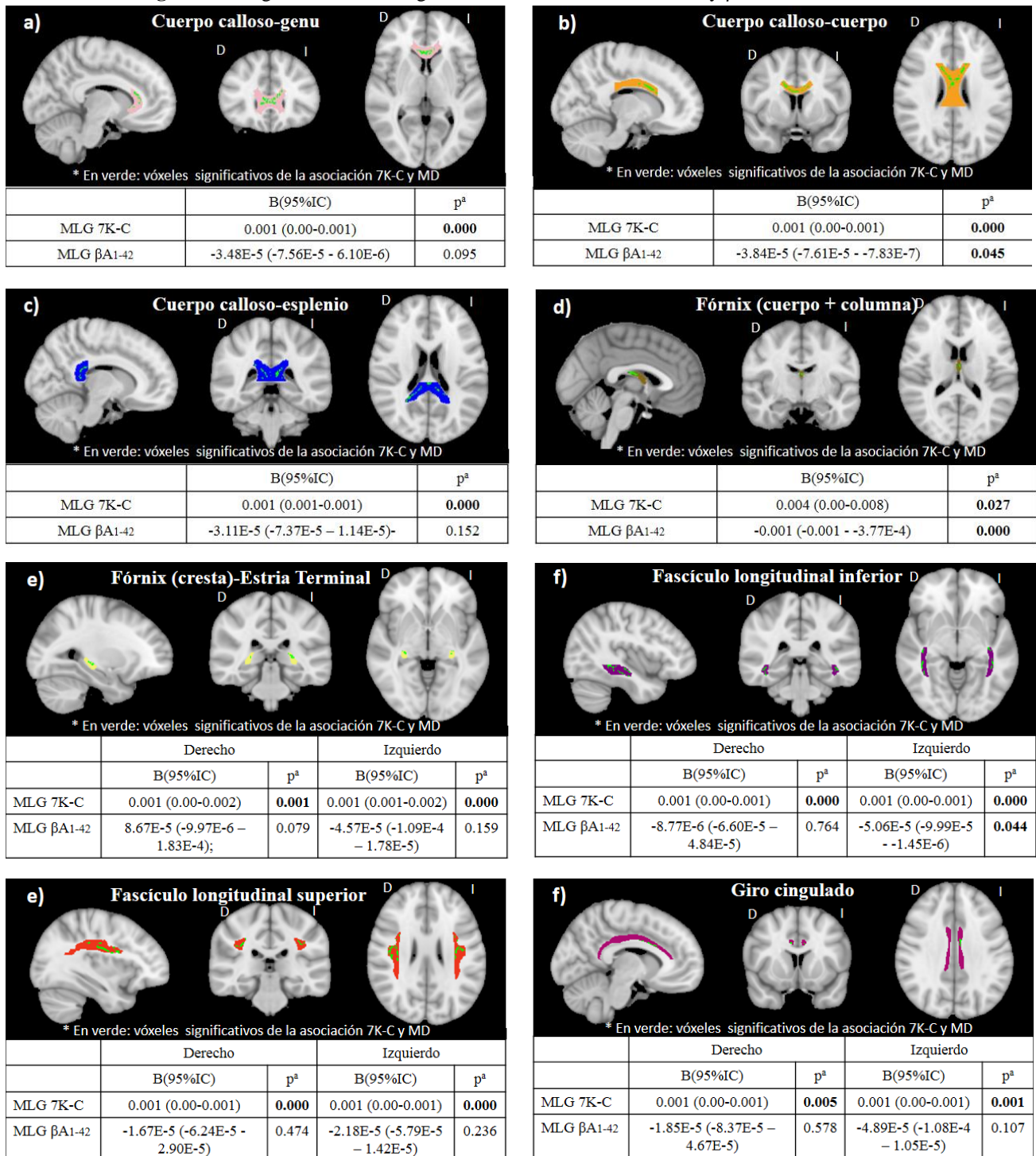
Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

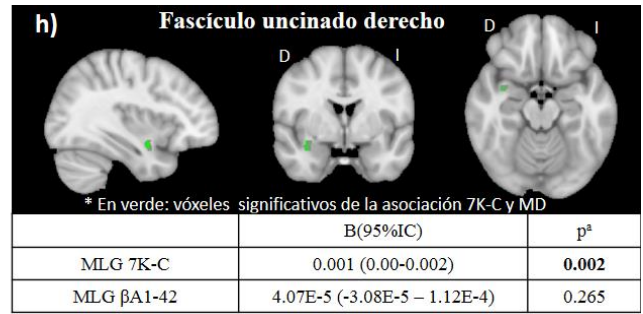
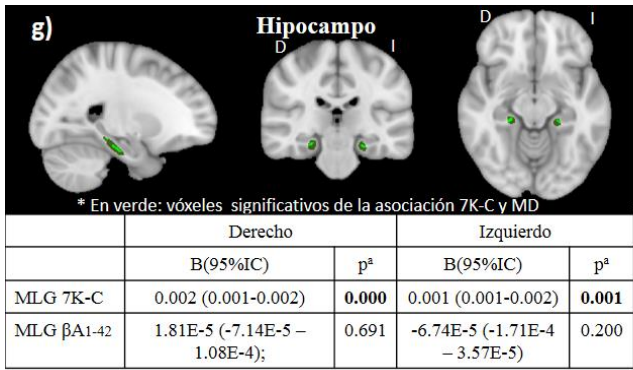
^a Ajustado por edad, género, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

Figura 12: Comparación de los valores de los índices de la DTI en sujetos βA^+ y βA^- .



Nota. FA = anisotropía fraccional; MD = difusividad media; AxD = difusividad axial; RD = difusividad radial; βA_{42} = beta-amiloide₁₋₄₂.

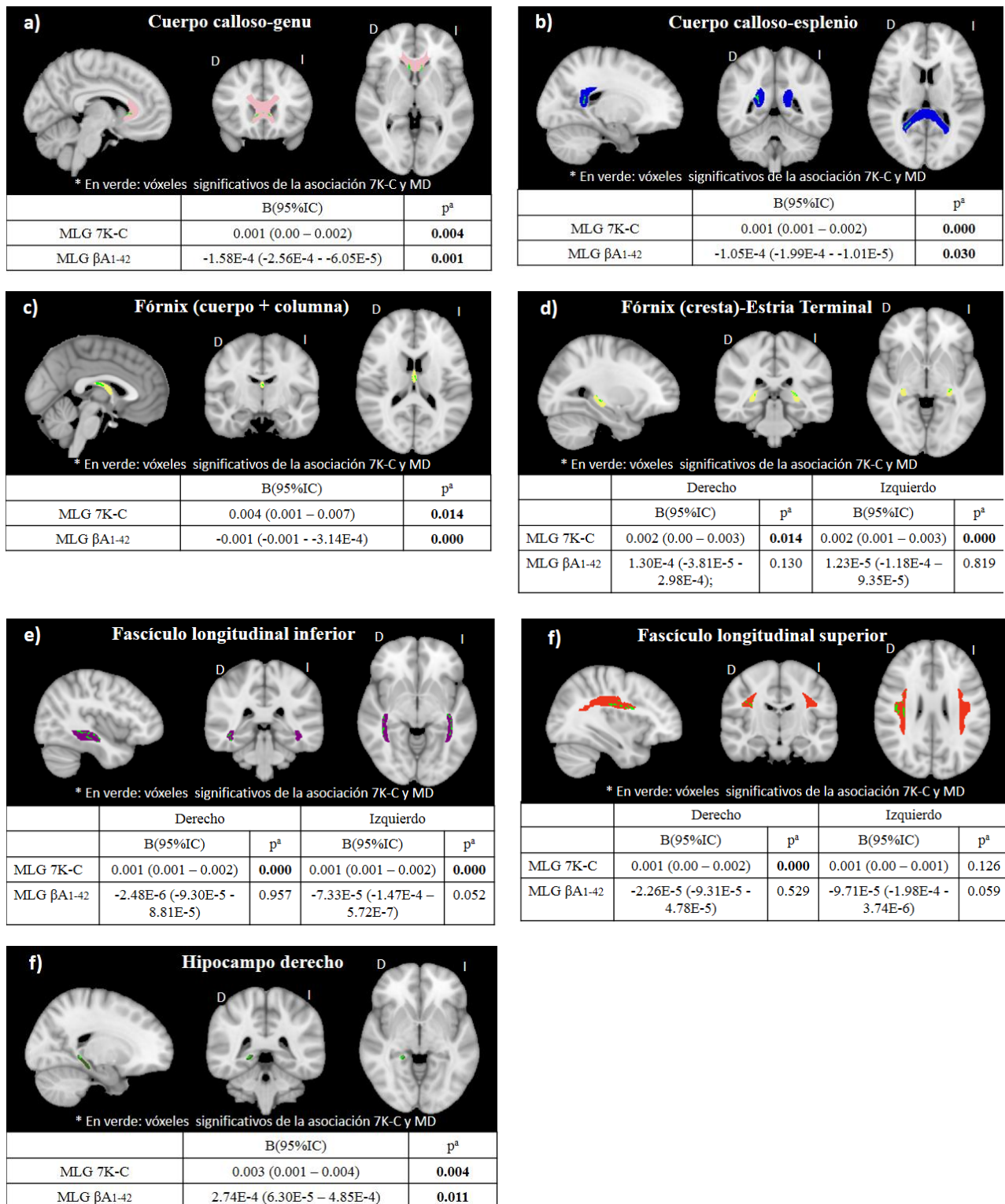
Figura 13: Regresiones lineales generalizadas del efecto del 7-KC y β A1-42 sobre la MD.



Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; 7-KC= 7-cetocolesterol; β A₁₋₄₂ = β -amiloide₁₋₄₂; MD = difusividad media; D = derecho; I = izquierdo.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Ajustado por edad, género, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

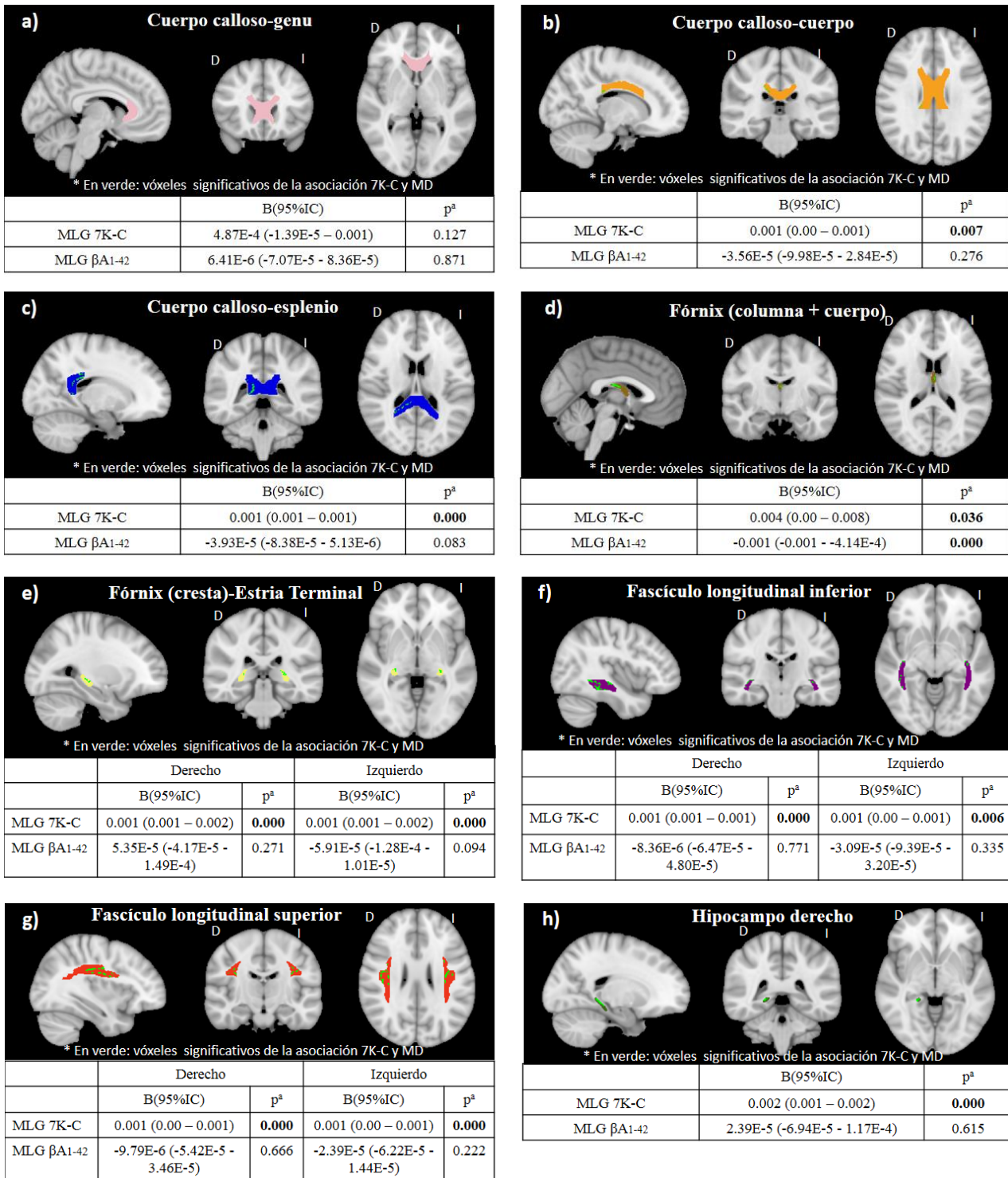
Figura 14: Regresiones lineales generalizadas del efecto del 7-KC y β A1-42 sobre la AxD.

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; 7-KC= 7cetocolésterol; β A₁₋₄₂ = β -amiloide₁₋₄₂; AxD, difusividad axial; D = derecho; I = izquierdo.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Ajustado por edad, género, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

Figura 15: Regresiones lineales generalizadas del efecto del 7-KC y β A1-42 sobre la RD.



Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; 7-KC= 7cetocolesterol; β A1-42 = β -amiloide₁₋₄₂; RD = difusividad radial; D = derecho; I = izquierdo.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Ajustado por edad, género, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

1.4.3 Efecto de los oxisteroles, la microestructura de la sustancia blanca y su interacción sobre βA_{1-42}

En este apartado se estudió el efecto del nivel de 7-KC y su interacción con los índices de la microestructura de la SB (microestructura*7-KC) sobre el nivel de βA_{1-42} . Se realizaron MLG en aquellas regiones e índices de la microestructura de la SB en los que se obtuvieron asociaciones significativas con el nivel de 7-KC y el nivel de βA_{1-42} (fórnix, cuerpo calloso, hipocampo, fascículo longitudinal inferior). Los modelos se corrigieron por la edad, el género, las HSB y el genotipo APOE. Se crearon dos MLG. En el primero se introdujeron el 7-KC, la microestructura y la interacción microestructura*7-KC como variables predictoras. Con el fin de analizar el papel de la neuroinflamación, en el segundo modelo se añadieron las variables del primer modelo más el YKL40. En los casos significativos se realizaron análisis de mediación y moderación.

1.4.3.1 Fórnix

Los índices MD, AxD y RD mostraron un efecto significativo sobre el βA_{1-42} (**Tabla 19** Modelo 1). El 7-KC y las interacciones 7-KC *MD, 7-KC *AxD y 7-KC *RD no mostraron un efecto significativo sobre el nivel de βA_{1-42} . En el modelo 2 el YKL40 mostró un efecto significativo sobre el βA_{1-42} y los índices MD, AxD y RD mantuvieron su significatividad (**Tabla 19** Modelo 2).

Tabla 19: Regresiones lineales generalizadas del efecto del 7-KC y la microestructura de la sustancia blanca del fórnix sobre βA_{1-42} .

	FRNX (MD)		FRNX (AxD)		FRNX (RD)	
	B (95%IC)	p ^a	B (95%IC)	p ^a	B (95%IC)	p ^a
Modelo 1						
(Intersección)	384.99 (147.95-622.04)	0.001	486.49 (209.33-763.64)	0.001	339.34 (113.33-565.35)	0.003
7-KC	-1.06 (-5.45-3.32)	0.635	-0.90 (-6.97-5.17)	0.771	-1.04 (-4.67-2.59)	0.575
MD	-121.19 (-207.72--34.66)	0.006				
7-KC*MD	0.16 (-2.10-2.42)	0.890				
AD			-131.74 (-230.42—33.06)	0.009		
7-KC*AD			0.07 (-2.40-2.54)	0.955		
RD					-112.62 (-192.35-32.89)	0.006
7-KC*RD					0.16 (-2.00-2.32)	0.884
Modelo 2						
(Intersección)	451.12 (215.90-686.33)	0.000	534.35 (262.40-806.30)	0.000	413.16 (187.66-638.67)	0.000
7-KC	-1.18 (-5.52-3.17)	0.596	-0.98 (-7.00-5.03)	0.749	-1.16 (-4.76-2.45)	0.530
MD	-104.86 (-189.93-19.79)	0.016				
7-KC*MD	0.25 (-1.98-2.47)	0.828				
AD			-111.57 (-208.69-14.44)	0.024		
7-KC*AD			0.12 (-2.30-2.55)	0.920		
RD					-98.84 (-177.08-20.61)	0.013
7-KC*RD					0.27 (-1.85-2.38)	0.805
YKL40	0.81 (0.25-1.37)	0.004	0.81 (0.25-1.37)	0.004	0.82 (0.26-1.37)	0.004

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; FRNX = fórnix; βA_{1-42} = β -amiloide₁₋₄₂; MD = difusividad media; AxD = difusividad axial; RD = difusividad radial; 7-KC = 7-cetocolesterol.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Ajustado por edad, sexo, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

1.4.3.2 Cuerpo calloso

Se halló una asociación negativa entre la AxD del esplenio y genu del cuerpo calloso y el βA_{1-42} (Tabla 20 Modelo 1). En el modelo 2, el YKL40 fue significativo y la AxD del esplenio y genu del cuerpo calloso mantuvieron su significatividad. El 7-KC y la interacción 7-KC*AxD no fueron significativos.

Tabla 20: Regresiones lineales generalizadas del efecto del 7-KC y la microestructura del cuerpo calloso sobre βA_{1-42} .

	CC-E (FA)		CC-C (MD)	
	B (95%IC)	p ^a	B (95%IC)	p ^a
Modelo 1				
(Intersección)	-567.28 (-1750.48-615.92)	0.347	584.38 (-158.67-1327.43)	0.123
7-KC	4.66 (-35.40-44.71)	0.820	5.73 (-18.63-30.08)	0.645
FA	1.09 (-0.39-2.57)	0.148		
7-KC*FA	-0.01 (-0.06-0.05)	0.796		
MD			-457.53 (-1498.56-583.51)	0.389
7-KC*MD			-8.56 (-40.36-23.24)	0.598
Modelo 2				
(Intersección)	-572.89 (-1710.00-564.22)	0.323	639.90 (-78.79-1358.59)	0.081
7-KC	7.52 (-32.65-47.69)	0.714	2.13 (-21.51-25.77)	0.860
FA	1.21 (-0.22-2.63)	0.097		
7-KC*FA	-0.01 (-0.06-0.04)	0.696		
MD			-396.86 (-1403.80-610.08)	0.440
7-KC*MD			-3.83 (-34.69-27.03)	0.808
YKL40	0.99 (0.43-1.54)	0.001	0.93 (0.36-1.49)	0.001
	CC-E (AxD)		CC-G (AxD)	
	B (95%IC)	p ^a	B (95%IC)	p ^a
Modelo 1				
(Intersección)	980.85 (335.39-1626.30)	0.003	947.72 (347.58-1547.86)	0.002
7-KC	-17.89 (-43.85-8.07)	0.177	-2.24 (-29.75-25.28)	0.873
AxD	-472.22 (-900.19—44.26)	0.031	-440.17 (-813.01—67.33)	0.021
7-KC*AxD	11.02 (-5.74-27.77)	0.198	0.95 (-16.40-18.31)	0.914
Modelo 2				
(Intersección)	1144.99 (521.14-1768.83)	0.000	943.55 (362.05-1525.06)	0.001
7-KC	-23.39 (-48.40-1.62)	0.067	-2.66 (-29.38-24.06)	0.845
AxD	-516.18 (-926.39—105.96)	0.014	-383.02 (-745.87—20.17)	0.039
7-KC*AxD	14.64 (-1.51-30.79)	0.076	1.24 (-15.63-18.12)	0.885
YKL40	1.02 (0.46-1.57)	0.000	0.88 (0.32-1.43)	0.002

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; CC-G = cuerpo calloso-genu; CC-E = cuerpo calloso-esplenio; CC-C = cuerpo calloso-cuerpo; βA_{1-42} = β -amiloide₁₋₄₂; FA = anisotropía fraccional; MD = difusividad media; AxD = difusividad axial; 7-KC = 7-cetocolésterol.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Ajustado por edad, sexo, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

1.4.3.3 Fascículo longitudinal inferior izquierdo

Se halló un efecto significativo del 7-KC, AxD y la interacción 7-KC*AxD sobre el nivel de βA_{1-42} . (**Tabla 21** Modelo 1). En el Modelo 2, el YKL40 y AxD fueron significativos y el 7-KC y la interacción 7-KC*AxD perdieron la significatividad (**Tabla 21** Modelo 2).

Tabla 21: Regresiones lineales generalizadas del efecto del 7-KC y la difusividad axial FLI izquierdo sobre βA_{1-42} .

	FLI-I (AxD)	
	B (95% IC)	p ^a
Modelo 1		
(Intersección)	1321.46 (515.18-2127.73)	0.001
7-KC	-38.73 (-74.93--2.52)	0.036
AxD	-722.00 (-1287.77--156.23)	0.012
7-KC*AxD	27.67 (1.22-54.11)	0.040
Modelo 2		
(Intersección)	1302.28 (521.77-2082.80)	0.001
7-KC	-33.86 (-69.59-1.86)	0.063
AxD	-652.99 (-1202.59--103.39)	0.020
7-KC*AxD	24.16 (-1.89-50.21)	0.069
YKL40	0.91 (0.36-1.47)	0.001

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; FLI = fascículo longitudinal inferior; I = izquierdo βA_{1-42} = β -amiloide₁₋₄₂; AxD = difusividad axial; 7-KC = 7-cetocolesterol.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Ajustado por edad, sexo, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

Con el fin de profundizar en los hallazgos significativos, se analizó el efecto moderador del 7-KC en la asociación entre la difusividad axial del fascículo longitudinal y el nivel de βA_{1-42} . Al ajustar el análisis por edad, género, HSB y genotipo APOE, los resultados mostraron un efecto moderador del 7-KC ($B = 27.66$, IC del 95% [0.06, 55.26], $t = 1.98$, $p = 0.049$). Al ajustar también por el YKL40, el 7-KC perdió su efecto moderador ($B = 24.16$, IC del 95% [-3.15, 51.47], $t = 1.75$, $p = 0.082$).

1.4.3.4 Hipocampo derecho

La AxD mostró un efecto significativo sobre el nivel de βA_{1-42} (**Tabla 22** Modelo 1.). En el modelo 2, el YKL40 fue significativo y la AxD mantuvo su significatividad (**Tabla 22** Modelo 2). El 7-KC y la interacción 7-KC*AxD no fueron significativos.

Tabla 22: Regresiones lineales generalizadas del efecto del 7-KC, la difusividad axial del hipocampo derecho sobre βA_{1-42} .

	Hipoc.D (AxD)	
	B (95%IC)	p ^a
Modelo 1		
(Intersección)	74.27 (-201.92-350.47)	0.598
7-KC	-0.13 (-8.35-8.10)	0.976
AxD	248.42 (57.91-438.94)	0.011
7-KC*AxD	-1.65 (-9.62-6.33)	0.686
Modelo 2		
(Intersección)	186.02 (-92.33-464.37)	0.190
7-KC	-0.17 (-8.17-7.83)	0.967
AxD	209.83 (23.04-396.62)	0.028
7-KC*AxD	-1.38 (-9.15-6.39)	0.728
YKL40	0.83 (0.28-1.39)	0.003

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; Hipoc.D = hipocampo derecho; βA_{1-42} = β -amiloide₁₋₄₂; AxD = difusividad axial; 7-KC = 7-cetocolesterol.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Ajustado por edad, sexo, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

1.4.4 Efecto de los oxiesteroles, el βA_{1-42} y su interacción sobre la microestructura de la sustancia blanca

En este apartado se estudió el efecto del nivel de 7-KC y su interacción con βA_{1-42} ($\beta A_{1-42} * 7-KC$) sobre los niveles de la microestructura de la SB en aquellas regiones en los que se observó un efecto significativo del 7-KC y del βA_{1-42} (fórnix, cuerpo caloso, hipocampo, fascículo longitudinal inferior). Los modelos se corrigieron por la edad, el género, las HSB y el genotipo APOE. Se crearon dos MLG. En el primero se introdujeron el 7-KC, βA_{1-42} y la interacción $\beta A_{1-42} * 7-KC$ como variables predictoras. Con el fin de analizar el papel de la neuroinflamación, en el segundo modelo se añadieron las variables del primer modelo más el YKL40. En los casos significativos se realizaron análisis de mediación y moderación.

1.4.4.1 Fórnix.

El 7-KC mostró un efecto significativo sobre la MD, AxD y RD (**Tabla 23** Modelo 1). En el modelo 2, el YKL40 no fue significativo y los índices MD, AxD y RD mantuvieron su significatividad. El βA_{1-42} y la interacción 7-KC* βA_{1-42} no fueron significativos en ningún índice.

Tabla 23 Regresiones lineales generalizadas del efecto del βA_{1-42} y 7-KC sobre la microestructura del fórnix.

	FRNX (MD)		FRNX (AxD)		FRNX (RD)	
	B (95%IC)	p ^a	B (95%IC)	p ^a	B (95%IC)	p ^a
Modelo 1						
(Intersección)	0.58 (0.03-1.14)	0.040	1.31 (0.83-1.80)	0.000	0.23 (-0.38-0.83)	0.464
7-KC	0.013 (0.002-0.024)	0.024	0.012 (0.002-0.022)	0.014	0.013 (0.001-0.026)	0.031
βA_{1-42}	-4.12E-4 (0.001-1.30E-4)	0.136	-3.20E-4 (0.001-1.53E-4)	0.185	-4.67E-4 (-0.001-1.22E-4)	0.121
7-KC* βA_{1-42}	-2.23E-5 (-4.64E-5-1.93E-6)	0.071	-2.07E-5 (-4.18E-5-4.73E-7)	0.055	-2.34E-5 (-4.97E-5-2.90E-6)	0.081
Modelo 2						
(Intersección)	0.48 (-0.10-1.05)	0.104	1.22 (0.71-1.72)	0.000	0.12 (-0.51-0.75)	0.704
7-KC	0.013 (0.002-0.024)	0.025	0.012 (0.002-0.022)	0.015	0.013 (0.001-0.026)	0.033
βA_{1-42}	-3.37E-4 (-0.001-0.000)	0.231	-2.51E-6 (-0.001-0.000)	0.307	-3.93E-4 (-0.001-2.08E-4)	0.200
7-KC* βA_{1-42}	-2.17E-5 (-4.59E-5-2.39E-6)	0.077	2.05E-5 (-4.13E-5-8.73E-7)	0.060	-2.29E-5 (-4.91E-5-3.37E-6)	0.088
YKL40	-0.001 (-0.002-4.72E-4)	0.187	-0.001 (-0.002-3.60E-4)	0.161	-0.001 (-0.003-0.001)	0.234

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; MD = difusividad media; AxD = difusividad axial; RD = difusividad radial; 7-KC = 7-cetocolésterol; βA_{1-42} = β -amiloide₁₋₄₂.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Ajustado por edad, sexo, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

1.4.4.2 Cuerpo calloso

El 7-KC tuvo un efecto positivo sobre la MD del cuerpo del cuerpo calloso y negativo sobre la FA del esplenio. Al introducir el YKL40 en el modelo, el 7-KC mantuvo la significatividad sobre la MD del cuerpo pero no sobre la FA del esplenio. El βA_{1-42} mostró un efecto negativo sobre la AxD del genu y esplenio del cuerpo calloso. Al introducir el YKL40 en estos modelos el βA_{1-42} mantuvo su significatividad (**Tabla 24**).

Tabla 24: Regresiones lineales generalizadas del efecto del βA_{1-42} y 7-KC sobre la microestructura del cuerpo calloso.

	CC-E (FA)		CC-C (MD)	
	B (95%IC)	p ^a	B (95%IC)	p ^a
Modelo 1				
(Intersección)	815.49 (777.43-853.56)	0.000	0.63 (0.58-0.68)	0.000
7-KC	-0.77 (-1.54-0.00)	0.050	0.001 (1.51E-4-0.002)	0.023
βA_{1-42}	0.02 (-0.02-0.06)	0.270	-1.01E-5 (-5.76E-5 - 3.59E-5)	0.650
7-KC* βA_{1-42}	3.36E-4 (-0.001-0.002)	0.692	-1.08E-6 (-3.17E-6 - 1.01E-6)	0.308
Modelo 2				
(Intersección)	812.57 (773.37-851.76)	0.000	0.62 (0.57-0.67)	0.000
7-KC	-0.74 (-1.50-0.03)	0.058	0.001 (1.23E-6-0.002)	0.027
βA_{1-42}	0.02 (-0.01-0.06)	0.216	-6.28E-6 (-5.40E-5 - 4.15E-5)	0.797
7-KC* βA_{1-42}	3.66E-4 (-0.001-0.002)	0.662	-1.06E-6 (-3.15E-6 - 1.03E-6)	0.320
YKL40	-0.04 (-0.14-0.06)	0.443	-5.77E-5 (-1.83E-4-6.74E-5)	0.366
	CC-E (AxD)		CC-G (AD)	
	B (95%IC)	p ^a	B (95%IC)	p ^a
Modelo 1				
(Intersección)	1.33 (1.21-1.46)	0.000	1.48 (1.35-1.61)	0.000
7-KC	-0.001 (-0.003-0.001)	0.427	1.81E-4 (-0.002-0.003)	0.892
βA_{1-42}	-1.56E-4 (-2.76E-4 - -3.69E-5)	0.010	-1.67E-4 (-2.94E-4 - -4.02E-5)	0.010
7-KC* βA_{1-42}	5.13E-6 (-1.93E-7 - 1.04E-5)	0.059	1.89E-6 (-3.75E-6 - 7.54E-6)	0.512
Modelo 2				
(Intersección)	1.33 (1.21-1.46)	0.000	1.46 (1.33-1.60)	0.000
7-KC	-0.001 (-0.004-0.001)	0.410	1.18E-4 (-0.003-0.003)	0.935
βA_{1-42}	-1.57E-4 (-2.27E-7 - 1.05E-5)	0.012	-1.56E-4 (-2.85E-4 - -2.64E-5)	0.018
7-KC* βA_{1-42}	5.11E-6 (-2.76E-4 - -3.69E-5)	0.061	1.95E-6 (-3.70E-6-7.60E-6)	0.499
YKL40	1.43E-5 (-3.06E-4 - 3.34E-4)	0.930	-1.40E-4 (-4.78E-4 - 1.99E-4)	0.419

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; 7-KC = 7-cetocolésterol; βA_{1-42} = β -amiloide₁₋₄₂; FA = anisotropía fraccional; AxD = difusividad axial; MD = difusividad media; CC-E = cuerpo calloso-esplenio; CC-C = cuerpo calloso-cuerpo; CC-G = cuerpo calloso-genu.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Ajustado por edad, sexo, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

1.4.4.3 Fascículo longitudinal inferior izquierdo

Se halló un efecto negativo del βA_{1-42} sobre la AxD del fascículo longitudinal inferior izquierdo. Al introducir el YKL40 en el modelo, el βA_{1-42} mantuvo la significatividad (**Tabla 25**).

Tabla 25: Regresiones lineales generalizadas del efecto del βA_{1-42} y 7-KC sobre la AxD del FLI izquierdo.

	FLI-I (AxD)	
	B (95% IC)	p ^a
Modelo 1		
(Intersección)	1.34 (1.24-1.43)	0.000
7-KC	-0.001 (-0.003-0.001)	0.492
βA_{1-42}	-1.10E-4 (-2.03E-4- -1.82E-5)	0.019
7-KC* βA_{1-42}	3.91E-6 (-2.018E-7-8.05E-6)	0.063
Modelo 2		
(Intersección)	1.34 (1.24-1.44)	0.000
7-KC	-0.001(-0.003-0.001)	0.522
βA_{1-42}	-1.12E-4 (-2.07E-4- -1.74E-5)	0.020
7-KC* βA_{1-42}	3.91E-6 (-2.25E-7-8.06E-6)	0.064
YKL40	1.49E-5 (-2.34E-4 - 2.63E-4)	0.906

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; FLI-I., fascículo longitudinal inferior izquierdo; AxD = difusividad axial; 7-KC = 7-cetocolesterol; βA_{1-42} = β -amiloide₁₋₄₂.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Ajustado por edad, sexo, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

1.4.4.4 Hipocampo derecho

El βA_{1-42} mostró un efecto positivo sobre la AxD del hipocampo derecho. Al introducir el YKL40 en el modelo, el βA_{1-42} mantuvo la significatividad (**Tabla 26**).

Tabla 26: Regresiones lineal generalizada del βA_{1-42} y 7-KC sobre la AxD del hipocampo derecho.

	Hipoc-D (AxD)	
	B (95%IC)	p ^a
Modelo 1		
(Intersección)	0.89 (0.62-1.17)	0.000
7-KC	0.003 (-0.002-0.009)	0.271
βA_{1-42}	3.34E-4 (6.53E-5- 0.001)	0.015
7-KC* βA_{1-42}	-3.95E-7 (-1.24E-5-1.16E-5)	0.949
Modelo 2		
(Intersección)	0.94 (0.65-1.22)	0.000
7-KC	0.003 (-0.002-0.009)	0.276
βA_{1-42}	3.01E-4 (2.79E-5- 0.001)	0.031
7-KC* βA_{1-42}	-6.51E-7 (-1.26E-5-1.13E-5)	0.915
YKL40	4.35E-4 (-2.82E-4-0.001)	0.234

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; Hipoc.D = hipocampo derecho; AxD = difusividad axial; 7-KC = 7-cetocolesterol; βA_{1-42} = β -amiloide₁₋₄₂.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Ajustado por edad, sexo, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

1.5 Oxiesteroides en líquido cefalorraquídeo, neurofilamento, difusividad axial y β -amiloides

El NfL es un marcador de daño axonal. Debido a que la AxD informa sobre daño axonal, y a que en el Capítulo 2 se describió una asociación negativa entre el NfL y la AxD en la mayoría de las regiones de la SB, en este apartado se analizó el efecto de las interacciones 7-KC*AxD y βA_{1-42} *AxD sobre el NfL. Se realizaron MLG en aquellas regiones donde la AxD se encontraba significativamente asociada al 7-KC y el βA_{1-42} . Se crearon diferentes MLG. Por un lado se estudió el efecto de la interacción 7-KC*AxD sobre el NfL y por otro lado el efecto de la interacción βA_{1-42} *AxD sobre el NfL. En los casos en los que ambas interacciones fueron significativas, se introdujeron conjuntamente en el modelo. Debido a la asociación entre el NfL y el YKL40 ($r_s = 0.525$; $p = 0.000$), y con el fin de analizar el papel de la neuroinflamación, en cada análisis se crearon dos modelos, uno sin el YKL40 (Modelo 1) y otro añadiendo el YKL40 (Modelo 2). Para profundizar en los hallazgos, se realizaron análisis de moderación y mediación. Todos los análisis se corrigieron por edad, género, HSB y genotipo APOE.

1.5.1 Fórnix

Se halló un efecto significativo de la AxD, 7-KC y la interacción AxD*7-KC sobre los niveles de NfL (**Tabla 27**). En el Modelo 2, el YKL40 fue significativo, el 7-KC y la interacción AxD*7-KC mantuvieron su efecto y la AxD lo perdió.

Con el fin de profundizar en el papel del 7-KC en la asociación entre NfL y AxD del fórnix, se exploró el efecto mediador y moderador. No se observó un efecto mediador de 7-KC debido a que no se cumplió la condición necesaria de existencia de una relación significativa entre el nivel de 7-KC y NfL. Se exploró entonces el papel moderador del 7-KC. El 7-KC fue moderador entre el nivel de NfL y la difusividad axial del fórnix, ($B = 10.97$, IC 95% [6.41, 15.54], $t = 4.76$, $p = 0.000$). Al introducir el YKL40 ($B = 11.14$, IC 95% [6.79, 15.49], $t = 5.07$, $p = 0.000$), el 7-KC mantuvo su efecto moderador.

Tabla 27: Regresiones lineales generalizadas del NfL, 7-KC y AxD del fórnix.

	NfL	
	B (95%IC)	p ^a
Modelo 1		
(Intersección)	15.80 (-475.33-506.93)	0.950
AxD	-202.83 (-377.69--27.97)	0.023
7-KC	-24.07 (-34.83--13.32)	0.000
AxD*7-KC	10.98 (6.60-15.35)	0.000
Modelo 2		
(Intersección)	139.14 (-325.69-603.96)	0.557
AxD	-151.70 (-317.71-14.31)	0.073
7-KC	-24.39 (-34.67--14.11)	0.000
AxD* 7-KC	11.14 (7.00-15.29)	0.000
YKL40	2.08 (1.12-3.03)	0.000

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; AxD = difusividad axial; 7-KC = 7-cetocolésterol; NfL = neurofilamento cadena ligera.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^aAjustado por edad, sexo, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

No se halló un efecto significativo de la AxD, $\beta_{A_{1-42}}$ y la interacción AxD* $\beta_{A_{1-42}}$ sobre los niveles de NfL en ninguno de los modelos (**Tabla 28**).

Tabla 28: Regresiones lineales generalizadas del NfL, $\beta_{A_{1-42}}$ y AxD del fórnix.

	NfL	
	B (95%IC)	p ^a
Modelo 1		
(Intersección)	-1241.56 (-2236.49--246.63)	0.014
AxD	331.43 (-121.02-783.88)	0.151
$\beta_{A_{1-42}}$	1.17 (-0.84-3.18)	0.254
AxD* $\beta_{A_{1-42}}$	-0.42 (-1.36-0.53)	0.388
Modelo 2		
(Intersección)	-1006.20 (-1974.01--38.39)	0.042
AxD	331.08 (-104.49-766.64)	0.136
$\beta_{A_{1-42}}$	0.88 (-1.06-2.82)	0.373
AxD* $\beta_{A_{1-42}}$	-0.35 (-1.25-0.56)	0.457
YKL40	1.86 (0.76-2.96)	0.001

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; AxD = difusividad axial; $\beta_{A_{1-42}}$ = β -amiloide₁₋₄₂; NfL = neurofilamento cadena ligera.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^aAjustado por edad, sexo, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

1.5.2 Cuerpo calloso

En el esplenio del cuerpo calloso se halló un efecto significativo del 7-KC y la interacción AxD*7-KC sobre NfL. En el Modelo 2, el YKL40 fue significativo y se mantuvieron los resultados del Modelo 1. En el genu del cuerpo calloso se halló un efecto significativo del 7-KC, AxD y la interacción AxD*7-KC. En el Modelo 2, el YKL40 fue significativo y se mantuvieron los resultados del Modelo 1 (**Tabla 29**).

Tabla 29: Regresiones lineales generalizadas del NfL, 7-KC y AxD del genu y esplenio del cuerpo calloso.

	NfL (CC-E)		NfL (CC-G)	
	B (95%IC)	p ^a	B (95%IC)	p ^a
Modelo 1				
(Intersección)	436.88 (-757.57-1631.33)	0.473	833.14 (-241.99-1908.27)	0.129
AxD	-633.11 (-1425.09-158.87)	0.117	-855.54 (-1523.47--187.60)	0.012
7-KC	-58.49 (-106.53--10.45)	0.017	-106.22 (-155.50--56.93)	0.000
AxD*7-KC	39.40 (8.39-70.41)	0.013	68.64 (37.55-99.73)	0.000
Modelo 2				
(Intersección)	757.49 (-383.40-1898.37)	0.193	855.28 (-160.18-1870.74)	0.099
AxD	-708.94 (-1459.14-41.27)	0.064	-741.98 (-1375.61--108.34)	0.022
7-KC	-69.53 (-115.27--23.79)	0.003	-109.91 (-156.58--63.25)	0.000
AxD* 7-KC	46.84 (17.30-76.37)	0.002	71.26 (41.79-100.72)	0.000
YKL40	2.03 (1.01-3.05)	0.000	1.91 (0.93-2.88)	0.000

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; AxD = difusividad axial; 7-KC = 7-cetocolesterol; NfL = neurofilamento de cadena ligera; CC-E = cuerpo calloso-esplenio; CC-G = cuerpo calloso-genu.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Ajustado por edad, sexo, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

Con el fin de profundizar en el papel del 7-KC sobre la asociación entre NfL y AxD del genu del cuerpo calloso, se exploró el efecto mediador y moderador. El 7-KC no tenía un efecto directo sobre el NfL por lo que no se cumplió la condición de mediador. Se exploró entonces el papel moderador. Se mostró que el 7-KC era un moderador entre el nivel de NfL y la difusividad axial del genu del cuerpo calloso, ($B = 68.64$, IC 95% [36.19, 101.09], $t = 4.18$, $p = 0.000$). El efecto moderador se mantuvo al introducir el YKL40 en el análisis ($B = 71.26$, IC 95% [40.36, 102.15], $t = 4.56$, $p = 0.000$).

También se exploró el papel moderador del 7-KC en la asociación entre NfL y AxD del esplenio del cuerpo calloso. Se mostró que el 7-KC era un moderador entre el nivel de NfL y la difusividad axial del esplenio del cuerpo calloso, ($B = 39.39$, IC 95% [7.04, 71.76], $t = 2.41$, $p = 0.017$). El efecto moderador se mantuvo al introducir el YKL40 en el análisis ($B = 46.83$, IC 95% [15.86, 77.80], $t = 2.99$, $p = 0.003$).

No se halló un efecto significativo de la AxD del genu y esplenio del cuerpo caloso, $\beta_{A_{1-42}}$ y la interacción $AD * \beta_{A_{1-42}}$ sobre los niveles de NfL en ninguno de los modelos (**Tabla 30**).

Tabla 30: Regresiones lineales generalizadas del NfL, $\beta_{A_{1-42}}$ y AxD del genu y esplenio del cuerpo caloso.

	NfL (CC-E)		NfL (CC-G)	
	B (95%IC)	p ^a	B (95%IC)	p ^a
Modelo 1				
(Intersección)	72.62 (-2614.52-2759.76)	0.958	-296.53 (-2672.49-2079.44)	0.807
AxD	-456.89 (-2281.61-1367.83)	0.624	-216.69 (-1753.82-1320.44)	0.782
$\beta_{A_{1-42}}$	-2.13 (-7.69-3.43)	0.452	-1.28 (-5.60-3.05)	0.563
AxD* $\beta_{A_{1-42}}$	1.60 (-2.16-5.37)	0.404	1.01 (-1.85-3.86)	0.490
Modelo 2				
(Intersección)	60.13 (-2548.94-2669.19)	0.964	-276.22 (-2576.73-2024.29)	0.814
AxD	-313.45 (-2087.97-1461.08)	0.729	-93.00 (-1583.46-1397.46)	0.903
$\beta_{A_{1-42}}$	-1.84 (-7.23-3.56)	0.504	-1.26 (-5.45-2.92)	0.554
AxD* $\beta_{A_{1-42}}$	1.30 (-2.36-4.96)	0.485	0.90 (-1.86-3.67)	0.521
YKL40	1.69 (0.58-2.80)	0.003	1.76 (0.65-2.86)	0.002

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; AxD = difusividad axial; $\beta_{A_{1-42}}$ = β -amiloide₁₋₄₂; NfL = neurofilamento de cadena ligera; CC-E = cuerpo caloso-esplenio; CC-G = cuerpo caloso-genu.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Ajustado por edad, sexo, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

1.5.3 Fascículo longitudinal inferior izquierdo

Los niveles de AxD, 7-KC y la interacción $AxD * 7-KC$ no tuvieron un efecto significativo sobre el NfL en ninguno de los dos modelos (**Tabla 31**).

Los niveles de AxD, $\beta_{A_{1-42}}$ y la interacción $AxD * \beta_{A_{1-42}}$ no fueron significativos en ninguno de los dos modelos (**Tabla 32**).

Tabla 31: Regresiones lineales generalizadas del NfL, 7-KC y AxD del FLI izquierdo.

	NfL	
	B (95%IC)	p ^a
Modelo 1		
(Intersección)	-33.56 (-1555.16-1488.04)	0.966
AxD	-447.54 (-1515.27-620.18)	0.411
7-KC	20.29 (-48.03-88.62)	0.561
AxD*7-KC	-12.48 (-62.38-37.43)	0.624
Modelo 2		
(Intersección)	-149.92 (-1606.40-1306.56)	0.840
AxD	-250.30 (-1275.89-775.28)	0.632
7-KC	38.69 (-27.97-105.35)	0.255
AxD* 7-KC	-25.52 (-74.12-23.09)	0.303
YKL40	1.86 (0.82-2.90)	0.000

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; AxD = difusividad axial; 7-KC = 7-cetocolesterol; NfL = neurofilamento de cadena ligera; FLI = fascículo longitudinal inferior.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Ajustado por edad, sexo, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

Tabla 32: Regresiones lineales generalizadas del NfL, βA_{1-42} y AxD del FLI izquierdo.

	NfL	
	B (95%IC)	p ^a
Modelo 1		
(Intersección)	-1973.69 (-5099.76-1152.38)	0.216
AxD	1016.47 (-1347.23-3380.17)	0.399
βA_{1-42}	3.79 (-2.51-10.10)	0.238
AxD* βA_{1-42}	-2.75 (-7.55-2.05)	0.261
Modelo 2		
(Intersección)	-1865.57 (-4892.26-1161.13)	0.227
AxD	1088.13 (-1200.32-3376.58)	0.351
βA_{1-42}	3.88 (-2.23-9.98)	0.213
AxD* βA_{1-42}	-2.93 (-7.58-1.71)	0.216
YKL40	1.73 (0.63-2.84)	0.002

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; AxD = difusividad axial; βA_{1-42} = β -amiloide₁₋₄₂; NfL = neurofilamento de cadena ligera.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Ajustado por edad, sexo, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

1.5.4 Hipocampo derecho

Los niveles de AxD, 7-KC y la interacción AxD*7-KC no tuvieron un efecto significativo sobre el NfL en ninguno de los dos modelos (**Tabla 33**).

Los niveles de AxD, βA_{1-42} y la interacción AxD* βA_{1-42} no fueron significativos en ninguno de los dos modelos (**Tabla 34**).

Tabla 33: Regresiones lineales generalizadas del NfL, 7-KC y AxD del hipocampo derecho.

	NfL	
	B (95%IC)	p ^a
Modelo 1		
(Intersección)	-532.17 (-1065.37-1.04)	0.050
AxD	-45.98 (-413.78-321.81)	0.806
7-KC	4.90 (-10.99-20.78)	0.546
AxD*7-KC	-2.14 (-17.54-13.25)	0.785
Modelo 2		
(Intersección)	-269.30 (-797.24-258.64)	0.317
AxD	-135.96 (-490.25-218.33)	0.452
7-KC	4.61 (-10.56-19.78)	0.551
AxD* 7-KC	-1.22 (-15.96-13.53)	0.871
YKL40	1.94 (0.88-2.99)	0.000

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; AxD = difusividad axial; 7-KC = 7-cetocolésterol; NfL = neurofilamento de cadena ligera.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Ajustado por edad, sexo, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

Tabla 34: Regresiones lineales generalizadas del NfL, βA_{1-42} y AxD del hipocampo derecho.

	NfL	
	B (95%IC)	p ^a
Modelo 1		
(Intersección)	-627.98 (-1611.07-355.11)	0.211
AxD	-19.19 (-962.30-923.92)	0.968
βA_{1-42}	0.27 (-1.42-1.97)	0.750
AxD* βA_{1-42}	-0.07 (-1.89-1.76)	0.942
Modelo 2		
(Intersección)	-727.36 (-1681.03-226.32)	0.135
AxD	315.52 (-621.34-1252.37)	0.509
βA_{1-42}	0.80 (-0.86-2.47)	0.345
AxD* βA_{1-42}	-0.82 (-2.64-1.01)	0.381
YKL40	1.87 (0.72-3.02)	0.001

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; AxD = difusividad axial; βA_{1-42} = β -amiloide₁₋₄₂; NfL = neurofilamento.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Ajustado por edad, sexo, hiperintensidades de la sustancia blanca y genotipo APOE.

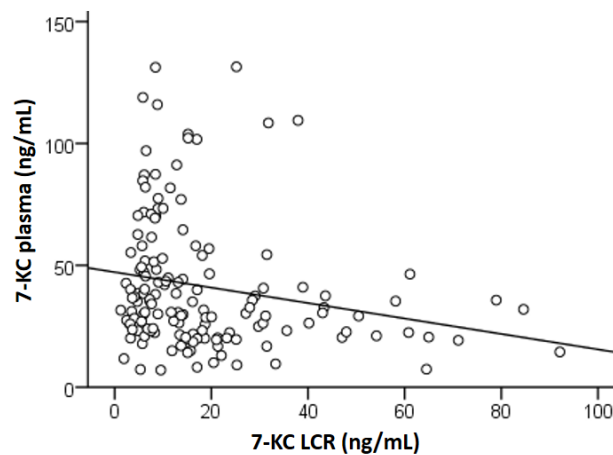
1.6 Oxiesteroides en líquido cefalorraquídeo y plasma

Con el objetivo de estudiar el valor del 7-KC en plasma como marcador no invasivo, en este apartado se determinó la existencia de correlación entre los niveles en plasma y LCR. El análisis mostró una asociación negativa entre el nivel de 7-KC en plasma y LCR ($r_s = -0.248$; $p = 0.002$) (**Figura 16**).

En el análisis univariante y multivariante los niveles plasmáticos de 7-KC no mostraron ninguna asociación significativa con los niveles de βA_{1-42} en LCR (datos no mostrados).

Los niveles plasmáticos de 24-OHC, 27-OHC y 7β -OHC no mostraron correlación con los niveles en LCR. Tampoco lo hicieron los niveles plasmáticos de estos oxiesteroides y niveles de βA_{1-42} en LCR (datos no mostrados)

Figura 16: Correlación entre niveles de 7-KC en LCR y plasma.



Nota. 7-KC = 7-cetocolesterol; LCR = líquido cefalorraquídeo.

2. Estudio longitudinal

Se estudió la relación entre los niveles basales de los metabolitos del colesterol en LCR, la microestructura de la SB y el cambio al cabo de 2.8 años de los biomarcadores de EA en LCR.

2.1 Datos descriptivos

Entre la visita basal y la visita de seguimiento transcurrió una media de 2.8 años. Se obtuvieron los datos longitudinales de todos los sujetos (n=153) que se incluyeron en el estudio transversal.

Los niveles de los biomarcadores de la visita de seguimiento se describen en la **Tabla 35**. Los niveles de βA_{1-40} y βA_{1-42} fueron significativamente más altos (**Figura 17**), los cocientes t-tau/ βA_{1-42} y p-tau/ βA_{1-42} fueron más bajos en la visita longitudinal que en la visita basal y el cociente $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40}$ no mostró ningún cambio significativo entre las dos visitas.

Tomando como referencia el punto de corte para cada biomarcador, 30 sujetos (19.9%) fueron positivos para el cociente $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40}$, 33 (21.6%) para t-tau y 8 (5.2%) para p-tau en la visita de seguimiento. Tomando como referencia el punto de corte para cada biomarcador y los resultados de la visita basal y longitudinal, de los 126 sujetos $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40}$ negativos en la visita basal, 7 (5.5%) pasan a ser positivos; de los 130 t-tau negativos 10 (7.7%) pasan a ser positivos y de los 148 p-tau negativos 4 (2.7%) pasan a ser positivos.

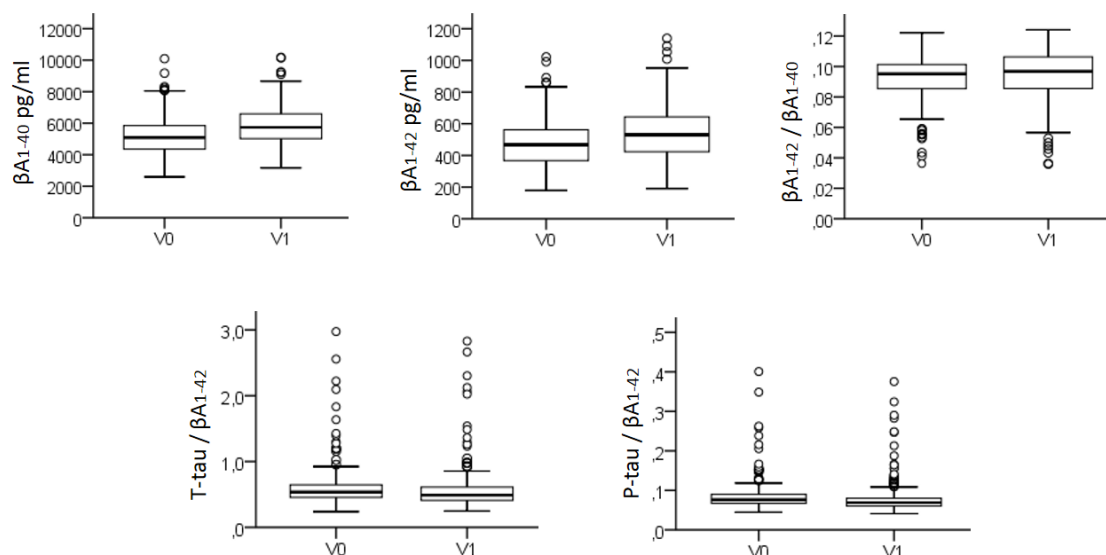
El cambio longitudinal de los niveles de βA_{1-42} , t-tau y p-tau, se calculó restando el nivel de la visita basal al nivel de la visita longitudinal. Los datos de la resta se muestran en la **Tabla 36**.

Tabla 35: Comparación de los niveles de los biomarcadores de la EA entre la visita basal y la visita longitudinal.

Variables	Visita basal		Visita longitudinal		p
	n	Mdn (pc25 – pc75) M (DE)	n	Mdn (pc25 – pc75) M (DE)	
βA_{1-40} , pg/ml	151	5091.43 (4343.08-5847.59)	152	5739.57 (5016.23-6587.59)	0.000
βA_{1-42} , pg/ml	151	478.73 (152.22)	152	549.61 (175.76)	0.000
t-tau, pg/ml	153	268.40 (201.87-336.76)	153	270.44 (213.79-366.43)	0.252
p-tau, pg/ml	152	38.50 (30.00-46.00)	153	38.00 (32.00-49.00)	0.373
$\beta A_{1-42} / \beta A_{1-40}$	151	0.10 (0.09-0.10)	151	0.10 (0.09-0.11)	0.162
t-tau/ βA_{1-42}	151	0.53 (0.45-0.65)	152	0.49 (0.41-0.61)	0.004
p-tau/ βA_{1-42}	150	0.08 (0.07-0.09)	152	0.07 (0.06-0.08)	0.000

Nota: Mdn= Mediana; pc = percentil; M = media; DE = Desviación Estándar; βA = β -amiloide; t-tau = tau total; p-tau = tau fosforilada.

Figura 17: Niveles de biomarcadores de la visita basal y longitudinal significativamente diferentes.



Nota: βA = β -amiloide; V_0 = visita basal; V_1 = visita longitudinal; T-tau = tau total; P-tau = tau fosforilada.

Tabla 36: Cambio longitudinal de los niveles de βA_{1-42} , t-tau y p-tau en LCR.

Variables	n	Mdn (Pc25 – Pc75)
βA_{1-40} , (v_1-v_0), pg/ml	151	686.77 (247.02-1140.96)
βA_{1-42} (v_1-v_0), pg/ml	151	63.73 (16.97-119.55)
t-tau (v_1-v_0), pg/ml	153	14.91 (-0.33-35.49)
p-tau (v_1-v_0), pg/ml	152	1.00 (-1.00-4.00)
$\beta A_{1-42} / \beta A_{1-40}$ (v_1-v_0)	151	0.00 (0.00-0.01)
t-tau/ βA_{1-42} (v_1-v_0)	151	-0.05 (-0.09-0.00)
p-tau/ βA_{1-42} (v_1-v_0)	150	-0.01 (-0.01-0.00)

Nota: Mdn= Mediana; pc = percentil; βA = β -amiloide; t-tau = tau total; p-tau = tau fosforilada; v_1 = visita longitudinal; v_0 = visita basal.

2.2 Oxiesteroles en líquido cefalorraquídeo y cambio longitudinal de los biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer

2.2.1 Correlación entre los oxiesteroles y el cambio longitudinal de los biomarcadores etiopatogénicos de la enfermedad de Alzheimer

2.2.1.1 Análisis univariante

No se encontraron correlaciones significativas entre los niveles basales de los oxiesteroles en LCR y el cambio longitudinal de los biomarcadores de EA (**Tabla 37**)

Tabla 37: Correlación entre los niveles de los oxiesteroles y el cambio longitudinal en los biomarcadores de EA.

Variables	βA_{1-42}		t-tau		p-tau	
	r_s	p	r_s	p	r_s	p
24-OHC	-0.01	0.879	0.00	0.981	0.08	0.354
27-OHC	0.03	0.687	-0.03	0.686	-0.01	0.945
7-KC	0.07	0.392	0.03	0.674	0.05	0.544
7 β -OHC	-0.08	0.343	-0.06	0.478	-0.10	0.277

Nota: r_s = coeficiente correlación Spearman; βA = β -amiloide; t-tau = tau total; p-tau = tau fosforilada; 24-OHC = 24-hidroxicolesterol; 27-OHC = 27-hidroxicolesterol; 7-KC = 7-cetocolesterol; 7 β -OHC = 7beta-hidroxicolesterol; EA = enfermedad de Alzheimer. Si $p < 0.05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

2.2.1.2 Análisis multivariante

En los MLG, la variable dependiente fue el cambio en los niveles de cada biomarcador. Además del género, edad y genotipo APOE, los modelos se corrigieron también por el tiempo transcurrido entre las dos visitas y el nivel de cada biomarcador en la visita basal. Se halló un efecto significativo del 7 β -OHC sobre el cambio longitudinal de βA_{1-42} (**Tabla 38, Figura 18**). Si en la muestra total los niveles de βA_{1-42} aumentaban con el tiempo, a mayor 7 β -OHC en la visita basal, los niveles de βA_{1-42} aumentan menos.

Se creó otro modelo introduciendo el YKL40 y las HSB. El 7 β -OHC mantuvo su efecto sobre el cambio longitudinal de βA_{1-42} , y el YKL40 y las HSB no mostraron un efecto significativo (**Tabla 39**).

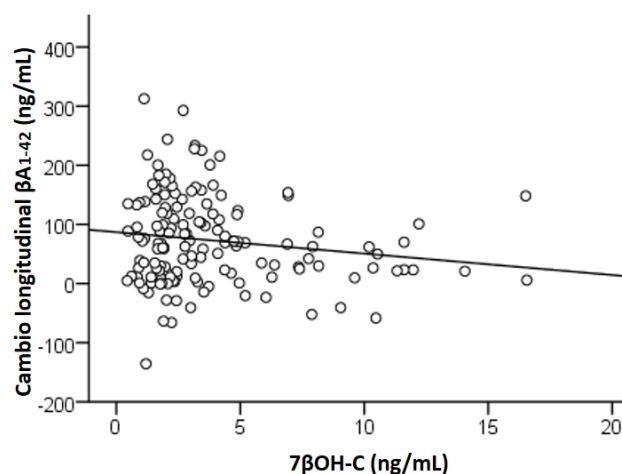
En el caso del 24-OHC, 27-OHC y 7-KC no se encontraron resultados significativos. Ningún oxiesterol mostró una asociación significativa con los cambios en los cocientes $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40}$, t-tau/ βA_{1-42} y p-tau/ βA_{1-42} (datos no mostrados).

Tabla 38: Regresiones lineales generalizadas de los niveles basales de los oxiesteroles y cambios longitudinales de βA_{1-42} , tau y p-tau.

	βA_{1-42}		t-tau		p-tau	
	B (95%IC)	p	B (95%IC)	p	B (95%IC)	p
Modelo 1						
(Intersección)	95.61 (-73.18-264.40)	0.267	-40.15 (-134.43-54.13)	0.404	-7.61 (-18.39-3.17)	0.167
24-OHC	-1.08 (-9.43-7.28)	0.801	-0.78 (-5.54-3.97)	0.746	0.26 (-0.28-0.80)	0.348
Edad	-0.74 (-2.49-1.00)	0.404	0.51 (-0.57-1.59)	0.357	0.10 (-0.03-0.22)	0.124
Género: M	11.73 (-12.12-35.58)	0.335	4.28 (-9.30-17.85)	0.537	0.30 (-1.25-1.86)	0.701
Género: H	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
APOE4+	-28.16 (-56.28--0.04)	0.050	-8.60 (-24.41-7.22)	0.287	-0.63 (-2.44-1.18)	0.497
APOE4-	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
βA_{1-42} (v_0)	0.04 (-0.04-0.11)	0.364				
t-tau (v_0)			0.10 (0.03-0.16)	0.003		
p-tau (v_0)					0.09 (0.03-0.15)	0.003
Tiemp. Trans	1.61 (-44.20-47.43)	0.945	1.73 (-24.51-27.97)	0.897	-0.06 (-3.09-2.97)	0.970
Modelo 2						
(Intersección)	95.57 (-74.77-265.91)	0.271	-38.68 (-136.44-59.07)	0.438	-7.60 (-18.81-3.62)	0.184
27-OHC	0.35 (-8.99-9.68)	0.942	-0.31 (-5.75-5.14)	0.912	0.01 (-0.62-0.64)	0.972
Edad	-0.65 (-2.34-1.05)	0.453	0.52 (-0.56-1.60)	0.343	0.11 (-0.01-0.23)	0.081
Género: M	15.64 (-7.81-39.10)	0.191	5.60 (-8.08-19.28)	0.422	0.45 (-1.12-2.02)	0.574
Género: H	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
APOE4+	-26.94 (-54.62-0.75)	0.056	-8.23 (-24.20-7.74)	0.313	-0.52 (-2.35-1.32)	0.582
APOE4-	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
βA_{1-42} (v_0)	0.03 (-0.04-0.11)	0.397				
t-tau (v_0)			0.10 (0.03-0.16)	0.003		
p-tau (v_0)					0.09 (0.03-0.15)	0.004
Tiemp. Trans	-2.43 (-47.29-42.43)	0.915	0.16 (-26.19-26.51)	0.991	-0.17 (-3.22-2.88)	0.912
Modelo 3						
(Intersección)	91.60 (-80.45-263.64)	0.297	-45.47 (-142.42-51.49)	0.358	-6.94 (-18.04-4.16)	0.220
7-KC	-0.03 (-0.74-0.68)	0.937	-0.08 (-0.48-0.32)	0.685	0.01 (-0.03-0.06)	0.594
Edad	-0.78 (-2.52-0.96)	0.379	0.51 (-0.57-1.59)	0.355	0.10 (-0.02-0.22)	0.114
Género: M	12.41 (-11.52-36.34)	0.309	4.35 (-9.29-17.99)	0.532	0.34 (-1.22-1.90)	0.671
Género: H	0 ^a		0 ^a		0 ^a	0 ^a
APOE4+	-28.73 (-56.90--0.57)	0.046	-8.76 (-24.63-7.10)	0.279	-0.63 (-2.45-1.19)	0.497
APOE4-	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
βA_{1-42} (v_0)	0.04 (-0.04-0.11)	0.376				
t-tau (v_0)			0.10 (0.03-0.16)	0.003		
p-tau (v_0)					0.10 (0.03-0.16)	0.003
Tiemp. Trans	3.29 (-45.13-51.71)	0.894	3.72 (-23.98-31.42)	0.793	-0.26 (-3.46-2.94)	0.873
Modelo 4						
(Intersección)	142.18 (-37.09-321.44)	0.120	-21.74 (-121.28-77.81)	0.669	-5.63 (-16.91-5.65)	0.328
7 β -OHC	-3.99 (-7.73-0.27)	0.036	-1.28 (-3.33-0.77)	0.222	-1.19 (-0.42-0.05)	0.116
Edad	-0.90 (-2.65-0.84)	0.311	0.40 (-0.69-1.49)	0.471	0.10 (-0.02-0.22)	0.110
Género: M	9.94 (-14.22-34.10)	0.420	2.72 (-11.07-16.52)	0.699	0.00 (-1.57-1.56)	0.998
Género: H	0 ^a		0 ^a		0 ^a	0 ^a
APOE4+	-30.08 (-58.57--1.58)	0.039	-9.46 (-25.47-6.55)	0.247	-0.67 (-2.49-1.14)	0.466
APOE4-	0 ^a		0 ^a		0 ^a	
βA_{1-42} (v_0)	0.04 (-0.04-0.12)	0.316				
t-tau (v_0)			0.10 (0.04-0.17)	0.003		
p-tau (v_0)					0.09 (0.03-0.15)	0.003
Tiemp. Trans	-6.99 (-54.51-40.53)	0.773	-1.07 (-28.27-26.12)	0.938	-0.27 (-3.38-2.84)	0.865

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; APOE4+ = portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; APOE4- = no portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; H = hombre; M = mujer; βA = beta amiloide; t-tau = tau total; p-tau = tau fosforilada., 27-OHC = 27-hidroxicolesterol; 24-OHC = 24-hidroxicolesterol; 7-KC = 7-cetocolesterol; 7 β -OHC = 7beta-hidroxicolesterol; v_0 = visita basal; Tiemp.Trans = tiempo transcurrido entre la visita basal y de seguimiento.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita. ^a Establecido en 0 ya que este parámetro es redundante.

Figura 18: Relación entre el cambio longitudinal de βA_{1-42} y 7β -OHC.

Nota. 7β -OHC = 7beta-hidroxicolesterol; βA_{1-42} = β -amiloide₁₋₄₂.

Tabla 39: Regresión lineal generalizada del 7β -OHC, HSB, YKL40 y cambio longitudinal de βA_{1-42} .

	βA_{1-42}	
	B (95%IC)	p ^a
(Intersección)	141.69 (-44.45-327.82)	0.136
7β -OHC	-4.04 (-7.77--0.30)	0.034
HSB	5.43 (-12.64-23.50)	0.556
YKL40	0.09 (-0.22-0.39)	0.573

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; HSB = hiperintensidades de la sustancia blanca, 7β -OHC = 7beta-hidroxicolesterol.

Si $p < 0.05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Ajustado por edad, género, genotipo APOE, nivel basal de βA_{1-42} y tiempo transcurrido entre la visita basal y longitudinal.

2.2.2 Oxiesteroles y cambio longitudinal de βA_{1-42} según la positividad de βA_{1-42} en la visita basal

Con el objetivo de profundizar la relación entre el 7β -C y el cambio longitudinal de βA_{1-42} , se realizaron los análisis en los grupos βA^- y βA^+ separadamente. El punto de corte que se utilizó para diferenciar los βA^- y βA^+ fue 0.08 de la relación $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40}$ de la visita basal.

2.2.2.1 Análisis univariante

No se observaron correlaciones significativas entre el cambio longitudinal de βA_{1-42} y nivel de 7β -OHC basal en el grupo βA^- ($r_s = -0.085$; $p = 0.349$) ni en el βA^+ ($r_s = 0.020$; $p = 0.926$).

2.2.2.2 Análisis multivariante

El 7β -OHC no mostró ningún efecto significativo sobre el cambio longitudinal de βA_{1-42} en el grupo βA^- ni en el βA^+ (**Tabla 40**).

Tabla 40: Regresiones lineales generalizadas del 7β -OHC y cambio longitudinal de βA_{1-42} en sujetos βA^- y βA^+ .

	βA^-		βA^+	
	B (95%IC)	p	B (95%IC)	p
(Intersección)	130.08 (-81.99-342.16)	0.229	204.49 (-1.55-410.54)	0.052
7β -OHC	-4.18 (-8.58-0.21)	0.062	1.04 (-3.84-5.95)	0.677
Edad	-0.25 (-2.36-1.86)	0.817	-1.08 (-3.68-1.53)	0.417
Género: M	11.59 (-16.05-39.23)	0.411	42.14 (7.36-76.92)	0.018
Género: H	0 ^a		0 ^a	
APOE4+	-25.27 (-61.20-10.67)	0.168	-2.90 (-34.61-28.82)	0.858
APOE4-	0 ^a		0 ^a	
βA_{1-42} (v_0)	0.02 (-0.08-0.11)	0.691	-0.15 (-0.29--0.02)	0.026
Tiemp. Trans	-11.25 (-68.56-46.06)	0.700	-30.08 (-87.35-27.18)	0.303

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC =intervalo de confianza; 7β -OHC = 7beta-hidroxicolesterol; βA = β -amiloide; APOE4+ = portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; APOE4- = no portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; H = hombre; M = mujer; v_0 = visita basal; Tiemp.Trans = tiempo transcurrido entre la visita basal y de seguimiento.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Establecido en 0 ya que este parámetro es redundante.

2.3 Microestructura de la sustancia blanca, oxiesteroles en líquido cefalorraquídeo y cambio longitudinal de los biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer

2.3.1 Efecto de la microestructura de la sustancia blanca sobre el cambio longitudinal del βA_{1-42}

El objetivo de este apartado fue determinar el valor predictivo de la microestructura de la SB sobre el cambio longitudinal de βA_{1-42} . Para ello se analizó la correlación entre el cambio longitudinal de βA_{1-42} y la microestructura en los vóxeles significativos del análisis transversal del efecto del 7-KC en la microestructura de la SB (**Tabla 18**). Se creó un MLG para cada índice y región. La variable dependiente fue el cambio longitudinal de βA_{1-42} . Todos los análisis fueron corregidos por edad, género, HSB, genotipo APOE, tiempo transcurrido entre las dos visitas y nivel de βA_{1-42} en la visita basal.

2.3.1.1 Anisotropía fraccional

No se encontró ningún efecto significativo de la FA sobre el cambio longitudinal de βA_{1-42} en ninguna región cognitiva (datos no mostrados).

2.3.1.2 Difusividad media

Se halló un efecto significativo de la MD del fascículo longitudinal superior derecho e izquierdo sobre el cambio longitudinal de βA_{1-42} (**Tabla 41**). Si en la muestra total los niveles de βA_{1-42} aumentaron con el tiempo, una mayor MD en la visita basal se asoció a un menor aumento de los niveles de βA_{1-42} . Estos resultados se mantuvieron en los sujetos βA^- pero no en los βA^+ (**Figura 19, Tabla 42**). En las demás regiones no se encontró ninguna asociación significativa (datos no mostrados).

2.3.1.3 Difusividad axial

No se encontró ningún efecto significativo del AxD sobre el cambio longitudinal de βA_{1-42} en ninguna región cognitiva (datos no mostrados).

2.3.1.4 Difusividad radial

Se halló un efecto significativo de la RD del fascículo longitudinal superior derecho sobre el cambio longitudinal de βA_{1-42} (**Tabla 43**). Si en la muestra total los niveles de βA_{1-42} aumentaron con el tiempo, una mayor RD en la visita basal se asoció a un menor aumento de los niveles de βA_{1-42} . Estos resultados se mantuvieron en los sujetos βA^- pero no en

los $\beta A+$ (Tabla 44, Figura 20). En las demás regiones no se encontró ninguna asociación significativa (datos no mostrados).

Tabla 41: Regresiones lineales generalizadas de la MD del FLS y el cambio longitudinal de βA_{1-42} .

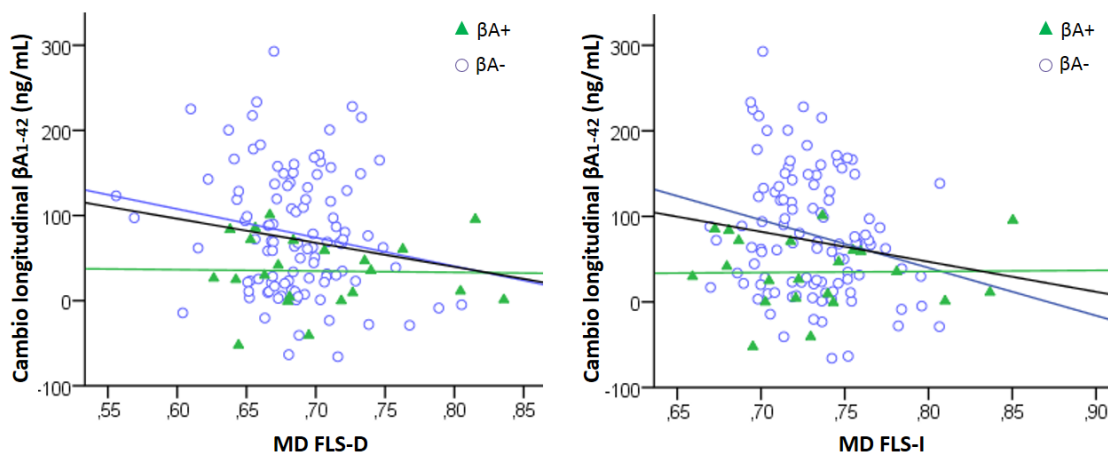
	FLS D		FLS I	
	B (95%IC)	p	B (95%IC)	p
(Intersección)	244.55 (3.24-485.86)	0.047	336.09 (33.36-638.82)	0.030
MD	-334.69 (-655.91—13.48)	0.041	-436.85 (-843.08—30.63)	0.035
Edad	-0.34 (-2.21-1.52)	0.718	-0.44 (-2.29-1.41)	0.641
Género: H	-9.26 (-34.21-15.68)	0.467	-7.81 (-32.57-16.96)	0.537
Género: M	0 ^a		0 ^a	
APOE4-	19.15 (-11.16-49.47)	0.216	23.24 (-7.29-53.77)	0.136
APOE4+	0 ^a		0 ^a	
HSB	7.24 (-11.58-26.06)	0.451	7.23 (-11.50-25.97)	0.449
βA_{1-42} (v_0)	0.03 (-0.05-0.11)	0.495	0.02 (-0.06-0.11)	0.556
Tiemp. Trans	17.25 (-29.99-64.49)	0.474	17.56 (-29.62-64.75)	0.466

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza βA = β -amiloide; FLS = fascículo longitudinal superior; D = derecho; I = izquierdo; MD = difusividad media; APOE4+ = portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; APOE4- = no portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; H = hombre; M = mujer; v_0 = visita basal; Tiemp. Trans = tiempo transcurrido entre la visita basal y de seguimiento; HSB = hiperintensidades de la sustancia blanca.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Establecido en 0 ya que este parámetro es redundante.

Figura 19: Relación entre la MD del FLS y el cambio longitudinal de βA_{1-42} según la positividad de βA en la visita basal.



Nota. MD = difusividad media; βA = β -amiloide; $\beta A+$ = sujetos con niveles de $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40} > 0.08$; $\beta A-$ = sujetos con niveles de $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40} \leq 0.08$; FLS-D = fascículo longitudinal superior-derecho; FLS-I = fascículo longitudinal superior-izquierdo.

Tabla 42: Regresiones lineales generalizadas de la MD del FLS y el cambio longitudinal de βA_{1-42} en sujetos $\beta A+$ y $\beta A-$.

	$\beta A-$		$\beta A+$	
	B (95%IC)	p	B (95%IC)	p
FLS D				
(Intersección)	273.69 (-13.89-561.28)	0.062	358.70 (-49.32-766.71)	0.085
MD	-413.07 (-791.73--34.40)	0.033	-118.03 (-699.38-463.32)	0.691
Edad	0.48 (-1.71-2.67)	0.667	-1.29 (-4.00-1.41)	0.349
Género: H	-8.99 (-37.06-19.08)	0.530	-53.35 (-92.82--13.88)	0.008
Género: M				
APOE4-	12.86 (-25.48-51.20)	0.511	7.30 (-25.38-39.99)	0.661
APOE4+				
HSB	8.59 (-14.58-31.77)	0.467	0.86 (-33.12-34.85)	0.960
βA_{1-42} (v_0)	0.00 (-0.10-0.10)	0.971	-0.17 (-0.33--0.02)	0.025
Tiemp. Trans	17.63 (-37.20-72.47)	0.529	-33.36 (-96.68-29.97)	0.302
FLS I				
(Intersección)	488.39 (111.94-864.84)	0.011	382.66 (9.71-755.60)	0.044
MD	-690.24 (-1192.64--187.85)	0.007	-143.32 (-602.59-315.96)	0.541
Edad	0.54 (-1.60-2.69)	0.620	-1.24 (-3.91-1.42)	0.361
Género: H	-7.91 (-35.54-19.71)	0.574	-53.22 (-90.36--16.09)	0.005
Género: M				
APOE4-	16.10 (-21.91-54.11)	0.406	9.22 (-22.98-41.42)	0.575
APOE4+				
HSB	10.92 (-12.12-33.97)	0.353	-0.55 (-22.91-21.81)	0.962
βA_{1-42} (v_0)	-0.01 (-0.10-0.09)	0.886	-0.19 (-0.34--0.04)	0.013
Tiemp. Trans	18.69 (-35.36-72.74)	0.498	-33.00 (-94.31-28.30)	0.291

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza; βA = β -amiloide; $\beta A-$ = sujetos con niveles de $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40} > 0.08$; $\beta A+$, sujetos con niveles de $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40} \leq 0.08$; FLS = fascículo longitudinal superior; D = derecho; I = izquierdo; MD = difusividad media; APOE4+ = portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; APOE4- = no portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; H = hombre; M = mujer; v_0 = visita basal; Tiemp. Trans = tiempo transcurrido entre la visita basal y de seguimiento; HSB = hiperintensidades de la sustancia blanca.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

Tabla 43: Regresión lineal generalizada de la RD del FLS derecho y el cambio longitudinal de βA_{1-42} .

	FLS D	
	B (95%IC)	p
(Intersección)	197.38 (-5.86-400.63)	0.057
RD	-358.74 (-689.71--27.77)	0.034
Edad	-0.45 (-2.29-1.40)	0.635
Género: H	9.84 (-15.14-34.81)	0.440
Género: M	0 ^a	
APOE4-	-20.70 (-51.01-9.61)	0.181
APOE4+	0 ^a	
HSB	7.23 (-11.49-25.94)	0.449
βA_{1-42} (v_0)	0.03 (-0.05-0.11)	0.462
Tiemp. Trans	18.53 (-28.82-65.89)	0.443

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC = intervalo de confianza βA = β -amiloide; FLS D= fascículo longitudinal superior derecho; RD = difusividad radial; APOE4+ = portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; APOE4- = no portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; H = hombre; M = mujer; v_0 = visita basal; Tiemp. Trans = tiempo transcurrido entre la visita basal y de seguimiento; HSB = hiperintensidades de la sustancia blanca.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

^a Establecido en 0 ya que este parámetro es redundante.

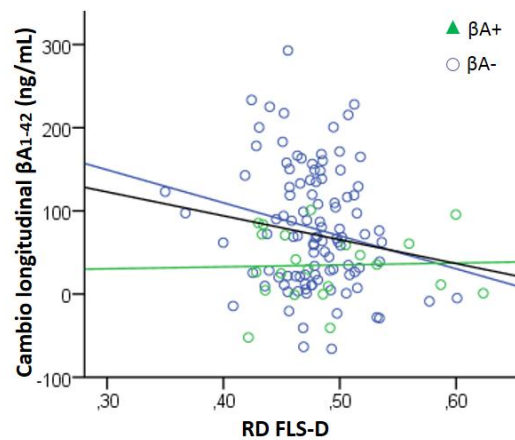
Tabla 44: Regresión lineal generalizada de la RD del FLS derecho y el cambio longitudinal de βA_{1-42} en sujetos $\beta A+$ y $\beta A-$.

	$\beta A-$		$\beta A+$	
	B (95%IC)	p	B (95%IC)	p
(Intersección)	220.41 (-23.12-463.93)	0.076	282.01 (-19.07-583.08)	0.066
RD	-486.65 (-884.50--88.79)	0.017	19.97 (-503.80-543.74)	0.940
Edad	0.43 (-1.72-2.59)	0.694	-1.18 (-4.00-1.64)	0.413
Género: H	-9.92 (-37.90-18.05)	0.487	-49.39 (-88.65--10.14)	0.014
Género: M				
APOE4-	15.86 (-22.42-54.15)	0.417	8.71 (-24.74-42.17)	0.610
APOE4+				
HSB	8.68 (-14.36-31.72)	0.460	-6.03 (-35.46-23.40)	0.688
βA_{1-42} (v_0)	0.00 (-0.09-0.10)	0.943	-0.18 (-0.33--0.03)	0.018
Tiemp. Trans	18.43 (-36.08-72.94)	0.508	-38.80 (-107.01-29.40)	0.265

Nota. B = coeficiente no estandarizado B de la constante; IC =intervalo de confianza βA = β -amiloide; $\beta A-$ = sujetos con niveles de $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40} > 0.08$; $\beta A-$ = sujetos con niveles de $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40} \leq 0.08$; FLS D= fascículo longitudinal superior derecho; RD = difusividad radial; APOE4+ = portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; APOE4- = no portador del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E; H = hombre; M = mujer; v_0 = visita basal; Tiemp.Trans = tiempo transcurrido entre la visita basal y de seguimiento; HSB = hiperintensidades de la sustancia blanca.

Si $p < .05$, el valor se muestra resaltado en negrita.

Figura 20: Relación entre la RD del FLS y el cambio longitudinal de βA_{1-42} según la positividad de βA en la visita basal.



Nota. RD = difusividad radial; βA = β -amiloide; $\beta A-$ = sujetos con niveles de $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40} > 0.08$; $\beta A-$ = sujetos con niveles de $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40} \leq 0.08$; FLS-D = fascículo longitudinal superior-derecho; FLS-I = fascículo longitudinal superior-izquierdo.

2.3.2 Efecto de los oxisteroles, la microestructura de la sustancia blanca y su interacción sobre el cambio longitudinal de βA_{1-42}

Aunque el 7-KC no mostrara un efecto significativo sobre el cambio longitudinal en los niveles de βA_{1-42} , teniendo en cuenta que en el estudio transversal se halló una asociación entre el 7-KC y la MD y RD del fascículo longitudinal superior, en este apartado se estudió si el efecto de la MD y RD basal del fascículo longitudinal superior sobre el cambio longitudinal de βA_{1-42} estaba moderado por los niveles de 7-KC.

Se realizaron análisis de moderación. El 7-KC mostró un efecto moderador significativo entre la MD del fascículo longitudinal superior izquierdo y el cambio longitudinal de βA_{1-42} ($B = -22.63$, IC del 95% $[-44.90, -0.36]$, $t = -2.01$, $p = 0.046$). El 7-KC no mostró ningún efecto moderador significativo entre la MD y RD del FLS derecho y el cambio longitudinal de βA_{1-42} (MD FLS derecho: $B = -13.39$, IC del 95% $[-28.03, 1.26]$, $t = -1.81$, $p = 0.070$; RD FLS derecho: $B = -15.24$, IC del 95% $[-31.39, 0.92]$, $t = -1.86$, $p = 0.064$).

DISCUSIÓN

El objetivo del presente capítulo era demostrar si existe una relación entre el metabolismo del colesterol cerebral y concretamente de los oxiesteroles, con la microestructura de la SB y los biomarcadores de la EA.

1. Población de estudio

La muestra estudiada en este capítulo presenta una media de edad de 57.86 años (**Tabla 1**), que puede considerarse relativamente joven en el estudio de la EA. Pero este hecho no es casual y es fruto del planteamiento inicial del estudio PGA, dado que se conoce que el proceso patológico de la EA comienza de 10 a 20 años antes de la aparición de los primeros síntomas clínicos hacia los 65-70 años ^{166,167}.

En cuanto al genotipo APOE, el 23.5% de los sujetos de la muestra del estudio son portadores del alelo $\epsilon 4$, y entre ellos dos presentan el genotipo homocigótico 4/4 (**Tabla 1**). En el presente estudio el porcentaje de personas portadoras del alelo $\epsilon 4$, es mayor que en la población general, que es de aproximadamente un 15% ⁶⁸; sin embargo, es similar a otro estudio prospectivo sobre la EA, cuya proporción de portadores del alelo $\epsilon 4$ en el grupo de personas sanas fue del 27% ¹⁶⁸. Existen otras cohortes con porcentajes similares^{70 72 169 170}, y se han estudiado también poblaciones con porcentajes mayores ^{171 172}. En un estudio realizado en pacientes con EA y en controles de origen vasco, la prevalencia de portadores de APOE4 fue inferior al 10%, pero los controles fueron personas seleccionadas que habían demostrado rendimientos normales en una batería neuropsicológica exhaustiva (supercontroles) ¹⁷³. La diferencia con respecto a los citados puede ser debida a que en el PGA se invitó a participar a los sujetos a través de información en prensa y radio, y es posible que las personas con antecedente familiar de demencia mostraran una mayor motivación para participar y, por lo tanto, la probabilidad de que haya más portadores del alelo $\epsilon 4$, pueda ser consecuencia de un sesgo de reclutamiento.

Las HSB representan lesiones cerebrales de la SB que están altamente relacionadas con la enfermedad de pequeño vaso cuya prevalencia aumenta con la edad ¹⁷⁴. En este estudio, el 90.8% de los sujetos tienen hiperintensidades del grado 0 y 1 en la escala de Fazekas y el 9.2% del grado 2 y 3 (**Tabla 1**). Estos datos son similares al reciente estudio realizado en España en 575 sujetos cognitivamente sanos de 58 años de edad donde el 92.2% de los

sujetos mostraron HSB del grado 0 y 1 y el 7.8% del 2 y 3¹⁷⁵. En estudios donde la muestra fue más joven, media de edad 30 años, no encontraron ningún sujeto con HSB del grado 2 y 3¹⁷⁶, en cambio, en sujetos mayores, media de edad 76 años, el porcentaje de sujetos en el grado 2 y 3 fue de 36.4%¹⁷⁷. La edad es un factor independiente que contribuye a la prevalencia y gravedad de las HSB¹⁷⁸.

Respecto a los niveles de los oxisteroles en LCR, la mediana del nivel de 24-OHC es de 1.75 ng/ml, la de 7-KC 13.60 ng/ml, la de 7 β -OHC, 2.70 ng/ml y la media de 27-OHC, 2.28 ng/ml (**Tabla 2**). El trabajo de revisión realizado por Leoni y colaboradores mostró que en los controles, en línea con nuestros resultados, la media de 27-OHC es de entre 0.6 y 2.2 ng/ml y del 24-OHC 1.3 ng/ml²⁸. La variabilidad interindividual de los niveles del 7-KC y 7 β -OHC es muy grande. Los valores mínimos y máximos del 7-KC y 7 β -OHC descritos en este trabajo son 1.24 ng/ml-92.11 ng/ml y 0.44 ng/ml-16.56 ng/ml respectivamente. Este hecho puede estar relacionado con que estos dos oxisteroles son producidos por procesos oxidativos y el estado oxidativo de cada persona puede ser muy diferente ya que depende de diferentes factores internos y externos¹⁷⁹. Según nuestros conocimientos no existe ningún trabajo previo sobre los niveles de 7-KC y 7 β -OHC en LCR de sujetos cognitivamente sanos.

Los niveles medios de los cocientes $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40}$, *tau* y *p-tau* en LCR están dentro del rango de normalidad, según los puntos de corte empleados en el laboratorio de Neurociencias de la Universidad de Gothenburg ($\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40}$: 0.08; *tau*: 400 pg/ml y *p-tau*: 60 pg/ml en menores de 60 años y 80pg/ml en mayores de 60 años) (**Tabla 4**). Respecto a la proporción de personas con niveles de βA positivos, 16.5%, la proporción es inferior a la hallada en la literatura. En la cohorte de 529 sujetos asintomáticos del estudio de Rochester, con una edad media de 78 años, y en la cohorte del ADRC de la Universidad de Washington, con 311 sujetos asintomáticos, con una media de edad de 72.9 años, un 30% presentaba amiloidosis al margen de los niveles de tau^{169,180}. La diferencia de nuestro trabajo respecto a los citados puede ser debida por un lado a la diferencia de edad, ya que nuestra muestra es mucho más joven, y por otro a que en nuestro trabajo la amiloidosis se mide mediante la relación $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40}$ mientras que en los estudios mencionados los puntos de corte se establecen mediante imagen (PET) o nivel de βA_{1-42} . Los resultados del cambio longitudinal de los niveles de los biomarcadores muestran que no existe ningún cambio significativo en los niveles de t-tau y p-tau. Los niveles de βA_{1-42} , aunque no del cociente $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40}$, aumentan ($p=0.000$)

(**Tabla 35**). Aunque en 18 personas el nivel de βA_{1-42} disminuye, los niveles de βA_{1-42} en toda la muestra aumentan una media de 71.92 pg/ml. Este aumento ocurre en sujetos $\beta A+$ y $\beta A-$, aunque en los $\beta A+$ el aumento es significativamente menor que en los $\beta A-$ ($p=0.007$). Algo similar ocurre en sujetos APOE4+ y APOE4- aunque en este caso también el aumento es menor en los portadores que en los no portadores ($p=0.023$). Las condiciones preanalíticas y el protocolo de análisis empleados para las muestras de la visita basal y la visita de seguimiento han sido exactamente las mismas por lo que estas condiciones no se relacionan con el fenómeno del aumento del βA_{1-42} . En otros estudios longitudinales sobre los niveles de los biomarcadores de EA en LCR en personas cognitivamente sanas, algunos han mostrado una disminución significativa de los niveles de βA_{1-42} ¹⁸¹⁻¹⁸³ mientras que en otros no se han encontrado diferencias significativas^{184,185}. Al igual que en nuestra muestra, un estudio demuestra que los sujetos cognitivamente sanos con niveles normales de βA_{1-42} en la visita basal son los que mayor dispersión muestran en el cambio anual de los niveles de βA_{1-42} , con aumento en algunos casos y disminución en otros¹⁸². En todos estos trabajos longitudinales el seguimiento mínimo fue de 4 años, mientras que en nuestro estudio el seguimiento tuvo una media de 2.8 años. Estos resultados sugieren que teniendo en cuenta la variabilidad interindividual del cambio longitudinal de los niveles de βA_{1-42} en personas sanas, es necesario realizar un seguimiento mayor para poder alcanzar, si fuera el caso, conclusiones robustas.

En nuestro estudio la mediana del nivel de NfL en LCR es de 501 pg/ml (**Tabla 3**). Este dato es similar a dos estudios recientes donde en sujetos cognitivamente sanos con una media de 63 y 60 años, la media de NfL fue de 656 pg/ml y 684.7 pg/ml respectivamente^{186,187}. En cambio, en otros estudios donde los sujetos cognitivamente sanos fueron mayores, 76 y 77 años, los niveles de NfL descritos fueron de 1047 pg/ml y 931 pg/ml^{188,189}. Este hecho puede corresponder a que la edad es un factor de riesgo de daño axonal¹⁶⁵. La mediana del nivel del YKL40 en nuestro estudio es de 121.759 ng/ml (**Tabla 3**). En la misma línea, un estudio reciente de Toschi y colaboradores muestra que la media del nivel del YKL40 en sujetos cognitivamente sanos de 60.7 años es de 102.9 ng/ml¹⁸⁷. En cambio otros estudios con sujetos de una edad media similar mostraron niveles algo superiores, entre 260-290 ng/ml^{190,191}. Esta diferencia entre trabajos puede ser debida a las condiciones analíticas. En nuestro estudio y en el estudio de Toschi y colaboradores se ha aplicado la misma técnica, mientras que en los otros dos trabajos donde la media es algo superior utilizaron una técnica diferente. En otros trabajos donde la edad media de la muestra fue mayor, los niveles de YKL40 aumentan debido,

posiblemente, a que la neuroinflamación es un proceso que ocurre durante el envejecimiento normal ¹⁸³.

2. Oxiesteroles y etiopatogenia de la enfermedad de alzheimer

Los resultados del estudio transversal del presente trabajo muestran una asociación negativa entre el 7-KC y βA_{1-42} , es decir, a mayor nivel de 7-KC menor nivel de βA_{1-42} . Los resultados del estudio longitudinal muestran una asociación negativa entre el 7 β -OHC y el cambio longitudinal de βA_{1-42} al cabo de 2.8 años, es decir a mayor nivel de 7 β -OHC menor aumento de los niveles βA_{1-42} . La neuroinflamación, medida por el YKL40, no se relaciona con estos resultados.

Los principales oxiesteroles que participan en la homeostasis del colesterol cerebral son el 24-OHC y 27-OHC. En pacientes con DCL y demencia se ha descrito una asociación positiva entre nivel de 24-OHC en LCR y niveles de t-tau y p-tau pero no de βA_{1-42} ^{110,130}. Esta asociación no fue significativa en sujetos cognitivamente sanos ^{110,130}. Popp y colaboradores describieron una asociación positiva entre niveles de 24-OHC en LCR y niveles de sAPP β y sAPP α en pacientes con EA, pero no con βA_{1-42} ¹⁰⁹. Nuestros resultados confirman la ausencia de asociación entre los niveles de 24-OHC y 27-OHC en LCR y los biomarcadores de EA en personas cognitivamente sanas (**Tabla 10**). Estos resultados sugieren que si el 24-OHC y 27-OHC estuvieran involucrados en la fisiopatología de la EA, este hecho no se presentaría en la fase inicial de la enfermedad.

La posible participación de los oxiesteroles formados por la auto-oxidación del colesterol en la fisiopatología de la EA es un campo de estudio en auge en los últimos años. En esta línea, un estudio sobre los niveles de los oxiesteroles en cerebros humanos *post-mortem* demostró que el nivel de algunos de los oxiesteroles derivados de la auto-oxidación del colesterol fue mayor en los sujetos en los estadios Braak I-II que en los controles, mientras que no hubo diferencias significativas en los niveles de los oxiesteroles de origen enzimático ¹⁰³. El 7-KC y el 7 β -OHC son los dos únicos productos de la autooxidación del colesterol producida por especies reactivas de oxígeno (ROS) en la posición C7 ¹⁵. El doble enlace del anillo B del colesterol es la diana más favorable para que las ROS influyan, y el C7 es una de las posiciones más susceptibles a esta oxidación ^{27,192}. El colesterol, al oxidarse, puede dar origen al 7-KC o al 7 β -OHC, pero no a ambos conjuntamente. Una vez sintetizados el 7-KC puede convertirse en 7 β -OHC mediante la enzima HSD11B1 y viceversa mediante HSD11B2 ¹⁹³. En general esta favorecida la

formación del 7-KC ¹⁹³. De hecho la correlación entre ambos oxiesteroles que se observa en nuestro estudio fue de $r_s = -0.823$; $p = 0.000$.

Los resultados del estudio transversal demuestran que a mayor nivel de 7-KC menor es el nivel de βA_{1-42} (**Tabla 13**). En la misma dirección, los resultados de los estudios en modelos de membranas lipídicas describen una asociación entre 7-KC y βA_{1-42} ^{95,101,194,195}. El 7-KC tiende a acumularse en las balsas lipídicas ¹⁹⁶, zonas de la bicapa lipídica donde actúa la enzima BACE. Kim y colaboradores observaron que en el modelo de la membrana lipídica la sustitución parcial del colesterol por el 7-KC disminuye las interacciones intramoleculares aumentando la inserción del βA_{1-42} en la bicapa lipídica ¹⁹⁴. En la misma línea, Phan y colaboradores demostraron que el 7-KC induce que la bicapa lipídica sea menos densa y más fluida que con el colesterol, acelerando así la asociación del βA_{1-42} con la bicapa lipídica ⁹⁵, especialmente del βA_{1-42} protofibrilar ¹⁹⁵. Además, un estudio reciente ha demostrado que el colesterol y el 7-KC tienen efectos diferentes sobre la agregación del βA_{1-42} mediada por la membrana ¹⁰¹. Mientras que el colesterol inhibe la fase de nucleación y acelera el crecimiento fibrilar, la sustitución parcial del colesterol por el 7-KC aumenta ligeramente la fase de nucleación y disminuye notablemente la elongación fibrilar ¹⁰¹. Los oligómeros de βA_{1-42} formados en la fase de nucleación se consideran más tóxicos que los monómeros solubles y las fibras maduras ¹⁹⁷. Estos trabajos sugieren que el colesterol y el 7-KC pueden modular la interacción del βA_{1-42} con las membranas celulares al influir en la fibrilación del péptido. Nuestro trabajo añade evidencia clínica para apoyar estos estudios experimentales sobre la relación entre el 7-KC y βA_{1-42} .

Los estudios *in vitro* demuestran que la apoptosis inducida por el 7-KC en las células se asocia a un aumento de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), estrés del retículo endoplasmático y una actividad mayor de la caspasa 3/7⁴⁶. Por este motivo, en el presente trabajo se estudió el efecto de la neuroinflamación, medida por el YKL40, sobre la relación entre el 7-KC y βA_{1-42} . Nuestros resultados muestran que el 7-KC y el YKL40 tienen un efecto significativo sobre βA_{1-42} , pero no se ha observado ninguna interacción significativa entre ambos (**Tabla 14**), lo que sugiere que la influencia de ambos en el proceso amiloidogénico se llevaría a cabo por diferentes vías moleculares. De hecho, nuestros resultados demuestran que cada uno de ellos se asocia de forma diferente con las enzimas y proteínas intermediarias del proceso amiloidogénico (BACE y sAPP β). El 7-KC no mostró ninguna asociación, mientras que sí se observó una asociación positiva

entre el YKL40 y $sAPP_{\beta}$ (**Tabla 14**). Al separar el análisis en sujetos $\beta A+$ y $\beta A-$, el efecto del 7-KC y YKL40 sobre los niveles de βA_{1-42} solo se mantuvo significativo en los sujetos $\beta A-$, y no en los sujetos $\beta A+$ (**Tabla 15 y 16**). Estos resultados coinciden con algunos estudios previos donde en sujetos $\beta A+$ solo encontraron correlación entre YKL40 y t-tau pero no con βA_{1-42} ^{162,190,191}. No obstante, un trabajo realizado por nuestro grupo, en colaboración con el grupo de Sant Pau (Dr. Alberto Lleó), en personas cognitivamente sanas mostró que en las personas $\beta A-$ hay una correlación positiva entre el YKL40 y βA_{1-42} mientras que en las personas $\beta A+$ esta correlación es negativa ¹⁹⁸. Es posible que si bien el 7-KC puede favorecer la agregación de βA_{1-42} y por tanto la formación de depósitos insolubles en las placas, este fenómeno no quede reflejado en el LCR en las personas $\beta A+$ en las que este proceso de formación de placas seniles estaría más avanzado. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que en nuestros análisis, 125 sujetos eran $\beta A-$ y 25 $\beta A+$, por lo que la diferencia en el tamaño muestral puede estar también influyendo en los resultados.

Los resultados del estudio longitudinal, muestran que a mayor nivel de 7β -OHC basal hay un menor aumento de los niveles de βA_{1-42} al cabo de 2.8 años (**Tabla 38**). El 7β -OHC, a diferencia del 7-KC, no se acumula en las balsas lipídicas de la membrana ¹⁹⁶ pero estudios en líneas celulares neuronales muestran que tiene un efecto sobre el βA_{1-42} ¹⁹⁹. Gamba y colaboradores demostraron que aumentando la expresión y la regulación de ciertas proteínas, el 7β -OHC aumentaba la acumulación de péptidos tóxicos de βA_{1-42} en la superficie celular, favoreciendo la formación de placas seniles ¹⁹⁹. Nuestros resultados deben ser analizados con precaución ya que el hallazgo longitudinal del aumento del βA_{1-42} y la asociación entre el 7β -OHC y un menor aumento de los niveles de βA_{1-42} podría estar sesgado e influenciado por el corto tiempo de seguimiento realizado y podría ser igualmente que este hecho también influya en que no se hubieran observado asociaciones longitudinales con el 7-KC. No se puede realizar ninguna conclusión robusta de los hallazgos de este apartado. Se está llevando a cabo la segunda visita de seguimiento del estudio PGA, en las que estos datos serán analizados.

Varios estudios llegan a la conclusión de que además de los niveles de βA_{1-42} , t-tau y p-tau en LCR, algunos oxisteroles en LCR podrían ser biomarcadores apropiados para la detección de la EA ^{6,29,109,129,130,200}. La mayor limitación de los marcadores en LCR es que la punción lumbar es una técnica invasiva, por lo que es conveniente estudiar también los posibles cambios periféricos. Aunque se observa una asociación entre los niveles de 7-

KC en plasma y LCR (**Figura 16**), nuestros resultados no muestran una asociación significativa de los niveles plasmáticos de 7-KC y 7 β -OHC con los niveles de β A₁₋₄₂ en LCR ni con el cambio longitudinal de β A₁₋₄₂. Nuestro análisis ha sido solo exploratorio por lo que se necesitaría un examen más exhaustivo sobre la relación de los niveles plasmáticos de estos oxiesteroles y niveles de β A₁₋₄₂ en LCR.

En resumen, es bien conocido que el 7-KC y el 7 β -OHC están involucrados en las vías de señalización del estrés oxidativo, con muerte celular caracterizado por la apoptosis y autofagia, llamado oxiaoptofagia, y que favorecen también la inflamación aumentando la secreción de las citoquinas ¹⁹³. El estrés oxidativo juega un papel fundamental en la iniciación y desarrollo de los procesos neurodegenerativos que caracteriza la EA. La asociación del estrés oxidativo con la acumulación del colesterol libre en los cerebros de pacientes con EA, podría facilitar la generación no enzimática de los oxiesteroles, que a diferencia del colesterol poseen fuertes efectos pro-inflamatorios y tóxicos relacionados también con la acumulación de β A₁₋₄₂.

3. Oxiesteroles, biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer y microestructura de la sustancia blanca

En el estudio transversal, el 7-KC muestra una asociación negativa sobre la FA y positiva sobre la MD, AxD y RD de múltiples regiones cognitivas, como son el hipocampo, el fascículo longitudinal superior e inferior y el cuerpo calloso. Además, el 7-KC modula la asociación entre la AxD y la pérdida axonal, medida por el NfL, en el esplenio y genu del cuerpo calloso y fórnix. En los vóxeles donde el 7-KC mostró un efecto significativo, un mayor nivel de β A₁₋₄₂ se asocia a un mayor valor de la FA y a un menor valor de la MD, AxD y RD en el fórnix, cuerpo calloso, fascículo longitudinal inferior e hipocampo. Los resultados del estudio longitudinal muestran que los valores bajos en la MD y RD del fascículo longitudinal superior en la visita basal, se asocian a un menor aumento al cabo de 2.8 años de los niveles de β A₁₋₄₂, y esta asociación está parcialmente moderada por el 7-KC.

El 7-KC induce estrés oxidativo ⁴⁶, el cual a su vez induce la activación de los astrocitos y microglía, aumentando así la producción de mediadores pro-inflamatorios y exacerbando el daño neuronal y axonal ⁵¹. En este sentido, hemos demostrado que el 7-KC modera la relación entre un menor valor de la AxD y un mayor nivel de NfL, marcador de daño axonal, en el fórnix y el esplenio y genu del cuerpo calloso (**Tabla 27 y 29**).

Nuestros resultados sugieren que los cambios en la microestructura de la SB relacionados con daño neuronal y axonal están asociados al metabolismo alterado del colesterol cerebral, concretamente en relación con los procesos oxidativos y el posible incremento membranal de los niveles de 7-KC. Los vóxeles significativos se encuentran principalmente distribuidos por el fascículo longitudinal inferior y superior e hipocampo (**Tabla 18**). Estas regiones son consideradas regiones de mielinización tardía. Diversos estudios han descrito que las fibras de las regiones de mielinización tardía son más vulnerables que las fibras de las regiones de mielinización temprana^{201–204}. Nuestro estudio sugiere que esta vulnerabilidad podría estar relacionada con los niveles de 7-KC y su efecto en la integridad y estructura del axolema. En cualquier caso, según nuestros conocimientos, no existen trabajos previos que analicen el efecto de los oxisteroles sobre la microestructura de la SB por lo que nuestros hallazgos deberían ser confirmados con otros estudios.

Respecto al efecto del βA_{1-42} sobre la microestructura de la SB nuestros resultados coinciden con estudios previos que describen valores inferiores de FA y superiores de MD en pacientes con EA, especialmente en áreas como el cuerpo calloso, fórnix, fascículo longitudinal superior e inferior y cíngulo^{205–212}. Se han descrito cambios similares en la microestructura de la SB en personas cognitivamente sanas con niveles anormales de βA_{1-42} , concretamente en el fascículo uncinado y fórnix^{213–216}. Sujetos presintomáticos portadores de mutaciones de la EA y portadores del alelo $\epsilon 4$ de la APOE muestran una mayor afectación de la microestructura de la SB en el fórnix en comparación con otras regiones como el hipocampo^{217,218}. En nuestro estudio, los sujetos $\beta A+$ tienen significativamente valores superiores de MD, AxD y RD en el fórnix que el grupo $\beta A-$ (**Figura 12**). Este resultado, junto con otros de la bibliografía, sugiere que el fórnix puede ser selectivamente más vulnerable que otras regiones de la SB en la etapa temprana de la EA. En este sentido algunos estudios van más allá y sugieren que la degradación microestructural del fórnix, precede a la atrofia del hipocampo y puede servir como un nuevo marcador de imagen para sujetos con deterioro cognitivo ligero en fase temprana¹⁵⁶

En cuanto a los estudios longitudinales, la mayoría de los trabajos muestran una disminución de los valores de la FA y aumento de la MD, RD y AxD en pacientes con EA y controles, siendo mayor el cambio en pacientes con EA^{219–222}. Al analizar la asociación entre los niveles de los biomarcadores de EA en LCR en la visita basal y el

cambio longitudinal de los valores de la DTI, no encuentran asociaciones significativas²²³, y tampoco entre los valores de la microestructura en la visita basal y el cambio longitudinal en los biomarcadores²²⁴. Estos resultados concuerdan con los nuestros, donde solo hemos encontrado asociación entre los valores de la MD y RD en el fascículo longitudinal superior y el cambio longitudinal de βA_{1-42} (**Tabla 41, 42**) En esta línea, Elahi y colaboradores demostraron que el aumento en los valores de la MD del fascículo longitudinal superior era la medida más representativa en sujetos con EA en relación con la microestructura de la SB.²²⁵

La interpretación de los parámetros de la DTI es compleja. Los estudios en modelos animales muestran que la disminución del índice AxD se asocia a degeneración axonal²²⁶⁻²²⁸, concretamente a la disminución del calibre axonal y al aumento de neurofilamentos y beta-tubulina²²⁹. Sin embargo, estos estudios encuentran un aumento de la AxD después de la remielinización, lo que indica que la AxD no está completamente separada de las vainas de mielina, aunque su aumento se relacionó principalmente con la ganancia de la morfología normal del axón como consecuencia de la remielinización. Esta asociación entre la AxD y el daño axonal ha sido cuestionada a la hora de interpretar el cerebro humano²³⁰. Mientras que en línea con los modelos animales nuestro estudio muestra una asociación entre el aumento del NfL y disminución de la AD, a la hora de analizar los procesos relacionados con la EA como la amiloidogénesis (βA_{1-42}) o procesos relacionados con la oxidación (7-KC) se observa un aumento de la AD. La mayoría de estudios en EA muestran un aumento de la AxD y muy pocos una disminución²³¹. De hecho, en un estudio donde compararon los índices de la DTI en pacientes con EA en estadios diferentes, mostraron que el aumento de la AxD era el acontecimiento más temprano de la alteración de la SB²³². El aumento de la AxD en la EA no es un hecho aleatorio ya que refleja la esperada progresión de la degeneración medida por el metabolismo de la glucosa, es decir primero en áreas posteriores y más tarde en anteriores²³². Algunos estudios han propuesto que el aumento de la AxD podría estar relacionado con que en zonas de cruce de fibras cada fibra o tracto afecta de forma diferente al tensor. Es decir en una zona concreta donde dos fibras se cruzan, la tensión aparente en esa zona reflejaría la media de ambas fibras, por lo tanto si uno degenera el tensor sería dirigido por el otro tracto aumentando así la AxD²³¹. Pero esta teoría no sería aplicable a nuestro caso o a otros estudios en personas con EA muy temprana, ya que en algunas regiones donde se observa el aumento de la AxD, como en el fórnix o cuerpo calloso, no existen zonas de cruce de fibras, por lo que el aumento de la AxD debería de tener alguna otra

explicación. Se desconoce exactamente qué mecanismo biológico podría ser el causante. Algunos especulan que el proceso neuropatológico subyacente al aumento de la AxD en la EA podría estar relacionado con procesos inflamatorios o con alguna forma de degeneración axonal como la hipótesis de la degeneración walleriana secundaria a la atrofia cortical distal ²³². La disminución de la AxD podría representar una respuesta inicial a la pérdida de axones (es decir, aumento de la matriz extracelular y de la glía), a la que podría seguir un aumento de la AxD a medida que los residuos celulares son eliminados por la microglía ²³³. Nuestro estudio podría sugerir que los procesos oxidativos jugaran también un papel en este aumento de la AxD. En cualquier caso se conoce que la interpretación de los índices de la DTI es muy complicada y es difícil determinar los procesos biológicos subyacentes a los cambios en los índices de la DTI²²⁸. Este hecho parece ser especialmente crítico con el índice AxD, ya que parece el índice más complicado de interpretar ²³⁴. Por lo tanto, la especificidad de la AxD de nuestros hallazgos no puede ser utilizada para delinear qué aspectos particulares de las regiones de la SB están alterados. Nuestros resultados muestran la importancia de evaluar los cuatro índices de la DTI.

En resumen, a la vista del efecto positivo o negativo sobre los distintos índices de la DTI, este estudio demuestra que un aumento de los niveles 7-KC en LCR y una disminución de βA_{1-42} se asocian a alteraciones de la microestructura de la SB en sujetos cognitivamente sanos. El aumento de 7-KC se relaciona con cambios en la mayoría de las regiones relacionadas con la cognición, principalmente las regiones de mielinización tardía, que son más vulnerables. La disminución de los niveles de βA_{1-42} se asocia con cambios en el hipocampo, fórnix, fascículo longitudinal inferior y cuerpo calloso. De hecho, el fórnix está más dañado en sujetos con patología amiloide ($\beta A+$) respecto a sujetos sin patología. Estos resultados sugieren que puede haber algunos procesos posiblemente relacionados con el estrés oxidativo que podrían comenzar a alterar la microestructura de la SB independientemente, o quizás antes, de la aparición de la patología amiloide. Estos cambios, que aparentemente no siguen un patrón específico, tendrían lugar en las regiones más vulnerables. El 7-KC, que sería un indicador de estrés oxidativo sobre el metabolismo del colesterol, modera la relación existente entre los niveles de NfL, un biomarcador de daño axonal, y los índices de la DTI, que son correlatos de la microestructura de la SB. Cabe plantear la hipótesis de que estos cambios puedan ser previos o incluso abonar el terreno para la aparición de patología amiloide, pero esto requiere estudios longitudinales con un tiempo de seguimiento más prolongado que el

aplicado en nuestro estudio. Por otro lado, hemos demostrado que mayores niveles de 7-KC se asocian con niveles más bajos de βA_{1-42} y que los niveles más bajos de βA_{1-42} se asocian con cambios en la microestructura en regiones concretas del fórnix, hipocampo, fascículo longitudinal inferior y cuerpo calloso. En este caso el nivel de 7-KC no es moderador ni mediador del efecto del βA_{1-42} sobre la microestructura en esas regiones. Esta observación puede interpretarse en el sentido de que si bien el aumento del 7-KC favorecería la patología amiloide, esta última puede tener un efecto independiente sobre la microestructura de la SB en esas regiones. El hecho de que el efecto se observa únicamente en regiones directamente relacionadas con las áreas cerebrales donde tienen lugar los depósitos patológicos de amiloide apoyaría esta visión. Según Braak y Braak, la acumulación de los depósitos de amiloide comienza en la neocorteza de la parte basal del lóbulo frontal, temporal y occipital. Posteriormente los depósitos se expanden por la mayoría de las áreas de asociación de la neocorteza, incluyendo algunos depósitos en la formación hipocampal, para finalmente expandirse por todo el cerebro. Desde el comienzo de la acumulación del amiloide en la corteza, existen depósitos de amiloide en la SB subyacente²³⁵. El fascículo longitudinal inferior, alterado por el βA_{1-42} en nuestro estudio, es un área de asociación que une la región temporal basal anterior con la parte occipital basal posterior, con lo que correspondería con la región del comienzo de los depósitos de amiloide. El fórnix, también alterado en nuestro estudio, es la principal eferencia del hipocampo y se encuentra justo en el borde inferior del cuerpo calloso, que a su vez conecta el hipocampo con el tálamo además de conectar las áreas frontales y occipitales de ambos hemisferios. Nuestros resultados sugieren que existen cambios en la microestructura de estas regiones que se asocian a cambios en los niveles de βA_{1-42} en LCR antes de que estos niveles alcancen un umbral patológico.

4. Limitaciones y fortalezas

Este estudio debe interpretarse teniendo en cuenta sus limitaciones. El estudio PGA ha permitido analizar de manera rigurosa una cohorte de sujetos de mediana edad, exhaustivamente fenotipada, permitiendo así una selección muy estricta de los sujetos sanos. Este hecho puede considerarse una fortaleza del estudio pero también una limitación, ya que el ser una muestra tan seleccionada puede que haya influido en los resultados. Además, los participantes son personas voluntarias, lo que implica que no se puede descartar cierto sesgo de reclutamiento con la consiguiente limitación de que los resultados no sean generalizables al resto de la población.

Los índices de la DTI son una medida indirecta de la microestructura de la SB. La interpretación es complicada en todos los trabajos de la DTI. No obstante, la fortaleza del estudio es que los participantes realizaron un 3T-DWI de alta resolución con 65 direcciones, lo que ha permitido realizar estimaciones robustas de las propiedades del tensor²³⁶.

Los niveles de los oxisteroles se consideran fiables. A pesar de su compleja detección y análisis, las determinaciones se han llevado a cabo en la Universidad de Aston, Birmingham (Dra. Irundika H.K. Dias), donde tienen bien establecida la técnica tal y como han demostrado en diferentes trabajos^{140,237}.

El grado de significatividad estadística de las asociaciones descritas en el estudio transversal y longitudinal entre los niveles de 7-KC, 7 β -OHC y β A₁₋₄₂ es marginal. En muchos casos el valor de la p se encuentra en los límites de la significatividad. Este estudio no sugiere que el 7-KC o el 7 β -OHC sean nuevos biomarcadores de EA, pero sí que pueden ayudar a entender el papel del metabolismo lipídico en la asociación entre el estrés oxidativo y la EA por un lado, y los cambios en la microestructura de la SB por otro.

Aunque el papel de la neuroinflamación se haya medido únicamente mediante el YKL40, este es el principal biomarcador de neuroinflamación¹⁶³. En cualquier caso, para conocer más a fondo el efecto de la neuroinflamación sobre los oxisteroles y/o microestructura de la SB, sería conveniente analizar conjuntamente más de un marcador de este proceso. Con el fin de explorar los posibles mecanismos biológicos previos a la acumulación anómala del amiloide, los sujetos de este estudio son completamente sanos, por lo que como cabía esperar el tamaño de muestra del grupo β A⁺ es muy pequeño. Para diferenciar o conocer los mecanismos biológicos que podrían estar actuando antes y después de la patología amiloide, sería interesante añadir en el estudio más sujetos β A⁺. Además, hubiera sido deseable contar con la información aportada de PET-amiloide. Estos datos habrían permitido estudiar relaciones topográficas entre los depósitos de amiloide y los cambios en la microestructura de las regiones de la SB analizadas.

No se pueden sacar conclusiones robustas del estudio longitudinal. Es posible que el tiempo de seguimiento haya sido demasiado corto, de hecho los niveles del cociente β A₁₋₄₂/ β A₁₋₄₀ y el nivel de t-tau y p-tau no cambian. El análisis de estos biomarcadores es fiable ya que se ha llevado a cabo en el laboratorio de Neurociencias de la Universidad de Gothenburg (Dr. Henrik Zetterberg) que participa en el programa de control de calidad de biomarcadores de LCR de la *Alzheimer's Association*. Los datos de la segunda visita

de seguimiento longitudinal de la cohorte del estudio PGA están siendo recogidos actualmente y serán objeto de análisis con el propósito de confirmar (en su caso) estos hallazgos y detectar nuevos resultados.

CONCLUSIONES

1. Los resultados de este trabajo muestran una relación entre los marcadores del metabolismo oxidativo del colesterol cerebral y los niveles de βA_{1-42} y sus cambios longitudinales en LCR por un lado y con cambios en la microestructura de la sustancia blanca por otro.
2. Los niveles de βA_{1-42} en LCR se relacionan con cambios en la microestructura de la sustancia blanca.
3. Los cambios en la sustancia blanca posiblemente obedecen en parte a degeneración axonal a la vista de la asociación entre cambios en la difusividad axial y el neurofilamento.
4. Los cambios en el metabolismo cerebral del colesterol, posiblemente como consecuencia de un ambiente de excesivo estrés oxidativo, podrían estar involucrados en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer, bien por la vía de la amiloidogénesis o bien por interferencia con el mantenimiento de la integridad de la microestructura de la sustancia blanca, y por tanto de la conectividad cerebral.
5. Los fenómenos de activación microglial, medida por los niveles de YKL40, no parecen estar involucrados en las alteraciones del metabolismo oxidativo del colesterol ni en su efecto sobre la microestructura de la sustancia blanca.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bjorkhem I, Meaney S. Brain Cholesterol: Long Secret Life Behind a Barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004;24(5):806–815.
2. Dietschy JM. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol. Chem* 2009;390(4):287–293.
3. Bjorkhem I, Heverin M, Leoni V, et al. Oxysterols and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 2006;114(s185):43–49.
4. Liu Q, Trotter J, Zhang J, et al. Neuronal LRP1 Knockout in Adult Mice Leads to Impaired Brain Lipid Metabolism and Progressive, Age-Dependent Synapse Loss and Neurodegeneration. *J. Neurosci.* 2010;30(50):17068–17078.
5. Zhang J, Liu Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell* 2015;6(4):254–264.
6. Hughes TM, Rosano C, Evans RW, Kuller LH. Brain Cholesterol Metabolism, Oxysterols, and Dementia. *J Alzheimers Dis* 2013;33(4):891–911.
7. Sun J-H, Yu J-T, Tan L. The Role of Cholesterol Metabolism in Alzheimer ' s Disease. *Mol Neurobiol* 2014;10.1007/s1
8. Gamba P, Testa G, Sottero B, et al. Oxysterols and Alzheimer's disease The link between altered cholesterol metabolism and Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2012;1259:54–64.
9. Petrov AM, Kasimov MR, Zefirov AL. Brain Cholesterol Metabolism and Its Defects: Linkage to Neurodegenerative Diseases and Synaptic Dysfunction. *Acta Naturae* 2016;8(1):58–73.
10. DeGrella RF, Simoni RD. Intracellular transport of cholesterol to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 1982;257(23):14256–62.
11. Nieweg K, Schaller H, Pfrieger FW. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J. Neurochem.* 2009;109(1):125–134.
12. Fünfschilling U, Saher G, Xiao L, et al. Survival of adult neurons lacking cholesterol synthesis in vivo. *BMC Neurosci.* 2007;8(1):1.
13. Morell P, Jurevics H. Origin of cholesterol in myelin. *Neurochem. Res.* 1996;21(4):463–70.
14. Saher G, Brügger B, Lappe-Siefke C, et al. High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat. Neurosci.* 2005;8(4):468–475.
15. Brown AJ, Jessup W. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol. Aspects Med.* 2009;30(3):111–122.
16. Bhattacharyya R, Kovacs DM. ACAT inhibition and amyloid beta reduction. *Biochim. Biophys. Acta* 2010;1801(8):960–5.
17. Sakashita N, Miyazaki A, Takeya M, et al. Localization of Human Acyl-Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase-1 (ACAT-1) in Macrophages and in Various Tissues. *Am. J. Pathol.* 2000;156(1):227–236.
18. Wüstner D, Mondal M, Tabas I, Maxfield FR. Direct Observation of Rapid Internalization and Intracellular Transport of Sterol by Macrophage Foam Cells. *Traffic* 2005;6(5):396–412.
19. Lund EG, Xie C, Kotti T, et al. Knockout of the Cholesterol 24-Hydroxylase Gene in Mice Reveals

- a Brain-specific Mechanism of Cholesterol Turnover. *J. Biol. Chem.* 2003;278(25):22980–22988.
20. Ramirez DMO, Andersson S, Russell DW. Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 2008;507(5):1676–1693.
 21. Heverin M, Meaney S, Lütjohann D, et al. Crossing the barrier: net flux of 27-hydroxycholesterol into the human brain. *J. Lipid Res.* 2005;46(5):1047–1052.
 22. Martin KO, Reiss AB, Lathe R, Javitt NB. 7 alpha-hydroxylation of 27-hydroxycholesterol: biologic role in the regulation of cholesterol synthesis. *J. Lipid Res.* 1997;38(5):1053–8.
 23. Meaney S, Heverin M, Panzenboeck U, et al. Novel route for elimination of brain oxysterols across the blood-brain barrier: conversion into 7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid. *J. Lipid Res.* 2007;48(4):944–951.
 24. Sodhi RK, Singh N. Liver X receptors: Emerging therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Pharmacol. Res.* 2013;72:45–51.
 25. Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, et al. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001;98(2):507–512.
 26. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, et al. ABCA1 Is Required for Normal Central Nervous System ApoE Levels and for Lipidation of Astrocyte-secreted apoE. *J. Biol. Chem.* 2004;279(39):40987–40993.
 27. Iuliano L. Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. *Chem. Phys. Lipids* 2011;164(6):457–468.
 28. Leoni V, Caccia C. Potential diagnostic applications of side chain oxysterols analysis in plasma and cerebrospinal fluid. *Biochem. Pharmacol.* 2013;86(1):26–36.
 29. Zmysłowski A, Szterk A. Oxysterols as a biomarker in diseases. *Clin. Chim. Acta* 2019;491:103–113.
 30. Smith LL. Cholesterol autoxidation 1981–1986. *Chem. Phys. Lipids* 1987;44(2–4):87–125.
 31. Ma L, Nelson ER. Oxysterols and nuclear receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2019;484:42–51.
 32. Filomenko R, Fourgeux C, Bretillon L, Gambert-Nicot S. Oxysterols: Influence on plasma membrane rafts microdomains and development of ocular diseases. *Steroids* 2015;99(Pt B):259–265.
 33. Meaney S, Bodin K, Diczfalusy U, Björkhem I. On the rate of translocation in vitro and kinetics in vivo of the major oxysterols in human circulation: critical importance of the position of the oxygen function. *J. Lipid Res.* 2002;43(12):2130–5.
 34. Wnętrzak A, Chachaj-Brekiesz A, Janikowska-Sagan M, Dynarowicz-Latka P. Influence of 7 α -hydroxycholesterol on sphingomyelin and sphingomyelin/phosphatidylcholine films - The Langmuir monolayer study complemented with theoretical calculations. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2019;1861(4):861–870.
 35. Wnetrzak A, Katarzyna Makyla-Juzak •, Filiczowska A, et al. Oxysterols Versus Cholesterol in Model Neuronal Membrane. I. The Case of 7-Ketocholesterol. *The Langmuir Monolayer Study. J. Membr. Biol.* 2017;250(5):553–564.
 36. Björkhem I, Lövgren-Sandblom A, Leoni V, et al. Oxysterols and Parkinson's disease: Evidence that levels of 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid correlates with the duration of the disease. *Neurosci. Lett.* 2013;555:102–105.

37. Lütjohann D, Breuer O, Ahlborg G, et al. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996;93(18):9799–804.
38. Lund E, Andersson O, Zhang J, et al. Importance of a Novel Oxidative Mechanism for Elimination of Intracellular Cholesterol in Humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996;16(2):208–212.
39. Mast N, Lin JB, Anderson KW, et al. Transcriptional and post-translational changes in the brain of mice deficient in cholesterol removal mediated by cytochrome P450 46A1 (CYP46A1). *PLoS One* 2017;12(10):e0187168.
40. Kotti TJ, Ramirez DMO, Pfeiffer BE, et al. Brain cholesterol turnover required for geranylgeraniol production and learning in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006;103(10):3869–3874.
41. Leoni V, Masterman T, Patel P, et al. Side chain oxidized oxysterols in cerebrospinal fluid and the integrity of blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *J. Lipid Res.* 2003;44(4):793–799.
42. Kim S-M, Kim B-Y, Son Y, et al. 7 α -Hydroxycholesterol induces inflammation by enhancing production of chemokine (C–C motif) ligand 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015;467(4):879–884.
43. Li W, Laskar A, Sultana N, et al. Cell death induced by 7-oxysterols via lysosomal and mitochondrial pathways is p53-dependent. *Free Radic. Biol. Med.* 2012;53(11):2054–2061.
44. Lordan S, Mackrill JJ, O'Brien NM. Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative diseases. *J. Nutr. Biochem.* 2009;20(5):321–336.
45. Vejux A, Lizard G. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol. Aspects Med.* 2009;30(3):153–170.
46. Sato Y, Ishihara N, Nagayama D, et al. 7-ketocholesterol induces apoptosis of MC3T3-E1 cells associated with reactive oxygen species generation, endoplasmic reticulum stress and caspase-3/7 dependent pathway. *Mol. Genet. Metab. Reports* 2017;10:56–60.
47. Chang M-C, Chen Y-J, Jein-Wein Liou E, et al. 7-Ketocholesterol induces ATM/ATR, Chk1/Chk2, PI3K/Akt signalings, cytotoxicity and IL-8 production in endothelial cells. *Oncotarget* 2016;7(46):74473–74483.
48. Mintzer E, Charles G, Gordon S. Interaction of two oxysterols, 7-ketocholesterol and 25-hydroxycholesterol, with phosphatidylcholine and sphingomyelin in model membranes. *Chem. Phys. Lipids* 2010;163(6):586–593.
49. Giudetti AM, Romano A, Lavecchia AM, Gaetani S. The Role of Brain Cholesterol and its Oxidized Products in Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2016;13(2):198–205.
50. Van Der Kant R, Langness VF, Herrera CM, et al. Cholesterol Metabolism Is a Druggable Axis that Independently Regulates Tau and Amyloid- β in iPSC-Derived Alzheimer's Disease Neurons. *Cell Stem Cell* 2018;24:363-375.e9.
51. Gamba P, Testa G, Gargiulo S, et al. Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 2015;7:119.
52. Zarrouk A, Debbabi M, Bezine M, et al. Lipid Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2018;15(4):303–312.
53. Testa G, Staurengi E, Giannelli S, et al. A silver lining for 24-hydroxycholesterol in Alzheimer's

- disease: The involvement of the neuroprotective enzyme sirtuin 1. *Redox Biol.* 2018;17:423–431.
54. Testa G, Rossin D, Poli G, et al. Implication of oxysterols in chronic inflammatory human diseases. *Biochimie* 2018;153:220–231.
 55. Dong HK, Gim J-A, Yeo SH, Kim H-S. Integrated late onset Alzheimer's disease (LOAD) susceptibility genes: Cholesterol metabolism and trafficking perspectives. *Gene* 2017;597:10–16.
 56. Linton MF, Gish R, Hubl ST, et al. Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation. *J. Clin. Invest.* 1991;88(1):270–281.
 57. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006;103(15):5644–5651.
 58. Xu Q, Bernardo A, Walker D, et al. Profile and Regulation of Apolipoprotein E (ApoE) Expression in the CNS in Mice with Targeting of Green Fluorescent Protein Gene to the ApoE Locus. *J. Neurosci.* 2006;26(19):4985–4994.
 59. Holtzman DM, Herz J, Bu G. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: Normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012;2(3):1–23.
 60. Shinohara M, Tachibana M, Kanekiyo T, Bu G. Role of LRP1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease: evidence from clinical and preclinical studies. *J. Lipid Res.* 2017;58(7):1267–1281.
 61. Lane-Donovan C, Herz J. The ApoE receptors Vldlr and Apoer2 in central nervous system function and disease. *J. Lipid Res.* 2017;58(6):1036–1043.
 62. Hirsch-Reinshagen V, Maia LF, Burgess BL, et al. The Absence of ABCA1 Decreases Soluble ApoE Levels but Does Not Diminish Amyloid Deposition in Two Murine Models of Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem.* 2005;280(52):43243–43256.
 63. Jansen PJ, Lütjohann D, Thelen KM, et al. Absence of ApoE Upregulates Murine Brain ApoD and ABCA1 Levels, But Does Not Affect Brain Sterol Levels, While Human ApoE3 and Human ApoE4 Upregulate Brain Cholesterol Precursor Levels. *J. Alzheimer's Dis.* 2009;18(2):319–329.
 64. Han X, Cheng H, Fryer JD, et al. Novel Role for Apolipoprotein E in the Central Nervous System. *J. Biol. Chem.* 2003;278(10):8043–8051.
 65. Levi O, Lütjohann D, Devir A, et al. Regulation of hippocampal cholesterol metabolism by apoE and environmental stimulation. *J. Neurochem.* 2005;95(4):987–997.
 66. Zhu L, Zhong M, Elder GA, et al. Phospholipid dysregulation contributes to ApoE4-associated cognitive deficits in Alzheimer's disease pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015;112(38):11965–11970.
 67. Tambini MD, Pera M, Kanter E, et al. ApoE4 upregulates the activity of mitochondria-associated ER membranes. *EMBO Rep.* 2016;17(1):27–36.
 68. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA Neurol.* 1997;278(16):1349–56.
 69. Liu C-C, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. *Nat. Rev. Neurol.* 2013;9(2):106–118.
 70. Petersen RC, Wiste HJ, Weigand SD, et al. Association of Elevated Amyloid Levels With Cognition and Biomarkers in Cognitively Normal People From the Community. *JAMA Neurol.*

- 2016;73(1):85.
71. Soldan A, Pettigrew C, Cai Q, et al. Hypothetical Preclinical Alzheimer Disease Groups and Longitudinal Cognitive Change. *JAMA Neurol.* 2016;73(6):698.
 72. Resnick SM, Bilgel M, Moghekar A, et al. Changes in A β biomarkers and associations with APOE genotype in 2 longitudinal cohorts. *Neurobiol. Aging* 2015;36(8):2333–2339.
 73. Reed B, Villeneuve S, Mack W, et al. Associations Between Serum Cholesterol Levels and Cerebral Amyloidosis. *JAMA Neurol.* 2014;71(2):195.
 74. Vemuri P, Knopman DS, Lesnick TG, et al. Evaluation of amyloid protective factors and alzheimer disease neurodegeneration protective factors in elderly individuals. *JAMA Neurol.* 2017;74(6):718–726.
 75. Szoek C, Goodwill AM, Gorelik A, et al. Apolipoprotein E4 Mediates the Association Between Midlife Dyslipidemia and Cerebral Amyloid in Aging Women. *J. Alzheimer's Dis.* 2019;68(1):105–114.
 76. Goñi FM. “Rafts”: A nickname for putative transient nanodomains. *Chem. Phys. Lipids* 2019;218:34–39.
 77. Simons K, Gerl MJ. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010;11(10):688–699.
 78. Allen JA, Halverson-Tamboli RA, Rasenick MM. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007;8(2):128–140.
 79. Fabelo N, Martín V, Marín R, et al. Altered lipid composition in cortical lipid rafts occurs at early stages of sporadic Alzheimer's disease and facilitates APP/BACE1 interactions. *Neurobiol. Aging* 2014;35(8):1801–1812.
 80. Marin R, Fabelo N, Fernández-Echevarría C, et al. Lipid Raft Alterations in Aged-Associated Neuropathologies. *Curr. Alzheimer Res.* 2016;13(9):973–984.
 81. Wang C, Shou Y, Pan J, et al. The relationship between cholesterol level and Alzheimer's disease-associated APP proteolysis/A β metabolism. *Nutr. Neurosci.* 2018;11:1–11.
 82. Vetrivel KS, Thinakaran G. Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 2010;1801(8):860–867.
 83. Barrett PJ, Song Y, Van Horn WD, et al. The Amyloid Precursor Protein Has a Flexible Transmembrane Domain and Binds Cholesterol. *Science (80-.).* 2012;336(6085):1168–1171.
 84. Ehehalt R, Keller P, Haass C, et al. Amyloidogenic processing of the Alzheimer β -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* 2003;160(1):113–123.
 85. Wood WG, Li L, Müller WE, Eckert GP. Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *J. Neurochem.* 2014;129(4):559–572.
 86. Ghribi O, Larsen B, Schrag M, Herman MM. High cholesterol content in neurons increases BACE, β -amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus. *Exp. Neurol.* 2006;200(2):460–467.
 87. Nicastro MC, Spigolon D, Librizzi F, et al. Amyloid β -peptide insertion in liposomes containing GM1-cholesterol domains. *Biophys. Chem.* 2016;208:9–16.
 88. Habchi J, Chia S, Galvagnion C, et al. Cholesterol catalyses A β 42 aggregation through a heterogeneous nucleation pathway in the presence of lipid membranes. *Nat. Chem.*

- 2018;10(6):673–683.
89. Abramov AY, Ionov M, Pavlov E, Duchon MR. Membrane cholesterol content plays a key role in the neurotoxicity of β -amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Aging Cell* 2011;10(4):595–603.
 90. Miners JS, Baig S, Palmer J, et al. Clearance of A β from the Brain in Alzheimer's Disease: A β -Degrading Enzymes in Alzheimer's Disease. *Brain Pathol.* 2008;18(2):240–252.
 91. Barbero-Camps E, Roca-Agujetas V, Bartolessis I, et al. Cholesterol impairs autophagy-mediated clearance of amyloid beta while promoting its secretion. *Autophagy* 2018;14(7):1129–1154.
 92. Lamartinière Y, Boucau M-C, Dehouck L, et al. ABCA7 Downregulation Modifies Cellular Cholesterol Homeostasis and Decreases Amyloid- β Peptide Efflux in an in vitro Model of the Blood-Brain Barrier. *J. Alzheimer's Dis.* 2018;64(4):1195–1211.
 93. Fernandez-Perez EJ, Peters C, Aguayo LG. Membrane Damage Induced by Amyloid Beta and a Potential Link with Neuroinflammation. *Curr. Pharm. Des.* 2016;22(10):1295–304.
 94. Itri R, Junqueira HC, Mertins O, Baptista MS. Membrane changes under oxidative stress: the impact of oxidized lipids. *Biophys. Rev.* 2014;6:47–61.
 95. Phan HTT, Hata T, Morita M, et al. The effect of oxysterols on the interaction of Alzheimer's amyloid beta with model membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 2013;1828:2487–2495.
 96. Famer D, Meaney S, Mousavi M, et al. Regulation of α - and β -secretase activity by oxysterols: Cerebrosterol stimulates processing of APP via the α -secretase pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;359(1):46–50.
 97. Urano Y, Ochiai S, Noguchi N. Suppression of amyloid- production by 24S-hydroxycholesterol via inhibition of intracellular amyloid precursor protein trafficking. *FASEB J.* 2013;27(10):4305–4315.
 98. Marwarha G, Raza S, Prasanthi JRP, Ghribi O. Gadd153 and NF- κ B Crosstalk Regulates 27-Hydroxycholesterol-Induced Increase in BACE1 and β -Amyloid Production in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *PLoS One* 2013;8(8):e70773.
 99. Prasanthi JR, Huls A, Thomasson S, et al. Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on β -amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol. Neurodegener.* 2009;4(1):1.
 100. Sharma N, Baek K, Phan HTT, et al. Glycosyl chains and 25-hydroxycholesterol contribute to the intracellular transport of amyloid beta (A β -42) in Jurkat T cells. *FEBS Open Bio* 2017;7(6):865–876.
 101. Phan HTT, Shimokawa N, Sharma N, et al. Strikingly different effects of cholesterol and 7-ketocholesterol on lipid bilayer-mediated aggregation of amyloid beta (1-42). *Biochem. Biophys. Reports* 2018;14:98–103.
 102. Hascalovici JR, Vaya J, Khatib S, et al. Brain sterol dys-regulation in sporadic AD and MCI: Relationship to heme oxygenase-1. *J Neurochem* 2009;110(4):1241–1253.
 103. Testa G, Staurengi E, Zerbinati C, et al. Changes in brain oxysterols at different stages of Alzheimer's disease_ Their involvement in neuroinflammation. *Redox Biol.* 2016;10:24–33.
 104. Iuliano L, Monticolo R, Straface G, et al. Vitamin E and enzymatic/oxidative stress-driven oxysterols in amnesic mild cognitive impairment subtypes and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers.*

- Dis. 2010;21(4):1383–92.
105. Zuliani G, Perrone Donnorso M, Bosi C, et al. Plasma 24S-hydroxycholesterol levels in elderly subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia: a case-control study. *BMC Neurol.* 2011;11:121.
 106. Zhang X, Xi Y, Yu H, et al. 27-hydroxycholesterol promotes A β accumulation via altering A β metabolism in mild cognitive impairment patients and APP/PS1 mice. *Brain Pathol.* 2019;29(4):558–573.
 107. Liu Q, An Y, Yu H, et al. Relationship between oxysterols and mild cognitive impairment in the elderly: a case-control study. *Lipids Health Dis.* 2016;15:177.
 108. Lutjohann D, Papassotiropoulos A, Bjorkhem I, et al. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J. Lipid Res.* 2000;41(2):195–8.
 109. Popp J, Lewczuk P, Kölsch H, et al. Cholesterol metabolism is associated with soluble amyloid precursor protein production in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 2012;123(2):310–316.
 110. Popp J, Meichsner S, Kölsch H, et al. Cerebral and extracerebral cholesterol metabolism and CSF markers of Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* 2013;86(1):37–42.
 111. Schonknecht P, Lutjohann D, Pantel J, et al. Cerebrospinal fluid 24S-hydroxycholesterol is increased in patients with Alzheimer's disease compared to healthy controls. *Neurosci Lett* 2002;324(1):83–85.
 112. Leoni V, Masterman T, Mousavi FS, et al. Diagnostic use of cerebral and extracerebral oxysterols. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2004;42(2)
 113. Papassotiropoulos A, Lütjohann D, Bagli M, et al. 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *J. Psychiatr. Res.* 2002;36(1):27–32.
 114. Bretillon L, Lütjohann D, Stähle L, et al. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect the balance between cerebral production and hepatic metabolism and are inversely related to body surface. *J. Lipid Res.* 2000;41(5):840–5.
 115. Solomon A, Leoni V, Kivipelto M, et al. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect brain volumes in patients without objective cognitive impairment but not in those with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 2009;462(1):89–93.
 116. Crick PJ, Griffiths WJ, Zhang J, et al. Reduced Plasma Levels of 25-Hydroxycholesterol and Increased Cerebrospinal Fluid Levels of Bile Acid Precursors in Multiple Sclerosis Patients. *Mol. Neurobiol.* 2017;54(10):8009–8020.
 117. Costa AC, Joaquim HPG, Nunes VS, et al. Donepezil effects on cholesterol and oxysterol plasma levels of Alzheimer's disease patients. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2018;268(5):501–507.
 118. van den Kommer TN, Dik MG, Comijs HC, et al. Total cholesterol and oxysterols: Early markers for cognitive decline in elderly? *Neurobiol. Aging* 2009;30(4):534–545.
 119. Hughes TM, Kuller LK, Lopez OL, et al. Markers of Cholesterol Metabolism in the Brain Show Stronger Associations with Cerebrovascular Disease than Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* January 2012;13233(301):53–61.
 120. Kölsch H, Heun R, Kerksiek A, et al. Altered levels of plasma 24S- and 27-hydroxycholesterol in demented patients. *Neurosci. Lett.* 2004;368(3):303–308.

121. Teunissen CE, Lütjohann D, von Bergmann K, et al. Combination of serum markers related to several mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2003;24(7):893–902.
122. Papassotiropoulos A, Lütjohann D, Bagli M, et al. Plasma 24S-hydroxycholesterol: a peripheral indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease. *Neuroreport* 2000;11(9):1959–62.
123. Teunissen CE, de Vente J, von Bergmann K, et al. Serum cholesterol, precursors and metabolites in a healthy aging population. *Neurobiol Aging* 2003;24:147–155.
124. Popp J, Meichsner S, Kölsch H, et al. Cerebral and extracerebral cholesterol metabolism and CSF markers of Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* 2013;86(1):37–42.
125. Besga A, Cedazo-Minguez A, Kåreholt I, et al. Differences in brain cholesterol metabolism and insulin in two subgroups of patients with different CSF biomarkers but similar white matter lesions suggest different pathogenic mechanisms. *Neurosci. Lett.* 2012;510(2):121–126.
126. Hughes TM, Lopez OL, Evans RW, et al. Markers of Cholesterol Transport are Associated with Amyloid Deposition in the Brain. *Neurobiol Aging* 2014;35:802–807.
127. Vega GL, Weiner MF. Plasma 24S hydroxycholesterol response to statins in Alzheimer's disease patients: effects of gender, CYP46, and ApoE polymorphisms. *J. Mol. Neurosci.* 2007;33(1):51–5.
128. Koschack J, Lütjohann D, Schmidt-Samoa C, Irle E. Serum 24S-hydroxycholesterol and hippocampal size in middle-aged normal individuals. *Neurobiol. Aging* 2009;30(6):898–902.
129. Leoni V. Oxysterols as markers of neurological disease - A review. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2009;69(1):22–25.
130. Leoni V, Solomon A, Lövgren-Sandblom A, et al. Diagnostic power of 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid: candidate marker of brain health. *J. Alzheimers. Dis.* 2013;36(4):739–47.
131. Shafaati M, Solomon A, Kivipelto M, et al. Levels of ApoE in cerebrospinal fluid are correlated with Tau and 24S-hydroxycholesterol in patients with cognitive disorders. *Neurosci. Lett.* 2007;425(2):78–82.
132. Leoni V, Shafaati M, Salomon A, et al. Are the CSF levels of 24S-hydroxycholesterol a sensitive biomarker for mild cognitive impairment? *Neurosci. Lett.* 2006;397(1–2):83–87.
133. Mateos L, Ismail MAM, Gil-Bea FJ, et al. Upregulation of brain renin angiotensin system by 27-hydroxycholesterol in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 2011;24(4):669–679.
134. H K, Lütjohann D, Jessen F, et al. RXRA gene variations influence Alzheimer's disease risk and cholesterol metabolism Heike. *J. Cell. Mol. Med.* 2009;13:589–598.
135. Griffiths WJ, Abdel-Khalik J, Yutuc E, et al. Concentrations of bile acid precursors in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Free Radic. Biol. Med.* 2019;134:42–52.
136. Burlot M-A, Braudeau J, Michaelsen-Preusse K, et al. Cholesterol 24-hydroxylase defect is implicated in memory impairments associated with Alzheimer-like Tau pathology. *Hum. Mol. Genet.* 2015;24(21):5965–5976.
137. Serrano-Pozo A, Vega GL, Lütjohann D, et al. Effects of Simvastatin on Cholesterol Metabolism and Alzheimer Disease Biomarkers. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2010;24(3):220–226.
138. Leoni V, Solomon A, Kivipelto M. Links between ApoE, brain cholesterol metabolism, tau and amyloid β -peptide in patients with cognitive impairment. *Biochem. Soc. Trans.* 2010;38(4):1021–1025.

139. Leoni V, Caccia C. Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chem. Phys. Lipids* 2011;164(6):515–524.
140. Dias IHK, Milic I, Lip GYH, et al. Simvastatin reduces circulating oxysterol levels in men with hypercholesterolaemia. *Redox Biol.* 2018;16:139–145.
141. Lleó A, Alcolea D, Martínez-Lage P, et al. Longitudinal cerebrospinal fluid biomarker trajectories along the Alzheimer’s disease continuum in the BIOMARKAPD study. *Alzheimer’s Dement.* 2019;15(6):742–753.
142. Jenkinson M, Beckmann CF, Behrens TEJ, et al. FSL. *Neuroimage* 2012;62(2):782–790.
143. Woolrich MW, Jbabdi S, Patenaude B, et al. Bayesian analysis of neuroimaging data in FSL. *Neuroimage* 2009;45(1):S173–S186.
144. Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, et al. Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *Neuroimage* 2004;23:S208–S219.
145. Smith SM. Fast robust automated brain extraction. *Hum. Brain Mapp.* 2002;17(3):143–155.
146. Rueckert D, Sonoda LI, Hayes C, et al. Nonrigid registration using free-form deformations: application to breast MR images. *IEEE Trans. Med. Imaging* 1999;18(8):712–721.
147. Smith SM, Jenkinson M, Johansen-Berg H, et al. Tract-based spatial statistics: Voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *Neuroimage* 2006;31(4):1487–1505.
148. Wenham PR, Price WH, Blandell G. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *Lancet (London, England)* 1991;337:1158–1166.
149. Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, et al. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer’s dementia and normal aging. *AJR Am.J.Roentgenol.* 1987;149(2):351–356.
150. Alcolea D, Martínez-Lage P, Sánchez-Juan P, et al. Amyloid precursor protein metabolism and inflammation markers in preclinical Alzheimer disease. *Neurology* 2015;85(7):626–633.
151. J H, J H. *Generalized Linear Models and Extensions*. third edit. 2012.
152. Borghesani PR, Madhyastha TM, Aylward EH, et al. The association between higher order abilities, processing speed, and age are variably mediated by white matter integrity during typical aging. *Neuropsychologia* 2013;51(8)
153. Madden DJ, Spaniol J, Costello MC, et al. Cerebral White Matter Integrity Mediates Adult Age Differences in Cognitive Performance NIH Public Access. *J Cogn Neurosci* 2009;21(2):289–302.
154. Salami A, Eriksson J, Nilsson L-G, Nyberg L. Age-related white matter microstructural differences partly mediate age-related decline in processing speed but not cognition. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2012;1822(3):408–415.
155. Davis SW, Dennis NA, Buchler NG, et al. Assessing the effects of age on long white matter tracts using diffusion tensor tractography. *Neuroimage* 2009;46(2):540–541.
156. Zhuang L, Sachdev PS, Trollor JN, et al. Microstructural White Matter Changes, Not Hippocampal Atrophy, Detect Early Amnesic Mild Cognitive Impairment. *PLoS One* 2013;8(3):e58887.
157. Mayo CD, Garcia-Barrera MA, Mazerolle EL, et al. Relationship between DTI metrics and cognitive function in Alzheimer’s disease. *Front. Aging Neurosci.* 2019;11:436.
158. Wang R, Fratiglioni L, Laukka EJ, et al. Effects of vascular risk factors and APOE 4 on white matter integrity and cognitive decline. *Neurology* 2015;84(11):1128–1135.
159. Field A. Moderation, Mediation and More Regression. In: *Discovering statistics using IBM SPSS*

- statistics. London: SAGE Publications; 2013 p. 392–428.
160. Power MC, Weuve J, Sharrett AR, et al. Statins, cognition, and dementia—systematic review and methodological commentary. *Nat. Rev. Neurol.* 2015;11(4):220–9.
 161. Shinohara M, Sato N, Shimamura M, et al. Possible modification of Alzheimer’s disease by statins in midlife: interactions with genetic and non-genetic risk factors. *Front. Aging Neurosci.* 2014;6:71.
 162. Melah KE, Yuan-Fu Lu S, Hoscheidt SM, et al. CSF markers of Alzheimer’s pathology and microglial activation are associated with altered white matter microstructure in asymptomatic adults at risk for Alzheimer’s disease HHS Public Access. *J Alzheimers Dis* 2016;50(3):873–886.
 163. Craig-Schapiro R, Perrin RJ, Roe CM, et al. YKL-40: A Novel Prognostic Fluid Biomarker for Preclinical Alzheimer’s Disease. *Biol. Psychiatry* 2010;68(10):903–912.
 164. Preische O, Schultz SA, Apel A, et al. Serum neurofilament dynamics predicts neurodegeneration and clinical progression in presymptomatic Alzheimer’s disease. *Nat. Med.* 2019;25(2):277–283.
 165. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 2018;14(10):577–589.
 166. 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 NIH Public Access Author Manuscript. *Alzheimers Dement* 2011;7(3):280–292.
 167. Gons RAR, van Oudheusden LJB, de Laat KF, et al. Hypertension is Related to the Microstructure of the Corpus Callosum: The RUN DMC Study. *J. Alzheimer’s Dis.* 2012;32(3):623–631.
 168. Ellis KA, Bush AI, Darby D, et al. The Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle (AIBL) study of aging: methodology and baseline characteristics of 1112 individuals recruited for a longitudinal study of Alzheimer’s disease. *Int. Psychogeriatrics* 2009;21(4):672–687.
 169. Vos SJ, Xiong C, Visser PJ, et al. Preclinical Alzheimer’s disease and its outcome: a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol.* 2013;12(10):957–965.
 170. Liu F, Pardo LM, Schuur M, et al. The apolipoprotein E gene and its age-specific effects on cognitive function. *Neurobiol. Aging* 2010;31(10):1831–1833.
 171. Soldan A, Pettigrew C, Li S, et al. Relationship of cognitive reserve and cerebrospinal fluid biomarkers to the emergence of clinical symptoms in preclinical Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Aging* 2013;34(12):2827–2834.
 172. Kivipelto M, Ngandu T, Laatikainen T, et al. Risk score for the prediction of dementia risk in 20 years among middle aged people: a longitudinal, population-based study. *Lancet Neurol.* 2006;5(9):735–741.
 173. Blázquez L, De Juan D, Ruiz-Martínez J, et al. Genes related to iron metabolism and susceptibility to Alzheimer’s disease in Basque population. *Neurobiol. Aging* 2007;28(12):1941–1943.
 174. Cuadrado-Godia E, Dwivedi P, Sharma S, et al. Cerebral Small Vessel Disease: A Review Focusing on Pathophysiology, Biomarkers, and Machine Learning Strategies. *J. stroke* 2018;20(3):302–320.
 175. Rojas S, Brugulat-Serrat A, Bargalló N, et al. Higher prevalence of cerebral white matter hyperintensities in homozygous *APOE-ε4* allele carriers aged 45–75: Results from the ALFA study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2018;38(2):250–261.
 176. Bae S, Kim J, Hwang J, et al. Increased prevalence of white matter hyperintensities in patients with

- panic disorder. *J. Psychopharmacol.* 2010;24(5):717–723.
177. Mika Yamawaki, Kenji Wada-Isoe, Mikie Yamamoto¹, et al. Association of cerebral white matter lesions with cognitive function and mood in Japanese elderly people: a population-based study. *Brain Behav.* 2015;5(3):e00315.
178. Zhuang F-J, Chen Y, He W-B, Cai Z-Y. Prevalence of white matter hyperintensities increases with age. *Neural Regen. Res.* 2018;13(12):2141–2146.
179. Martinez-Moral M-P, Kannan K. How stable is oxidative stress level? An observational study of intra- and inter-individual variability in urinary oxidative stress biomarkers of DNA, proteins, and lipids in healthy individuals. *Environ. Int.* 2019;123:382–389.
180. Knopman DS, C.R. Jack J, Wiste HJ, et al. Short-term clinical outcomes for stages of NIA-AA preclinical Alzheimer disease. *Neurology* 2012;78:1576–1582.
181. Mattsson N, Insel P, Nosheny R, et al. CSF protein biomarkers predicting longitudinal reduction of CSF β -amyloid₄₂ in cognitively healthy elders. *Transl. Psychiatry* 2013;3(8):e293.
182. Toledo JB, Xie SX, Trojanowski JQ, Shaw LM. Longitudinal change in CSF Tau and A β biomarkers for up to 48 months in ADNI. *Acta Neuropathol.* 2013;126(5):659–70.
183. Courtney L. Sutphen. Longitudinal Cerebrospinal Fluid Biomarker Changes in Preclinical Alzheimer Disease During Middle Age. *JAMA Neurol.* 2015;72(9):1029–1042.
184. Buchhave P, Blennow K, Zetterberg H, et al. Longitudinal study of CSF biomarkers in patients with Alzheimer’s disease. *PLoS One* 2009;4(7):e6294.
185. Gomar JJ, Conejero-Goldberg C, Davies P, et al. Anti-Correlated Cerebrospinal Fluid Biomarker Trajectories in Preclinical Alzheimer’s Disease. *J. Alzheimer’s Dis.* 2016;51(4):1085–1097.
186. Niikado M, Chrem-Méndez P, Itzcovich T, et al. Evaluation of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Chain as a Routine Biomarker in a Memory Clinic. *Journals Gerontol. Ser. A* 2019;74(4):442–445.
187. Toschi N, Lista S, Baldacci F, et al. Neurobiology of Aging Biomarker-guided clustering of Alzheimer’s disease clinical syndromes. *Neurobiol. Aging* 2019;83:42–53.
188. Zetterberg H, Skillbäck T, Mattsson N, et al. Association of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Concentration With Alzheimer Disease Progression. *JAMA Neurol.* 2016;73(1):60–67.
189. Moore EE, Hohman TJ, Badami FS, et al. Neurofilament relates to white matter microstructure in older adults. *Neurobiol. Aging* 2018;70:233–241.
190. Antonell A, Mansilla A, Rami L, et al. Cerebrospinal Fluid Level of YKL-40 Protein in Preclinical and Prodromal Alzheimer’s Disease. *J. Alzheimer’s Dis.* 2014;42(3):901–908.
191. Gispert JD, Monté GC, Falcon C, et al. CSF YKL-40 and pTau₁₈₁ are related to different cerebral morphometric patterns in early AD. *Neurobiol. Aging* 2016;38:47–55.
192. Zerbinati C, Iuliano L. Cholesterol and related sterols autoxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 2017;111:151–155.
193. Vejux A, Abed-vieillard D, Hajji K, et al. 7-ketocholesterol and 7 β -hydroxycholesterol: in vitro and animal models used to characterize their activities and to identify molecules preventing their toxicity. *Biochem. Pharmacol.* 2019;
194. Kim DH, Frangos JA. Effects of Amyloid b-Peptides on the Lysis Tension of Lipid Bilayer Vesicles Containing Oxysterols. *Biophys. J.* 2008;95(2):620–628.

195. Phan HTT, Vestergaard MC, Baek K, et al. Localization of amyloid beta (A β 1-42) protofibrils in membrane lateral compartments: Effect of cholesterol and 7-Ketocholesterol. *FEBS Lett.* 2014;588(18):3483–3490.
196. Ragot K, Mackrill JJ, Zarrouk A, et al. Absence of correlation between oxysterol accumulation in lipid raft microdomains, calcium increase, and apoptosis induction on 158N murine oligodendrocytes. *Biochem. Pharmacol.* 2013;86(1):67–79.
197. Zhao LN, Long H, Mu Y, Chew LY. The toxicity of amyloid β oligomers. *Int. J. Mol. Sci.* 2012;13(6):7303–27.
198. Alcolea D, Martinez-Lage P, Sanchez-Juan P, et al. Amyloid precursor protein metabolism and inflammation markers in preclinical Alzheimer disease. *Neurology* 2015;85(7):626–633.
199. Gamba P, Leonarduzzi G, Tamagno E, et al. Interaction between 24-hydroxycholesterol, oxidative stress, and amyloid- β in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: three partners in crime. *Aging Cell* 2011;10(3):403–417.
200. Wang H-L, Wang Y-Y, Liu X-G, et al. Cholesterol, 24-Hydroxycholesterol, and 27-Hydroxycholesterol as Surrogate Biomarkers in Cerebrospinal Fluid in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *J. Alzheimers. Dis.* 2016;51(1):45–55.
201. Benitez A, Fieremans E, Jensen JH, et al. White matter tract integrity metrics reflect the vulnerability of late-myelinating tracts in Alzheimer's disease. *NeuroImage Clin.* 2014;4:64–71.
202. Bartzokis G, Lu PH, Heydari P, et al. Multimodal magnetic resonance imaging assessment of white matter aging trajectories over the lifespan of healthy individuals. *Biol. Psychiatry* 2012;72(12):1026–1034.
203. Stricker NH, Schweinsburg BC, Delano-Wood L, et al. Decreased white matter integrity in late-myelinating fiber pathways in Alzheimer's disease supports retrogenesis. *Neuroimage.* 2009;1(451):10–16.
204. Lu PH, Lee GJ, Shapira J, et al. Regional Differences in White Matter Breakdown Between Frontotemporal Dementia and Early-Onset Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2014;39(2):261–269.
205. Agosta F, Pievani M, Sala S, et al. White Matter Damage in Alzheimer Disease and Its Relationship to Gray Matter Atrophy. *Radiology* 2011;258(3):853–863.
206. Bosch B, Arenaza-Urquijo EM, Rami L, et al. Multiple DTI index analysis in normal aging, amnesic MCI and AD. Relationship with neuropsychological performance. *Neurobiol. Aging* 2012;33(1):61–74.
207. Douaud G, Jbabdi S, Behrens TEJ, et al. DTI measures in crossing-fibre areas: Increased diffusion anisotropy reveals early white matter alteration in MCI and mild Alzheimer's disease. *Neuroimage* 2011;55(3):880–890.
208. Kumar A, Singh S, Verma A, Mishra VN. Proteomics based identification of differential plasma proteins and changes in white matter integrity as markers in early detection of mild cognitive impaired subjects at high risk of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 2018;676:71–77.
209. Li K-C, Luo X, Zeng Q-Z, et al. Distinct Patterns of Interhemispheric Connectivity in Patients With Early- and Late-Onset Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* 2018;10:261.
210. Li Y, Feng F, Lin P, et al. Cognition-related white matter integrity dysfunction in Alzheimer's

- disease with diffusion tensor image. *Brain Res. Bull.* 2018;143:207–216.
211. Madhavan A, Schwarz CG, Duffy JR, et al. Characterizing White Matter Tract Degeneration in Syndromic Variants of Alzheimer’s Disease: A Diffusion Tensor Imaging Study. *J. Alzheimer’s Dis.* 2015;49(3):633–643.
212. Serra L, Cercignani M, Lenzi D, et al. Grey and White Matter Changes at Different Stages of Alzheimer’s Disease. *J. Alzheimer’s Dis.* 2010;19(1):147–159.
213. Al-Janabi OM, Brown CA, Bahrani AA, et al. Distinct White Matter Changes Associated with Cerebrospinal Fluid Amyloid- β 1-42 and Hypertension. *J. Alzheimer’s Dis.* 2018;66(3):1095–1104.
214. Brown CA, Johnson NF, Anderson-Mooney AJ, et al. Development, validation and application of a new fornix template for studies of aging and preclinical Alzheimer’s disease. *NeuroImage Clin.* 2017;13:106–115.
215. Gold BT, Zhu Z, Brown CA, et al. White matter integrity is associated with CSF markers of AD in normal adults. *Neurobiol Aging* 2014;35(10):2263–2271.
216. Vipin A, Ng KK, Ji F, et al. Amyloid burden accelerates white matter degradation in cognitively normal elderly individuals. *Hum. Brain Mapp.* 2019;40(7):2065–2075.
217. Ringman JM, O’Neill J, Geschwind D, et al. Diffusion tensor imaging in preclinical and presymptomatic carriers of familial Alzheimer’s disease mutations. *Brain* 2007;130(Pt 7):1767–76.
218. Smith CD, Chebrolu H, Andersen AH, et al. White matter diffusion alterations in normal women at risk of Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Aging* 2010;31(7):1122–1131.
219. Mayo CD, Mazerolle EL, Ritchie L, et al. Longitudinal changes in microstructural white matter metrics in Alzheimer’s disease. *NeuroImage Clin.* 2017;13:330–338.
220. Kitamura S, Kiuchi K, Taoka T, et al. Longitudinal white matter changes in Alzheimer’s disease: A tractography-based analysis study. *Brain Res.* 2013;1515:12–18.
221. Firbank MJ, Watson R, Mak E, et al. Longitudinal diffusion tensor imaging in dementia with Lewy bodies and Alzheimer’s disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2016;24:76–80.
222. Teipel SJ, Meindl T, Wagner M, et al. Longitudinal Changes in Fiber Tract Integrity in Healthy Aging and Mild Cognitive Impairment: A DTI Follow-Up Study. *J. Alzheimer’s Dis.* 2010;22(2):507–522.
223. Kim WH, Racine AM, Adluru N, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers of neurofibrillary tangles and synaptic dysfunction are associated with longitudinal decline in white matter connectivity: A multi-resolution graph analysis. *NeuroImage Clin.* 2019;21:101586.
224. Racine AM, Merluzzi AP, Adluru N, et al. Association of longitudinal white matter degeneration and cerebrospinal fluid biomarkers of neurodegeneration, inflammation and Alzheimer’s disease in late-middle-aged adults. *Brain Imaging Behav.* 2019;13(1):41–52.
225. Elahi FM, Marx G, Cobigo Y, et al. Longitudinal white matter change in frontotemporal dementia subtypes and sporadic late onset Alzheimer’s disease. *NeuroImage Clin.* 2017;16:595–603.
226. Song S-K, Sun S-W, Ramsbottom MJ, et al. Dysmyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water. *Neuroimage* 2002;17(3):1429–36.
227. Song S-K, Yoshino J, Le TQ, et al. Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain. *Neuroimage* 2005;26(1):132–140.
228. Amlien IK, Fjell AM. Diffusion tensor imaging of white matter degeneration in Alzheimer’s

- disease and mild cognitive impairment. *Neuroscience* 2014;276:206–215.
229. Harsan LA, Poulet P, Guignard B, et al. Brain dysmyelination and recovery assessment by noninvasive in vivo diffusion tensor magnetic resonance imaging. *J. Neurosci. Res.* 2006;83(3):392–402.
230. Wheeler-Kingshott CAM, Cercignani M. About Axial and Radial Diffusivities. *Magn. Reson. Med.* 2009;61:1255–1260.
231. Acosta-Cabronero J, Nestor PJ. Diffusion tensor imaging in Alzheimer’s disease: insights into the limbic-diencephalic network and methodological considerations. *Front. Aging Neurosci.* 2014;6:266.
232. Acosta-Cabronero J, Alley S, Williams GB, et al. Diffusion Tensor Metrics as Biomarkers in Alzheimer’s Disease. *PLoS One* 2012;7(11):e49072.
233. Madden DJ, Bennett IJ, Song AW. Cerebral White Matter Integrity and Cognitive Aging: Contributions from Diffusion Tensor Imaging. *Neuropsychol. Rev.* 2009;19(4):415–435.
234. Danielian LE, Iwata NK, Thomasson DM, Floeter MK. Reliability of Fiber Tracking Measurements in Diffusion Tensor Imaging for Longitudinal Study. *Neuroima* 2010;49(2):1572–1580.
235. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82(4):239–259.
236. Jones DK, Knösche TR, Turner R. White matter integrity, fiber count, and other fallacies: The do’s and don’ts of diffusion MRI. *Neuroimage* 2013;73:239–254.
237. Dias IHK, Wilson SR, Roberg-Larsen H. Chromatography of oxysterols. *Biochimie* 2018;153:3–12.

ANEXO I

Manuscrito publicado

Journal: Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2019;13:105426

Title: Localisation of oxysterols at the sub-cellular level and in biological fluids

Authors: Irundika HK Dias, Khushboo Borahb, Berivan Amin, Helen R Griffithsb, Khoulood Sassid, Gerard Lizard, Ane Iriondo, Pablo Martinez-Lage

Abstract: Oxysterols are oxidized derivatives of cholesterol that are formed enzymatically or via reactive oxygen species or both. Cholesterol or oxysterols ingested as food are absorbed and packed into lipoproteins that are taken up by hepatic cells. Within hepatic cells, excess cholesterol is metabolised to form bile acids. The endoplasmic reticulum acts as the main organelle in the bile acid synthesis pathway. Metabolised sterols originating from this pathway are distributed within other organelles and in the cell membrane. The alterations to membrane oxysterol: sterol ratio affects the integrity of the cell membrane. The presence of oxysterols changes membrane fluidity and receptor orientation. It is well documented that hydroxylase enzymes located in mitochondria facilitate oxysterol production via an acidic pathway. More recently, the presence of oxysterols was also reported in lysosomes. Peroxisomal deficiencies favour intracellular oxysterols accumulation. Despite the low abundance of oxysterols compared to cholesterol, the biological actions of oxysterols are numerous and important. Oxysterol levels are implicated in the pathogenesis of multiple diseases ranging from chronic inflammatory diseases (atherosclerosis, Alzheimer's disease and bowel disease), cancer and numerous neurodegenerative diseases. In this article, we review the distribution of oxysterols in sub-cellular organelles and in biological fluids.

ANEXO II

Manuscrito en revisión

Journal: Journal of Alzheimer's Disease

Title: Cerebrospinal fluid 7-ketocholesterol level is associated with amyloid- β_{42} and white matter microstructure in cognitively healthy adults

Authors: Ane Iriondo, Maite García-Sebastian, Arantzazu Arrospide, Maria Arriba, Sara Aurtenetxe, Myriam Barandiaran, Montserrat Clerigue, Mirian Ecay-Torres, Ainara Estanga, Alazne Gabilondo, Andrea Izagirre, Jon Saldias, Mikel Tainta, Jorge Villanua, Kaj Blennow, Henrik Zetterberg, Javier Mar, Beatriz Abad-García, Irundika HK Dias, Felix M. Goñi, Pablo Martínez-Lage

Abstract

Background: Abnormal cholesterol metabolism changes the neuronal membrane and interferes with amyloidogenesis. Oxysterols in CSF are related to Alzheimer's disease (AD) biomarkers in mild cognitive impairment and dementia. Cholesterol turnover is important for axonal and white matter (WM) microstructure maintenance.

Objective: We aim to demonstrate that the association of oxysterols, biomarkers and WM microstructure occurs early in asymptomatic individuals.

Methods: We studied the association of inter-individual variability of CSF 24-hydroxycholesterol (24-OHC), 27-hydroxycholesterol (27-OHC), 7-ketocholesterol (7-KC), 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC), amyloid- β_{42} (A β_{42}), total-tau (t-tau), phosphorylated-tau (p-tau), neurofilament (NfL) and WM microstructure in cognitive regions, using diffusion tensor imaging (DTI), generalized lineal models and moderation/mediation analyses in 153 healthy adults.

Results: 7-KC levels were related to A β_{42} ($B = -1.41$; $p = 0.041$). Higher 7-KC levels were related to lower fractional anisotropy (FA) and higher mean (MD), axial (AxD) and radial (RD) diffusivity in cognitive regions. 7-KC modulated the association between AxD and NfL in the corpus callosum splenium ($B = 39.39$, $p = 0.017$) and genu ($B = 68.64$, $p = 0.000$) and fornix ($B = 10.97$, $p = 0.000$). Lower A β_{42} levels were associated to lower FA and higher MD, AxD and RD in the fornix, corpus callosum, inferior longitudinal fasciculus and hippocampus. The association between AxD and A β_{42} was moderated by 7K-C ($p = 0.048$).

Conclusion: This study adds clinical evidence to support the role of 7K-C on axonal integrity and the involvement of cholesterol metabolism in the A β_{42} generation process.

CAPÍTULO

04



Optimización del análisis del
lipidoma del líquido
cefalorraquídeo

RESUMEN

Por la importancia de los lípidos en la señalización molecular del cerebro y su papel en enfermedades neurológicas, el análisis del lipidoma del líquido cefalorraquídeo (LCR) es un campo de gran interés. La preparación de muestras para la extracción de los lípidos previo al análisis es un punto crítico. Existen diferentes disolventes y protocolos para la extracción de las múltiples clases lipídicas, pero no hay ningún estudio comparativo sobre la eficacia de estos protocolos. Con el objetivo de optimizar la extracción de lípidos del LCR para su posterior análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-MS), en este capítulo comparamos dos métodos de preparación de muestras: precipitación de proteínas mediante el isopropanol (IPA) y extracción líquido-líquido con cloroformo-metanol (CHCl_3 -MeOH). Para ello, utilizamos el LCR de sujetos cognitivamente sanos y sin dislipidemia. El criterio establecido para comparar los métodos se ha centrado en la simplicidad, reproducibilidad, recuperación y la cobertura lipídica obtenida con cada método.

Los dos métodos fueron altamente reproducibles (más del 75% de los lípidos mostraron un coeficiente de variación menor del 30%). En cuanto a la recuperación, mediante el método monofásico de IPA se obtuvieron valores superiores en la mayoría de las clases lipídicas estudiadas. En relación a la cobertura lipídica, se observó una variación en la selectividad lipídica entre los dos métodos, dado que el IPA fue más selectivo para los lípidos polares.

La precipitación de proteínas mediante IPA proporciona excelentes resultados en términos de simplicidad, cobertura de lípidos, reproducibilidad y recuperación. Se concluye que es un procedimiento de elección para la caracterización de lípidos a gran escala mediante el uso de UHPLC-MS en el análisis del LCR.

INTRODUCCIÓN

1. Lípidos

Los lípidos son un grupo diverso de compuestos, en su mayoría insolubles en agua, que participan en muchas funciones críticas de las células y organismos. Su estructura es muy heterogénea por las diferentes longitudes de las cadenas hidrocarbonadas, los orígenes metabólicos y las modificaciones en los residuos. Debido a esta diversidad, el número de especies que existen en un fluido o tejido es incalculable. Yetukiri y colaboradores ¹, mediante cálculos informáticos, estimaron en alrededor de 200000 las especies moleculares lipídicas. Estos últimos años, gracias a los avances en la investigación, esta cifra va en aumento.

Existen diferentes tipos de clasificación lipídica. La clasificación más común es aquella que tiene en cuenta el número de productos liberados por la hidrólisis. Así los lípidos se pueden clasificar en dos grupos: lípidos simples y complejos. Los simples son aquellos que después de la hidrólisis forman un máximo de dos productos (ej. acilglicerol: ácido graso y glicerol) y los complejos pueden formar tres o más entidades (ej. glicerofosfolípidos: ácido graso, glicerol y grupo polar). Otros, añaden un tercer grupo denominado “derivados” y los definen como los alcoholes y ácidos grasos derivados de la hidrólisis de los lípidos simples ². En este último grupo se diferencian ocho categorías: ácidos grasos (FA), glicerolípidos (GL), glicerofosfolípidos (GP), esfingolípidos (SP), esteroides, sacarolípidos, poliquétidos y prenoles. De estas 8 categorías, los FA, GL, GP, SP y esteroides son los más abundantes en los fluidos biológicos en mamíferos.

El cerebro humano contiene una gran cantidad y variedad de lípidos. Después del tejido adiposo, es la región con mayor proporción de lípidos de todo el organismo. El 45-66% en peso de la sustancia blanca y el 36-40% de la sustancia gris están compuestas por lípidos. Este porcentaje aumenta en la mielina, donde hasta un 80% puede llegar a ser lípido ³. Los lípidos más abundantes del cerebro son el colesterol, los GP y los SP. Los lípidos ejercen funciones estructurales y fisiológicas críticas en el mantenimiento de la función cerebral, y proporcionan información sobre los posibles cambios metabólicos relacionados con una enfermedad⁴. Estos compuestos y especies moleculares lipídicas del cerebro están involucrados en una amplia variedad de enfermedades neurológicas,

incluyendo trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer ⁵⁻⁸ (EA), Parkinson ⁹, esclerosis múltiple ¹⁰ o esclerosis lateral amiotrófica ¹¹.

2. Lipidómica en líquido cefalorraquídeo y enfermedad de Alzheimer

El metabolismo defectuoso de los lípidos se asocia a los procesos fisiopatológicos de la EA. Mapstone y colaboradores describieron que las personas cognitivamente sanas que en 2 años desarrollaron deterioro cognitivo ligero (DCL) o demencia, tenían niveles significativamente inferiores de 10 GP plasmáticos en comparación con los sujetos que se mantuvieron cognitivamente sanos ¹². Además, demostraron que los niveles de estos GP predecían quiénes desarrollarían DCL o demencia con una precisión superior al 90%. Aunque el análisis lipídico en plasma proporcione una ventana no invasiva para la detección y búsqueda de los biomarcadores lipídicos, el LCR es el fluido corporal que mejor refleja los cambios biológicos del cerebro, permitiendo explorar de un modo más específico los procesos bioquímicos de estos trastornos ¹³.

En cuanto a los niveles lipídicos en LCR existe una gran controversia. Algunos estudios muestran niveles inferiores de lisofosfatidilcolinas (LPC) ⁷, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS) ⁵ en el LCR en sujetos con EA en comparación con sujetos sanos. Otros estudios en cambio no han observado ninguna diferencia significativa en estos GP ^{6,14}. En relación con los SP, se han descrito niveles superiores de ceramidas (Cer) ¹⁵ y esfingomielinas (SM) ^{6,14} e inferiores de sulfátidos ¹⁶ en pacientes con EA. Además de estas diferencias en los niveles de GP y SP, Mulder y colaboradores observaron niveles inferiores de colesterol libre y ésteres de colesterol en el LCR ¹⁷ a pesar de los aumentos observados en los cerebros de los pacientes con EA ^{18,19} y en los modelos de ratones con EA ²⁰. Wood y colaboradores no observaron diferencias significativas en los niveles de los GL, GP y SP entre sujetos con DCL, demencia y controles ⁸.

Esta falta de consenso en los niveles lipídicos del LCR en pacientes con EA puede estar relacionada con la falta de un protocolo universal para el análisis lipidómico en LCR. Cada uno de los estudios mencionados utiliza una técnica y un protocolo diferente, lo que hace muy complicada la comparación de resultados entre estudios. La estandarización de una técnica común para todos los estudios facilitaría llegar a conclusiones específicas y entender mejor el papel de los lípidos en la fisiopatología de la EA.

3. Técnicas de análisis de la lipidómica en líquido cefalorraquídeo

Existen varias técnicas analíticas para la detección y cuantificación de lípidos en muestras de LCR, de las cuales la espectrometría de masas (MS) es la técnica más empleada ²¹, generalmente precedida por la separación por cromatografía líquida (CL) ²² o cromatografía de gases (CG) ²³. El constante desarrollo de espectrómetros de masas de alta resolución tales como los analizadores FT-ICR, Orbitrap y tiempo de vuelo (*time-of-flight*, TOF), ha aumentado enormemente la resolución de masas. Además, los límites de detección bajos (pM-nM), la alta velocidad de escaneo y la posibilidad de acoplar técnicas de separación como la CL y CG hacen que la espectrometría de masas sea hoy en día la técnica elegida en la mayoría de los estudios lipidómicos.

En estos estudios, la extracción de los lípidos de su matriz biológica es un paso crítico previo al análisis de la MS. La precipitación de proteínas y la extracción de lípidos son los métodos comúnmente utilizados para la preparación de las muestras de lípidos antes de su detección mediante MS. En el caso particular de los fluidos biológicos, los sistemas de disolventes más utilizados para la elaboración de perfiles lipídicos no específicos son los sistemas bifásicos de extracción a base de cloroformo descritos por Bligh and Dyer (B&D) ²⁴ y Folch ²⁵. Estos dos métodos, se basan en la separación de los lípidos de los metabolitos polares mediante su partición en sistemas orgánicos disolvente-agua.

A lo largo de los años, se han introducido algunas modificaciones en la composición original de estos sistemas de disolventes ²⁶, y estas modificaciones se han hecho muy comunes en el análisis de los lípidos del LCR ^{27,28}. Algunos estudios han evaluado la eficacia de la extracción de lípidos mediante diferentes mezclas de disolventes en plasma. Un estudio donde compararon la extracción de las clases predominantes de GP entre los dos métodos de extracción de lípidos principales en plasma (Folch y B&D) mostró recuperaciones similares en ambos métodos²⁹. Al comparar el método Folch con otros sistemas alternativos de extracción, se observó también recuperaciones similares en las clases lipídicas ³⁰. Reis y colaboradores compararon cinco disolventes y mostraron sólo pequeñas diferencias en la recuperación de las clases predominantes de los lípidos plasmáticos ³¹. Teniendo en cuenta la recuperación, la simplicidad, la rentabilidad y la reproducibilidad, Sarafian y colaboradores llegaron a la conclusión de que la precipitación de proteínas por IPA era el método más adecuado para el análisis de los lípidos en plasma ³².

Según nuestro conocimiento, no existen estudios de comparación de métodos de preparación de muestras en el LCR. Debido a que la concentración lipídica en el LCR puede llegar a ser 200 veces menor que en plasma, se necesitan estudios comparativos sobre la extracción de lípidos en este fluido.

Hipótesis

Se plantea la hipótesis de que, a pesar de la supresión iónica, la recuperación en el procedimiento IPA será lo suficientemente alta para compensar la pérdida de sensibilidad causada por los compuestos hidrofílicos endógenos presentes en el extracto lipídico obtenido por el protocolo IPA. Además, se propone que el protocolo IPA será más reproducible y sencillo.

Objetivo

El objetivo de este capítulo es identificar, mediante un conjunto de criterios como la simplicidad del procedimiento, la cobertura lipídica, la reproducibilidad y la recuperación, cuál de estos dos métodos (B&D o IPA) es el más robusto y eficiente para la elaboración de perfiles lipídicos a gran escala en trastornos neurológicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Obtención de muestra y reactivos

1.1 Muestra de líquido cefalorraquídeo

Las muestras de LCR se obtuvieron de los participantes del "Estudio Deba". El proyecto Deba es un estudio epidemiológico sobre la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer en personas mayores de 60 años del municipio gipuzkoano de Deba. El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación Ética y Clínica local, y todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito para participar.

Para el presente estudio, se seleccionaron 10 participantes sin deterioro cognitivo, definido por una puntuación de 0 en la Escala de Evaluación Clínica de Demencia (*Clinical Dementia Rating*, CDR)³³ y sin trastornos lipídicos. Tras la punción lumbar, las muestras de LCR se congelaron a -80°C en menos de 60 min. En el momento de análisis, cada alícuota de LCR (0,5 ml) se descongeló en hielo y se agitó en el vórtex. Todas las muestras de LCR se mezclaron en un mismo recipiente.

1.2 Reactivos y estándares

El agua, metanol, acetonitrilo, IPA y ácido fórmico fueron del grado Optima® LC/MS de Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). El cloroformo del grado HPLC, el acetato de leucina, el acetato de leucina hidratado, el formiato de amonio y la solución de hidróxido de sodio fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) y las dos mezclas de estándar interno (SI) (Splash™ LipidoMix™ y mezcla de SI de ceramida/esfingoide) y el SI d18:1-12:0 Su (**Tabla 1**) por Avanti Polar Lipids, Inc (Alabaster, AL, USA).

Tabla 1: Composición lipídica de la mezcla de los estándares internos.

Mix SI	Nombre compuesto	Masa exacta	Formula química	Conc. (µg/mL)
	15:0-18:1(d7) PC	752.6061	C ₄₁ H ₇₃ D ₇ NO ₈ P	160.7
	15:0-18:1(d7) PE	710.5591	C ₃₈ H ₆₇ D ₇ NO ₈ P	5.7
	15:0-18:1(d7) PS (Na Salt)	776.5309	C ₃₉ H ₆₆ D ₇ NNaO ₁₀ P	4.2
	15:0-18:1(d7) PG (Na Salt)	763.5357	C ₃₉ H ₆₇ D ₇ NaO ₁₀ P	29.1
	15:0-18:1(d7) PI (NH ₄ Salt)	846.5963	C ₄₂ H ₇₅ D ₇ NO ₁₃ P	9.1
	15:0-18:1(d7) PA (Na Salt)	689.4994	C ₃₆ H ₆₁ D ₇ NaO ₈ P	7.4
Splash	18:1(d7) Lyso PC	528.3921	C ₂₆ H ₄₅ D ₇ NO ₇ P	25.5
LipidoMix	18:1(d7) Lyso PE	486.3451	C ₂₃ H ₃₉ D ₇ NO ₇ P	5.3
	18:1(d7) Chol Ester	657.6441	C ₄₅ H ₇₁ D ₇ O ₂	356.1
	18:1(d7) MG	363.3366	C ₂₁ H ₃₃ D ₇ O ₄	2.0
	15:0-18:1(d7) DG	587.5506	C ₃₆ H ₆₁ D ₇ O ₅	9.4
	15:0-18:1(d7) -15:0 TG	811.7646	C ₅₁ H ₈₉ D ₇ O ₆	57.3
	D18:1-18:1(d9) SM	737.6397	C ₄₁ H ₇₂ D ₉ N ₂ O ₆ P	30.9
	Cholesterol (d7)	393.3988	C ₂₇ H ₃₉ D ₇ O	98.4
	Sphingosine (C17)	285.2668	C ₁₇ H ₃₅ NO ₂	7.2
	Sphinganine (C17)	287.2824	C ₁₇ H ₃₇ NO ₂	7.3
	Sphingosine-1-PO ₄ (C17)	365.2331	C ₁₇ H ₃₆ NO ₅ P	9.1
	Sphinganine-1-PO ₄ (C17)	367.2488	C ₁₇ H ₃₈ NO ₅ P	8.9
Ceramide/Sphingoid Internal Standard Mixture I	Ceramide (C12)	481.4495	C ₃₀ H ₅₉ NO ₃	12.3
	Ceramide (C25)	663.6529	C ₄₃ H ₈₅ NO ₃	16.7
	Ceramide-1-PO ₄ (C12)	561.4158	C ₃₀ H ₆₀ NO ₆ P	14.3
	Sphingomyelin (C12)	646.5050	C ₃₅ H ₇₁ N ₂ O ₆ P	16.0
	Glucosyl(β) C12 Ceramide	643.5023	C ₃₆ H ₆₉ NO ₈	16.5
	Lactosyl(β) C12 Ceramide	805.5550	C ₄₂ H ₇₉ NO ₁₃	21.0
C12 Mono-sulfo Galactosyl(β)Ceramide (d18:1/12.0)	D18:1-12:0 Su	740.4857	C ₃₆ H ₇₂ N ₂ O ₁₁ S	25.0

2. Preparación de muestra y análisis

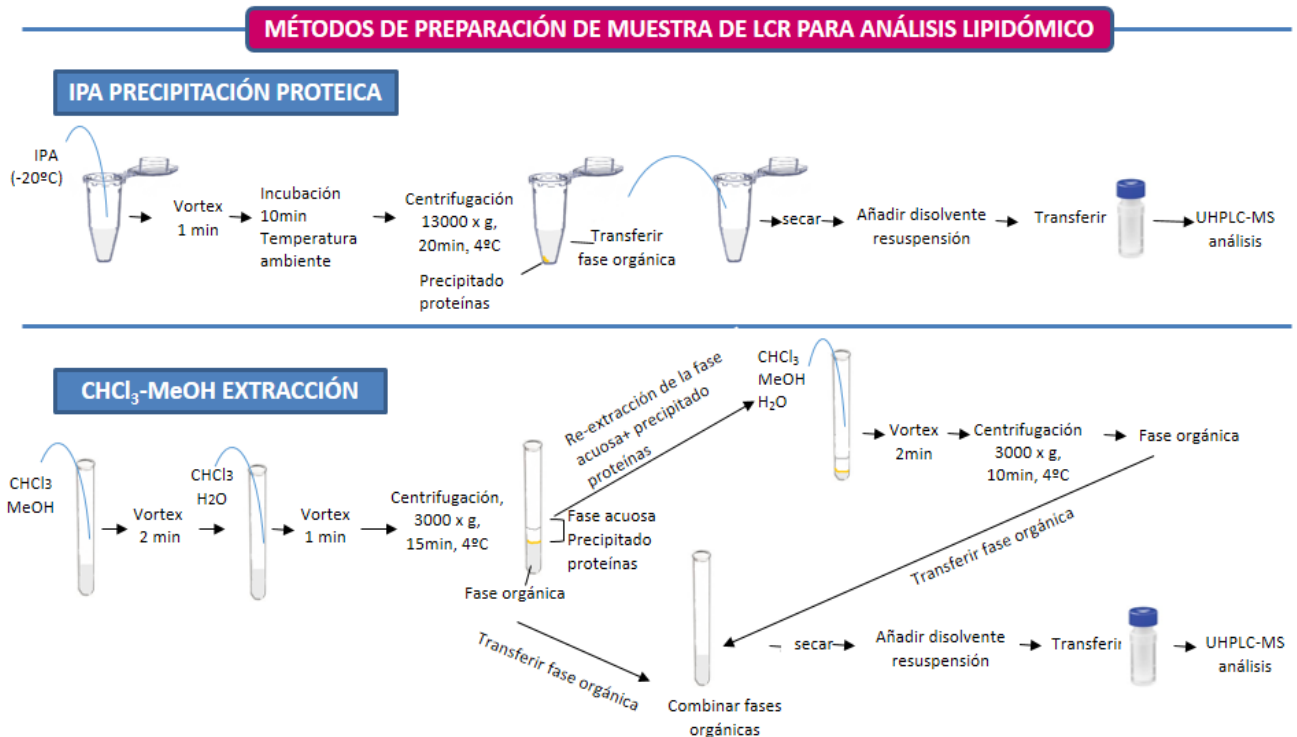
2.1 Preparación de muestra para UHPLC-MS^E

2.1.1 Isopropanol

Las proteínas de las muestras de LCR (200 μ L cada una) se precipitaron mediante la adición de 3 volúmenes de IPA preenfriado a -20°C en un tubo Eppendorf de 2 ml. Las mezclas se agitaron en el vórtex y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, las muestras se centrifugaron a $13000 \times g$ durante 20 minutos a 4°C . La fase superior, donde se encuentran los lípidos, se traspasó a otro tubo Eppendorf. Finalmente, las muestras se secaron en una centrifuga de vacío y se almacenaron a -80°C hasta su análisis mediante UHPLC-MS^E (**Figura 1**).

2.1.2 Cloroformo-Metanol

Siguiendo el protocolo original de B&D se extrajeron los lípidos de las muestras de LCR (200 μ L cada una) en tubos de vidrio mediante la adición de 375 μ L de CHCl_3 :MeOH (1:2). Las muestras se agitaron en el vórtex durante 2 minutos. Posteriormente, se añadieron 125 μ L de CHCl_3 y 125 μ L de agua (H_2O). Las muestras se agitaron en el vórtex durante 1 minuto y se centrifugaron a $3000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . Después, la fase inferior (fase orgánica donde se encuentran los lípidos) se transfirió a un tubo de vidrio limpio. A la fase superior restante (fase acuosa) y a la interfase de la proteína, se le añadieron 300 μ L de CHCl_3 :MeOH: H_2O (1:1:1; v/v/v), se agitaron en el vórtex durante 2 min y se centrifugaron a $3000 \times g$ durante 10 min a 4°C . La fase superior se descartó y la fase orgánica se combinó con la primera fase orgánica. Finalmente, todas las muestras se secaron en una centrifuga de vacío y se almacenaron a -80°C hasta su análisis mediante UHPLC-MS^E (**Figura 1**).

Figura 1: Métodos de preparación de muestra de LCR para el análisis lipidómico.

Nota. IPA = isopropanol; CHCl₃ = cloroformo; MeOH = metanol; UHPLC-MS = cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

2.2 Elección del disolvente de resuspensión

Antes de comparar los dos métodos de preparación de muestras, se evaluaron las propiedades de tres disolventes de resuspensión para los lípidos más abundantes del LCR. Debido a la simplicidad del protocolo del IPA, se prepararon tres réplicas por disolvente de resuspensión, siguiendo este protocolo de preparación de muestra. Las muestras se resuspendieron en 100 µL de cada una de las siguientes mezclas de disolventes: metanol: tolueno (90:10; v/v), cloroformo: metanol (1:2; v/v), IPA: acetonitrilo: agua (2:1:1; v/v/v). Cada réplica fue inyectada en el sistema UHPLC-MS en modo positivo y negativo.

2.3 Recuperación y reproducibilidad

La recuperación se midió añadiendo 10 μ L de cada mezcla de estándar SI a la muestra antes (*prespiked*) y después (*postspiked*) del método de preparación de la muestra. La reproducibilidad del método se confirmó mediante 5 muestras *prespiked* y 5 *postspiked*. El análisis previo de los SI por UHPLC-MS^E en ionización por electrospray positivo (ESI+) y negativo (ESI-) permitió la caracterización de m/z y el tiempo de retención (tR) de iones moleculares, aductos e iones fragmento. Para los cálculos de recuperación, se seleccionó el área del ion más intenso para cada SI (**Tabla 2**).

Tabla 2: Estándares internos e ion más intenso utilizado para el cálculo del factor de recuperación.

Nº compuesto	Lípido	CL tR (min)	ESI-Q-ToF		
			ESI modo	Pico de ion más intenso	Masa exacta
1	Sphingosine (C17)	0.80	ESI+	[M+H-H ₂ O] ⁺	268.2640
2	Sphinganine (C17)	0.86	ESI+	[M+H-H ₂ O] ⁺	270.2797
3	18:1(d7) Lyso PC	1.00	ESI+	[M+H] ⁺	529.3999
4	Sphingomyelin (C12)	2.71	ESI+	[M+H] ⁺	647.5122
5	Lactosyl(β) C12 Ceramide	2.75	ESI+	[M+Na] ⁺	828.5449
6	Glucosyl(β) C12 Ceramide	2.97	ESI+	[M+Na] ⁺	666.4921
7	Ceramide (C12)	3.63	ESI+	[M+Na] ⁺	504.4393
8	d18:1-18:1(d9) SM	4.47	ESI+	[M+H] ⁺	738.6475
9	15:0-18:1(d7) PC	5.19	ESI+	[M+H] ⁺	753.6134
10	15:0-18:1(d7) DG	8.92	ESI+	[M+Na] ⁺	610.5404
11	Ceramide (C25)	13.76	ESI+	[M+Na] ⁺	686.6427
12	15:0-18:1(d7) -15:0 TG	15.06	ESI+	[M+NH ₄] ⁺	829.7990
13	18:1(d7) Chol Ester	15.47	ESI+	[M+Na] ⁺	680.6339
14	18:1(d7) Lyso PE	1.05	ESI-	[M-H] ⁻	485.3379
15	18:1-12:0 Su	2.00	ESI-	[M-H] ⁻	722.4519
16	15:0-18:1(d7) PI (NH ₄ Salt)	3.96	ESI-	[M-H] ⁻	828.5619
17	15:0-18:1(d7) PS (Na Salt)	4.15	ESI-	[M-H] ⁻	753.5417
18	15:0-18:1(d7) PG (Na Salt)	4.26	ESI-	[M-H] ⁻	740.5464
19	15:0-18:1(d7) PE	5.57	ESI-	[M-H] ⁻	709.5519
---	15:0-18:1(d7) PA (Na Salt)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
---	18:1(d7) MG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
---	Sphingosine-1-PO ₄ (C17)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
---	Sphinganine-1-PO ₄ (C17)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
---	Ceramide-1-PO ₄ (C12)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
---	Cholesterol (d7)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Nota. CL = cromatografía líquida; tR = tiempo retención.

2.4 Linealidad

Con el fin de evaluar la linealidad del método, se añadieron los SI a las muestras de control de calidad (QC). Las muestras de QC se inyectaron en cinco concentraciones diferentes que oscilaron entre 0,5 y 17805 ng/mL. Se estudió la sensibilidad del método determinando las pendientes de la curva de calibración y los valores límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). El LOD y el LOQ de los lípidos de los SI individuales se calcularon según el método de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC). Para el LOD, se consideró una relación señal/ruido (S/N) de 3, mientras que para el LOQ la relación S/N aceptada fue de 10 (S/N corresponde a la relación señal/ruido obtenida por el software MassLyns).

2.5 UHPLC-MS^E Análisis

La cromatografía líquida (UHPLC) se realizó utilizando el sistema ACQUITY UPLCTM de Waters (Milford, MA, EUA), equipado con una bomba binaria de suministro de disolvente, un inyector automático y un horno de columna. Se utilizó una columna de fase inversa (Acquity UPLC C18 CSH, 100×2.1 mm, 1.7 μm) y una precolumna (Acquity UPLC C18 CSH 1.7 μm VanGuardTM) para la separación de lípidos individuales. Los disolventes utilizados como fases móviles fueron: acetonitrilo-agua (40:60, v/v) con 10 mM de formiato de amonio y 0,1 % de ácido fórmico (fase A), y acetonitrilo-isopropanol (10:90, v/v) con 10 mM de formiato de amonio y 0,1 % de ácido fórmico (fase B). El flujo fue de 500 μL/min y el volumen de inyección de 7,5 μL. El inyector automático tuvo una temperatura de 4 °C y la columna se mantuvo a una temperatura de 65 °C. En la **Tabla 3** se muestra el gradiente utilizado.

Tabla 3: Gradiente cromatográfico.

Tiempo (min)	%A	%B	Curva
Inicial	60	40	Inicial
2.00	57	43	6
2.10	50	50	1
12.00	46	54	6
12.10	30	70	1
18.00	0	100	6
19.00	0	100	6
19.10	60	40	6
21.00	60	40	1

Todos los datos del UHPLC-MS^E fueron adquiridos en un SYNAPT G2 HDMS, con una configuración cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-ToF) (Waters, Milford, MA, EUA) equipado con una fuente de ionización electrospray (ESI) que operó tanto en modo de ionización positivo (+) como negativo (-).

Los parámetros empleados en la interfase electrospray fueron los siguientes: el voltaje capilar fue ajustado a 1kV en ESI+ y ESI-, la temperatura de la fuente a 120°C, y la temperatura de desolvatación a 500°C. Se utilizó nitrógeno como gas de desolvatación y gas de cono, con caudales de 1000 L/h y 10 L/h, respectivamente.

La calibración interna del espectrómetro de masas se realizó con una disolución de formiato sódico (0,5 mM). Además, se realizó una corrección de masa en todos los espectros adquiridos en base a las relaciones de m/z 556.2771 y 278.1141 (en modo positivo), o 554.2615 y 236.1035 (en modo negativo) de la disolución patrón leucina-encefalina utilizada como “*lock mass*”. Para ello, se preparó una disolución de leucina-encefalina (2 ng/μL) en acetonitrilo-agua (50:50, v/v) con 0,1% de ácido fórmico. Los parámetros establecidos para la “*lock mass*” fueron los siguientes: tiempo de barrido 0.3 s, en intervalos de 10 s, promediando 3 barridos; la ventana de masas fue de ± 0.5 Da, con un voltaje de cono de 30V y un flujo de 10 μL/min.

La adquisición de datos en modo MS^E se realizó en el rango de masas 50-1200 u en modo de resolución (FWHM≈20,000) con un tiempo de exploración de 0.3 s y un retardo entre barridos de 0.024 s. El voltaje de cono se ajustó a 40 V (ESI+ y ESI-). El espectrómetro de masas se utilizó en el modo de adquisición MS^E para ambas polaridades. Durante este método de adquisición, el cuadrupolo operó solamente en un modo de RF de banda ancha. Se crearon dos funciones de adquisición de datos, MS y MS^E, que se alternaron periódicamente durante el análisis. La primera función, MS (comúnmente denominada función de baja energía), consistió en fijar una energía de colisión baja (6 eV) en la celda *trap* de la celda de colisión T-Wave, para recoger los iones sin fragmentar. En la segunda función, MS^E (conocida como función de alta energía), se fijó, además, una rampa de energía de colisión de 15-40 eV en la celda *transfer*, para recoger iones fragmento. En ambos casos se empleó argón como gas de colisión y los datos se recogieron en modo continuo.

3. Diseño, identificación y procesado de datos

3.1 Diseño de análisis

Las muestras de estudio (réplicas de cada protocolo) fueron analizadas aleatoriamente en las condiciones de análisis UHPLC-Q-TOF, indicadas en el apartado “UHPLC-MS^E análisis” de este capítulo. El diseño y orden del análisis fue el siguiente:

- Tres blancos, que consistían en el disolvente de resuspensión elegido (metanol:tolueno 90:10 (v/v)), con el fin de probar cualquier posible contaminación o efecto de arrastre en el sistema UHPLC-ESI-OToF
- Una disolución de SI en metanol:tolueno 90:10 (v/v)
- 15 inyecciones de una muestra de control de calidad (QC) para acondicionamiento del sistema, preparada combinando alícuotas iguales de las réplicas de cada método. En un ensayo previo se observó que se necesitaban al menos 15 inyecciones de una muestra que contenía la matriz estudiada para estabilizar el sistema.
- Las muestras (réplicas de cada protocolo) inyectadas aleatoriamente para reducir al mínimo el efecto de la deriva instrumental causada por la degradación de la columna o por la contaminación de la fuente de la MS en la evaluación de la reproducibilidad.
- Finalmente se inyectaron un QC, la disolución de SI en metanol:tolueno 90:10 (v/v) y un blanco.

Además, después de cada cinco muestras, una muestra de QC fue inyectada regularmente a lo largo de la secuencia para monitorizar la sensibilidad y la estabilidad del UHPLC-ESI-Q-ToF_MS.

3.2 Identificación de lípidos

Los datos obtenidos por el UHPLC-MS^E fueron extraídos usando el software MS^E Data Viewer (Waters MS Technologies, Manchester, U.K.). Este software se utilizó para alinear los espectros de iones precursores e iones productos de acuerdo con los tiempos de retención, generando un archivo de texto exportable, que se utilizó para la identificación de lípidos mediante el software SimLipid (Premier Biosoft, EE.UU.). La identidad de los compuestos fue establecida utilizando el espectro MS de baja energía de colisión en modo positivo y negativo para determinar el peso molecular, y el espectro MS^E de alta energía de colisión para producir la fragmentación utilizada para definir otros

detalles estructurales. La tolerancia para la identificación de MS y MSMS se estableció en 5 mDa.

3.3 Procesamiento de datos

Los datos se adquirieron mediante el software MassLynx V4.1 como archivos sin procesar, se convirtieron en archivos NetCDF utilizando el conversor DataBridge 3.5 (Waters, Milford, USA) y se agruparon de acuerdo con los diferentes protocolos de preparación de muestras. Los blancos y los QC se trataron como grupos separados. Los archivos NetCDF fueron procesados usando bioconductor XCMS 1.42.0 (Metlin, La Jolla, CA, USA) para convertir los datos tridimensionales de LC-MS (tR, m/z, intensidad) en una tabla de características detectadas, alineadas por el tiempo de retención y m/z, anotando la intensidad para cada característica en cada muestra. XCMS fue escrito en el lenguaje de programación estadístico R V3.2.2. La identificación de picos se realizó con el algoritmo de detección de MachedFilter. A continuación, se utilizó R-package CAMERA para filtrar los picos detectados y evitar artefactos de LC-MS (aquellos picos que no presentan iones moleculares de metabolitos como isótopos, aductos y fragmentos comunes, múltiples estados de carga, etc.). Finalmente, se exportaron las tablas de características detectadas generadas (que comprenden los pares de m/z-tR y sus correspondientes intensidades para cada muestra) a SPSS para un análisis univariado y a SIMCA 14.1 (Umetrics, Umea, Suecia) para un análisis multivariado.

4. Análisis estadístico

4.1 Análisis univariante

A fin de comparar la distribución de los coeficientes de variación (CV) de las intensidades de cada característica entre las réplicas de cada protocolo, se realizaron análisis univariantes. Para este fin, únicamente se tuvieron en cuenta los valores de CV inferiores al 30%, que es el valor aceptable en el análisis de biomarcadores³⁴. Este CV de cada característica se calculó dividiendo la desviación estándar entre la media de la intensidad de las réplicas de cada protocolo. A fin de visualizar las diferencias entre los métodos de preparación de muestra se representó un histograma con los valores de los CV. Además, se estimó la variabilidad instrumental mediante el cálculo del CV en muestras de QC, constituido por la combinación de 20 μ L de cada uno de los 20 extractos. Todos los

análisis estadísticos se realizaron en la versión 20 del SPSS. La significatividad estadística se definió como $P \leq 0.05$

4.2 Análisis multivariante

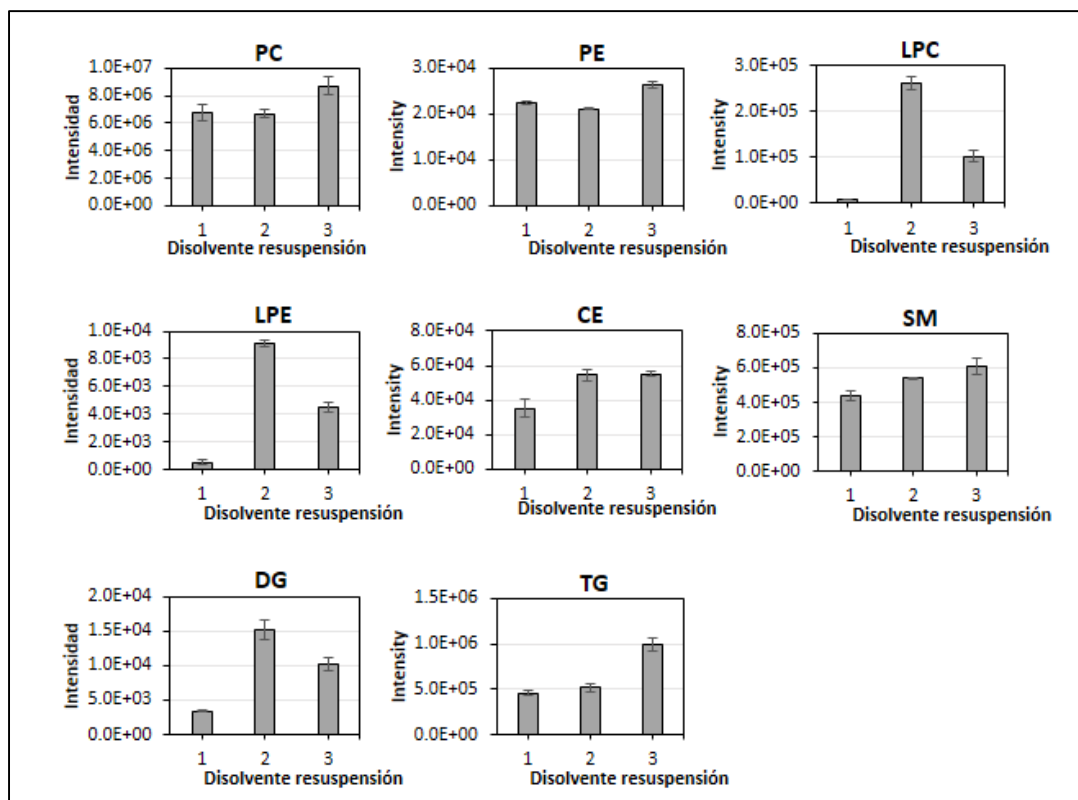
Para evaluar el grado de similitud entre los diferentes protocolos, se realizó el análisis de componentes principales (PCA) con las intensidades extraídas de XCMS utilizando SIMCA 14.1 (Umetrics, Umea, Suecia). Para ello, los datos fueron previamente transformados logarítmicamente a $10\log$ (área de pico) y centrados (*mean-centring*). El gráfico de puntuaciones generado del análisis PCA permitió observar si existen diferencias entre los dos protocolos de preparación de muestra, y los gráficos de carga (coeficientes del modelo frente a covarianza) permitieron identificar las características discriminatorias entre perfiles de lípidos para cada modelo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Elección de disolvente de resuspensión

Con el objetivo de determinar el efecto de cada disolvente de resuspensión en la detección de las diferentes especies lipídicas, se representó la intensidad total de cada una de las clases lipídicas en las que se detectaron más de 5 especies moleculares (**Figura 2**). Se observó que el cloroformo-metanol proporcionaba una buena cobertura para las familias lipídicas más abundantes (GP, GL, SP, lípidos esteroides). Sin embargo, se seleccionó como disolvente de resuspensión el metanol:tolueno, el cual mostró una cobertura intermedia entre cloroformo:metanol e isopropanol:acetonitrilo:agua. Este hecho se debe a que la mezcla de cloroformo:metanol produce desdoblamiento en los picos que eluyen al inicio del cromatograma y a que la evaporación del cloroformo durante largas secuencias aumenta la irreproducibilidad de los resultados.

Figura 2: Intensidad total de las clases lipídicas más abundantes en CSF utilizando diferentes disolventes de resuspensión.



Nota. (1) isopropanol:acetonitrilo:agua (2:1:1; v/v/v); (2) metanol:tolueno (90:10; v/v); (3) cloroformo:metanol (1:2; v/v); PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; LPC, liso-fosfatidilcolina; LPE, liso-fosfatidiletanolamina; CE, colesterol-éster; SM, esfingomielinea; DG, diglicérido; TG, triglicérido.

2. Preparación de la muestra

2.1 Seguridad

Debido a la peligrosidad de los tres disolventes, (MeOH, CHCl₃, IPA) es necesario cumplir las correspondientes medidas de seguridad. El CHCl₃ es particularmente peligroso y tóxico^{35,36} y es cancerígeno para el hígado y el riñón³⁷. IPA es un alcohol secundario y cumpliendo con las correspondientes medidas de seguridad, su manejo es más fácil que el de MeOH o CHCl₃.

2.2 Pipeteo

Cada paso de pipeteado puede causar fallos instrumentales y disminuir el rendimiento, especialmente en el pipeteado manual. Para minimizar estos errores sistemáticos, es importante minimizar los pasos de pipeteado sobre todo en los estudios a gran escala donde se requiere el análisis de muchas muestras.

La preparación de la muestra mediante el protocolo de IPA requiere dos pasos de pipeteado: uno para añadir el IPA y el otro para recoger la fase orgánica y transferirla a un nuevo recipiente. Por el contrario, la preparación de muestra mediante CHCl₃-MeOH requiere al menos tres pasos. En este último protocolo se realiza la recolección de la fase orgánica inferior lo cual necesita de un pipeteado cuidadoso para evitar la contaminación por proteínas en la interfase. En este procedimiento, a veces también es necesario repetir el paso de centrifugación para asegurarse la recogida de toda la fase orgánica. Por el contrario, en el protocolo con IPA después de la centrifugación se obtiene una capa monofásica con un precipitado de proteína en el fondo del recipiente, evitando así todos los problemas asociados a la presencia de una interfase y disminuyendo los riesgos de contaminación del extracto lipídico con proteínas (**Figura 1**).

2.3 Economía de costes

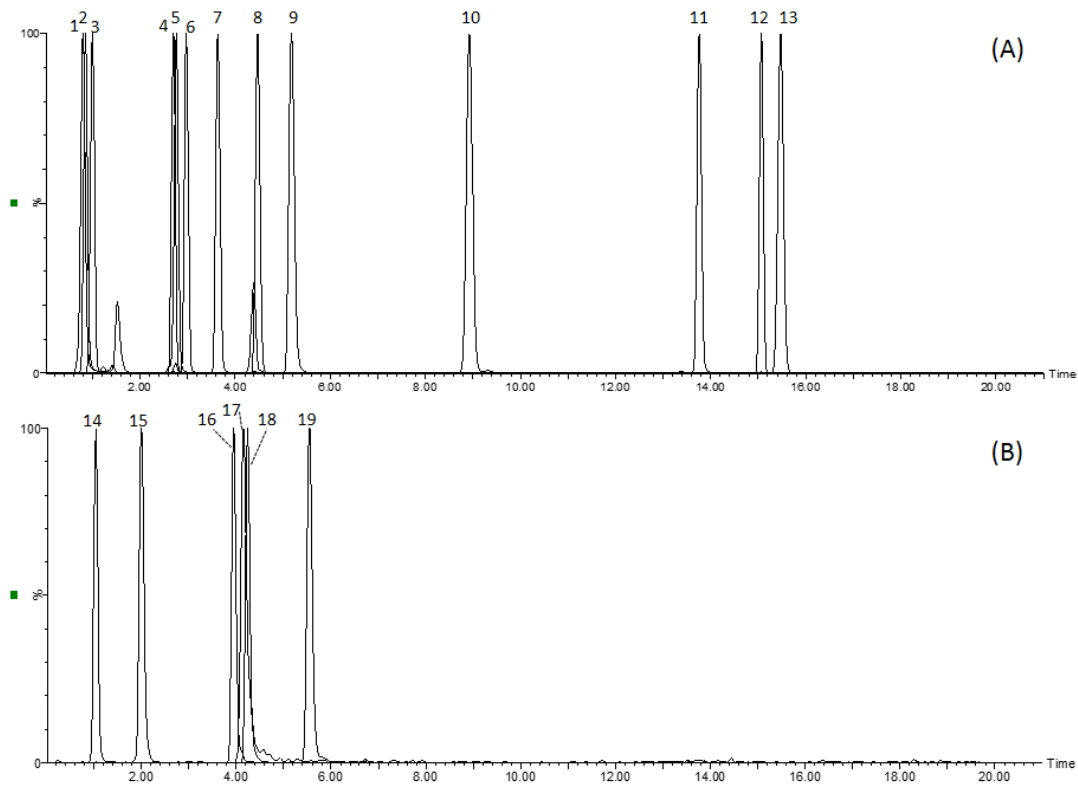
Existen diferentes aspectos para analizar el coste. En cuanto al precio del disolvente, los disolventes de extracción B&D cuestan el doble que el IPA. Además, en el protocolo de B&D, se necesitan dos disolventes de grado HPLC (MeOH y CHCl₃) en lugar de uno. En cuanto a los tubos, los alcoholes como el IPA no reaccionan con los materiales de los tubos de plástico por lo que todo el proceso se puede llevar a cabo en los tubos Eppendorf. El CHCl₃ por el contrario, podría reaccionar con el plástico y se necesitan tubos de vidrio, los cuales son más caros. Respecto al esfuerzo de trabajo, se deben distinguir dos tiempos

a lo largo del proceso de preparación de la muestra. Uno de ellos es el tiempo de evaporación. El IPA requiere un tiempo de secado mayor en el SpeedVac que el CHCl₃-MeOH, por lo que también se consume más energía eléctrica. El otro es el tiempo de manipulación de la muestra antes de la evaporación. En este punto, el protocolo de CHCl₃-MeOH cuenta con más pasos que el protocolo de IPA, necesitando así el triple de tiempo. Además, cuanto mayor sea el número de pasos, menor será la reproducibilidad del método. En resumen, el proceso de preparación de muestras mediante IPA es más corto y económico que el método CHCl₃-MeOH.

3. Lípidos detectados

En las cinco categorías lipídicas examinadas, se detectaron 13 clases de lípidos (relación señal/ruido > 3): Ácidos Grasos (FA), esfingolípidos (SP) [esfingomielina (SM), glucosilceramida (glucosilceramida (GlyCer), sulfoglucoesfingolípidos (Su)], esteroides [ésteres de colesterol (CE)], y glicerolípidos (GL) [triglicéridos (TG) y diglicéridos (DG)], y glicerofosfolípidos (GP) [glicerofosfatidilcolina (PC), LPC, fosfatidiletanolamina (PE), lisofosfatidiletanolamina (LPE), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilglicerol (PG)]. En la **Figura 3** se muestran los cromatogramas extraídos de los 19 SI en LCR. Todos los SI eluyeron en los primeros 16 min, primero los lípidos menos hidrofóbicos y posteriormente los más hidrofóbicos.

En los casos de la SM, TG, DG, PC, LPC, CE y GlyCer el ion más intenso se detectó en modo positivo, mientras que en el caso del FA, LPE, PE, PI, PG Cer y Su, se hizo en modo negativo (**Tabla 2**). El ion más intenso para la PC, LPC y SM fue el ion molecular protonado $[M+H]^+$ y para el FA, PE, LPE, Su, PI y PG el ion molecular desprotonado $[M-H]^-$. Tal y como se esperaba, la adición de formiato de amonio a las fases móviles mejoró la señal de los TG formándose el aducto con amonio y detectándose el $[M+NH_4]^+$ ³⁸. A pesar del uso de formiato de amonio, también se detectaron algunos aductos de sodio $[M+Na]^+$. En el caso de los CE, GlyCer y DG, este aducto de sodio fue el más intenso, mientras que en el caso de PC, LPC, SM y TG fue el segundo aducto más intenso.

Figura 3: Cromatogramas del ion extraído de los estándares internos detectados.

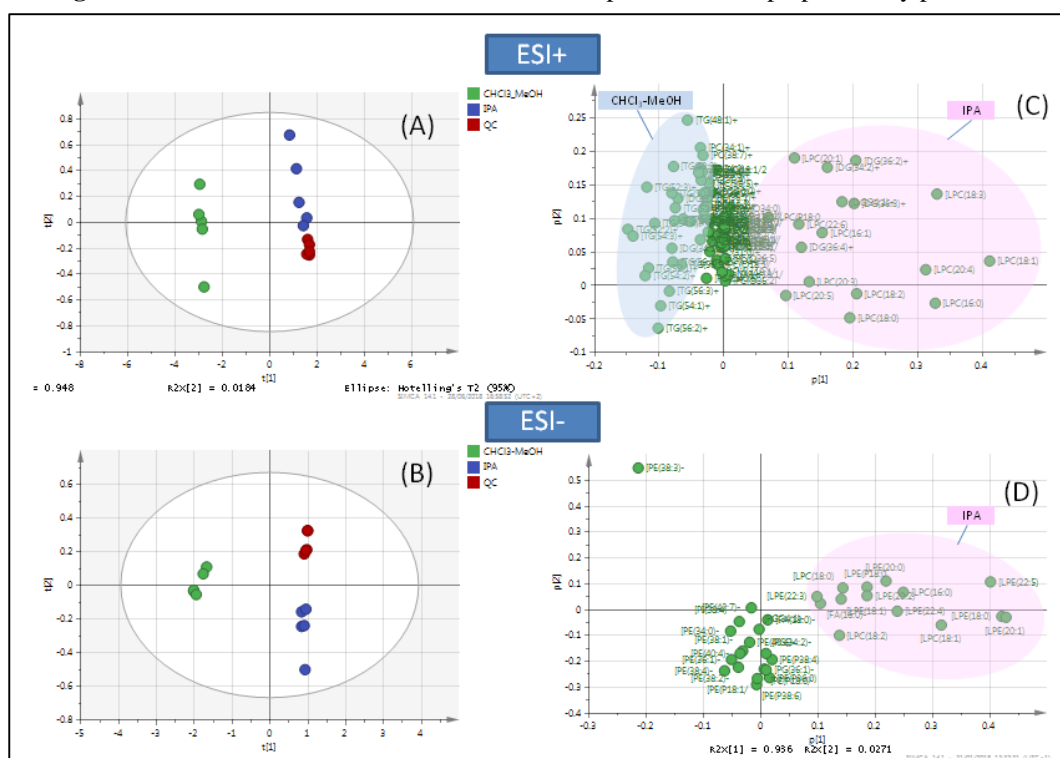
Nota. (A) en modo positivo, (B) en modo negativo: 1: Sphingosine (C17); 2: Sphinganine (C17); 3: 18:1(d7) Lyso PC; 4: Sphingomyelin (C12); 5: Lactosyl(β) C12 Ceramide; 6: Glucosyl(β) C12 Ceramide; 7: Ceramide (C12); 8: d18:1-18:1(d9) SM; 9: 15:0-18:1(d7) PC; 10: 15:0-18:1(d7) DG; 11: Ceramide (C25); 12: 15:0-18:1(d7) -15:0 TG; 13: 18:1(d7) Chol Ester; 14: 18:1(d7) Lyso PE; 15: 18:1-12:0 Su ; 16: 16:0-18:1(d7) PI (NH₄ Salt); 17: 15:0-18:1(d7) PS (Na Salt); 18: 15:0-18:1(d7) PG (Na Salt); 19: 15:0-18:1(d7) PE.

En la plataforma completa de XCMS, se detectaron 4.864 características en ambas polaridades. Entre estas características, 175 fueron lípidos. La clase lipídica TG, con 51 especies, fue la clase con el mayor número de especies, seguida por la PC con 42 especies, SM con 20 especies y LPC con 17 especies (**Anexo I**). Por tanto, la familia de los GP presentó el mayor número de especies detectadas. Aunque el nivel de los GP en LCR es 300 veces menor que en el suero, debido a su abundancia en las membranas celulares³⁹ es la familia más abundante en el LCR junto con los esteroides⁴⁰. Por otro lado, los esteroides, y especialmente los oxisteroides, las especies más importantes en el metabolismo del colesterol cerebral⁴¹, no se detectaron mediante esta técnica debido a su baja capacidad de ionización en ESI.

Las diferencias entre los métodos de preparación de muestras se determinaron mediante PCA. Los gráficos de puntuación mostraron una separación entre el método con IPA y con CHCl₃-MeOH (**Figura 4 A-B**). Los gráficos de carga permitieron observar que la principal diferencia entre los métodos de preparación se debía al LPC y TG en ESI+ y

LPE en ESI- (**Figura 4 C-D**) mostrando mayor detección de LPC y LPE y una menor detección de TG mediante el protocolo IPA en comparación con el método CHCl₃-MeOH. Por tanto, el método de precipitación IPA permitió la inclusión de todas las clases lipídicas, pero mejoró especialmente la detección de lípidos polares, mientras que la extracción de CHCl₃-MeOH dio lugar a un aumento de los lípidos no polares, en particular el TG, y a una disminución significativa de los lípidos polares. Este hecho puede atribuir a la afinidad intrínseca de los lípidos por cada disolvente.

Figura 4: Análisis PCA de las muestras de estudio por método de preparación y por muestra.



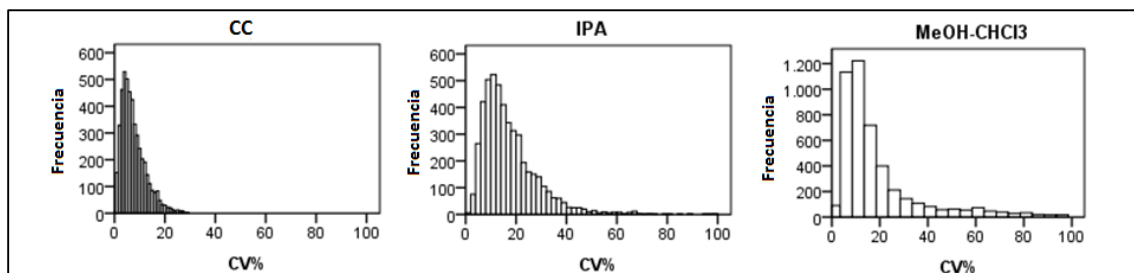
Nota. Gráfico de puntuaciones y gráfico de cargas representados por los dos primeros componentes principales del modelo PCA en ESI+ (A y C) y ESI- (B y D). En los gráficos de puntuaciones, Precipitación IPA (azul), extracción MeOH-CHCl₃ (verde), QC, control de calidad (rojo). En los gráficos de carga IPA (rosa), MeOH-CHCl₃ (azul).

4. Reproducibilidad

4.1 Análisis univariante

La lipidómica se basa en la comparación relativa de perfiles espectrales, por lo que se necesita una estrategia sistemática de QC para evaluar la reproducibilidad del trabajo analítico. Con el objetivo de determinar la capacidad de proporcionar perfiles similares entre réplicas idénticas, se dividió una muestra de LCR en 10 alícuotas: 5 muestras se analizaron siguiendo el protocolo con IPA y otras 5 con CHCl₃-MeOH, todas ellas de forma independiente. La columna se acondicionó previamente con 15 inyecciones de QC para obtener tiempos de retención estables antes de la inyección de las muestras de estudio. De este modo, la variación de los tiempos de retención en las muestras de estudio no superó los 2.4 seg y en el caso de la variación de la masa no superó los 0,02 Da, obteniendo así un correcto pre-procesamiento de los datos e identificación de las características. Con el objetivo de visualizar la distribución de las características [tiempo de retención (tR) y m/z] de las réplicas de las muestras de QC y de las muestras obtenidas por el método de extracción de lípidos IPA o CHCl₃-MeOH, se realizaron histogramas con los CV de intensidad de pico (**Figura 5**). El 99,5% de las características de las muestras de QC mostraron valores de CV inferiores al 30%, el cual es el valor máximo para el análisis de biomarcadores ³⁴, demostrando así la estabilidad del instrumento y de las muestras a lo largo del tiempo. Los resultados de los CV de las muestras analizadas con IPA permitieron observar una extracción robusta de lípidos ya que el 89,5% de las características revelaron valores de los CV inferiores al 30%, mientras que con CHCl₃-MeOH el 78,7% de las características mostraron un CV inferior al 30% (Chi² = 25.69; p = 0.000).

Figura 5: Histogramas de los coeficientes de variación.



Nota. CV = coeficiente de variación; QC = control de calidad; IPA = isopropanol; MeOH-CHCl₃ = metanol-cloroformo.

Los CV se compararon mediante la prueba Kruskal-Wallis. Las muestras analizadas con IPA y con CHCl₃-MeOH mostraron significativamente valores de CV superiores a los de las muestras de QC. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre las muestras preparadas por los protocolos de extracción de lípidos CHCl₃-MeOH e IPA (**Tabla 4**). A diferencia de nuestros resultados, Sarafian y colaboradores no encontraron ninguna diferencia significativa en los CV entre las muestras analizadas con IPA y las muestras de QC³². Esta diferencia podría deberse al hecho de que en el trabajo de Sarafian y colaboradores, la reproducibilidad intrínseca fue menor (el 66.6% de las características de las muestras de QC tuvieron un CV inferior al 30%) que en nuestro caso (el 99.5% de las características de las muestras de QC tuvieron un CV inferior al 30%).

Tabla 4: Comparación de los coeficientes de variación.

	CC	MeOH-CHCl ₃	IPA	p
CV% mediana (pc 25; pc75)	6 (4; 10)	13 (8; 25)	14 (9; 21)	0.000 ^{a, b}

Nota. QC = control de calidad, IPA = isopropanol; MeOH- CHCl₃ = metanol-cloroformo; CV = coeficiente de variación.

Si p<.05, el valor se muestra en negrita.

^a Comparación entre QC y IPA.

^b Comparación entre QC y MeOH- CHCl₃.

4.2 Análisis multivariante

Con el fin de evaluar la reproducibilidad entre los métodos de preparación de la muestra, se realizó el análisis de PCA (**Figura 4**). En el gráfico de puntuaciones de PCA representado por los dos primeros componentes principales (PC1 vs PC2), se observó la estrecha agrupación entre los QC, lo que evidenció una vez más la fiabilidad de la plataforma UHPLC-QToF-MS. Además, las réplicas de cada método de preparación de muestra estaban muy agrupadas entre sí, lo que demuestra que los dos métodos estudiados fueron reproducibles.

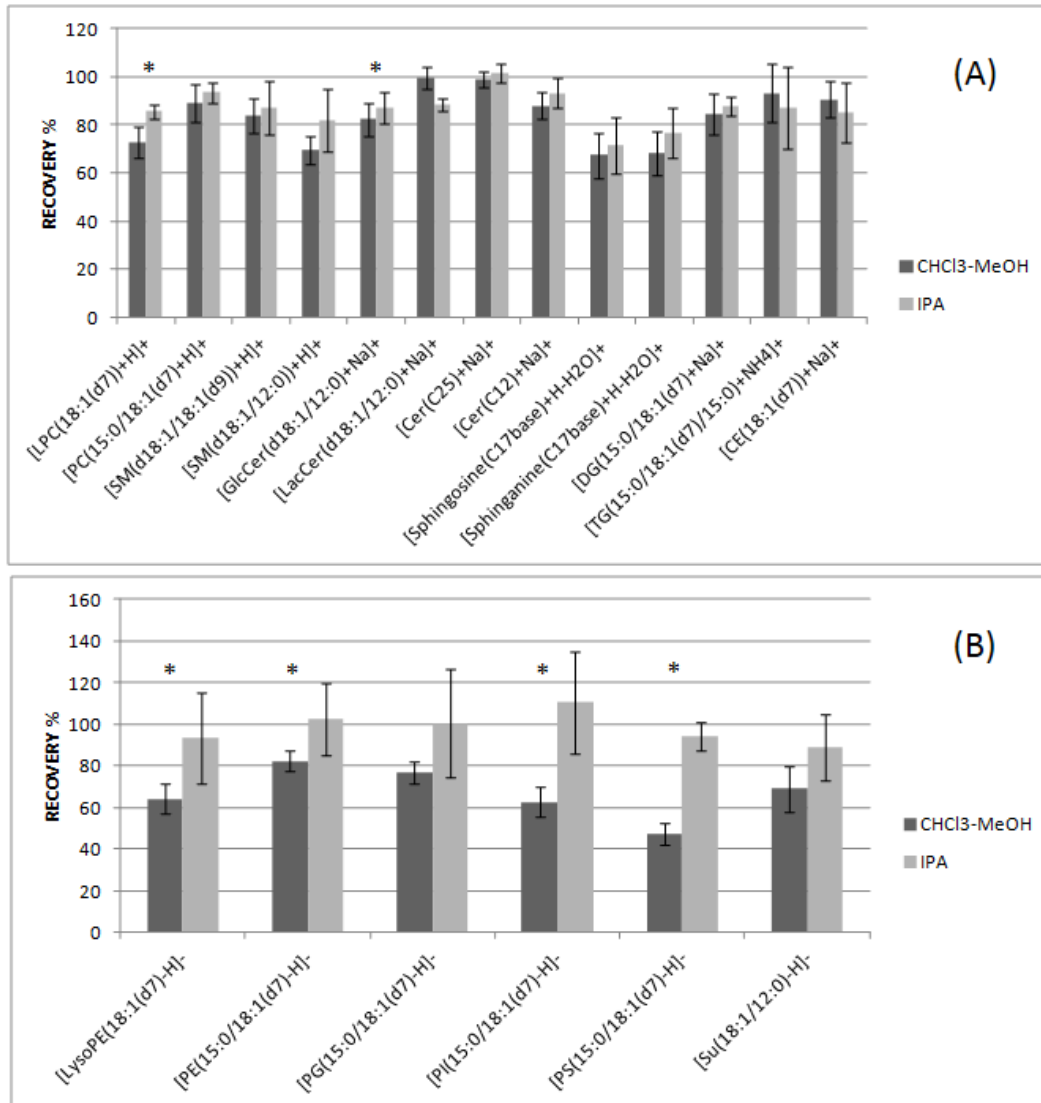
5. Recuperación

En este apartado se analizó la eficacia de los métodos de preparación con CHCl_3 -MeOH e IPA para determinar la capacidad de recuperación de los 19 SI añadidos a las muestras antes (*prespiked*) y después (*postspiked*) de su preparación. La recuperación se calculó mediante la relación entre las áreas de pico de los SI *prespiked* y los *postspiked*. Las muestras *prespiked* informan sobre la cantidad de SI detectado, y las *postspiked* sobre la cantidad de SI detectable.

La recuperación fue superior al 60% en los 19 SI analizados mediante los dos procedimientos, excepto en el caso de los PS cuya recuperación fue del 47% en las muestras preparadas con CHCl_3 -MeOH (**Figura 6**). En todos los SI, el método de precipitación IPA tuvo una recuperación mayor que el CHCl_3 -MeOH, excepto en el caso del TG y CE, en los cuales la recuperación fue más alta mediante CHCl_3 -MeOH. La diferencia fue significativa en los casos de LPC, LacCer, LPE, PE, PI y PS. En resumen, estos resultados muestran que siendo efectivos ambos métodos, el IPA permitió una recuperación significativamente mayor en la mayoría de los GP.

Junto con la recuperación, es importante valorar la supresión iónica en las muestras obtenidas por los dos protocolos de extracción de lípidos. Mediante el protocolo de extracción líquido-líquido con CHCl_3 -MeOH, la extracción de los compuestos hidrofílicos endógenos presentes en la matriz es muy pequeña, mientras que con la estrategia de precipitación de proteínas con IPA, estos compuestos se recuperan y se envían a la columna y al MS. Estos compuestos hidrofílicos endógenos compiten con los lípidos por la ionización en la fuente de ionización y por ello, las intensidades de los lípidos podrían disminuir. En este línea, en nuestro trabajo se observó que la intensidad de los lípidos de los SI de las muestras *postspiked* (después del método de preparación de la muestra) analizadas con IPA, fue menor que en las muestras analizadas con CHCl_3 -MeOH (excepto en DG y GlyCer), mostrando así una mayor supresión de iones con IPA. A pesar de la supresión de iones, las intensidades de los lípidos de los SI de las muestras analizadas con IPA *prespiked* (antes de la fase de preparación de la muestra) fueron mayores que las intensidades analizadas con CHCl_3 -MeOH, debido a que los valores de recuperación fueron también más altos, excepto en el caso de TG y CE. Por lo tanto, estos resultados muestran que la disminución de la intensidad de los lípidos mediante la supresión de la ionización se compensa con un mayor porcentaje de recuperación en la extracción de IPA.

Figura 6: Recuperación de lípidos mediante IPA y CHCl₃-MeOH.



Nota. (A), en modo positivo; (B), en modo negativo. IPA = isopropanol; CHCl₃-MeOH = cloroformo-metanol.

* p<0.05.

6. Linealidad y sensibilidad

Debido a los diferentes rangos de concentración de los lípidos, es muy importante que los métodos analíticos muestren un amplio rango dinámico y tengan suficiente sensibilidad para permitir la cuantificación de las moléculas presentes en concentraciones altas y bajas. Con el objetivo de determinar estos parámetros, se añadieron de modo creciente las cantidades de los SI antes de la preparación de la muestra desde los límites de detección hasta las concentraciones de lípidos presentes en el LCR y se elaboraron curvas de calibrado mediante la correlación entre la intensidad adquirida y la cantidad añadida. A partir de estos datos, se determinó el intervalo lineal del calibrado para cada IS, su expresión matemática, el coeficiente de correlación ($r^2 = 0.9902-0.9996$), la sensibilidad y los límites de detección y cuantificación (**Tabla 5**).

La sensibilidad se expresó mediante la pendiente de la curva de calibrado y los límites de detección y cuantificación se estimaron como 3 y 10 veces, respectivamente, la señal (altura de pico) del ruido de fondo.

Los SI 18:1(d7) LPC y ceramida (C12) mostraron las sensibilidades más altas mientras que 18:1(d7) CE resultó tener la más baja. Los valores más bajos de LOD y LOQ fueron para el LPC 18:1(d7) (LOD 0.4 ng/mL; LOQ 0.5 ng/mL) y los más altos para CE 18:1(d7) (LOD 3.56 µg/mL; LOQ 4.75 µg/mL). En resumen, los resultados obtenidos para los límites de cuantificación muestran que el método de precipitación del IPA es suficientemente sensible para la determinación de compuestos lipídicos en muestras de LCR.

Tabla 5: Linealidad y sensibilidad de los 19 estándares internos detectados.

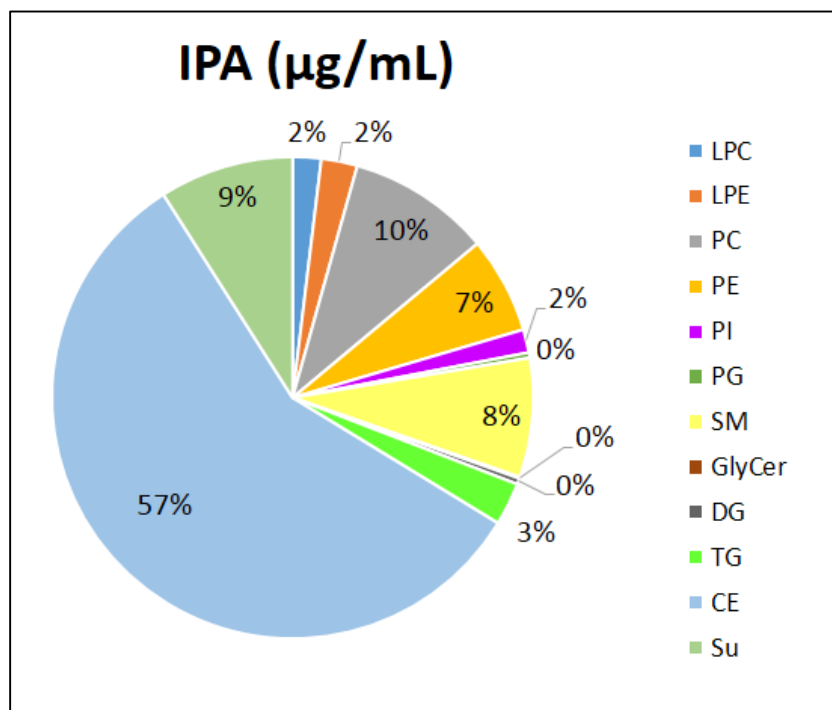
	Lípido	Rango lineal (µg/mL)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	Pendiente	Linealidad R ²
1	Sphingosine (C17)	0.010-0.36	0.0008	0.0010	88486	0.9902
2	Sphinganine (C17)	0.0009-0.36	0.0004	0.0009	87043	0.9978
3	18:1(d7) Lyso PC	0.0005-1.28	0.0004	0.0005	166788	0.9971
4	Sphingomyelin (C12)	0.0020-0.80	0.0015	0.0020	26659	0.9964
5	Lactosyl(β) C12 Ceramide	0.010-0.28	0.0039	0.010	7439	0.9937
6	Glucosyl(β) C12 Ceramide	0.0009-0.32	0.0006	0.0009	80719	0.9959
7	Ceramide (C12)	0.0006-0.24	0.0005	0.0006	263171	0.9987
8	d18:1-18:1(d9) SM	0.0031-1.55	0.0026	0.0031	37941	0.9928
9	15:0-18:1(d7) PC	0.014-8.04	0.013	0.014	29113	0.9943
10	15:0-18:1(d7) DG	0.0028-0.47	0.0009	0.0028	46809	0.9964
11	Ceramide (C25)	0.0014-0.16	0.00095	0.0014	97320	0.9973
12	15:0-18:1(d7) -15:0 TG	0.0080-2.87	0.0038	0.0080	11742	0.9996
13	18:1(d7) Chol Ester	4.75-17.81	3.56	4.75	7.3543	0.9910
14	18:1(d7) Lyso PE	0.025-0.26	0.015	0.025	12404	0.9981
16	15:0-18:1(d7) PI (NH4 Salt)	0.0086-0.45	0.0086	0.142	8706	0.9976
17	15:0-18:1(d7) PS (Na Salt)	0.034-0.21	0.013	0.034	3492	0.9970
18	15:0-18:1(d7) PG (Na Salt)	0.026-1.45	0.0130	0.0260	8706	0.9976
19	15:0-18:1(d7) PE	0.014-0.28	0.0079	0.0146	9290	0.9981

Nota. LOD = límite de detección; LOQ = límite de cuantificación.

7. Composición lipídica del LCR

La composición lipídica de sujetos sanos se determinó con el método de preparación de muestras con IPA. La cuantificación se calculó normalizando la intensidad del pico monoisotópico de cada especie a la intensidad del pico monoisotópico del SI correspondiente. Los GP y los derivados del colesterol fueron el 79,6% de los lípidos totales en el LCR tal y como muestran estudios anteriores^{40,42}. Los ésteres de colesterol representaron más del 50% de los lípidos. Dentro de la familia de los GP, los PC y PE fueron los más abundantes (9,6% y el 6,5%), seguidos de los PI (1,6%) y los PG (0,4%). La LPC y la LPE representaron alrededor del 5% de los lípidos totales. Los GL fueron menos del 4 %, mientras que los SP fueron el 18,1 % de los lípidos totales en el LCR (Figura 7).

Figura 7: Gráfica de los porcentajes de la composición lipídica mediante IPA.



Nota. LPC = lisofosfatidilcolina; LPE = lisofosfatidiletanolamina; PC = fosfatidilcolina; PE = fosfatidiletanolamina; PI = fosfatidilinositol; PG = fosfatidilglicerol; SM = esfingomielina; GlyCer = glucoceramida; DG = diglicerido; TG = triglicérido; CE = ésteres de colesterol; Su = sulfátidos.

Los estudios lipidómicos se centran sobre todo en la comparación del lipidoma de pacientes y controles, prestando mayor atención a los lípidos más abundantes como los GP^{14,43}, SP^{6,44} y esteroides. Estos trabajos no han proporcionado listados de las especies lipídicas detectadas. Según nuestro conocimiento, el único trabajo que muestra un listado de las familias y especies lipídicas detectadas en LCR en sujetos sanos mediante el método ESI, es la publicada en 2016 por Seyer y colaboradores²⁷. Al igual que en el presente trabajo, Seyer y colaboradores observaron que el TG era la clase lipídica y los GP la familia lipídica con mayor número de especies detectadas. Teniendo en cuenta la masa exacta, el tiempo de retención y los experimentos de MS/MS, identificaron algunas ceramidas, gangliósidos y glicerofosforilserinas que no fueron detectadas en nuestro estudio. Según algunos estudios, los GP, especialmente el PC y PI, y las SM del LCR podrían ser los biomarcadores más importantes a la hora de detectar enfermedades del sistema nervioso central^{14,44}. Estas especies lipídicas pueden ser fácilmente detectadas por ambas técnicas de preparación de muestra analizadas en este trabajo.

CONCLUSIONES

1. La preparación de muestras mediante isopropanol requiere menos tiempo, es más sencilla, menos tóxica y más barata que el cloroformo-metanol.
2. Las preparaciones de muestras mediante isopropanol y cloroformo-metanol son reproducibles.
3. La recuperación de lípidos es mayor con el isopropanol que con el cloroformo-metanol.
4. La preparación de muestras mediante isopropanol es el método más adecuado para los análisis lipídicos a gran escala en muestras de líquido cefalorraquídeo con el fin de explorar los cambios bioquímicos en los trastornos neurodegenerativos.

Nota: Como resultado de este trabajo, y en línea con este trabajo de tesis doctoral, nuestro grupo se encuentra analizando el LCR de 200 sujetos cognitivamente sanos con el objetivo de seguir profundizando en el conocimiento del papel de los lípidos cerebrales en los estadios más tempranos de la EA.

BIBLIOGRAFÍA

1. L. Y. Informatics and computational strategies for the study of lipids. *Mol. Biosyst.* 2008;4:121–127.
2. Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S9-14.
3. O'Brien JS, Sampson EL. Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin " J. *Lipid Res.* 1965;6:537–544.
4. Ghosh A, Nishtala K. Biofluid lipidome: a source for potential diagnostic biomarkers. *Clin. Transl. Med.* 2017;6(1):22.
5. Fonteh AN, Chiang J, Cipolla M, et al. Alterations in cerebrospinal fluid glycerophospholipids and phospholipase A2 activity in Alzheimer's disease. *J. Lipid Res.* 2013;54(10):2884–2897.
6. Kosicek M, Zetterberg H, Andreasen N, et al. Elevated cerebrospinal fluid sphingomyelin levels in prodromal Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 2012;516(2):302–305.
7. Mulder C, Wahlund L, Teerlink T, et al. Chapter 7 Decreased lysophosphatidylcholine / phosphatidylcholine ratio in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Neural Transm.* 2003;110:949–955.
8. Wood PL, Barnette BL, Kaye JA, et al. Non-targeted lipidomics of CSF and frontal cortex grey and white matter in control, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease subjects. *Acta Neuropsychiatr.* 2015;18:270–278.
9. Björkhem I, Lövgren-Sandblom A, Leoni V, et al. Oxysterols and Parkinson's disease: Evidence that levels of 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid correlates with the duration of the disease. *Neurosci. Lett.* 2013;555:102–105.
10. Gonzalo H, Brieva L, Tatzber F, et al. Lipidome analysis in multiple sclerosis reveals protein lipoxidative damage as a potential pathogenic mechanism. *J. Neurochem.* 2012;123(4):622–634.
11. Blasco H, Veyrat-Durebex C, Bocca C, et al. Lipidomics reveals cerebrospinal- fluid signatures of ALS. *Sci. Rep.* 2017;7. doi:10.1038/s41598-017-17389-9.
12. Mapstone M, Cheema AK, Fiandaca M, Xiaogang Z. Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nat. Med.* 2014;20(4):415–8.
13. Orešković D, Klarica M. The formation of cerebrospinal fluid: Nearly a hundred years of interpretations and misinterpretations. *Brain Res. Rev.* 2010;64(2):241–262.
14. Kosicek M, Kirsch S, Bene R, et al. Nano-HPLC–MS analysis of phospholipids in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients—a pilot study. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010;398(7-8):2929-37
15. Sato H, Tomimoto H, Ohtani R, et al. Astroglial expression of ceramide in Alzheimer's disease brains: A role during neuronal apoptosis. *Neuroscience* 2005;130(3):657–666.
16. Han X, Fagan AM, Cheng H, et al. Cerebrospinal fluid sulfatide is decreased in subjects with incipient dementia. *Ann. Neurol.* 2003;54(1):115–119.
17. Mulder M, Ravid R, Swaab DF, et al. Reduced levels of cholesterol, phospholipids, and fatty acids in cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients are not related to apolipoprotein E4. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 1998;12(July):198–203.

18. Cutler RG, Kelly J, Storie K, et al. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101(7):2070–5.
19. Bandaru VVR, Troncoso J, Wheeler D, et al. ApoE4 disrupts sterol and sphingolipid metabolism in Alzheimer's but not normal brain. *Neurobiol. Aging* 2009;30(4):591–599.
20. Tajima Y, Ishikawa M, Maekawa K, et al. Lipidomic analysis of brain tissues and plasma in a mouse model expressing mutated human amyloid precursor protein/tau for Alzheimer's disease. *Lipids Health Dis.* 2013;12:68.
21. Want EJ, Cravatt BF, Siuzdak G. The expanding role of mass spectrometry in metabolite profiling and characterization. *ChemBioChem* 2005;6(11):1941–1951.
22. Sommer U, Herscovitz H, Welty FK, Costello CE. LC-MS-based method for the qualitative and quantitative analysis of complex lipid mixtures. *J. Lipid Res.* 2006;47(4):804–814.
23. A J, Trygg J, Gullberg J, et al. Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome. *Anal. Chem.* 2005;77(24):8086–8094.
24. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959;37(8):911–917.
25. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957;226(1):497–509.
26. Colsch B, Seyer A, Boudah S, Junot C. Lipidomic analysis of cerebrospinal fluid by mass spectrometry-based methods. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2014;38(1):53–64.
27. Seyer A, Junot SBSBC, Colsch B. Annotation of the human cerebrospinal fluid lipidome using high resolution mass spectrometry and a dedicated data processing workflow. *Metabolomics* 2016;12:91.
28. Wood PL, Woltjer RL. Biomarkers for Alzheimer's Disease Drug Development. *Methods Mol. Biol.* 2018;1750:69–74.
29. Iverson SJ, Lang SL, Cooper MH. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids* 2001;36(11):1283–7.
30. Byeon SK, Lee JY, Moon MH. Optimized extraction of phospholipids and lysophospholipids for nanoflow liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analyst* 2012;137:451–458.
31. Reis A, Rudnitskaya A, Blackburn GJ, et al. A comparison of five lipid extraction solvent systems for lipidomic studies of human LDL. *J. Lipid Res.* 2013;54:1812–1824.
32. Sarafian MH, Gaudin M, Lewis MR, et al. Objective set of criteria for optimization of sample preparation procedures for ultra-high throughput untargeted blood plasma lipid profiling by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2014;86(12):5766–5774.
33. Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* 1993;43(11):2412–4.
34. Michopoulos F, Lai L, Gika H, et al. UPLC-MS-based analysis of human plasma for metabonomics using solvent precipitation or solid phase extraction. *J. Proteome Res.* 2009;8(4):2114–21.
35. Potts AM, Johnson L V. Studies on the visual toxicity of methanol. I. The effect of methanol and

- its degradation products on retinal metabolism. *Am. J. Ophthalmol.* 1952;35(5 2):107–13.
36. Weisburger EK. Carcinogenicity studies on halogenated hydrocarbons. *Environ. Health Perspect.* 1977;21:7–16.
 37. Meek ME, Beauchamp R, Long G, et al. Chloroform: Exposure estimation, hazard characterization, and exposure-response analysis. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part B* 2002;5(3):283–334.
 38. Murphy RC, Gaskell SJ. New applications of mass spectrometry in lipid analysis. *J. Biol. Chem.* 2011;286(29):25427–25433.
 39. Han X, Holtzman DM, McKeel DW. Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *J. Neurochem.* 2001;77(4):1168–80.
 40. Illingworth DR, Glover J. The composition of lipids in cerebrospinal fluid of children and adults. *J. Neurochem.* 1971;18(5):769–76.
 41. Hughes TM, Rosano C, Evans RW, Kuller LH. Brain cholesterol metabolism, oxysterols, and dementia. *J Alzheimers Dis* 2013;33(4):891–911.
 42. Tourtellotte WW. Study of lipids in cerebrospinal fluid. VI. The normal lipid profile. *Neurology* 1959;9(6):375–83.
 43. Walter A, Korth U, Hilgert M, et al. Glycerophosphocholine is elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *Neurobiol. Aging* 2004;25(10):1299–303.
 44. Torretta E, Arosio B, Barbacini P, et al. Particular CSF sphingolipid patterns identify iNPH and AD patients. *Sci. Rep.* 2018;8(1):13639.

ANEXO I

Composición lipídica del líquido cefalorraquídeo

Estructura lipídica	m/z	Tiempo de retención (min)	Media RSD (%; n=5 muestras QC)	Coefficiente de correlación entre áreas de cromatografía y diluciones de QC	CHCl ₃ -MeOH Área de pico de cromatografía	IPA Área de pico de cromatografía
[CE(18:2)+Na] ⁺	671.5726	15.15	10.34	0.98863	6177	4274
[CE(18:1)+Na] ⁺	673.5853	15.49	11.84	0.94431	2051	1703
[CE(20:4)+Na] ⁺	695.5789	14.94	13.46	0.97568	4529	3531
[CE(20:3)+Na] ⁺	697.6044	15.47	25.66	0.81209	1934	1329
[CE(22:6)+Na] ⁺	719.5793	14.75	15.02		1384	1061
[DG(34:2)+Na] ⁺	615.4955	8.27	5.95		744	3951
[DG(34:1)+Na] ⁺	617.5120	10.36	4.20	0.99893	777	4907
[DG(36:4)+Na] ⁺	639.4951	6.89	5.73		440	1520
[DG(36:3)+Na] ⁺	641.5105	8.55	1.00	0.99209	634	4977
[DG(36:2)+Na] ⁺	643.5251	10.61	2.86	0.99560	932	7107
[HexCer(d18:1/24:1)+Na] ⁺	832.6627	10.81	9.96	0.99743	2481	2887
[LPC(14:0)+H] ⁺	468.3146	0.77	11.39	0.97081	1114	972
[LPC(15:0)+H] ⁺	482.3214	0.85	6.89	0.99536	3515	340487
[LPC(16:1)+H] ⁺	494.3173	0.84	3.36	0.99849	682	2894
[LPC(16:0)+H] ⁺	496.3443	0.97	1.98	0.99204	2282	45030
[LPC(16:0)+Na] ⁺	518.3243	0.96	6.02	0.99111	690	17885
[LPC(P16:0)+H] ⁺	480.3364	1.03	7.69	0.99574	1134	2619
[LPC(17:0)+H] ⁺	510.3688	1.02	5.96	0.99538	3324	3626
[LPC(18:2)+H] ⁺	520.3260	0.85	7.24	0.99809	939	6203
[LPC(18:1)+H] ⁺	522.3535	1.01	5.39	0.99896	1263	60433

[LPC(18:0)+H]+	524.3726	1.28	5.00	0.99895	1546	8679
[LPC(P18:0)+H]+	508.3109	0.98	7.29	0.98320	910	1840
[LPC(20:5)+H]+	542.3302	0.84	3.84	0.99421	1065	2469
[LPC(20:4)+H]+	544.3373	0.94	2.56	0.99842	925	19407
[LPC(20:3)+H]+	546.3534	0.91	1.70	0.99439	1314	4244
[LPC(20:2)+H]+	548.3626	0.99	5.22	0.98976	2725	1042
[LPC(20:1)+H]+	550.3753	1.00	4.66	0.98805	6827	23344
[LPC(22:6)+H]+	568.3532	0.95	4.14	0.98803	2266	7455
[LPC(22:4)+H]+	572.3714	0.93	3.31	0.98958	2261	1452
[PC(30:0)+H]+	706.5429	4.44	4.56	0.99228	59671	54525
[PC(31:0)+H]+	720.5551	5.12	6.52		3135	2532
[PC(32:1)+H]+	732.5527	4.66	2.46	0.99624	34210	28333
[PC(32:0)+H]+	734.5660	5.81	3.30	0.98875	147706	118331
[PC(32:0)+Na]+	756.5432	5.81	4.05	0.98086	21013	17241
[PC(O32:1)+H]+/[PC(P32:0)+H]+	718.5730	6.57	4.70	0.99563	2967	3089
[PC(O32:1)+H]+/[PC(P32:0)+H]+	718.5736	5.47	7.66		2409	2343
[PC(O32:0)+H]+	720.5890	6.83	3.32	0.99594	2823	2826
[PC(33:1)+H]+	746.5697	5.24	7.35	0.99664	6684	6019
[PC(34:3)+H]+	756.5425	4.23	5.99		4132	4430
[PC(34:2)+H]+	758.5668	4.89	4.28	0.99792	48620	40814
[PC(34:2)+Na]+	780.5570	4.89	4.11		5549	5037
[PC(34:1)+H]+	760.5893	5.97	5.06	0.96829	2358755	1937327
[PC(34:1)+Na]+	782.5698	5.97	4.01	0.99699	231373	203007
[PC(34:0)+H]+	762.5926	5.97	5.21	0.98367	132143	106138
[PC(O34:3)+H]+/[PC(P34:2)+H]+	742.5753	5.48	5.97		1992	1840
[PC(O34:2)+H]+/[PC(P34:1)+H]+	744.5893	6.75	4.27	0.99925	13504	13282
[PC(O34:2)+Na]+	766.5777	6.71	2.85		7415	4214
[PC(O34:1)+H]+/[PC(P34:0)+H]+	746.6050	6.99	1.77	0.99974	11732	12744

[PC(O34:0)+H]+	748.6193	9.00	10.52		1036	1232
[PC(35:2)+H]+	772.5865	5.21	1.59	0.98998	10644	8836
[PC(35:1)+H]+	774.5996	6.82	4.37		4217	3628
[PC(35:0)+H]+	776.6014	5.24	2.39		138753	137088
[PC(36:4)+H]+	782.5709	4.70	3.23	0.95758	71668	57564
[PC(36:4)+Na]+	804.5529	4.69	2.93	0.99705	12812	10589
[PC(36:3)+H]+	784.5855	5.20	1.69	0.99935	19857	17680
[PC(36:2)+H]+	786.6002	6.21	3.22	0.99660	58506	49347
[PC(36:1)+H]+	788.6136	7.84	0.87	0.99910	60348	52001
[PC(O36:5)+H]+/[PC(P36:4)+H]+	766.5750	5.21	4.93	0.99417	6857	7168
[PC(O36:4)+H]+/[PC(P36:3)+H]+	768.5957	5.46	2.84	0.99782	6228	5940
[PC(O36:3)+H]+/[PC(P36:2)+H]+	770.6044	6.91	8.46	0.99856	2409	2314
[PC(O36:2)+H]+/[PC(P36:1)+H]+	772.6204	8.86	7.48		1984	2172
[PC(O36:2)+H]+/[PC(P36:1)+H]+	772.6205	7.18	12.98		1860	1909
[PC(38:6)+H]+	806.5662	4.39	2.53	0.97806	240643	195448
[PC(38:5)+H]+	808.5817	6.15	4.66	0.99761	9822	8160
[PC(38:4)+H]+	810.6001	6.10	4.54	0.99725	77654	61413
[PC(38:4)+Na]+	832.5816	6.10	4.69	0.99136	12654	10626
[PC(38:3)+H]+	812.6162	6.85	6.09	0.99889	7637	6548
[PC(38:2)+H]+	814.6340	7.95	6.68		2729	2439
[PC(O38:5)+H]+/[PC(P38:4)+H]+	794.6003	5.55	2.31	0.97214	5962	5538
[PC(O38:5)+H]+/[PC(P38:4)+H]+	794.6042	6.85	8.63		1806	1901
[PC(40:7)+H]+	832.5864	4.46	2.37	0.99714	10046	8190
[PC(40:6)+H]+	834.5983	5.68	4.28	0.99347	14920	12310
[PC(40:6)+Na]+	856.5804	5.68	6.86		4262	3654
[PC(40:5)+H]+	836.6070	6.17	7.25		2183	2541
[PC(40:4)+H]+	838.6241	7.42	27.32		2034	1870
[PC(O40:7)+H]+/[PC(P40:6)+H]+	818.5984	5.21	9.12		1501	1543

[PC(44:4)+H]+	894.7150	14.96	9.37		3262	2431
[PC(44:2)+H]+	898.7286	15.39	6.88		4164	2806
[SM(d18:1/14:0)+H]+	675.5368	3.41	2.90	0.99298	2759	2636
[SM(d18:1/15:0)+H]+	689.5536	3.85	4.05		1351	1363
[SM(d18:1/16:1)+H]+	701.5582	3.55	2.78	0.99647	5042	4868
[SM(d18:1/16:1)+Na]+	723.5400	3.55	2.24		976	1134
[SM(d18:1/16:0)+H]+	703.5752	4.38	3.52	0.96878	593835	668861
[SM(d18:1/16:0)+Na]+	725.5525	4.37	1.01	0.97181	48120	51839
[SM(d18:0/16:0)+H]+	705.5777	4.38	2.62	0.98649	29925	33917
[SM(d18:0/16:0)+Na]+	727.5623	4.37	5.94	0.99315	4161	4270
[SM(d18:1/17:0)+H]+	717.5722	5.08	11.79		2176	2249
[SM(d18:1/18:1)+H]+	729.5829	4.52	0.72	0.98668	19742	20039
[SM(d18:1/18:0)+H]+	731.6062	5.70	2.47	0.99129	46588	49070
[SM(d18:1/19:1)+H]+	743.6056	4.39	6.96		1547	1398
[SM(d18:1/20:3)+H]+	801.6855	11.33	7.96		1483	1639
[SM(d18:1/20:1)+H]+	757.6260	5.19	1.90	0.99788	23007	19405
[SM(d18:1/20:0)+H]+	759.6372	7.51	2.87	0.99765	5635	6046
[SM(d18:1/20:0)+Na]+	781.6184	7.51	6.48		1199	1187
[SM(d18:1/21:0)+H]+	773.6390	8.77	25.60		1738	1781
[SM(d18:1/22:1)+H]+	785.6498	7.80	3.10	0.99676	5271	5491
[SM(d18:1/22:0)+H]+	787.6681	9.88	5.15	0.99488	7199	7509
[SM(d18:0/22:0)+H]+	789.6796	9.89	11.58		1240	1304
[SM(d18:1/23:1)+H]+	799.6694	8.99	9.75		2577	2909
[SM(d18:2/24:1)+H]+	811.6647	7.77	2.46	0.99801	8111	8699
[SM(d18:2/24:1)+Na]+	833.6458	7.77	1.47		1733	1869
[SM(d18:1/24:1)+H]+	813.6843	9.79	1.50	0.99585	19277	20226
[SM(d18:1/24:0)+H]+	815.6979	12.72	0.90		4173	4043
[SM(d18:1/24:0)+Na]+	837.6788	12.73	6.85		1157	1299

[TG(44:2)+NH4]+	764.6893	14.10	7.66		720	698
[TG(44:1)+NH4]+	766.6944	14.42	4.63		1428	1172
[TG(44:0)+NH4]+	768.7074	14.74	8.99		1378	1262
[TG(45:1)+NH4]+	780.7060	14.59	6.77		1677	1465
[TG(45:0)+NH4]+	782.7213	14.91	4.22		6233	3285
[TG(46:2)+NH4]+	792.7087	14.49	6.19		1869	1698
[TG(46:1)+NH4]+	794.7201	14.78	10.42	0.68720	3752	3095
[TG(46:0)+NH4]+	796.7283	15.06	2.40	0.71060	4708	4025
[TG(47:2)+NH4]+	806.7227	14.68	1.76		2559	1885
[TG(47:1)+NH4]+	808.7388	14.93	3.99	0.62200	4336	3444
[TG(47:0)+NH4]+	810.7522	15.19	7.06	0.29765	4366	3418
[TG(48:3)+NH4]+	818.7195	14.52	2.15		1679	1254
[TG(48:2)+NH4]+	820.7370	14.84	6.26	0.96889	8506	5078
[TG(48:1)+NH4]+	822.7523	15.09	2.62	0.96559	12239	8568
[TG(48:0)+NH4]+	824.7703	15.33	3.30	0.87665	14533	10648
[TG(49:2)+NH4]+	834.7501	15.07	2.68	0.99904	375420	282691
[TG(49:1)+NH4]+	836.7572	15.08	2.11	0.99066	37068	28213
[TG(49:0)+NH4]+	838.7825	15.48	15.70	0.79721	3989	3053
[TG(50:3)+NH4]+	846.7527	14.82	8.10		7786	4258
[TG(50:2)+NH4]+	848.7682	15.11	6.01	0.97617	34273	17868
[TG(50:0)+NH4]+	852.8027	15.58	4.87	0.26216	42436	24203
[TG(51:4)+NH4]+	856.7681	15.35	5.74		7651	5081
[TG(51:3)+NH4]+	860.7685	14.99	0.60		2038	1437
[TG(51:2)+NH4]+	862.7853	15.26	8.25		4341	2600
[TG(51:1)+NH4]+	864.7997	15.49	7.05	0.76966	4143	2788
[TG(51:0)+NH4]+	866.8116	15.68	2.13		1551	1134
[TG(52:5)+NH4]+	870.7542	14.57	14.61		2149	1272
[TG(52:4)+NH4]+	872.7828	14.87	6.72	0.97708	13629	7187

[TG(52:3)+NH4]+	874.7808	15.12	13.71	0.98723	122146	43797
[TG(52:2)+NH4]+	876.8017	15.38	10.66	0.99045	212389	54062
[TG(52:1)+NH4]+	878.8122	15.41	10.40	0.97172	29783	9694
[TG(52:0)+NH4]+	880.8289	15.85	1.46	0.14904	19082	11254
[TG(53:3)+NH4]+	888.8083	15.24	5.51		2488	1356
[TG(53:2)+NH4]+	890.8163	15.53	4.82		4434	2303
[TG(53:1)+NH4]+	892.8281	15.65	10.21		2356	1197
[TG(54:6)+NH4]+	896.7734	14.63	1.08		2684	1722
[TG(54:5)+NH4]+	898.7907	14.89	6.66	0.92101	11874	6140
[TG(54:4)+NH4]+	900.8124	15.12	8.79	0.99610	83592	31615
[TG(54:3)+NH4]+	902.8161	15.40	11.18	0.97993	156433	42233
[TG(54:2)+NH4]+	904.8269	15.53	9.82	0.95111	39641	11969
[TG(54:1)+NH4]+	906.8578	15.78	11.79	0.02635	4684	1675
[TG(54:0)+NH4]+	908.8648	16.10	4.91	0.32893	5071	3005
[TG(55:2)+NH4]+	918.8529	15.62	2.26		1940	767
[TG(55:0)+NH4]+	922.8809	16.27	15.38	0.26947	860	506
[TG(55:0)+NH4]+	922.8831	15.58	13.25		1025	741
[TG(56:5)+NH4]+	926.8072	15.18	15.71		4102	2265
[TG(56:4)+NH4]+	928.8320	15.42	5.48		3892	1841
[TG(56:3)+NH4]+	930.8427	15.61	4.67		3884	1688
[TG(56:2)+NH4]+	932.8670	15.90	11.61		2583	865
[TG(56:0)+NH4]+	936.8944	16.36	8.78		1246	722
[TG(58:1)+NH4]+	962.9066	16.38	6.43	0.22706	1133	519
[FA(16:0)-H]-	255.2299	0.95	13.36		210	401
[FA(18:1)-H]-	281.2447	2.10	3.96		322	181
[FA(18:0)-H]-	283.2596	2.81	20.48	0.93955	684	734
[PE(34:1)-H]-	716.5198	4.69	10.34		522	390
[PE(34:0)-H]-	718.5403	5.82	13.68	0.99878	1172	877

[PE(36:2)-H]-	742.5508	4.27	3.43	0.99851	8898	6774
[PE(36:1)-H]-	744.5544	5.98	3.57	0.99482	3654	2980
[PE(P36:0)-H]-	722.5090	5.65	12.14		306	401
[PE(38:4)-H]-	766.5387	4.70	13.24		603	458
[PE(38:3)-H]-	768.5588	4.51	6.02		830	147
[PE(38:2)-H]-	770.5727	6.27	23.92		517	457
[PE(38:1)-H]-	772.5902	7.85	9.75		514	466
[PE(P38:6)-H]-	746.5121	5.23	14.23	0.99191	904	1026
[PE(P38:4)-H]-	750.5449	7.43	10.48	0.98096	665	850
[PE(40:6)-H]-	790.5398	6.09	2.74	0.99830	1034	995
[PE(40:4)-H]-	794.5574	6.05	8.81	0.98991	848	742
[PE(P40:7)-H]-	772.5265	5.36	17.19		388	443
[PE(P40:6)-H]-	774.5442	6.86	4.52	0.99671	2167	2606
[PE(42:7)-H]-	816.5550	4.38	4.21		301	273
[PG(34:1)-H]-	747.5133	5.23	6.92		560	590
[PG(36:1)-H]-	775.5474	6.86	3.27	0.99757	1218	1508
[PI(36:0)-H]-	865.5920	5.24	1.88	0.91361	3218	2751
[PI(38:4)-H]-	885.5492	4.62	10.87	0.99412	1592	1284
[LPE(18:1)-H]-	478.2946	0.83	5.71		136	313
[LPE(18:0)-H]-	480.3103	0.96	2.75	0.99607	213	3173
[LPE(P18:0)-H]-	464.3099	1.55	6.86		145	442
[LPE(20:2)-H]-	504.2929	0.83	17.91	0.98880	151	480
[LPE(20:1)-H]-	506.3233	1.00	0.81	0.99789	168	2603
[LPE(20:0)-H]-	508.3379	1.29	7.50	0.99423	221	816
[LPE(22:5)-H]-	526.3129	0.85	5.65	0.99853	148	1791
[LPE(22:4)-H]-	528.3049	0.83	6.58	0.99760	152	699
[LPE(22:3)-H]-	530.3211	0.87	7.17	0.98657	197	371

Nota. RSD = desviación estándar relativa; m/z = masa/carga; QC = control de calidad; IPA = isopropanol; CHCl₃-MeOH = cloroformo-metanol.

ANEXO II

Manuscrito publicado

Journal: Talanta. 2019;195:619-627

Title: Isopropanol extraction for cerebrospinal fluid lipidomic profiling analysis

Authors: Ane Iriondo, Mikel Tainta, Jon Saldias, Maria Arriba, Begona Ochoa, Felix M. Goni, Pablo Martinez-Lage, Beatriz Abad-Garcia.

Abstract: The cerebrospinal fluid (CSF) lipidome is attracting increasing attention due to the importance of lipids in brain molecular signaling and their involvement in several neurological diseases. Different solvent systems have been used for the extraction of multiple lipid classes from CSF but no comparative study of the effectiveness of these protocols has been carried out. To optimize CSF lipid extraction for lipidomic measurements by untargeted ultrahigh performance liquid chromatography – mass spectrometry, we evaluate and compare two sample preparation protocols, one involving protein precipitation with isopropanol (IPA) and other consisting of a liquid-liquid extraction with chloroform-methanol. For that purpose, human CSF from neurologically healthy and normolipidemic volunteers was used. The criteria established to compare these two methods were based on four critical aspects of sample preparation: simplicity, lipid coverage, reproducibility and recovery efficiencies. We found that both methods were highly reproducible techniques (> 75% of the lipids with coefficient of variation (CV)<30%). In terms of recovery, the single-step IPA procedure yielded better values for most of the lipid classes and it was less toxic and simpler than the liquid-liquid extraction method. In relation to lipid coverage, variation in selectivity was observed between methods, providing evidence that IPA was more selective for polar lipids. Overall, IPA precipitation provides excellent results in terms of simplicity of execution, lipid coverage, reproducibility and recovery. We conclude that it is a choice procedure for large-scale, untargeted lipid profiling using UHPLC-MS in CSF analysis.

CAPÍTULO

05

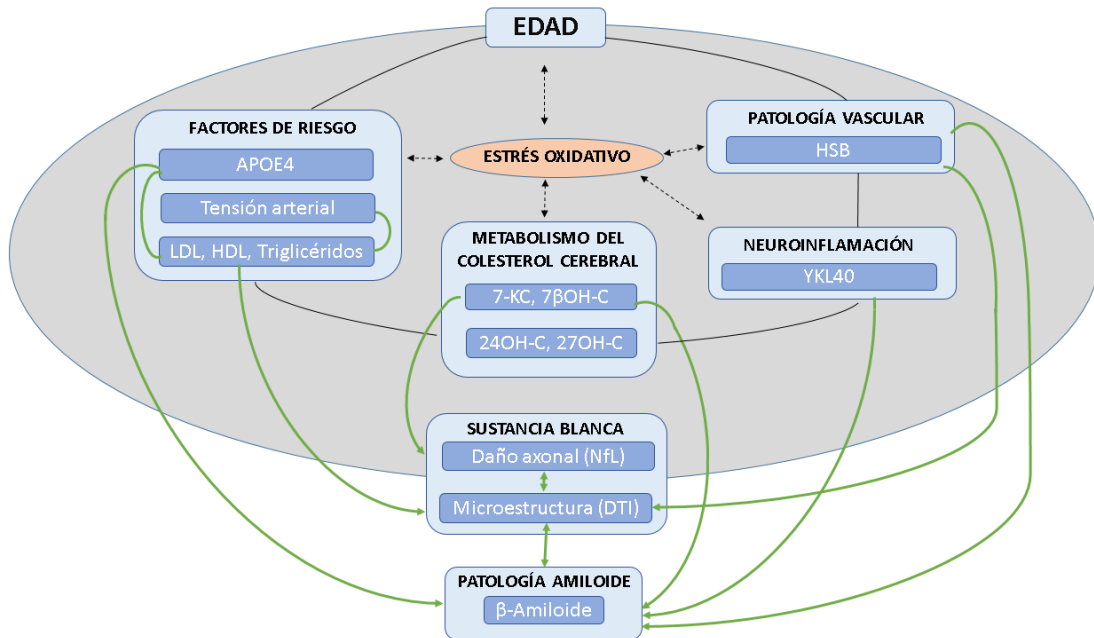


Discusión general

DISCUSIÓN GENERAL

El enfoque lipidómico en la investigación de la enfermedad de Alzheimer (EA) ha contribuido a mejorar nuestro conocimiento sobre los mecanismos fisiopatológicos de esta enfermedad ¹. Debido a la importancia de los lípidos en la reparación y mantenimiento de las membranas axonales y vainas mielínicas de la sustancia blanca (SB) ², el metabolismo lipídico podría estar también relacionado con los cambios tempranos descritos en la microestructura de la SB en la fisiopatología de la EA ³. Con el objetivo de estudiar estos posibles mecanismos moleculares que podrían ser previos a la acumulación del β -amiloide₁₋₄₂ (β A₁₋₄₂), en esta tesis se ha investigado si la variabilidad interindividual de los niveles lipídicos, concretamente los relacionados con el metabolismo del colesterol, se relaciona con la microestructura de la SB y los biomarcadores establecidos de la EA en sujetos cognitivamente sanos. En el capítulo 2 se ha estudiado la asociación entre los lípidos plasmáticos y la microestructura de la SB. El objetivo del capítulo 3 ha sido determinar la relación entre el metabolismo cerebral del colesterol, concretamente los oxisteroles, la microestructura de la SB y los biomarcadores de EA. Con el fin de determinar, además de los metabolitos del colesterol, la relación entre las principales familias lipídicas del cerebro y la fisiopatología de la EA, en el capítulo 4 se ha llevado a cabo la puesta a punto de la metodología del análisis del lipidoma en el líquido cefalorraquídeo (LCR). En este capítulo final, se han integrado los resultados de toda la tesis y se han determinado las posibles implicaciones y líneas futuras de investigación. La **Figura 1** muestra las asociaciones investigadas integradas en un esquema teórico.

Figura 1: Contexto fisiopatológico hipotético pre-amiloide.



Nota. Las flechas verdes representan asociaciones significativas entre factores descritos en esta tesis. 7-KC = 7-ketocolesterol; 7βOH-C = 7beta-hidroxicolesterol; 24OH-C = 24-hidroxicolesterol; 27OH-C = 27-hidroxicolesterol; APOE4 = portador del alelo ε4 de la Apolipoproteína E; HSB = hiperintensidades de la sustancia blanca; NfL = neurofilamento de cadena ligera.

RESULTADOS PRINCIPALES

1. Metabolismo del colesterol y microestructura de la sustancia blanca

En sujetos cognitivamente sanos, un mayor nivel de lipoproteínas de colesterol de baja densidad (LDL) y triglicéridos (TG) en plasma y de 7-cetocolesterol (7-KC) en LCR por un lado, y una disminución de las lipoproteínas de colesterol de alta densidad (HDL) en plasma por otro, se asocian a cambios en la mayoría de las regiones de la SB relacionadas con la cognición. Estos cambios consisten en menor anisotropía fraccional (FA) y mayor difusividad media (MD), difusividad axial (AxD) y difusividad radial (RD) en el caso de 7-KC, menor AxD en los casos de LDL y TG y mayor AxD en el caso de HDL. La AxD se relaciona con daño axonal (neurofilamento). El 7-KC y el colesterol LDL moderan la relación existente entre los niveles de neurofilamento de cadena ligera (NfL) y el índice de la AxD. Además, nuestros resultados confirman el hecho de que factores de riesgo como la edad ⁴, las hiperintensidades de la sustancia blanca (HSB)⁵ o la hipertensión ⁶ afectan también a la microestructura de la SB. La asociación entre el metabolismo del colesterol plasmático y cerebral y la microestructura de la SB es independiente de estos factores de riesgo.

2. Metabolismo del colesterol cerebral y biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer

El 7-KC y 7beta-hidroxicolesterol (7β-OHC) muestran una asociación significativa con el βA₁₋₄₂. En el estudio transversal, un mayor nivel de 7-KC se asocia a niveles más bajos de βA₁₋₄₂. En el estudio longitudinal, a mayor nivel de 7β-OHC en la visita basal, menor es el aumento de los niveles de βA₁₋₄₂ al cabo de 2.8 años. Nuestros resultados añaden nuevas pruebas clínicas a los resultados de los estudios experimentales existentes sobre la relación entre estos oxisteroles y βA₁₋₄₂ ⁷⁻¹⁰. Dichos oxisteroles no muestran una relación directa con factores de riesgo como la edad, tensión o genotipo de la Apolipoproteína E (APOE) y tampoco con procesos moleculares tales como la patología Tau, patología vascular, neuroinflamación o daño axonal.

3. Biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer, microestructura de la sustancia blanca y metabolismo del colesterol cerebral

En línea con la bibliografía, nuestros resultados muestran que una disminución de los niveles de βA_{1-42} se asocia a cambios en la microestructura de la SB en regiones concretas del fornix, cuerpo calloso, fascículo longitudinal inferior e hipocampo^{3,6,11,12}. Además, de acuerdo con estudios previos en sujetos portadores de APOE4 y en sujetos con EA determinada genéticamente, nuestro trabajo muestra que la microestructura del fórnix se encuentra más alterada en sujetos con marcadores positivos de βA ^{13,14}. Estos sujetos $\beta A+$ corresponderían a personas con EA preclínica Grado 1/2 según Sperling¹⁵, a personas en riesgo de EA según el grupo internacional de trabajo¹⁶ o a personas A+ en la clasificación A/T/N¹⁷. Por otro lado, un mayor valor de MD y RD del fascículo longitudinal superior en la visita basal se asocia a un menor incremento de los niveles de βA_{1-42} al cabo de dos años. El 7-KC no es moderador ni mediador del efecto del βA_{1-42} sobre la microestructura de esas regiones.

4. Técnicas de análisis de la lipidómica

La lipidómica en el LCR es compleja debido a la baja concentración de lípidos. En esta tesis hemos demostrado que la preparación de muestras mediante isopropanol es más efectiva, sencilla, barata y reproducible que el procedimiento con cloroformo-metanol.

CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

1. Fortalezas

La principal fortaleza de este trabajo, que se ha realizado en el contexto del estudio longitudinal del Proyecto Gipuzkoa Alzheimer (PGA), radica en que se trata de un estudio que ha permitido analizar de manera rigurosa una cohorte de sujetos de mediana edad, exhaustivamente fenotipada, reclutada en un único centro con datos clínicos, bioquímicos y radiológicos muy detallados. Además, en los presentes estudios se han aplicado criterios de selección clínicos, cognitivos y radiológicos estrictos, con el objetivo de excluir posibles contaminaciones en los resultados debidas a la presencia de personas con síntomas psicológicos o psiquiátricos (Capítulo 2-4). Una de las grandes dificultades de este tipo de estudios es que los sujetos accedan a la realización de la punción lumbar para la obtención de LCR. Pese a ello, se ha dispuesto de muestras de LCR en la visita basal y visita longitudinal (Capítulo 3). Los niveles de estos biomarcadores y de los oxisteroles se han determinado en centros de referencia y se consideran fiables. Además, mediante la puesta a punto de la metodología, se ha podido aportar un perfil lipidómico de referencia del LCR en personas sin trastorno del metabolismo lipídico y cognitivamente sanas (Capítulo 4).

2. Limitaciones

Una de las limitaciones más importantes tiene que ver con que los participantes son personas voluntarias, lo que implica que no se puede descartar cierto sesgo de reclutamiento con la consiguiente limitación de que los resultados no sean generalizables al resto de la población (Capítulo 2 y 3). Además, en los estudios en los que se empleó la técnica de imagen por tensor de difusión hay que tener en cuenta que los índices de la DTI son una medida indirecta de la microestructura de la SB y que la interpretación es muy compleja (Capítulo 2,3). No se han podido sacar conclusiones robustas del estudio longitudinal de biomarcadores. El número de personas en los que los niveles de βA_{1-42} disminuyen, tal y como sería esperable en presencia de patología amiloide, ha sido muy pequeño. En la muestra total se ha observado un aumento de los niveles de este biomarcador. La interpretación biológica o patológica de este aumento es incierta y probablemente exige tiempos de seguimiento más largos. Las condiciones preanalíticas y analíticas han sido las mismas para las muestras basales y longitudinales. Hubiera sido

deseable contar con la información aportada por estudios de PET-amiloide. Estos datos habrían permitido estudiar relaciones topográficas entre los depósitos de amiloide y los cambios en la microestructura de las regiones de la SB analizadas.

IMPLICACIONES

Los hallazgos de esta tesis proporcionan información sobre la implicación del metabolismo del colesterol en la fisiopatología de la EA y podrían contribuir al planteamiento de posibles estrategias de prevención sobre factores de riesgo modificables.

1. Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer

Durante las últimas décadas, la investigación de los biomarcadores de la EA se ha centrado en el βA_{1-42} como principal protagonista en el comienzo de su patogénesis. La mayoría de los estudios sugieren que la agregación del βA_{1-42} desencadena una serie de mecanismos que conducen a la neurodegeneración, patología sináptica, muerte celular y deterioro cognitivo^{18,19}. Aunque todavía la “hipótesis de la cascada amiloide” domine la investigación sobre la EA y cuente con el apoyo de muchos estudios, se ha puesto en tela de juicio por su falta de comprensión e integridad^{20,21}. En esta línea, cabe destacar la importancia de investigar y conocer los procesos previos a la aparición de la patología amiloide. En este sentido, nuestros hallazgos en personas cognitivamente sanas y con biomarcadores de EA con medias dentro del rango de normalidad, nos ofrecen una gran ventana de oportunidad para el estudio de algunas de estas posibles vías, concretamente las vías relacionadas con el metabolismo del colesterol. Nuestros hallazgos apoyan el carácter multifactorial de la patología²² y sugieren diversos mecanismos paralelos en el escenario de la enfermedad. Por un lado, el 7-KC y 7 β -OHC podrían estar involucrados en los procesos de amiloidogénesis^{9,10} y en este sentido podrían ser uno de los nexos de unión entre el estrés oxidativo, la alteración del metabolismo del colesterol cerebral y la aparición de la patología amiloide propia de la EA. Por otro lado, y aunque a diferencia del colesterol estos oxisteroles posean fuertes efectos pro-inflamatorios^{23,24}, nuestros resultados sugieren que el papel de estos oxisteroles y el del YKL40 en el proceso amiloidogénico se llevaría a cabo por diferentes vías moleculares. Respecto a la afectación de la SB, diversos factores de riesgo y procesos moleculares se asocian a cambios en su microestructura independientemente del efecto del propio envejecimiento del cerebro. Por un lado, y de acuerdo con la bibliografía, hemos observado que factores de riesgo como la edad⁴ o factores de riesgo vasculares tales como la hipertensión⁶ o los niveles de LDL, HDL y TG²⁵, alteran esta microestructura. Por otro lado, la patología supuestamente vascular (HSB)⁵ y el daño axonal^{26,27} se asocian a cambios en la

microestructura. Por último, y por primera vez según nuestros conocimientos, nuestro estudio demuestra que el metabolismo del colesterol cerebral resultante del estrés oxidativo se asocia también a estas alteraciones. Ninguno de estos cambios de la microestructura de SB que se asocian con estos factores y procesos moleculares parecen seguir un patrón específico. No obstante, parecen más extensos en regiones de la SB que por su mielinización tardía y mayor demanda de recambio lipídico serían más vulnerables a distintas patologías, incluida la patología amiloide. En esta línea, podrían aumentar la vulnerabilidad a la patología amiloide antes de su aparición. El efecto del βA_{1-42} se observa en las regiones directamente relacionadas con las áreas cerebrales donde tienen lugar los depósitos patológicos de amiloide. En cualquier caso, se necesitarían estudios longitudinales con un tiempo de seguimiento mayor al aplicado en nuestro estudio para confirmar estas conclusiones.

2. Estudios de prevención

Los estudios de prevención se pueden dividir en tres categorías: prevención primaria, para prevenir la acumulación de βA_{1-42} ; prevención secundaria, para reducir el impacto y la progresión de la ya existente patología antes de que aparezcan los primeros síntomas; y prevención terciaria, para controlar las manifestaciones clínicas y maximizar la calidad de vida. Nuestros resultados se centran en personas cognitivamente sanas con una media de los niveles de los biomarcadores dentro del rango de normalidad y podrían ayudar en el diseño de los estudios de prevención primaria. Por un lado, nuestros resultados apoyan el conocimiento de que la EA es una enfermedad multifactorial, por lo que se necesitarían ensayos multifactoriales ²². Además de las terapias anti- βA_{1-42} ²⁸⁻³⁰, anti-tau ³¹ o anti-inflamatorias ³² que se están llevando a cabo, se deberían considerar las terapias anti-oxidantes. La insuficiencia metabólica propia del cuerpo humano aumenta con la edad, y trae consigo procesos como el estrés oxidativo³³, lo que puede conducir a la acumulación de compuestos patógenos como el 7-KC en las células seniles causando efectos nocivos y muerte celular. Para prevenir los procesos patológicos inducidos o relacionados con los oxisteroles, se podrían utilizar enfoques terapéuticos mediante moléculas anti-oxidantes como la N-acetilcisteína, vitamina E, polifenoles o lípidos deuterados^{33,34}. Algunos estudios demuestran que el 7-KC y 7 β -OHC se pueden ingerir también mediante ciertos alimentos industriales ³⁵, por lo que una dieta adecuada podría influir también en nuestros niveles de los oxisteroles. A la hora del diseño de los estudios, nuestros resultados muestran la importancia del metabolismo del colesterol y en este sentido no nos podemos

olvidar de las estatinas. Aunque la mayoría de los ensayos clínicos con estatinas en pacientes con EA han sido negativos, y el tratamiento de las estatinas no se asocia a un cambio longitudinal de los biomarcadores de EA en sujetos sanos ³⁶, puede que una intervención más multifactorial como puede ser un tratamiento mixto de anti-oxidantes y estatinas tenga algún efecto preventivo sobre la acumulación de βA_{1-42} ³³ y la microestructura de la SB. En cualquier caso, y observando todos los factores de riesgo relacionados con la edad, las intervenciones en el estilo de vida podrían ser más beneficiosas si se cambiara de un enfoque único a uno personalizado, teniendo en cuenta la edad. Las relaciones entre todos los factores de riesgo modificables y la patología de la EA deberían investigarse a fondo en diferentes grupos de edad.

LÍNEAS FUTURAS

A pesar de que nuestros estudios hayan proporcionado nuevas perspectivas en la fisiopatología de la EA, hayan mejorado nuestra comprensión sobre la importancia del metabolismo del colesterol en esta enfermedad y se hayan establecido técnicas de análisis, quedan cuestiones por resolver.

En los análisis e índices de DTI queda por determinar el correlato patológico del aumento de la AxD asociado a factores de riesgo como la edad, las HSB, el aumento de 7-KC o la disminución de βA_{1-42} . Trabajos realizados en cerebros de ratas que combinan la DTI con técnicas de microscopia electrónica muestran que una disminución de la AxD se asocia a daño axonal³⁷. Si bien una disminución o un aumento de los valores de la AxD muestran cambios en la microestructura de la SB, se desconocen los posibles procesos anatómicos, biológicos o físicos subyacentes a estos cambios. Existe la gran dificultad de estudiar el cerebro *in vivo* mediante diferentes técnicas y no es posible realizar la DTI en cerebros fijados en formalina. Quizás estudios combinados de neuroimagen y microscopia en modelos animales de patología amiloide, estrés oxidativo o neuroinflamación ayuden en este camino.

Existe una gran controversia sobre la asociación entre los niveles de lípidos plasmáticos y los rendimientos cognitivos. Mientras que algunos estudios muestran una asociación entre niveles alterados de lípidos plasmáticos y un peor rendimiento cognitivo al cabo de unos años³⁸⁻⁴⁰ otros estudios no encuentran ninguna relación⁴¹. En esta tesis se ha demostrado una asociación entre los lípidos plasmáticos y cambios en la microestructura de las regiones involucradas en los procesos de cognición en personas cognitivamente sanas. Con el objetivo de esclarecer la asociación entre los lípidos plasmáticos y la cognición, podría ser interesante introducir en los análisis transversales sujetos con deterioro cognitivo ligero y analizar si la posible asociación entre cognición y lípidos se encuentra mediada por la microestructura de la SB. Por otro lado, un estudio longitudinal de personas cognitivamente sanas para analizar si los sujetos con mayores niveles de LDL, y por consiguiente mayor afectación de la microestructura, son los que antes empiezan a deteriorarse podría ayudar también a esclarecer este punto.

Respecto a los oxisteroles y los biomarcadores de EA, los niveles de significatividad en las asociaciones halladas entre el 7-KC, el 7 β -OHC y el βA_{1-42} son marginales. Aunque estudios experimentales describen un efecto directo de estos oxisteroles sobre el péptido

amiloide^{7,9,10}, cabe también la posibilidad de que el estrés oxidativo ponga en marcha paralelamente dos procesos, el aumento del 7-KC por un lado y la disminución del βA_{1-42} por otro. En este caso el 7-KC y el βA_{1-42} no tendrían una relación directa pero su asociación podría estar condicionada por el estrés oxidativo. El análisis de productos de la peroxidación lipídica como marcadores del daño oxidativo³³ podría ayudar a esclarecer esta posible vía. Por otro lado, para confirmar el hecho de que el 7-KC favorece la agregación de βA_{1-42} en personas todavía sin una patología amiloide y que este hecho no se refleje en personas con patología en las que este proceso estaría más avanzado, la muestra de sujetos $\beta A+$ y $\beta A-$ tendría que ser equiparable. Además, un estudio longitudinal con un tiempo de seguimiento más prolongado que el aplicado en nuestro estudio podría ayudar a determinar si la variabilidad interindividual de los niveles de 7-KC y 7 β -OHC se asocia a una disminución longitudinal de amiloide. A pesar de que estos oxisteroles se asocian a procesos inflamatorios²⁴, no se ha encontrado ninguna asociación significativa entre el marcador de neuroinflamación YKL40 y los oxisteroles. El análisis de otros marcadores de inflamación como el MCP-1, sCR1 o eotaxina-1, donde sus niveles plasmáticos permiten diferenciar sujetos sanos respecto a sujetos con DCL o EA⁴², ayudaría a confirmar este hallazgo. Por último, el nivel de estos oxisteroles, además de estar bajo el control del estrés oxidativo, está también bajo el control de la variación del nivel del colesterol libre del cerebro. La relación oxisterol/colesterol podría ser preferible para estos análisis.

Posiblemente el hecho de que, a diferencia del 7-KC, no se haya encontrado ninguna asociación significativa entre el 7 β -OHC y la microestructura de la SB se relacione con que en general se favorece la formación del 7-KC en el proceso auto-oxidativo del colesterol. En los casos en los que exista un aumento del daño oxidativo, como puede ser el caso de sujetos con DCL, puede que el 7 β -OHC tenga algún efecto sobre la microestructura. Por otro lado, un estudio longitudinal sobre la microestructura de la SB permitiría observar si los sujetos con un aumento de los niveles de 7-KC y una disminución del βA_{1-42} , muestran mayores cambios en la mayoría de las regiones de la SB y especialmente en áreas relacionadas con los depósitos de amiloide respecto a los sujetos que mantienen estables sus niveles de 7-KC y βA_{1-42} . En este sentido los estudios de PET-amiloide ayudarían a estudiar las relaciones topográficas entre los depósitos de amiloide y las regiones de la SB analizadas. Podría también ser interesante estudiar la correlación entre la microestructura de la SB y el grosor cortical o volumetría regional.

Estos análisis ayudarían a esclarecer si el daño axonal observado en la SB se relaciona con el daño cortical o si, por el contrario, son dos acontecimientos independientes. Los datos de los niveles de la proteína básica de mielina, junto con los niveles de NfL, permitirían diferenciar el daño axonal del daño mielínico en los cambios detectados en la microestructura de la SB.

Con el objetivo de tener una visión global sobre el metabolismo lipídico en la fisiopatología de la EA, además de estudiar el metabolismo del colesterol, se necesita un estudio que abarque todo el lipidoma del cerebro. En este sentido, y una vez que se han establecido la técnica y las condiciones de análisis, el estudio comparativo del lipidoma entre sujetos cognitivamente sanos con y sin patología amiloide por un lado y entre sanos y pacientes con DCL por otro, podría ayudar en esta vía.

En resumen, un estudio longitudinal con un tiempo mayor que el aplicado en este estudio, con una muestra equiparable de sujetos cognitivamente sanos con niveles normales y anormales de βA_{1-42} y sujetos con DCL, con marcadores de daño oxidativo y otros marcadores de neuroinflamación, con la relación oxisterol/colesterol y el análisis de más clases lipídicas como los fosfolípidos y las ceramidas ayudaría a mejorar el conocimiento sobre el metabolismo lipídico en la patología amiloide.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wong MW, Braidy N, Poljak A, et al. Dysregulation of lipids in Alzheimer's disease and their role as potential biomarkers. *Alzheimer's Dement.* 2017;13(7):810–827.
2. Saeedimasing M, Montanino A, Kleiven S, Villa A. Role of lipid composition on the structural and mechanical features of axonal membranes: a molecular simulation study. *Sci. Rep.* 2019;9(1):8000.
3. Vipin A, Ng KK, Ji F, et al. Amyloid burden accelerates white matter degradation in cognitively normal elderly individuals. *Hum. Brain Mapp.* 2019;40(7):2065–2075.
4. Chad JA, Pasternak O, Salat DH, Chen JJ. Re-examining age-related differences in white matter microstructure with free-water corrected diffusion tensor imaging. *Neurobiol. Aging* 2018;71:161–170.
5. Vangberg TR, Eikenes L, Håberg AK. The effect of white matter hyperintensities on regional brain volumes and white matter microstructure, a population-based study in HUNT. *Neuroimage* 2019;203:116158.
6. Al-Janabi OM, Brown CA, Bahrani AA, et al. Distinct white matter changes associated with cerebrospinal fluid amyloid- β 1-42 and hypertension. *J. Alzheimer's Dis.* 2018;66(3):1095–1104.
7. Phan HTT, Vestergaard MC, Baek K, et al. Localization of amyloid beta ($A\beta$ 1-42) protofibrils in membrane lateral compartments: Effect of cholesterol and 7-Ketocholesterol. *FEBS Lett.* 2014;588(18):3483–3490.
8. Phan HTT, Hata T, Morita M, et al. The effect of oxysterols on the interaction of Alzheimer's amyloid beta with model membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 2013;1828:2487–2495.
9. Phan HTT, Shimokawa N, Sharma N, et al. Strikingly different effects of cholesterol and 7-ketocholesterol on lipid bilayer-mediated aggregation of amyloid beta (1-42). *Biochem. Biophys. Reports* 2018;14:98–103.
10. Gamba P, Leonarduzzi G, Tamagno E, et al. Interaction between 24-hydroxycholesterol, oxidative stress, and amyloid- β in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: three partners in crime. *Aging Cell* 2011;10(3):403–417.
11. Brown CA, Johnson NF, Anderson-Mooney AJ, et al. Development, validation and application of a new fornix template for studies of aging and preclinical Alzheimer's disease. *NeuroImage Clin.* 2017;13:106–115.
12. Gold BT, Zhu Z, Brown CA, et al. White matter integrity is associated with CSF markers of AD in normal adults. *Neurobiol Aging* 2014;35(10):2263–2271.
13. Ringman JM, O'Neill J, Geschwind D, et al. Diffusion tensor imaging in preclinical and presymptomatic carriers of familial Alzheimer's disease mutations. *Brain* 2007;130(Pt 7):1767–76.
14. Smith CD, Chebrolu H, Andersen AH, et al. White matter diffusion alterations in normal women at risk of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2010;31(7):1122–1131.
15. 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 NIH Public Access Author Manuscript. *Alzheimers Dement* 2011;7(3):280–292.
16. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol.* 2014;13(6):614–629.
17. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 2018;14(4):535–562.
18. Hardy J, Higgins G. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992;256(5054):184–185.
19. Jack CR. Update on hypothetical model of Alzheimer's disease biomarkers. *Lancet Neurol.* 2013;12(2):207–216.
20. Erik S. Musiek and David M. Holtzman. Three dimensions of the amyloid hypothesis: Time, space,

- and “wingmen.” *Nat Neurosci.* 2015;18(6):800–806.
21. Herrup K. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat. Neurosci.* 2015;18(6):794–799.
 22. Khalid Iqbal and Inge Grundke-Iqbal. Alzheimer disease, a multifactorial disorder seeking multitherapies. *Alzheimers Dement.* 2010;6(5):420–424.
 23. Gamba P, Testa G, Gargiulo S, et al. Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer’s disease. *Front. Aging Neurosci.* 2015;7:119.
 24. Sato Y, Ishihara N, Nagayama D, et al. 7-ketocholesterol induces apoptosis of MC3T3-E1 cells associated with reactive oxygen species generation, endoplasmic reticulum stress and caspase-3/7 dependent pathway. *Mol. Genet. Metab. Reports* 2017;10:56–60.
 25. Williams VJ, Leritz EC, Shepel J, et al. Interindividual variation in serum cholesterol is associated with regional white matter tissue integrity in older adults. *Hum Brain Mapp* 2013;34(8):1826–1841.
 26. Moore EE, Hohman TJ, Badami FS, et al. Neurofilament relates to white matter microstructure in older adults. *Neurobiol. Aging* 2018;70:233–241.
 27. Melah KE, Yuan-Fu Lu S, Hoscheidt SM, et al. CSF markers of Alzheimer’s pathology and microglial activation are associated with altered white matter microstructure in asymptomatic adults at risk for Alzheimer’s disease HHS Public Access. *J Alzheimers Dis* 2016;50(3):873–886.
 28. Mullard A. Sting of Alzheimer’s failures offset by upcoming prevention trials. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2012;11(9):657–60.
 29. Sperling RA, Rentz DM, Johnson KA, et al. The A4 study: Stopping AD before symptoms begin? *Sci. Transl. Med.* 2014;6(228):228fs13.
 30. Christensen DD. Changing the course of Alzheimer’s disease: anti-amyloid disease-modifying treatments on the horizon. *Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry* 2007;9(1):32–41.
 31. Sigurdsson EM. Tau immunotherapies for Alzheimer’s disease and related tauopathies: progress and potential pitfalls. *J. Alzheimer’s Dis.* 2018;64(s1):S555–S565.
 32. Shadfar S, Hwang CJ, Lim M-S, et al. Involvement of inflammation in Alzheimer’s disease pathogenesis and therapeutic potential of anti-inflammatory agents. *Arch. Pharm. Res.* 2015;38(12):2106–19.
 33. Butterfield DA, Halliwell B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2019;20(3):148–160.
 34. Vejux A, Abed-vieillard D, Hajji K, et al. 7-ketocholesterol and 7 β -hydroxycholesterol: in vitro and animal models used to characterize their activities and to identify molecules preventing their toxicity. *Biochem. Pharmacol.* 2019:113648.
 35. Barriuso B, Ansorena D, Astiasarán I. Oxysterols formation: A review of a multifactorial process. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2017;169:39–45.
 36. Li G, Mayer CL, Morelli D, et al. Effect of simvastatin on CSF Alzheimer disease biomarkers in cognitively normal adults. 2017;89(12):1251–1255.
 37. Song S-K, Yoshino J, Le TQ, et al. Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain. *Neuroimage* 2005;26(1):132–140.
 38. Samieri C, Perier M-C, Gaye B, et al. Association of cardiovascular health level in older age with cognitive decline and incident dementia. *JAMA* 2018;320(7):657–664.
 39. Power MC, Rawlings A, Richey Sharrett A, et al. Association of midlife lipids with 20-year cognitive change: a cohort study HHS Public Access. *Alzheimers Dement* 2018;14(2):167–177.
 40. Mapstone M, Cheema AK, Fiandaca M, Xiaogang Z. Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nat. Med.* 2014;20(4):415–8.
 41. Tortelli R, Lozupone M, Guerra V, et al. Midlife metabolic profile and the risk of late-life cognitive decline. *J. Alzheimer’s Dis.* 2017;59(1):121–130.
 42. Morgan AR, Touchard S, Leckey C, et al. Inflammatory biomarkers in Alzheimer’s disease plasma. *Alzheimer’s Dement.* 2019;15(6):776–787.