
El proyecto ALFA

Una plataforma de investigación para identificar las características fisiopatológicas tempranas de la enfermedad de Alzheimer

barcelonaβeta
BRAIN RESEARCH CENTER

fundación
pasqual
maragall

El proyecto ALFA

Una plataforma de investigación para identificar las características fisiopatológicas tempranas de la enfermedad de Alzheimer

José Luis Molinuevo^{a,*}, Nina Gramunt^a, Juan Domingo Gispert^a,
Karine Fauria^a, Manel Esteller^{b,c,d}, Carolina Minguillon^a,
Gonzalo Sánchez-Benavides^a, Gema Huesa^a,
Sebastián Morán^{b,c}, Rafael Dal-Ré^a and Jordi Camí^{e,f,*}

a. Barcelonabeta

Brain Research Center,
Barcelona.

b. Programa de Epigenética y
Biología del Cáncer (PEBC),
**Institut d'Investigació
Biomèdica de Bellvitge**
(IDIBELL), Barcelona.

c. Departamento de Ciencias
Fisiológicas II, Facultad
de Medicina, **Universitat de
Barcelona** (UB), Barcelona.

**d. Institució Catalana de Recerca
i Estudis Avançats (ICREA),**
Barcelona.

e. Fundació Pasqual Maragall,
Barcelona.

f. Universitat Pompeu Fabra,
Barcelona.

*** Autores de correspondencia**

José Luis Molinuevo
jlmolinuevo@fpmaragall.org

Jordi Camí
jcamí@fpmaragall.org

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La fase preclínica de la enfermedad de Alzheimer (EA) es óptima para identificar los eventos fisiopatológicos tempranos y desarrollar programas de prevención. Estos son los objetivos compartidos del proyecto ALFA, que incluye el registro ALFA, la cohorte madre ALFA y el estudio de cohorte anidado ALFA+.

MÉTODOS

La visita inicial de la cohorte madre ALFA incluyó una evaluación cognitiva completa, la administración de unos cuestionarios sobre los hábitos de vida, unas extracciones de ADN y resonancia magnética (RM). El estudio anidado ALFA+ añade biomarcadores de neuroimagen y de líquido para un fenotipado más exhaustivo.

RESULTADOS

2.743 participantes de entre 45 y 74 años de edad fueron incluidos en la cohorte madre ALFA. Aquí demostramos que esta cohorte, compuesta en su mayoría por descendientes cognitivamente sanos de pacientes de la EA, está enriquecida para factores de riesgo genéticos de la EA.

DISCUSIÓN

El proyecto ALFA representa una valiosa infraestructura que se utilizará en diferentes estudios y ensayos para prevenir la EA. La cohorte longitudinal ALFA+ servirá para entender la historia natural de la enfermedad así como para modelar las fases preclínicas con el fin de desarrollar ensayos clínicos con éxito.

Palabras clave: enfermedad de Alzheimer, demencia, estudio de cohortes, cognición, prevención, biomarcadores, factores de riesgo.

1. INTRODUCCIÓN

El aumento de la esperanza de vida media que se ha producido en los países desarrollados durante los últimos cincuenta años ha ido acompañado de un incremento en la prevalencia de los trastornos asociados con la edad.

La enfermedad de Alzheimer (EA) y, más específicamente, la EA de inicio tardío (llamada por su acrónimo inglés LOAD) es la primera causa de discapacidad neurológica en personas de edad avanzada causando una enorme carga social y económica en las sociedades modernas [1]. En la actualidad, más de 45 millones de personas sufren demencia en todo el mundo y con el progresivo envejecimiento de la población se espera que esta cifra aumente hasta 130 millones en 2050 [2]. A pesar de que las características clínico-patológicas de la EA se han descrito hace más de un siglo, su exacta etiología sigue siendo desconocida. Hay que destacar que, hasta la fecha, todos los ensayos clínicos realizados que evalúan fármacos modificadores de la enfermedad han fracasado [3].

En la última década, varios biomarcadores *in vivo* de la EA, tales como la concentración de β-amiloide (Aβ) y tau en el líquido cefalorraquídeo (LCR [4]), la atrofia del hipocampo [5, 6], el hipometabolismo temporoparietal [7, 8] y la deposición cerebral de amiloide medido por tomografía por emisión de positrones (TEP [9, 10]), han estado ampliamente caracterizados. Los

resultados de estos estudios muestran que la patología de Alzheimer se desarrolla durante varios años e incluso décadas antes de que aparezcan los síntomas clínicos; a este período asintomático, silencioso de la enfermedad se le denomina la fase preclínica de la EA [11]. La detección de esta fase preclínica abre oportunidades para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Si en los próximos años surgen nuevos tratamientos capaces de retrasar la evolución de la enfermedad y la aparición de la demencia, éstos serán especialmente útiles durante la fase preclínica de la enfermedad [12]. De hecho, como la carga de la EA aumenta con el envejecimiento de la población, un tratamiento capaz de retrasar la aparición de la demencia unos pocos años tendría un tremendo impacto en el coste social de la enfermedad. Se ha calculado que un retraso del inicio de la demencia de tan sólo 5 años podría reducir un 33% el coste económico de la EA [13]. En este escenario, se ha planteado la hipótesis de que, con el fin de aumentar las posibilidades de éxito, los medicamentos que han fracasado en los ensayos realizados en pacientes con la EA deben ser ensayados en sujetos cognitivamente sanos que tengan un riesgo más elevado de desarrollar la enfermedad. Todavía más, la etapa preclínica podría ser el periodo de tiempo óptimo para evaluar nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a dianas no solo relacionadas con la cascada amiloide, sino también enfocadas a retrasar la pérdida neuronal [14]. Por otra parte, las estrategias preventivas de intervención pueden ayudar a entender mejor la relación entre los diferentes factores médicos, ambientales y genéticos, y la aparición de los síntomas.

El desarrollo de estudios de prevención requiere la identificación de individuos con un mayor riesgo de desarrollar la EA en un futuro próximo para ser reclutados en ensayos clínicos como personas asintomáticas. Con esto en mente, se han diseñado una serie de proyectos de investigación que están actualmente en curso, tales como el programa de Registro de Wisconsin para la Prevención de Alzheimer (WRAP) [15], el estudio de Hijos Adultos [16], el programa PREVENT [17] y el estudio de cohorte longitudinal del proyecto Europeo para la Prevención de la Demencia de Alzheimer (EPAD) [18], entre otros.

Siguiendo la misma lógica y con el objetivo de aumentar nuestro conocimiento sobre la fisiopatología y los factores patogénicos emergentes durante las etapas preclínicas tempranas de la EA, el Barcelonaβeta Brain Research Center (BBRC) inició el proyecto ALFA (de Alzheimer y Familias) para el seguimiento prospectivo de una cohorte de personas cognitivamente normales, la mayoría de las cuales son hijos/as de pacientes de la EA. La infraestructura ALFA consiste en el registro ALFA, la cohorte madre ALFA y el estudio anidado de cohorte ALFA+. El registro ALFA contiene datos demográficos básicos de personas que desean participar en futuros proyectos del BBRC. La cohorte madre ALFA está formada por participantes cognitivamente normales con edades comprendidas entre los 45 y los 74 años, a quienes se les hizo realizar una serie de pruebas cognitivas y de quienes se ha recogido su historia clínica, información relacionada con su estilo de vida y una muestra de sangre para

su posterior análisis genético. La cohorte madre ALFA servirá como base para el establecimiento de protocolos y estudios de investigación, tanto observacionales como de intervención, de participantes preclínicos en riesgo de deterioro cognitivo debido a la EA. Además, se repondrá a partir de nuevo reclutamiento y a partir del registro ALFA. A los participantes de la cohorte ALFA se les ofrecerá la opción de entrar en proyectos actualmente activos en el BBRC como EPAD [18] o futuros ensayos clínicos y otros estudios de investigación.

Un subgrupo de participantes de la cohorte ALFA será invitado a participar en un estudio a largo plazo longitudinal anidado, denominado estudio ALFA+, en el que se realizará un fenotipo más detallado. Además de una descripción similar a la de la cohorte madre ALFA, conllevará la adquisición de biomarcadores tanto húmedos (LCR, sangre y orina) como de neuroimagen (RM y TEP).

En este artículo, se describen la cohorte madre ALFA y el estudio ALFA+. Por otra parte, también se presentan el perfil sociodemográfico y la descripción de las variables de riesgos asociadas a la EA de los participantes de la cohorte madre en la visita inicial del estudio. ■

2. MÉTODOS

2.1. LA COHORTE MADRE ALFA

La cohorte madre ALFA representa una plataforma de investigación de la que se alimentarán estudios relacionados, tales como el estudio longitudinal ALFA+.

2.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: personas cognitivamente normales castellano y/o catalanoparlantes de edades comprendidas entre los 45 y los 74 años que estuvieran de acuerdo con los procedimientos y pruebas del estudio: entrevista clínica y cuestionarios asociados a factores de riesgo, pruebas cognitivas, extracción de una muestra de sangre para análisis de ADN y RM. Además, un allegado estaba involucrado en la evaluación funcional del voluntario y ambos debían conceder su consentimiento. Un alto porcentaje de los individuos reclutados eran descendientes de pacientes con la EA.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: (1) Rendimiento cognitivo fuera de los puntos de corte establecidos: *Mini Mental State Examination* [19, 20] (MMSE) <26, *Memory Impairment Screen* [21, 22] (MIS) <6, subprueba de orientación temporal del test Barcelona II [23] (TO-BTII) <68, fluencia semántica [24, 25] (animales; SF) <12. (2) *Clinical Dementia Rating Scale* [26]; CDR>0. (3) Trastornos psiquiátricos mayores (según DSM-IV-TR) o enfermedades que pudieran afectar a las capacidades cognitivas (depresión aguda

activa o trastorno de ansiedad generalizada, trastorno bipolar, esquizofrenia y demencia). La escala de depresión y ansiedad de Goldberg [27, 28] (GADS) se utilizó para la detección de trastornos del estado de ánimo. En caso de que los resultados fueran dudosos el evaluador determinaba si el voluntario cumplía criterios DSM-IV-TR para el trastorno de ansiedad generalizada o episodio depresivo mayor y era excluido si éste era el caso. (4) Trastorno auditivo y/o visual grave, trastorno del desarrollo neurológico y/o psicomotor. (5) Enfermedades relevantes que pudieran interferir con la cognición (insuficiencia renal en hemodiálisis, cirrosis hepática, enfermedad pulmonar crónica con terapia de oxígeno, trasplante de órganos sólidos, fibromialgia, cáncer activo en tratamiento o cualquier otra enfermedad que el investigador considerara que pudiera afectar a la cognición del participante). (6) Trastornos neurológicos como la enfermedad de Parkinson, apoplejía, epilepsia en tratamiento con ataques frecuentes (>1/mes) en el último año, esclerosis múltiple u otras enfermedades neurológicas graves. (7) Lesión cerebral que pudiera interferir con la cognición: historia de traumatismo craneoencefálico con lesión parenquimatosa o accidente cerebrovascular isquémico extraaxial o accidente cerebrovascular hemorrágico, cirugía cerebral, tumores cerebrales u otras causas que puedan generar daño cerebral adquirido, tales como la quimioterapia cerebral o la radioterapia, y, por último, (8) patrón sospechado de historia familiar de la EA autosómica dominante: 3 individuos afectados en dos generaciones diferentes,

con un inicio antes de los 60 años de edad. Los criterios de inclusión y de exclusión del estudio ALFA se resumen en la **Tabla 1**.

2.1.2. EVALUACIÓN BASAL

Los voluntarios reclutados fueron recibidos en el BBRC, Barcelona, donde fueron evaluados por un neuropsicólogo cualificado. Una vez habían dado su

consentimiento y se había revisado el cumplimiento de los criterios de inclusión del estudio, se registraron la historia clínica y una serie de características sociodemográficas del sujeto y se realizó la evaluación cognitiva. Una enfermera del estudio se encargó de tomar las mediciones de presión arterial y de la altura, peso y diámetro de la cintura, así como de la obtención de una muestra de sangre para su posterior uso.

Tabla 1. Criterios de inclusión en la cohorte madre ALFA

 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hombres y mujeres castellano y/o catalanoparlantes ✓ Con edades comprendidas entre los 45 y los 74 años ✓ Aceptación de los procedimientos del estudio y pruebas ✓ Participación de un allegado para la evaluación funcional del participante 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Cognitivos: MMSE <26, MIS <6, SF <12, TO-BTII <68 ✗ CDR >0 ✗ Trastornos psiquiátricos mayores (DSM-IV-TR) o enfermedades que pudieran afectar a las capacidades cognitivas ✗ Trastornos auditivos y/o visuales graves, trastornos graves del desarrollo neurológico y/o enfermedades importantes que pudieran interferir con la cognición ✗ Desórdenes neurológicos ✗ Lesión cerebral que pudiera interferir con la cognición ✗ Sospecha de historia familiar de la EA autosómica dominante

Abreviaturas: CDR, Clinical Dementia Rating scale; MMSE, Mini-Mental State Examination; MIS, Memory Impairment Screen; TO-BTII, Time- Orientation subtest of the Barcelona Test II; SF, Semantic Fluency.

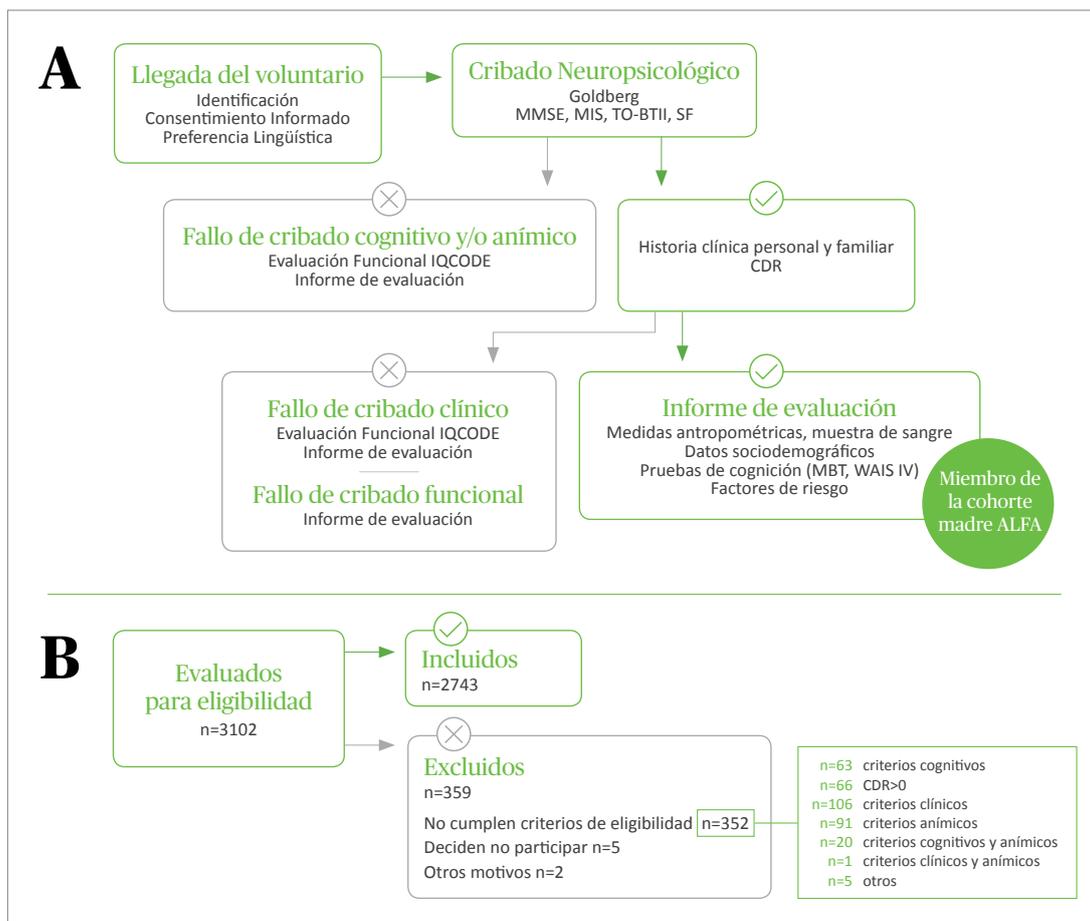
La primera visita se estructuró de la siguiente manera (**Fig. 1A**):

2.1.2.1. REVISIÓN DE LOS CRITERIOS DE INCLUSIÓN DEL ESTUDIO

Para garantizar el cumplimiento de los criterios de inclusión del estudio,

una evaluación inicial del estado neuropsicológico de los voluntarios se llevó a cabo a través de las herramientas de evaluación mencionadas anteriormente. Dada la realidad bilingüe del contexto social en el que se produjo la visita, se pidió previamente a los participantes su idioma de preferencia (catalán o castellano).

Figura 1. Representación esquemática de la visita inicial de la cohorte ALFA (A) y del proceso de selección (B)



A) Independientemente de su elegibilidad para entrar o no en la cohorte, todos los voluntarios evaluados recibieron un informe específico sobre los resultados de la evaluación. **B**) Los criterios cognitivos se evaluaron mediante unas pruebas cognitivas (MMSE, MIS, TO-BTII y SF). La Escala de Depresión y de Ansiedad de Goldberg se utilizó para la detección de trastornos del estado de ánimo.

Las personas evaluadas recibieron un informe específico que recogía los resultados de las pruebas independientemente de si el voluntario era elegible o no a formar parte de la población ALFA. La escala CDR fue la última herramienta de evaluación. En caso de que el sujeto fuera excluido previamente por cualquier otra razón, la evaluación funcional se llevó a cabo a través del IQCODE [29, 30] (que es más corto y no habrá un seguimiento del voluntario) y se incluyó el resultado en el informe entregado (**Fig. 1A**). Se aconsejó a los sujetos excluidos por criterios cognitivos o funcional, visitar a su médico de cabecera si habían notado previamente un cambio significativo en su rendimiento mental diario. A las personas excluidas por motivos anímicos se les recomendó pedir consejo médico.

Después de una evaluación cognitiva, funcional y del estado de ánimo inicial se preguntó a los voluntarios acerca de su historial médico familiar y personal, con especial énfasis en los trastornos psiquiátricos y neurológicos. Aquéllos a los que se les detectó una condición incompatible con su inclusión en el estudio fueron excluidos.

2.1.2.2. EVALUACIÓN NEUROPSICOLÓGICA

Después de la evaluación inicial, se administró a los participantes una batería de pruebas cognitivas experimental para la posible detección de deterioro temprano en seguimientos longitudinales (**Fig. 1B**). Esta batería evaluó la memoria episódica verbal [Memory Binding Test [31, 32] (MBT)], la velocidad psicomotora, el procesamiento

visual, la función ejecutiva y no verbal y el razonamiento verbal (Clave de números, puzzles visuales, Dígitos, Matrices y Similaridades del WAIS IV [33]).

2.1.2.3. DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS Y ANTECEDENTES CLÍNICOS

Se registraron los datos sociodemográficos básicos. Se preguntó a todos los participantes acerca de su historial médico familiar y personal a la vez que se registró su uso de medicación crónica.

La reserva cognitiva de los participantes se evaluó con el Cuestionario de Reserva Cognitiva [34] que consta de 8 puntos que son su educación formal, la educación formal de sus padres, la asistencia a cursos, su ocupación, su educación musical, los idiomas que hablan, la frecuencia de lectura y de actividades cognitivamente estimulantes.

2.1.2.4. MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS Y OBTENCIÓN DE MUESTRA DE SANGRE

Se registró el peso, la altura, la presión arterial y la circunferencia de la cintura y la cadera de los participantes. Las medidas de peso y altura se utilizaron para calcular el índice de masa corporal (IMC) que permite su clasificación en $IMC \leq 30$ o $IMC > 30$, puntos de corte considerados en el algoritmo de riesgo de demencia CAIDE (factores de riesgo cardiovascular, envejecimiento e incidencia de demencia) [35]. Del mismo modo, las medidas de presión arterial

sistólica de los participantes permiten su clasificación en dos grupos (≤ 140 y >140) que implican distintos grados de riesgo.

Se obtuvieron 10 ml de sangre en un tubo de EDTA y se centrifugaron para separar el plasma de la fracción celular. Ambas fracciones fueron inmediatamente almacenadas a -20°C en las instalaciones del Hospital del Mar y posteriormente transferidas al Biobanco del Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (Barcelona, España) y se mantuvieron a -80°C hasta su posterior uso.

2.1.3. GENOTIPADO DEL GEN APOLIPOPROTEÍNA E (APOE)

A partir de la fracción celular de la sangre se obtuvo ADN total por digestión con proteinasa K seguida por precipitación alcohólica. Utilizando los cebadores (APOE-F 5'-TTGAAGGCCTACAAATCGGAACTG-3' y APOE-R 5'-CCGGCTGCCATCTCCTCCATCCG-3') las muestras fueron genotipadas para dos SNPs, *rs429358* y *rs7412*, determinando los posibles alelos APOE: $\epsilon 1$, *rs429358* (C) + *rs7412* (T); $\epsilon 2$, *rs429358* (T) + *rs7412* (T); $\epsilon 3$, *rs429358* (T) + *rs7412* (C); y $\epsilon 4$, *rs429358* (C) + *rs7412* (C).

2.1.4. OTROS DATOS EPIDEMIOLÓGICOS RECOGIDOS

Se obtuvo información adicional a través de cuestionarios auto-administrados. Se utilizó la escala EQ-5D-3L [36, 37] para

medir la calidad de vida percibida de los participantes; la actividad física se midió con la versión española reducida del Cuestionario de Actividad Física durante el Tiempo Libre del Minnesota [38]; los hábitos dietéticos fueron recogidos mediante un cuestionario de frecuencia alimentaria de 166 ítems; el consumo de alcohol, de tabaco y de drogas fueron recogidos mediante una versión simplificada del Cuestionario del Plan Nacional de Salud sobre Drogas del Ministerio Español de 2009; un cuestionario sobre los hábitos de sueño [39]; se usó una versión revisada del cuestionario de personalidad de Eysenck [40] (EPQ-R) para evaluar los rasgos de personalidad; y, por último, la actividad social y prácticas religiosas fueron también registradas.

2.1.5. GESTIÓN DE DATOS Y CONTROL DE CALIDAD

Los datos fueron recogidos de manera sistemática utilizando dos bases de datos: una para el procedimiento de cribado que permite la creación automática de informes con los resultados (NeuroCog; www.neuro-cog.com) y el resto de la información se introdujo directamente en un sistema de gestión de datos (OpenClinica; www.openclinica.com) que permitió la generación de informes para análisis adicionales. El 67,5% (2095 de 3102) de los documentos fuente de la evaluación cognitiva fueron revisados por un grupo de evaluadores específicamente formados en procedimientos de monitorización y control de calidad y todos los errores o inconsistencias

fueron notificados, registrados y consecuentemente modificados.

El control de calidad de los datos se realizó sobre todos los casos visitados utilizando los informes completos de incidencias dentro de las dos bases de datos y comparados con nuestros registros personales. Las consultas se corrigieron mediante verificación de documentos fuente. Por otra parte, toda la información fue revisada minuciosamente en busca de inconsistencias y campos no rellenados por el equipo de gestión de datos y, cuando fue posible y/o necesario, se llevaron a cabo las medidas correctivas necesarias. Además, y a lo largo de todo el estudio, los evaluadores recibían boletines regularmente, donde, entre otras cosas, se resaltaban los errores e inconsistencias más frecuentes y las medidas establecidas para evitarlos.

2.1.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar las diferencias entre las frecuencias de los genotipos *APOE* de la cohorte madre ALFA y las reportadas en sujetos control de la base de datos AlzGene (<http://www.alzgene.org/meta.asp?geneID=83>) se utilizó la prueba de Chi cuadrado. Esta misma prueba se utilizó para evaluar las diferencias en la prevalencia de las características clínicas y las puntuaciones CAIDE entre los miembros de la cohorte ALFA y la población general [35, 41]. Se utilizó el programa SPSS 15.0 para Windows para todos los análisis. Las diferencias se consideraron significativas a $P < .05$.

2.2. EL ESTUDIO ALFA+

Un grupo de participantes de la cohorte madre ALFA serán invitados a participar en el estudio ALFA+: un estudio longitudinal anidado a largo plazo que tiene el objetivo de entender los cambios fisiopatológicos tempranos de la EA durante su fase preclínica. La cohorte longitudinal ALFA+ incluirá 440 individuos, que serán invitados a participar en función de su perfil de riesgo específico de sufrir la EA. Este perfil será determinado por un algoritmo en el que se tomará en consideración la historia familiar de la EA de los participantes y su genotipo *APOE*, sus puntuaciones de memoria episódica verbal y CAIDE. Además, los participantes serán estratificados por edad y sexo.

El estudio ALFA+ comenzará durante 2016 y cada tres años se llevarán a cabo visitas completas de seguimiento. Los criterios de inclusión y exclusión serán similares a los de la cohorte madre ALFA (Tabla 1), con la adición de la aceptación a todos los procedimientos descritos a continuación.

2.2.1. IMAGEN POR RESONANCIA MAGNÉTICA (MRI)

Las imágenes de resonancia magnética se adquirirán en un escáner de 3,0 T y el protocolo incluirá una secuencia en 3D ponderada en T1 con tamaño de vóxel isotrópico sub-milimétrico y secuencias clínicas ponderadas en T2 orientadas a lo largo del eje principal del hipocampo con el fin de permitir la segmentación precisa de

los subcampos del hipocampo. Además, una secuencia de imágenes por difusión de alta resolución angular (HARDI) y una secuencia de resonancia magnética funcional sin tareas de 9 minutos serán adquiridas con una resolución espacial isotrópica. La plataforma ALFA permitirá la creación de imágenes de sub-estudios adicionales, incluyendo la implementación y validación de secuencias de investigación de RM.

2.2.2. PUNCIÓN LUMBAR

Se recogerá LCR en tubos de polipropileno por punción lumbar realizada entre las 9 y las 12 horas. Las muestras serán procesadas en un máximo de 1 hora y centrifugadas a 4°C durante 10 minutos a 2000 g, almacenadas en tubos de polipropileno y congeladas a -80°C. Se analizarán los biomarcadores de la EA clásicos (Aβ42, Aβ40, Tau total y p-tau) y otras moléculas de interés (como YKL-40, neurogranina y oligómeros de Aβ). Las determinaciones se llevarán a cabo en el laboratorio del Prof. Kaj Blennow (Instituto de Neurociencias y Fisiología, Departamento de Psiquiatría y Neuroquímica, Academia Sahlgrenska de la Universidad de Gotemburgo, Suecia).

2.2.3. TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES (TEP) DE AMILOIDE

Se administrará una única dosis intravenosa de 185 MBq de 18F-Flutemetamol en un volumen máximo de 10 ml con una masa máxima del producto de 6 ng/ml. El procedimiento de TEP, con una duración de 30 minutos (6 marcos de 5 minutos), se

iniciará 90 minutos después de la inyección del radiotrazador.

2.2.4. TEP DE 18F-FLUDEOXYGLUCOSE (FDG)

Se administrará a los participantes una única dosis intravenosa de 370 MBq en un volumen de 1 a 10 ml. El procedimiento de TEP, con una duración de 30 minutos (6 marcos de 5 minutos), se iniciará 45 minutos después de la inyección del radiotrazador.

2.2.5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El protocolo de estudio ALFA fue aprobado por el Comité de Ética Independiente *Parc de Salut Mar Barcelona* e inscrito en *Clinicaltrials.gov* (Identificador: NCT01835717). El estudio se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de la Ley española 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica (Ley 14/2007 de Investigación Biomédica). Como se ha mencionado antes, todos los participantes aceptaron los procedimientos del estudio mediante la firma de un consentimiento informado y tenían un allegado que aceptó participar en el procedimiento de evaluación funcional, que también concedió su consentimiento. Un requisito previo para entrar en el estudio ALFA+ (identificador *Clinicaltrials.gov* NCT02485730) será el de aceptar los procedimientos del estudio así como aceptar que los resultados de LCR no les serán revelados. ■

3. RESULTADOS

Hasta la fecha, se ha llevado a cabo la primera visita del estudio ALFA que incluye, principalmente, la caracterización sociodemográfica, cognitiva y del haplotipo *APOE* de los participantes.

El 17 de septiembre de 2012 se llevó a cabo una rueda de prensa en la que se explicaron

los principales objetivos del proyecto ALFA, así como los criterios de inclusión de sus participantes. Esto dio lugar a que alrededor de 5000 personas mostraron su interés en formar parte de la cohorte madre ALFA y, de estos, 3102 fueron visitados y evaluados para elegibilidad desde Abril de 2013 a Noviembre de 2014 en el BBRC. Cerca de 2.000 personas no fueron visitadas debido a una variedad de razones, tales como no cumplir con los criterios de inclusión (por ejemplo, rango de edad), no

Tabla 2. Caracterización inicial de los participantes de la cohorte madre ALFA

	TOTAL (n=2743)	Grupo 1 (n=500)	Grupo 2 (n=666)	Grupo 3 (n=631)	Grupo 4 (n=617)	Grupo 5 (n=265)	Grupo 6 (n=64)
Edad (años)	55.8 (6.7)	46.7 (1.4)	51.4 (1.5)	56.3 (1.5)	61.5 (1.6)	66.1 (1.5)	71.2 (1.4)
Hombres/Mujeres (%)	36.8/63.2	33.6/66.4	36.9/63.1	34.4/65.6	42.9/57.1	34.3/65.7	35.9/64.1
Educación (años)	13.3 (3.5)	14.0 (3.3)	13.7 (3.4)	13.1 (3.4)	13.0 (3.7)	12.7 (3.6)	12.6 (3.5)
GADS-A ¹	0.6 (1.2)	0.7 (1.3)	0.7 (1.4)	0.6 (1.1)	0.4 (0.9)	0.5 (1.0)	0.4 (0.9)
GADS-D ¹	0.2 (0.7)	0.2 (0.6)	0.2 (0.7)	0.2 (0.6)	0.1 (0.6)	0.2 (0.8)	0.3 (0.9)
MMSE (0-30) ¹	29.0 (1.1)	29.2 (1.0)	29.1 (1.0)	29.0 (1.1)	29.0 (1.1)	28.9 (1.2)	28.6 (1.1)
MIS (0-8) ¹	7.8 (0.5)	7.8 (0.4)	7.8 (0.5)	7.8 (0.5)	7.7 (0.6)	7.6 (0.6)	7.7 (0.5)
TO-BTII (0-70) ¹	70.0 (0.1)	70 (0.0)	70.0 (0.0)	70.0 (0.1)	70.0 (0.1)	70.0 (0.0)	70.0 (0.0)
SF (0-...) ¹	22.5 (5.1)	24.0 (5.0)	23.3 (5.1)	22.5 (5.0)	21.2 (4.9)	20.9 (4.8)	19.9 (4.2)
MBT-TPR (0-32) ²	23.7 (5.3)	24.8 (5.0)	24.2 (5.4)	23.6 (5.0)	22.9 (5.7)	22.4 (5.0)	22.8 (5.1)
Coding-TS (0-135) ²	65.8 (14.8)	73.9 (12.4)	70.7 (13.2)	65.8 (13.6)	60.1 (14.0)	54.9 (12.2)	51.0 (13.5)
VP (0-26) ²	13.3 (4.3)	15.0 (4.4)	14.2 (4.2)	13.3 (4.0)	12.0 (3.9)	11.6 (3.9)	11.0 (3.2)
DS-T (0-48) ²	24.8 (5.2)	25.6 (5.3)	25.2 (5.1)	24.8 (5.4)	24.2 (5.0)	23.8 (5.1)	22.1 (3.6)
Matrix R (0-26) ²	16.6 (4.4)	18.2 (4.0)	17.8 (4.0)	16.4 (4.2)	15.4 (4.3)	14.5 (4.6)	13.0 (4.1)
Similitudes (0-36) ²	22.1 (4.7)	22.8 (4.6)	22.7 (4.6)	22.2 (4.7)	21.5 (4.7)	20.9 (4.9)	20.4 (5.1)

Grupo 1, 45-49 años; grupo 2, 50-54 años; grupo 3, 55-59 años; grupo 4, 60-64 años; grupo 5, 65-69 años; grupo 6, 70-74 años.

GADS-A, escala de ansiedad de Goldberg; GADS-D, escala de depresión de Goldberg; MMSE, mini-mental state examination; MIS, memory impairment screen; TO-BTII, Time-orientation subtest of the Barcelona Test II; SF, fluencia semántica - animales; MBT-TPR, Memory Binding Test Total Paired Recall; Coding-TS (Codificación-TS), Coding Total Score (puntuación total de codificación); VP, Visual Puzzles (puzzles visuales); DS-T, Digit Span Total, Matrix R, Matrix Reasoning; Similarities (Similitudes). ¹pruebas de cribado; ²batería de pruebas experimentales. Los posibles rangos de puntuación se indican entre paréntesis.

estaban disponibles, tenían dificultades para asistir a la visita, etc.

Como se ha mencionado, y para asegurar el cumplimiento de los criterios de inclusión del estudio, las 3102 personas evaluadas se sometieron a un examen cognitivo. Aquellos voluntarios que quedaron fuera de los puntos de corte definidos (ver Métodos) fueron descartados del estudio. Por otra parte, la historia médica personal y familiar también fue analizada con el fin de garantizar el cumplimiento de los criterios clínicos de inclusión. Así, 359 voluntarios fueron excluidos por no cumplir criterios o se dieron de baja voluntariamente, lo que resultó en la inclusión en la cohorte ALFA de 2743 personas de edades comprendidas entre los 45 y los 74 años, en su mayoría hijos/as de pacientes de la EA (**Fig. 1B**). De todos los excluidos por criterios cognitivos (n=63), 21 obtuvieron un MMSE<26, 22 un MIS<6, 14 un SF<12, 3 un MMSE<26 y un MIS<6, uno de un MIS<6 y un SF<12 y, por último, 2 no llegaron a los puntos de corte para el MMSE, el MIS y las pruebas de SF. En cuanto al rendimiento cognitivo de sujetos excluidos por criterios cognitivos y anímicos (n=20), 10 puntuaron <26 en el MMSE, 7 <6 en el MIS, uno <12 en la SF, uno un MIS<6 y un SF<12 y, por último, 1 no alcanzó los puntos de corte para el MMSE, MIS y TO.

La edad media de los miembros de la cohorte madre ALFA (SD) fue de 55,8 (±6,7) años, el 36,8% eran hombres y el

63,2% mujeres con una media de 13,3 (±3,5) años de educación formal. En cuanto a los criterios de inclusión, la puntuación media en el MMSE fue de 29,0 (±1,1), la puntuación de MIS de 7,8 (±0,5), la puntuación de TO-BTII de 70,0 (±0,1) y la puntuación SF de 22,5 (±5,1). En la tabla 2 se resume la caracterización inicial de los miembros de la cohorte ALFA clasificados por grupos de edad. En cuanto a reserva cognitiva, los participantes fueron agrupados en cuatro categorías (C1-C4) siendo C1 la que corresponde a la puntuación más baja y C4 la más alta. [34]. La mayoría de los participantes (69%) se sitúa en la categoría más alta (C4), 27% en C3 y sólo el 4% y el 1% se clasificaron en C2 y C1, respectivamente.

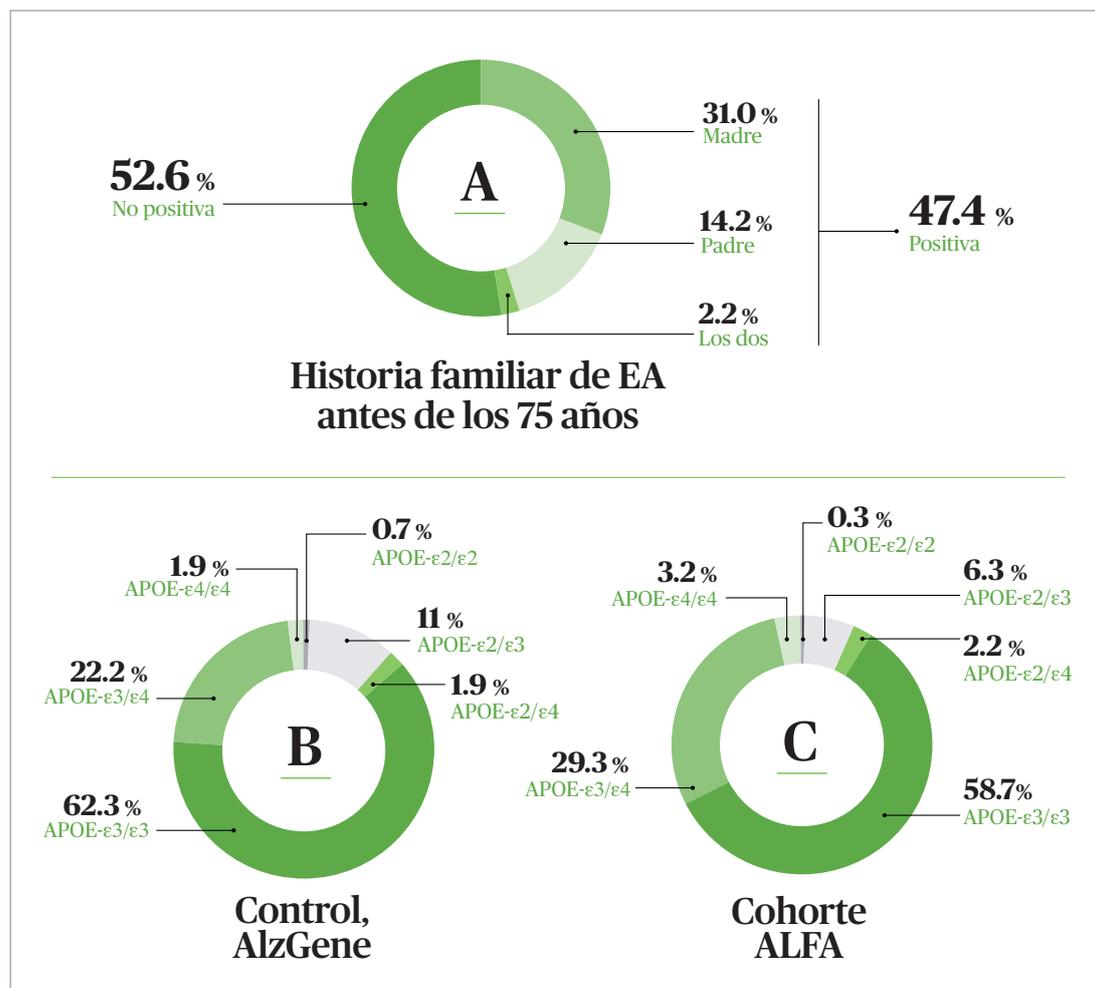
Los antecedentes familiares de la EA de los participantes se registraron durante la visita inicial. En particular, se registró quién, su madre y/o padre, había sido diagnosticado con la enfermedad. El 86,3% de los participantes tenían al menos uno de sus padres que había sufrido la EA. Al considerar una codificación más estricta de los antecedentes familiares, es destacable que el 47,4% de los participantes ALFA tenía al menos uno de sus padres que había sido diagnosticado con la EA antes de los 75 años. Específicamente, el 2,2% de los voluntarios tenía ambos padre y madre que habían sido diagnosticados con la EA (al menos uno de ellos antes de los 75 años), en el 14,2% el padre había sido diagnosticado con la EA y el 31,0% de los participantes del estudio la madre había

sido diagnosticada con la EA antes de los 75 años (**Fig. 2A**).

El análisis del genotipado del gen *APOE* reveló una mayor frecuencia del alelo *APOE-ε4* en miembros la cohorte madre ALFA que en la población general (19%

y 14%, respectivamente; $p < 0,001$). En concreto, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de genotipos *APOE-ε3/ε4* y *APOE-ε4/ε4* en el grupo ALFA y el control ($p < 0,001$). Notablemente, no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje

Figura 2. Principales factores de riesgo no modificables para la enfermedad de Alzheimer.



A) Representación esquemática de la historia familiar de EA de los participantes del estudio ALFA antes de la edad de 75 años. Porcentaje de genotipos *APOE* en la población de cohorte madre ALFA (**C**) en comparación con la control (**B**).

de individuos *APOE-ε2/ε4* en la población ALFA y la control ($p=.241$). La Figura 2 muestra el porcentaje de cada uno de los genotipos *APOE* encontrado en nuestra población (C) en comparación con los porcentajes de personas cognitivamente normales tomados de la base de datos AlzGene (B). De los 2670 participantes ALFA cuyo genotipo se pudo determinar, 9 son homocigotos *APOE-ε2/ε2* homocigotos, 167 heterocigotos *APOE-ε2/ε3*, 59 *APOE-ε2/ε4*, 1567 homocigotos *APOE-ε3/ε3*, 782 heterocigotos *APOE-ε3/ε4* y, por último, 86 son homocigotos *APOE-ε4/ε4*.

Otras variables de interés obtenidas durante la visita inicial fueron el estilo de vida y factores de riesgo cardiovascular que habían sido previamente sugeridos como factores de riesgo modificables que pueden aumentar o disminuir el riesgo de deterioro cognitivo y de demencia. Estos incluyen la comorbilidad cardiovascular y endocrino-metabólica, el nivel de actividad física de los participantes y sus hábitos de fumar [35, 42]. El 28,4% de los participantes comunicó la existencia de comorbilidades cardiovasculares, siendo la hipertensión la más frecuente (64,5%). El 42,4% comunicó comorbilidades endocrino-metabólicas: de éstos, el 69,8% informó dislipidemia actual y el 9,8% eran diabéticos. El 79,8% de los miembros de la cohorte ALFA tenía un $IMC \leq 30$ y el 73,6% una presión arterial sistólica ≤ 140 , ambos de estos rangos asociados con un menor riesgo de desarrollar deterioro

cognitivo y/o enfermedad cardiovascular. Sus hábitos de fumar y el nivel de actividad física se recogieron mediante cuestionarios autoadministrados que se fueron respondidos remotamente por el 84,1 y el 84,7% de la población ALFA, respectivamente. El 65,4% de la población encaja en la categoría de “activos” (por lo menos 150 minutos/semana de ejercicio moderado o 75 minutos/semana de ejercicio vigoroso) y el 34,6% fueron clasificados como inactivos. El 17,5% de la población ALFA nunca había fumado, el 57,6% había dejado de fumar desde hacía más de un año y, por último, el 24,9% de ellos cayó en la categoría de fumadores. Las principales características clínicas y de estilo de vida de la cohorte ALFA se comparan con los de la población general española [41] en la **Tabla 3**.

Una vez que los principales factores de riesgo no modificables de la EA (es decir, la historia familiar y el genotipo *APOE*; Figura 2) y los factores de riesgo cardiovascular (**Tabla 3**) habían sido definidos para la población ALFA, calculamos su puntuación de riesgo CAIDE de demencia, un abordaje bien establecido para evaluar la probabilidad de demencia en la vejez de acuerdo con las categorías de puntuación de riesgo a mediana edad [35]. Los índices de riesgo de los participantes se calcularon utilizando ambos modelos estadísticos CAIDE que difieren en si tienen (modelo II) o no (modelo I) el genotipo *APOE* en consideración. La **Tabla 4** muestra el

porcentaje de participantes de la cohorte ALFA que se encuentra en cada una de los rangos de puntuación CAIDE, así como su comparación con los porcentajes de población general obtenidos a partir de la publicación original [35].

El estudio de cohorte longitudinal ALFA+ incluirá un subconjunto de 440 participantes. Estará enriquecido en factores de riesgo para la EA tales como la edad, la historia familiar de la enfermedad y el genotipo *APOE-ε4*, e igualado por género. ■

Tabla 3. Características clínicas y de estilo de vida de los participantes de la cohorte madre ALFA.

	POBLACIÓN GENERAL		POBLACIÓN ALFA	
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
Hipertensión¹	47.0	39.0	51.6	34.2
Diabetes²	13.0	10.0	6.3	3.5
Dislipidemia²	35	32	35.8	29.4
IMC 25-29.9	51.0	36.0	52.3	36.5
IMC ≥30	29.0	29.0	24.3	18.0
Fumador	33.0	21.0	23.6	25.7
Ex-fumador³	36.0	14.0	61.1	55.6
No fumador	32.0	66.0	15.3	18.7

Se muestran los porcentajes. ¹autocomunicados hipertensión + sistólica/diastólica ≥140/90mmHg; ²autocomunicados; ³desde más de un año. Con la excepción de IMC 25-29,9, el resto de las comparaciones fueron estadísticamente significativas (p<0,05).

Tabla 4. Análisis de la puntuación CAIDE de riesgo de demencia de la población ALFA.

PUNTUACIÓN CAIDE MODELO I			PUNTUACIÓN CAIDE MODELO II		
Puntuación	Población CAIDE n=1350	Población ALFA n=2302	Puntuación	Población CAIDE n=1318	Población ALFA n=2247
0-5	29,7	45,0	0-5	22,2	29,2
6-7	20,0	29,1	6-8	27,5	41,1
8-9	23,1	18,4	9-10	20,0	17,5
10-11	18,2	6,2	11-12	17,2	9,3
12-15	9,0	1,3	13-18	13,1	2,9

4. DISCUSIÓN

Resultados procedentes de estudios de biomarcadores y de imagen demuestran la existencia de una fase preclínica, asintomática de la EA [11, 43-47].

Además, las intervenciones farmacológicas modificadoras de la enfermedad, dirigidas a personas con la EA leve y moderada y en pacientes en la última etapa de la enfermedad no han producido hasta ahora ningún beneficio clínico significativo [48]. En este escenario, los estudios de intervención y programas de prevención secundaria en individuos asintomáticos a riesgo toman especial relevancia, antes de que se haya producido una disfunción de la red neuronal sustancial e irreversible. Con este fin, la identificación de la patología de la EA a través de biomarcadores contribuirá al diseño eficiente y de mayor rendimiento de los ensayos preclínicos de la EA así como al de estudios de prevención.

Tomando en cuenta todo lo anterior, y con el objetivo último de identificar factores de riesgo que puedan predisponer a sufrir o ser indicativos de la EA en individuos asintomáticos, nos dispusimos a establecer una cohorte de participantes cognitivamente normales, enriquecida por historia familiar de la EA. La cohorte madre ALFA está actualmente formada por 2743 personas, representando una plataforma de investigación de gran valor. De esta población, se invitará a subgrupos

específicos a formar parte de estudios más tecnológicos aunque de menor tamaño. Uno de ellos, el estudio anidado de cohorte ALFA+ ha sido diseñado para incluir, además de la caracterización que ya se ha descrito (evaluación neuropsicológica, historia clínica, genotipado *APOE* y cuestionarios de estilo de vida), tomas de muestras de sangre y LCR, TEP de amiloide y de FDG y RM estructural y funcional. Estos procedimientos se repetirán cada tres años.

En cuanto a la evaluación neuropsicológica de los participantes de la cohorte madre ALFA, las pruebas de cribado cognitivo muestran datos descriptivos muy similares entre grupos de edad. Sin embargo, la prueba de fluencia semántica constituye una excepción, ya que muestra una tendencia a disminuir con edad avanzada (**Tabla 2**). Esto es consistente con hallazgos previos que relacionan el envejecimiento cognitivo con menores rendimientos en tareas de fluencia [25, 49]. Por otra parte, se observa un claro efecto techo en la mayor parte de las pruebas cognitivas utilizadas para fines de cribado: por ejemplo, la puntuación media para el MMSE es de 29 (de 30), 7,8 (de 8.0) para el MIS y 70 (de un total de 70) para la TO-BTII (Tabla 2). Por otra parte, las pruebas neuropsicológicas incluidas en la batería cognitiva experimental (el MBT y las subpruebas WAIS-IV) son más complejas y no muestran efectos techo, como se muestra para el MBT una vez validado [32, 50]. De hecho, el MBT se diseñó con la intención de superar algunas limitaciones de la prueba FCSRT ampliamente utilizada

para la detección de cambios sutiles de memoria episódica debido a la EA [31]. Por otro lado, el objetivo inicial de las subpruebas WAIS es evaluar la inteligencia, que, por definición, tiene un amplio rango de rendimiento en la población. De hecho, nuestros resultados sugieren que tanto el MBT como las subpruebas WAIS pueden ser útiles para la detección de cambios sutiles en el rendimiento cognitivo en evaluaciones longitudinales de individuos que puntúan dentro de rangos psicométricos normales y, así, servir como marcadores cognitivos de la EA preclínica. Sin embargo, la exposición repetida a la misma prueba podría conllevar efectos de práctica que conducen a un mejor rendimiento en evaluaciones posteriores. Estas mejoras pueden enmascarar cambios preclínicos sutiles, pero, por otro lado, efectos de práctica reducidos se han sugerido como marcadores cognitivos de fase III de la EA preclínica [51].

La exhausta evaluación cognitiva realizada en la visita inicial de la cohorte madre ALFA nos permite utilizar los resultados de los participantes en el algoritmo de selección utilizado para evaluar los perfiles de riesgo de la EA de los individuos a los que invitamos a formar parte de los proyectos activos en el BBRC como EPAD [18], la cohorte longitudinal ALFA+ o futuros ensayos y estudios. Además, la comparación de las puntuaciones entre aquellas pruebas que son comunes en la visita inicial de la cohorte madre ALFA y la primera visita de los futuros estudios y/o ensayos nos permitirá obtener datos longitudinales con el fin último de evaluar deterioro cognitivo.

Estudios familiares han demostrado que tener una historia familiar de la EA representa un factor de riesgo para LOAD [52, 53] y el mayor factor de susceptibilidad genética es el alelo *APOE-ε4* [54]. Como se mencionó anteriormente, la cohorte madre ALFA está principalmente compuesta por hijos/as de pacientes de la EA (47,4% de ellos lo son de pacientes de la EA que habían mostrado signos de deterioro cognitivo antes de los 75 años) y se podía esperar una mayor frecuencia de alelos *APOE-ε4* que en la población general. En acuerdo con esto, la frecuencia de genotipos *APOE-ε3/-ε4* y *APOE-ε4/-ε4* es significativamente mayor en miembros de la cohorte ALFA que en la población de control (Fig. 2). Por lo tanto, nuestros resultados confirman que hemos establecido una cohorte enriquecida en factores de riesgo genético para la EA. Como consecuencia, también se espera que la proporción de pacientes que presenten marcadores biológicos alterados, cambios de neuroimagen y, finalmente, desarrollo de deterioro cognitivo sea más alta, lo que podrá ser evaluado en estudios longitudinales y, en concreto, en el estudio ALFA+.

En resumen, la cohorte madre ALFA representa una valiosa estructura de participantes de mediana edad que representa todo el espectro de riesgo de sufrir la EA, de la que se alimentarán diferentes proyectos y ensayos para prevenir la enfermedad. El estudio de cohorte longitudinal ALFA+, mediante un profundo fenotipaje de los participantes, tiene

por objetivo el estudio de las etapas más tempranas de la EA preclínica, lo que ayudará a entender los cambios fisiopatológicos tempranos y a modelar las fases preclínicas con el fin de desarrollar ensayos exitosos.

Futuras aplicaciones clínicas

A lo largo del proyecto ALFA, se detectarán marcadores biológicos y de neuroimagen presentes en la fase preclínica de la EA,

precediendo o informando sobre la presencia del depósito de Aβ en el cerebro. Por otra parte, los biomarcadores utilizados y validados en estos estudios podrán constituirse como puntos finales para la construcción de ensayos de intervención aleatorizados y controlados de grandes poblaciones, lo que conducirá al desarrollo de intervenciones farmacológicas y no farmacológicas dirigidas a personas a riesgo de sufrir la EA. ■

AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría expresar nuestro más sincero agradecimiento a los voluntarios del proyecto ALFA, sin los cuales nuestra investigación no sería posible.

La investigación que ha conducido a estos resultados ha recibido financiación de la Obra Social "la Caixa". Se obtuvieron fondos adicionales del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Instituto de Salud Carlos III (PII2/00326). Las muestras biológicas se almacenan en el MARBiobanc (Barcelona) que recibe fondos del Instituto de Salud Carlos III FEDER (RDO9/0076/00036). Juan D. Gispert disfruta de una beca Ramón y Cajal (RYC-2013-13054).

Agradecemos a nuestros colaboradores que nos han apoyado en el diseño y ejecución del proyecto ALFA (Carme Junqué, Raquel Sánchez-Valle, Jesús Pujol, Carmen Ayuso, Jordi Sunyer, Jordi Alonso y Jordi Peña-Casanova), y al comité científico internacional del proyecto (Bruno Dubois, Zaven Khachaturian, Javier Nieto, Ronald Petersen, Hugo Vanderstichele y Bengt Winblad). Agradecemos a Neil Forrest la revisión cuidadosa de este manuscrito y a los revisores de este artículo por sus valiosos comentarios.

En memoria de la Sra. María Thos i Negre; los autores desean agradecer su donación a la Fundación Pasqual Maragall para la investigación sobre la prevención de la enfermedad de Alzheimer. ■

REFERENCIAS

1. Takizawa, C., et al., *Epidemiological and economic burden of Alzheimer's disease: a systematic literature review of data across Europe and the United States of America*. J Alzheimers Dis, 2015. **43**(4): p. 1271-84.
2. Alzheimer's Disease International, *World Alzheimer Report 2015. The global impact of dementia: an analysis of prevalence, incidence, cost and trends*. 2015: London.
3. Schneider, L.S., et al., *Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014*. J Intern Med, 2014. **275**(3): p. 251-83.
4. Molinuevo, J.L., et al., *The clinical use of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: a consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative*. Alzheimers Dement, 2014. **10**(6): p. 808-17.
5. Bernard, C., et al., *Time course of brain volume changes in the preclinical phase of Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement, 2014. **10**(2): p. 143-151 e1.
6. Ikeda, M., et al., *MRI-based quantitative assessment of the hippocampal region in very mild to moderate Alzheimer's disease*. Neuroradiology, 1994. **36**(1): p. 7-10.
7. Landau, S.M., et al., *Amyloid deposition, hypometabolism, and longitudinal cognitive decline*. Ann Neurol, 2012. **72**(4): p. 578-86.
8. Ewers, M., et al., *Cognitive reserve associated with FDG-PET in preclinical Alzheimer disease*. Neurology, 2013. **80**(13): p. 1194-201.
9. Johnson, K.A., et al., *Florbetapir (F18-AV-45) PET to assess amyloid burden in Alzheimer's disease dementia, mild cognitive impairment, and normal aging*. Alzheimers Dement, 2013. **9**(5 Suppl): p. S72-83.
10. Doraiswamy, P.M., et al., *Amyloid-beta assessed by florbetapir F 18 PET and 18-month cognitive decline: a multicenter study*. Neurology, 2012. **79**(16): p. 1636-44.
11. Vos, S.J., et al., *Preclinical Alzheimer's disease and its outcome: a longitudinal cohort study*. Lancet Neurol, 2013. **12**(10): p. 957-65.
12. Vellas, B., et al., *Prevention trials in Alzheimer's disease: an EU-US task force report*. Prog Neurobiol, 2011. **95**(4): p. 594-600.
13. Alzheimer Association, *Changing the Trajectory of Alzheimer's Disease: How a Treatment by 2025 Saves Lives and Dollars*. 2010.
14. Vellas, B., et al., *Designing drug trials for Alzheimer's disease: what we have learned from the release of the phase III antibody trials: a report from the EU/US/CTAD Task Force*. Alzheimers Dement, 2013. **9**(4): p. 438-44.
15. Sager, M.A., B. Hermann, and A. La Rue, *Middle-aged children of persons with Alzheimer's disease: APOE genotypes and cognitive function in the Wisconsin Registry for Alzheimer's Prevention*. J Geriatr Psychiatry Neurol, 2005. **18**(4): p. 245-9.
16. Coats, M. and J.C. Morris, *Antecedent biomarkers of Alzheimer's disease: the adult children study*. J Geriatr Psychiatry Neurol, 2005. **18**(4): p. 242-4.
17. Ritchie, C.W., K. Wells, and K. Ritchie, *The PREVENT research programme--a novel research programme to identify and manage midlife risk for dementia: the conceptual framework*. Int Rev Psychiatry, 2013. **25**(6): p. 748-54.
18. Ritchie, C.W., et al., *Development of interventions for the secondary prevention of Alzheimer's dementia: the European Prevention of Alzheimer's Dementia (EPAD) project*. Lancet Psychiatry, 2016. **3**(2): p. 179-86.
19. Folstein, M.F., S.E. Folstein, and P.R. McHugh, *"Minimal state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician*. J Psychiatr Res, 1975. **12**(3): p. 189-98.
20. Blesa, R., et al., *Clinical validity of the 'minimal state' for Spanish speaking communities*. Neuropsychologia, 2001. **39**(11): p. 1150-7.
21. Buschke, H., et al., *Screening for dementia with the memory impairment screen*. Neurology, 1999. **52**(2): p. 231-8.
22. Bohm, P., et al., *[Spanish version of the Memory Impairment Screen (MIS): normative data and discriminant validity]*. Neurologia, 2005. **20**(8): p. 402-11.
23. Quinones-Ubeda, S., *Psychology*. 2009, Barcelona: Ramon Llull University.
24. Ramier AM, H.H., *Role respectif des atteintes frontales et de la lateralisation lesionnelle dans les deficits de la fluence verbale*. Rev Neurol (Paris) 1970. **123**: p. 17-22.

25. Pena-Casanova, J., et al., *Spanish Multicenter Normative Studies (NEURONORMA Project): norms for verbal fluency tests*. Arch Clin Neuropsychol, 2009. **24**(4): p. 395-411.
26. Morris, J.C., *The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules*. Neurology, 1993. **43**(11): p. 2412-4.
27. Goldberg, D., et al., *Detecting anxiety and depression in general medical settings*. BMJ, 1988. **297**(6653): p. 897-9.
28. Monton, C., et al., *[Anxiety scales and Goldberg's depression: an efficient interview guide for the detection of psychologic distress]*. Aten Primaria, 1993. **12**(6): p. 345-9.
29. Morales Gonzalez, J.M., et al., *[Validation of the S-IQCODE: the Spanish version of the informant questionnaire on cognitive decline in the elderly]*. Arch Neurobiol (Madr), 1992. **55**(6): p. 262-6.
30. Jorm, A.F. and P.A. Jacomb, *The Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly (IQCODE): socio-demographic correlates, reliability, validity and some norms*. Psychol Med, 1989. **19**(4): p. 1015-22.
31. Buschke, H., *The rationale of the Memory Binding Test, in Dementia and Memory*, L.G. Nilsson and N. Ohta, Editors. 2014, Psychology Press: New York. p. 55-71.
32. Gramunt, N., et al., *Reference Data of the Spanish Memory Binding Test in a Midlife Population from the ALFA STUDY (Alzheimer's and Family)*. J Alzheimers Dis, 2015. **48**(3): p. 613-25.
33. Wechsler, D., *WAIS-IV, Escala de inteligencia de Wechsler para adultos-IV*. 2012, Madrid: Pearson.
34. Rami L, V.-P.C., Bartrés-Faz D, Caprile C, Solé-Padullés C, Castellvi M, Olives J, Bosch B, Molinuevo JL., *Cognitive reserve questionnaire. Scores obtained in a healthy elderly population and in one with Alzheimer's disease*. Rev Neurol, 2011. **52**(4): p. 195-201.
35. Kivipelto, M., 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): p. 735-41.
36. Brooks, R., *EuroQol: the current state of play*. Health Policy 1996. **37**(1): p. 53-72.
37. The EuroQol Group, *EuroQol-a new facility for the measurement of health-related quality of life*. Health Policy 1990. **16**(3): p. 199-208.
38. Elosua, R., et al., *Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire In Spanish Women. Investigators of the MARATDON Group*. Med Sci Sports Exerc, 2000. **32**(8): p. 1431-7.
39. Haro, J.M., et al., *[Prevalence of mental disorders and associated factors: results from the ESEMeD-Spain study]*. Med Clin (Barc), 2006. **126**(12): p. 445-51.
40. Eysenck, H., Eysenck, SB, *EPQ-R. Cuestionario revisado de personalidad de Eysenck*. 10th ed. 2001, Madrid: TEA ediciones.
41. Grau, M., et al., *[Cardiovascular risk factors in Spain in the first decade of the 21st Century, a pooled analysis with individual data from 11 population-based studies: the DARIOS study]*. Rev Esp Cardiol, 2011. **64**(4): p. 295-304.
42. Wilson, P.W., et al., *Prediction of coronary heart disease using risk factor categories*. Circulation, 1998. **97**(18): p. 1837-47.
43. Bateman, R.J., et al., *Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease*. N Engl J Med, 2012. **367**(9): p. 795-804.
44. Knopman, D.S., et al., *Short-term clinical outcomes for stages of NIA-AA preclinical Alzheimer disease*. Neurology, 2012. **78**(20): p. 1576-82.
45. Mormino, E.C., et al., *Amyloid and APOE epsilon4 interact to influence short-term decline in preclinical Alzheimer disease*. Neurology, 2014. **82**(20): p. 1760-7.
46. Reiman, E.M., et al., *Brain imaging and fluid biomarker analysis in young adults at genetic risk for autosomal dominant Alzheimer's disease in the presenilin 1 E280A kindred: a case-control study*. Lancet Neurol, 2012. **11**(12): p. 1048-56.
47. Villemagne, V.L., et al., *Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study*. Lancet Neurol, 2013. **12**(4): p. 357-67.
48. Cummings, J.L., T. Morstorf, and K. Zhong, *Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures*. Alzheimers Res Ther, 2014. **6**(4): p. 37.

49. Lucas, J.A., et al., *Mayo's older Americans normative studies: category fluency norms*. J Clin Exp Neuropsychol, 1998. **20**(2): p. 194-200.
50. Gramunt, N., et al., *Psychometric properties of the Memory Binding Test (MBT): test-retest reliability and convergent validity*. Submitted.
51. Hassenstab, J., et al., *Absence of practice effects in preclinical Alzheimer's disease*. Neuropsychology, 2015. **29**(6): p. 940-8.
52. Green, R.C., et al., *Risk of dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease*. JAMA, 2002. **287**(3): p. 329-36.
53. Cupples, L.A., et al., *Estimating risk curves for first-degree relatives of patients with Alzheimer's disease: the REVEAL study*. Genet Med, 2004. **6**(4): p. 192-6.
54. Farrer, L.A., 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, 1997. **278**(16): p. 1349-56.
55. Kivipelto, M., et al., *The Finnish Geriatric Intervention Study to Prevent Cognitive Impairment and Disability (FINGER): study design and progress*. Alzheimers Dement, 2013. **9**(6): p. 657-65. ■

barcelona β **eta**
BRAIN RESEARCH CENTER

fundación
pasqual
maragall

C/Wellington, 30
08005 Barcelona-España
Tel.: (+34) 93 316 09 94

www.barcelonabeta.org
www.fpmaragall.org