

DOCUMENTO DE COMISIÓN/GRUPO DE TRABAJO

Estandarización de aspectos preanalíticos para el estudio de biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer en el líquido cefalorraquídeo[☆]

Standardization of preanalytical factors to study biomarkers of Alzheimer's disease in cerebrospinal fluid

Alejandro Gella Concustell^{a,b,*}, Albert Lladó Plarrumani^c y José Luis Molinuevo Guix^c

^a Institut de Neurociències i Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

^b Grupo de Trabajo de Neuroquímica y Enfermedades Neurológicas y Comisión de Proteínas de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC), Barcelona, España

^c Unidad de Alzheimer y otros trastornos cognitivos, Servicio de Neurología, Hospital Clínic, Barcelona, España

Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más frecuente de demencia, con una prevalencia que aumenta significativamente con la edad. Durante las últimas décadas, se está produciendo un paulatino envejecimiento de nuestra sociedad que conllevará a un aumento significativo del número de casos de EA. Puesta en el punto de mira como la «epidemia silenciosa» del siglo ^{xxi}, la EA será uno de los problemas socio-sanitarios de mayor envergadura a resolver en los próximos años. Por tanto, existe la necesidad urgente de validar biomarcadores de la EA que permitan no solo detectar esta enfermedad en los estadios iniciales, sino que además permitan evaluar nuevas terapias encaminadas a detener o retrasar su evolución.

La EA es una patología neurodegenerativa de curso progresivo y, hasta ahora, incurable, que se caracteriza histopatológicamente por una acumulación extracelular, en forma de placas seniles, de la proteína β -amiloide ($A\beta$) y por una acumulación intracelular de la forma hiperfosforilada de la proteína tau en forma de ovillos neurofibrilares¹. Su fenotipo clínico se caracteriza por un gradual deterioro cognitivo que afecta inicialmente, en su forma más típica, a la memoria y, posteriormente, a otros dominios cognitivos, generando una alteración funcional progresiva hasta conducir finalmente a la muerte.

Recientemente, se han propuesto nuevos criterios diagnósticos para la EA por parte del National Institute on Aging of the National Institutes of Health (NIA-NIH) junto con la Alzheimer's Association (AA). Los principales cambios respecto a los bien establecidos criterios del The National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) son la estratificación de la enfermedad en 3 fases y la incorporación de biomarcadores como potencial herramienta diagnóstica²⁻⁵. Asimismo, el nuevo consenso generado por el International Working Group

[☆] Este documento tiene la conformidad de las otras dos Sociedades (AEBM y AEFA) como Recomendación profesional en el ámbito del Laboratorio Clínico.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: alexgella@gmail.com (A. Gella Concustell).

Tabla 1 Biomarcadores en el líquido cefalorraquídeo empleados para el diagnóstico de la EA (10)

Biomarcador	Controles (pg/ml)	EA (pg/ml)
A β ₄₂	794 $\pm$ 20	< 500 ^a
T-tau	136 $\pm$ 89 (21-50 años)	^a
	243 $\pm$ 127 (51-70 años)	> 450
	341 $\pm$ 171 (>71 años)	> 600 ^a
P-tau _{181P}	23 $\pm$ 2	> 60 ^a

Resultados obtenidos empleando el equipo de reactivos de Inno-genetics.

^a No relevante para el diagnóstico de la EA (> 60 años).

* p < 0,001.

for New Research Criteria for the Diagnosis of Alzheimer's Disease específica que los marcadores más útiles para establecer el diagnóstico de la enfermedad son los denominados marcadores fisiopatológicos, entre los que se incluyen varios analitos medibles en líquido cefalorraquídeo (LCR)⁶. En cuanto a estos, hasta la fecha, se han establecido 3: la A β ₄₂ aminoácidos (A β ₄₂), la proteína tau total (T-tau) y su forma fosforilada en la posición 181 (P-tau_{181P})⁷⁻⁹. Se ha descrito ampliamente que la medida conjunta de estos marcadores en el LCR permite no solo el diagnóstico temprano de la forma esporádica de EA, sino que también permite identificarla en su fase preclínica con una sensibilidad y una especificidad $\geq$ 85%¹⁰⁻¹³. Sin embargo, y siempre interpretándose en su contexto clínico, para extender el uso de estos marcadores en la práctica clínica es necesaria una mayor estandarización de los factores preanalíticos.

Biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer

Proteína β -amiloide

La proteína A β ₄₂ se origina por la proteólisis por parte de secretasas (β y γ) sobre la proteína precursora de amiloide. El procesamiento de estos fragmentos a través del camino amiloidogénico acaba llevando a la formación y la agregación del péptido A β ₄₂ que se acumula en forma de placas seniles. El análisis en el LCR del péptido A β ₄₂ demuestra una reducción significativa en su concentración (tabla 1) si es comparada con la población sana^{10,14}.

Proteína tau total

La EA se caracteriza por la inclusión intraneuronal de la proteína asociada a microtúbulos tau. En la población sana, la concentración de T-tau en el LCR aumenta con la edad (tabla 1). Sin embargo, la concentración de la proteína T-tau se ve significativamente incrementada en pacientes con la EA al compararlos con sujetos controles de la misma edad^{7,14}.

Proteína tau fosforilada

La proteína tau está marcadamente hiperfosforilada (39 lugares de fosforilación) en la EA. Esta anormal hiperfosforilación resulta en una pérdida de su función estructural

que conlleva una disfunción del transporte axonal. La detección de la forma fosforilada en la posición 181 está significativamente aumentada en la EA (tabla 1) si se compara con los controles^{9,14}.

Objeto y campo de aplicación

El objeto de esta recomendación es establecer el procedimiento para la obtención del LCR y las condiciones para su manipulación, con el fin de estandarizar algunas variables preanalíticas asociadas a la medida de los marcadores biológicos actualmente recomendados en este fluido para el diagnóstico de la EA.

Basándose en la evidencia científica, esta recomendación pretende minimizar los errores preanalíticos con la finalidad de mejorar la transferibilidad de los resultados entre diferentes laboratorios y aumentar la validez diagnóstica de la EA.

Este documento está dirigido a todos los profesionales sanitarios que gestionen muestras de LCR y estén especialmente involucrados en el diagnóstico de la EA.

Variables

Variables relacionadas con la punción lumbar

Punción lumbar

El procedimiento más habitual para la obtención del LCR es la punción lumbar (PL). El paciente se coloca en decúbito lateral, con las rodillas pegadas al pecho y el cuello flexionado, o bien sentado con el cuello flexionado anteriormente y la espalda arqueada hacia delante de modo que queden abiertos los espacios intervertebrales. La punción se realiza entre las vértebras L3-L4 o L4-L5. Trazando una línea desde las crestas ilíacas hasta la columna, se introduce una aguja biselada atraumática (0,7 mm y 22 G) en el espacio intervertebral, debiéndose llegar hasta el espacio subaracnoideo para proceder a retirar el fiador interno dejando salir el líquido hasta el recipiente donde vaya a ser recogido¹⁵⁻¹⁸.

Ritmo circadiano

No se han demostrado variaciones intraindividuales relacionadas con la hora de extracción. Sin embargo, para facilitar la recepción, el procesamiento y el almacenamiento de la muestra, es recomendable realizar la PL entre 9 y 13 h^{16,18}.

Ingesta

No se ha demostrado que la ingesta de alimentos afecte de manera significativa a las concentraciones de A β ₄₂, T-tau y P-tau_{181P}, por lo que no es necesario estar en ayunas antes de efectuar la PL^{16,18}.

Volumen de muestra

El fraccionamiento de la muestra no es necesario cuando la punción es atraumática porque no se han encontrado diferencias secuenciales. Aunque el volumen estándar de extracción es de 10-12 ml, se recomienda un volumen mínimo de 1,5 ml para permitir el análisis de las muestras^{16,18}.

Tubo de recogida de muestra

Uno de los factores que afecta en mayor medida a la variabilidad preanalítica en la medida de marcadores de EA es el tipo de tubo de recogida de muestra. Se ha descrito que la proteína A β se une inespecíficamente a la pared de los tubos de recogida de muestra, dando como resultado una infravaloración de su concentración real^{18,19}. Para minimizar esta adsorción inespecífica, es indispensable usar tubos de propileno (PP) en el momento de recoger el LCR, evitando en todo momento el uso de tubos de vidrio o poliestireno^{19,20}. Por otro lado, hay que mencionar que aun empleando tubos de PP, se han encontrado diferencias significativas en los valores de los biomarcadores de la EA en función del laboratorio fabricante que suministra los mismos²⁰. Dada la importancia a la hora de escoger el tubo de PP, en la [tabla 1](#) se incluyen la marca y la referencia de los tubos recomendados.

Variables relacionadas con la manipulación y el almacenaje de la muestra

Después de obtener el LCR mediante PL, las muestras pueden estar sujetas a distintos factores que pueden influir sobre la correcta medida de los biomarcadores de EA.

Centrifugación

Se recomienda centrifugar las muestras antes de transcurridas 2 h de su extracción, manteniendo una velocidad de

2.000 xg durante 10 min a temperatura ambiente (en torno a 20 °C). Para muestras hemorrágicas, esta centrifugación está especialmente indicada, ya que una concentración de eritrocitos superior a 500 células/ μ L puede interferir en la posterior medida.

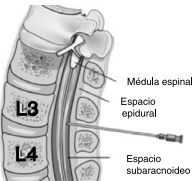
Las muestras una vez centrifugadas pueden conservarse un máximo de 5 días a 4 °C, aunque es recomendable preparar alícuotas lo antes posible en tubos de PP con rosca evitando el empleo de pipetas de vidrio para prevenir la adsorción del péptido A β ₄₂. Es recomendable emplear volúmenes pequeños (0,25 o 0,5 mL) sobrepasando hasta el 75% de la capacidad del tubo para minimizar la adsorción y evaporación de la muestra.

Tiempo y temperatura hasta la conservación

Para aquellas muestras que deban ser enviadas a otro laboratorio para su análisis, se recomienda que no transcurran más de 5 días antes de su congelación.

Conservación

Las alícuotas de LCR deben ser congeladas a -80 °C hasta su análisis, evitando más de 2 ciclos de congelación/descongelación. Las muestras de LCR conservadas a -80 °C son estables hasta al menos 2 años. Por otro lado, las muestras conservadas a -20 °C pueden almacenarse hasta 2 meses.

	PARÁMETRO	PROCEDIMIENTO	RECOMENDACIÓN
	Punción Lumbar	Tipo de aguja	22G (atraumática)
		Localización	Espacio intervertebral L3-L5
		Medicación	Evitar en pacientes tratados con anticoagulantes
	Ritmo circadiano	Hora del día de la extracción	Durante la mañana (9 –13 horas)
	Ingesta	Consumo de alimentos	No es necesario estar en ayunas
	Volumen de muestra	Volumen LCR extraído	Volumen mínimo de 1,5 mL
	Tipo de tubo	Material	PP ^(a)
	Muestras paralelas	Suero, plasma, extracción de ADN	Sí, si es posible (al mismo tiempo que PL)
	Procesamiento	Centrifugación	2.000 xg durante 10 min a TA
		Concentración eritrocitos	< 500 células/ μ L
	Tiempo hasta almacenaje		< 5 días, 4 °C
	Alícuotas	Volumen / Capacidad	0,25-0,5 mL / $\geq$ 75%
		Material	PP ^(a)
	Conservación / Estabilidad	Temperatura (Tiempo)	-80 °C (2 años) ; -20 °C (2 meses)
	Ciclos congelación/descongelación		2 como máximo

Abreviaciones: LCR, líquido cefalorraquídeo; PL, punción lumbar; PP, polipropileno; TA, temperatura ambiente.

^(a) PP recomendado por BIOMARKAPD bajo el auspicio de el Joint Programming Neurodegenerative Disease (JPND):

Tubos de 10 mL (Sarstedt #62.610.018), Tubos de 2, 1 o 0,5 mL (Sarstedt #72.694.007)

Figura 1 Recomendaciones para la estandarización de variables preanalíticas en el estudio de biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer en el líquido cefalorraquídeo.

Recomendaciones

Variables relacionadas con la punción lumbar

Punción lumbar

- La punción se realiza entre las vértebras L3-L4 o L4-L5.
- Emplear aguja biselada atraumática (0,7 mm y 22 G).

Ritmo circadiano

- Realizar la PL entre 9 y 13 h.

Ingesta

- No es necesario estar en ayunas antes de efectuar la PL.

Volumen de muestra

- Volumen estándar de extracción es de 10-12 ml. Volumen mínimo de 1,5 ml.

Tubo de recogida de muestra

- Indispensable usar tubos de PP en el momento de recoger el LCR.

Variables relacionadas con la manipulación y el almacenaje de la muestra

Centrifugación

- Centrifugar las muestras antes de transcurridas 2 h de su extracción.
- Centrifugar a una velocidad de 2.000 xg durante 10 min a temperatura ambiente (~20 °C).
- Preparar alícuotas lo antes posible en tubos de PP con rosca una vez centrifugadas las muestras. Emplear volúmenes pequeños (0,25 o 0,5 ml) sobrepasando hasta el 75% de la capacidad del tubo.

Tiempo y temperatura hasta conservación

- Las muestras una vez centrifugadas pueden conservarse un máximo de 5 días a 4 °C.

Conservación

- Las alícuotas de LCR deben ser congeladas a –80 °C hasta su análisis.
- Evitar más de 2 ciclos de congelación/descongelación.
- Las muestras de LCR conservadas a –80 °C son estables hasta al menos 2 años.
- Las muestras de LCR conservadas a –20 °C pueden almacenarse hasta 2 meses.

En la [figura 1](#) se recogen, a modo de resumen, las recomendaciones establecidas para la estandarización de aspectos preanalíticos para el estudio de biomarcadores de la EA en el LCR.

Agradecimientos

A los miembros del grupo de trabajo de Neuroquímica y Enfermedades Neurológicas de la SEQC (C. Andrés

Fernández, J.L. García de Veas, F. Marqués García), así como a todos los componentes de la comisión de Proteínas (M.C. Cárdenas Fernández, M. Fernández García, J. Jiménez Jiménez, G. Marcaida Benito, D. Pérez Surribas, E. Pitters Pérez, C. Valdecabres Ortiz, E. Zapico Muñiz) por su revisión crítica de la recomendación aquí presentada.

Bibliografía

1. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2010;362:329–44.
2. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7:263–9.
3. Jack CR Jr, Albert MS, Knopman DS, McKhann GM, Sperling RA, Carrillo MC, et al. Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7:257–62.
4. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, 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. *Alzheimers Dement*. 2011;7:280–92.
5. Albert MS, Dekosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, 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;7:270–9.
6. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Hampel H, Molinuevo JL, Blennow K, et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: The IWG-2 criteria. *Lancet Neurol*. 2014;13:614–29.
7. Sjögren M, Vanderstichele H, Agren H, Zachrisson O, Edsberg M, Wikkelso C, et al. Tau and Abeta42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21-93 years of age: Establishment of reference values. *Clin Chem*. 2001;47:1776–81.
8. Blennow K. CSF biomarkers for mild cognitive impairment. *J Intern Med*. 2004;256:224–34.
9. Hampel H, Blennow K, Shaw LM, Hoessler YC, Zetterberg H, Trojanowski JQ. Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 2010;45:30–40.
10. Humpel C. Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. *Trends Biotechnol*. 2011;29:26–32.
11. Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2010;6:131–44.
12. Molinuevo JL, Blennow K, Dubois B, Engelborghs S, Lewczuk P, Perret-Liaudet A, 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;10:808–17.
13. Kang J-H, Korecka M, Toledo JB, Trojanowski JQ, Shaw LM. Clinical utility and analytical challenges in measurement of cerebrospinal fluid amyloid-β1-42 and τ proteins as Alzheimer Disease biomarkers. *Clin Chem*. 2013;59:903–16.
14. Valdecabres C, Gella A, Castillo C, Pérez D, Martínez C, Llopart I. Recomendaciones para el estudio de las proteínas del líquido cefalorraquídeo. Documentos de la SEQC. 2014:57–67.
15. Guillén E, Buño A, Díaz R, Galán A, Guevara P, Malumbres S, et al. Recomendaciones para el estudio del líquido cefalorraquídeo. Documentos de la SEQC. 2010:12–6.

16. Vanderstichele H, Bibl M, Engelborghs S, le Bastard N, Lewczuk P, Molinuevo JL, et al. Standardization of preanalytical aspects of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: A consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimers Dement*. 2012;8: 65–73.
17. Teunissen CE, Tumani H, Engelborghs S, Mollenhauer B. Bio-banking of CSF: International standardization to optimize biomarker development. *Clin Biochem*. 2014;47(4-5):288–92.
18. Del Campo M, Mollenhauer B, Bertolotto A, Engelborghs S, Hampel H, Simonsen AH, et al. Recommendations to standardize preanalytical confounding factors in Alzheimer's and Parkinson's disease cerebrospinal fluid biomarkers: An update. *Biomark Med*. 2012;6:419–30.
19. Lehmann S, Schraen S, Quadrio I, Paquet C, Bombois S, Delaby C, et al. Impact of harmonization of collection tubes on Alzheimer's disease diagnosis. *Alzheimers Dement*. 2014; 10:S390–4.
20. Perret-Liaudet A, Pelpel M, Tholance Y, Dumont B, Vanderstichele H, Zorzi W, et al. Cerebrospinal fluid collection tubes: A critical issue for Alzheimer disease diagnosis. *Clin Chem*. 2012;58:787–9.