



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

# Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos

Jordi Sarto Alonso

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA



# **Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos**

Memoria de tesis doctoral presentada por **Jordi Sarto Alonso** para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona.

## **Dirigida por:**

**Raquel Sánchez del Valle Díaz**, directora y tutora, Unitat d'Alzheimer i altres Trastorns Cognitius, Servicio de Neurología del Hospital Clínic de Barcelona, Fundació de Recerca Clínic - Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) e Instituto de Neurociencias, Departamento de Medicina, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universitat de Barcelona, España.

**Mircea Balasa**, Unitat d'Alzheimer i altres Trastorns Cognitius, Servicio de Neurología del Hospital Clínic de Barcelona, Fundació de Recerca Clínic - Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, España.

## **Programa de Doctorado Medicina e Investigación Traslacional.**

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Barcelona.

Abril de 2025

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

## **AGRADECIMIENTOS**

La presente tesis ha sido realizada con la inestimable ayuda de numerosas personas, a quienes me gustaría transmitir mis más sinceros agradecimientos, especialmente:

A Mircea, Raquel y Albert, por su liderazgo, guía y horas dedicadas a mi aprendizaje profesional, científico e investigador y por su disponibilidad y fácil accesibilidad. Gracias por ser los mejores referentes y haberme permitido aprender a vuestro lado.

Al resto del equipo de la Unitat d'Alzheimer i altres Trastorns Cognitius, en especial a Nuria, Diana, Neus, Jordi, Bea y Guada, por su compañerismo en el día a día, soporte, ayuda y haber podido crecer y aprender junto a vosotros, tanto a nivel personal como profesional.

A mis padres y a Alma, por su compañía, amor, consejos de valor inestimable y apoyo incondicional en todo momento.

## **FINANCIACIÓN**

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) a través de los proyectos FIS 19/00198 y 22/00343 (Mircea Balasa), 19/00449 y 23/00173 (Albert Lladó) y 20/00448 (Raquel Sánchez del Valle), proyectos co-fundados por la Unión Europea.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....	9
ENUMERACIÓN DE LOS ARTÍCULOS DE LA TESIS .....	10
RESUMEN .....	11
INTRODUCCIÓN .....	15
Aspectos generales, epidemiología y etiología del deterioro cognitivo .....	15
Métodos diagnósticos actuales de las principales etiologías neurodegenerativas de deterioro cognitivo .....	17
Biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo .....	33
HIPÓTESIS .....	44
OBJETIVOS .....	46
MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS .....	48
Trabajo número 1 .....	48
Trabajo número 2 .....	50
Trabajo número 3 .....	52
DISCUSIÓN .....	55
CONCLUSIONES .....	76
BIBLIOGRAFÍA .....	78

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A $\beta$ : proteína beta-amiloide cerebral

BP: biomarcador plasmático

DCL: deterioro cognitivo leve

DCLw: demencia por cuerpos de Lewy

DFT: demencia frontotemporal

EA: enfermedad de Alzheimer

E: especificidad

FG: filtrado glomerular

FME: fármacos modificadores de enfermedad

GFAP: proteína ácida fibrilar glial

IMC: índice de masa corporal

NfL: cadena ligera de neurofilamentos

NND: etiologías no neurodegenerativas de deterioro cognitivo

P: precisión de una prueba (de *accuracy* en inglés: verdaderos positivos + verdaderos negativos / total)

P-tauX: proteína tau fosforilada en el residuo X

S: sensibilidad

T-tau: proteína tau total

UCH-L1: hidrolasa L1 C-terminal de la ubiquitina

## ENUMERACIÓN DE LOS ARTÍCULOS DE LA TESIS

### Tesis en formato de compendio de publicaciones

La tesis consta de tres objetivos y tres artículos.

1. **Jordi Sarto**, Raquel Ruiz-García, Núria Guillén, Óscar Ramos-Campoy, Neus Falgàs, Diana Esteller-Gauxax, José Contador, Guadalupe Fernández, Yolanda González, Adrià Tort-Merino, Jordi Juncà-Parella, Bea Bosch, Sergi Borrego-Écija, Laura Molina-Porcel, Magda Castellví, Miguel Vergara, Anna Antonell, Josep María Augé, Laura Naranjo, Raquel Sánchez-Valle, Albert Lladó, Mircea Balasa. Diagnostic Performance and Clinical Applicability of Blood-Based Biomarkers in a Prospective Memory Clinic Cohort. *Neurology*. 2023. Volumen 100 (8). Páginas 860-873. Factor de impacto: 7,7; Cuartil (Clinical Neurology): 1, Decil: 1 (JCR 2023).
2. **Jordi Sarto**, Diana Esteller-Gauxax, Adrià Tort-Merino, Nuria Guillén, Agnès Pérez-Millan, Neus Falgàs, Sergi Borrego-Écija, Guadalupe Fernández-Villullas, Bea Bosch, Jordi Juncà-Parella, Anna Antonell, Laura Naranjo, Raquel Ruiz-García, Josep María Augé, Raquel Sánchez-Valle, Albert Lladó, Mircea Balasa. Impact of demographics and comorbid conditions on plasma biomarkers concentrations and their diagnostic accuracy in a memory clinic cohort. *Journal of Neurology*. 2024. Volumen 271 (4). Páginas 1973-1984. Factor de impacto: 4,8; Cuartil (Clinical Neurology): 1, Decil: 2 (JCR 2023).
3. **Jordi Sarto**, Diana Esteller-Gauxax, Núria Guillén, Neus Falgàs, Sergi Borrego-Écija, Miquel Massons, Guadalupe Fernández-Villullas, Yolanda González, Adrià Tort-Merino, Beatriz Bosch, Magda Castellví, Gerard Piñol-Ripoll, Jordi Juncà-Parella, Andrea del Val, Agnès Pérez-Millan, Aina Comas, Anna Antonell, Laura Naranjo, Raquel Ruiz-García, Josep María Augé, Raquel Sánchez-Valle, Albert Lladó, Mircea Balasa. Accuracy and clinical applicability of plasma tau 181 and 217 for Alzheimer's disease diagnosis in a memory clinic cohort. *Journal of Neurology*. 2025. ePub 23 enero de 2025, 272:160. Factor de impacto: 4,8; Cuartil (Clinical Neurology): 1, Decil: 2 (JCR 2023).

## RESUMEN

**Títol:** Utilitat dels biomarcadors plasmàtics per al diagnòstic etiològic del deteriorament cognitiu en un centre especialitzat de trastorns cognitius.

**Introducció:** el deteriorament cognitiu suposa un dels principals problemes de salut a nivell mundial i es preveu que augmenti exponencialment els propers anys. Les etiologies de deteriorament cognitiu més freqüents són les neurodegeneratives (malaltia d'Alzheimer [MA], demència per cossos de Lewy i demència frontotemporal [DFT]), que es defineixen neuropatològicament per l'acúmul anòmal d'una/es proteïna/es concretes específiques. Un diagnòstic etiològic específic s'associa a una millora pronòstica, a la reducció de costos socials i econòmics i a l'accès a tractament farmacològic i no farmacològic específic. La MA és la principal etiologia de deteriorament cognitiu i es defineix biològicament per l'acúmul anòmal de proteïna amiloide i tau. Actualment, es pot realitzar un diagnòstic precís de la MA basat en biomarcadors (PET amiloide o biomarcadors en líquid cefalorraquidi), però aquests biomarcadors són cars, invasius i només estan disponibles en centres especialitzats. En els darrers anys s'han desenvolupat biomarcadors plasmàtics (BP) per identificar les diferents etiologies neurodegeneratives del deteriorament cognitiu. Tot i els prometedors resultats en els estudis recents, cal conèixer l'aplicabilitat clínica en cohorts de pràctica clínica habitual dels diferents BP, així com l'impacte de factors confusors aliens a la malaltia neurodegenerativa (p. ex., edat, índex massa corporal [IMC], filtrat glomerular [FG]) sobre els BP. Aquesta tesi pretén estudiar i analitzar els BP més prometedors en una cohort de pràctica clínica habitual en un centre terciari de deteriorament cognitiu per tal de conèixer-ne l'aplicabilitat clínica per a la implementació rutinària.

**Hipòtesis:** i. Els BP p-tau181, GFAP, NfL, t-tau i UCH-L1 tindran una precisió diagnòstica moderada o elevada per identificar l'etiologia del deteriorament cognitiu en una cohort prospectiva de pràctica clínica habitual. L'ús d'algoritmes específics basats en BP en tres escenaris clínics (discriminació d'amiloïdosi cerebral, diagnòstic de DFT, discriminació d'etiologies neurodegeneratives) tindrà una aplicació pràctica que permetrà augmentar la precisió diagnòstica i disminuir la necessitat d'altres proves complementàries. ii. La presència

d'alguns factors demogràfics i analítics, certes comorbiditats i la medicació concomitant modificaran els nivells plasmàtics de p-tau181, p-tau217, GFAP i NfL més enllà de la patologia neurològica. iii. El BP p-tau217 serà igual o superior a p-tau181 plasmàtic per a la discriminació de l'estat d'amiloïdosi cerebral de la MA i la seva aplicació mitjançant un algoritme amb dos punts de tall permetrà un diagnòstic precís i robust i l'estalvi d'un nombre elevat de proves diagnòstiques actuals.

**Objectius:** i. Estudiar la capacitat discriminatòria i aplicabilitat clínica dels BP p-tau181, GFAP, NfL, t-tau i UCH-L1 en tres supòsits clínics. ii. Analitzar l'impacte de factors potencialment confusors sobre els nivells plasmàtics de p-tau181, p-tau217, GFAP i NfL i com aquests factors alteren la precisió diagnòstica dels BP per a discriminació d'amiloïdosi. iii. Estudiar i comparar la capacitat diagnòstica de p-tau217 plasmàtic amb p-tau181 en una cohort prospectiva de pràctica clínica habitual.

**Material, mètodes i resultats:** es van incloure 268, 360 i 468 pacients en els treballs 1, 2 i 3, respectivament, reclutats prospectivament de tots els pacients derivats com a primera visita al nostre centre especialitzat de deteriorament cognitiu a qui es va realitzar de forma assistencial valoració clínica, biomarcadors específics de MA i extracció venosa per a determinació dels BP. Al primer treball, p-tau181 plasmàtic va ser el més útil per a predir l'estat amiloide (definit per LCR/PET amiloide), amb sensibilitat i especificitat del 85%; usant un algoritme amb dos punts de tall, es va identificar l'estat amiloide amb elevada precisió en un 60% dels pacients, estalviant en aquests pacients la punció lumbar o PET amiloide. La combinació de p-tau181 i NfL plasmàtics van tenir un moderat rendiment per al diagnòstic de DFT. Cap combinació de BP va demostrar utilitat pràctica per a la discriminació d'etiologies neurodegeneratives de les no neurodegeneratives. En el segon treball, el FG es va associar als nivells de p-tau181 plasmàtics, l'edat, el FG i l'IMC amb els de GFAP i l'edat i el FG amb els de NfL, tot i que cap d'aquests factors va tenir un impacte significatiu en els punts de tall ni el rendiment dels BP. Al tercer treball, p-tau217 plasmàtic va demostrar una capacitat diagnòstica molt elevada per a la discriminació de l'estat d'amiloide definit per LCR, superior a p-tau181 plasmàtic, amb sensibilitat i especificitat del 89%, sense impacte en aquesta per cap factor confusor. Usant un algoritme amb dos punts de tall de p-tau217, es va discriminar l'estat d'amiloïdosi cerebral en més de dos terços dels pacients sense necessitat de proves complementàries addicionals. Al terç restant, que inclou un major nombre de pacients amb

Alzheimer en fases inicials (amiloide positius, tau negatius), es podrien realitzar biomarcadors d'Alzheimer convencionals a criteri clínic. Aquest algoritme de p-tau217 va ser molt robust, ja que en un model que assumia un  $-/+10\%$  de variabilitat dels seus nivells, el seu rendiment va presentar mínims canvis.

**Conclusions:** i. En una cohort prospectiva d'un centre terciari de deteriorament cognitiu, l'ús d'un algoritme de p-tau181 plasmàtic per a la discriminació de l'estat amiloide podria haver estalviat més de la meitat de puncions lumbars i PET d'amiloide realitzats. ii. El FG es va associar a canvis significatius en la concentració de p-tau181 plasmàtic, mentre que el FG i l'IMC van modificar els nivells de p-tau217, però no van tenir impacte en el rendiment dels BP per discriminar l'estat amiloïdosi cerebral, pel que no es recomana ajustar els punts de tall de manera sistemàtica per cap de les variables confusores estudiades. iii. P-tau217 plasmàtic va ser superior a p-tau181 per a la discriminació de l'estat amiloide definit per LCR. Usant un algoritme amb dos punts de tall, s'hauria pogut discriminar l'estat d'amiloïdosi amb molt alta precisió en més de dos terços dels pacients sense necessitat de proves complementàries addicionals. Els resultats donen suport a l'ús de p-tau217 plasmàtic com a eina diagnòstica inicial de MA als centres terciaris de deteriorament cognitiu.

**Paraules clau:** deteriorament cognitiu, demència, malaltia d'Alzheimer, biomarcadors diagnòstics, biomarcadors plasmàtics.

## I. INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

### Aspectos generales, epidemiología y etiología del deterioro cognitivo

El deterioro cognitivo es un síndrome que se caracteriza por un declinar adquirido y progresivo en la cognición y es hoy uno de los principales problemas de salud pública mundial, siendo una de las mayores causas de discapacidad, dependencia, coste económico y social y mortalidad. El deterioro cognitivo leve (DCL), definido como un declinar cognitivo objetivable pero que no interfiere de forma significativa en las actividades de la vida diaria, tiene una prevalencia estimada del 15% en la población general. Cuando el deterioro cognitivo es de suficiente gravedad para impactar de forma relevante en la funcionalidad diaria del sujeto, hablamos, sindrónicamente, de demencia.

Se calcula que hay 55 millones de personas con deterioro cognitivo en fase de demencia en todo el mundo, previéndose un aumento significativo de la prevalencia de casos en los próximos años debido al envejecimiento de la población, especialmente en países de media y baja renta. Un tercio de las mujeres y 20% de los hombres desarrollarán algún tipo de demencia a lo largo de su vida. El estigma, las desigualdades en acceso a recursos sanitarios y la falta de conocimiento y el nihilismo terapéutico, tanto de la población general como del personal sanitario, provoca un infradiagnóstico global de entre un 20 y un 75%, siendo mayor en zonas con menores recursos económicos y sanitarios. En España, las consultas médicas por quejas cognitivas suponen uno de los motivos más frecuentes de visita en atención primaria.(1-7)

La etiología del deterioro cognitivo es variada, incluyendo tanto causas neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer [EA], demencia por cuerpos de Lewy [DCLw] o el espectro de demencia frontotemporal [DFT]) como no neurodegenerativas (lesiones vasculares cerebrales, enfermedades psiquiátricas, abuso de sustancias, estados carenciales, enfermedades infecciosas o lesiones traumáticas cerebrales). En los países desarrollados, las enfermedades neurodegenerativas suponen la etiología más frecuente de deterioro cognitivo, siendo la EA la causa más frecuente y representando un 60-70% del total de casos, seguida de

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

la DCLw, la DFT y la demencia vascular (dependiendo del rango de edad), siendo frecuente la coexistencia de lesiones cerebrales de más de un origen.(4,6,8,9)

Un diagnóstico certero y temprano es primordial para acceder al tratamiento farmacológico y no farmacológico, disminuir la incertidumbre, para la planificación de cuidados mientras aun haya capacidad decisoria, para participar en ensayos clínicos con potenciales fármacos modificadores de enfermedad (FME). Este diagnóstico precoz es especialmente relevante en el momento actual en que los primeros FME están empezando a emerger en la práctica clínica habitual. Además, los pacientes con deterioro cognitivo no diagnosticado o con un diagnóstico tardío tienen más ingresos hospitalarios, una mayor estancia media, mayor mortalidad y mayores costes económicos directos e indirectos comparados con aquellos ya diagnosticados. El hecho de que cada etiología de deterioro cognitivo tenga unas manifestaciones clínicas, evolución, pronóstico y tratamientos distintos y que los ensayos clínicos y los FME sean específicos para cada enfermedad, hace necesario un diagnóstico etiológico preciso.(6,10–14)

En nuestro medio, los estudios de prevalencia muestran de forma consistente que el deterioro cognitivo está siendo infradiagnosticado, con estimaciones que llegan al 20-30% de los casos en algunos ámbitos. Los motivos son diversos, incluyendo la falsa “normalización” del deterioro cognitivo en la tercera edad, la creencia por parte del personal sanitario y población general de que al no haber un tratamiento modificador de enfermedad no hay beneficio en realizar un diagnóstico, la falta de métodos diagnósticos accesibles y una polarización del conocimiento y procedimientos diagnósticos hacia centros académicos. Dicha polarización hacia centros terciarios aumenta el infradiagnóstico, la inequidad y el coste en el sistema de salud del deterioro cognitivo.(6,12)

Es debido a ésta elevada prevalencia e incidencia del deterioro cognitivo, a sus costes personales, sociales, familiares, laborales y económicos, al infradiagnóstico y a la importancia actual del diagnóstico precoz y certero que son necesarios métodos de cribado y de confirmación diagnóstica válidos y accesibles a nivel de la población general para la identificación precisa y precoz de sujetos con un deterioro cognitivo neurodegenerativo.

## Métodos diagnósticos actuales de las principales etiologías neurodegenerativas de deterioro cognitivo

Las distintas demencias neurodegenerativas son proteinopatías que se definen por su tipo de neurodegeneración y de proteína anómala acumulada a nivel cerebral y su *gold standard* diagnóstico es el análisis anatómo-patológico postmortem. El diagnóstico *in vivo* se realiza actualmente mediante criterios diagnósticos que incluyen síntomas y signos clínicos y pruebas complementarias, con resultados variables de precisión en la correlación clínico-patológica. En el momento actual, la valoración y diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo se realiza de forma habitual en nuestro medio mediante una anamnesis estructurada, una exploración neurológica y cognitiva, una analítica sanguínea para descartar alteraciones causantes o contribuyentes y una prueba de neuroimagen estructural (resonancia magnética cerebral [RM] o tomografía computarizada craneal [TC]). En algunos casos, como en pacientes con inicio de los síntomas antes de los 65 años, con una presentación o curso clínico atípico o en fases iniciales (de DCL), se realizan estudios más específicos como una punción lumbar o una tomografía por emisión de positrones (PET), siendo estos estudios de mayor precisión diagnóstica, pero asociados a un mayor coste y/o invasividad y realizados de forma sistemática solamente en centros terciarios con una menor accesibilidad por parte de la población. A continuación, se explican los métodos diagnósticos actuales de las principales etiologías neurodegenerativas de deterioro cognitivo.

### **Enfermedad de Alzheimer**

La EA es una enfermedad neurodegenerativa que causa un declinar cognitivo progresivo y es la etiología más frecuente de deterioro cognitivo y demencia, representando un 60-70% del total de casos.(4) La edad supone el factor de riesgo más importante para la EA, duplicándose su incidencia cada 5 años a partir de los 65 años. De forma arbitraria, se definió como EA de inicio precoz (5-10% del total de casos) aquella con inicio de los síntomas antes de los 65 años y como EA de inicio tardío cuando el inicio de síntomas era después de los 65 años. Más allá de la edad, aproximadamente un 80% de la variancia en el riesgo de EA se debe a factores genéticos, siendo el alelo APOE el principal factor genético de riesgo, confiriendo en el caso

de los individuos heterocigotos *APOE ε4* 2-3 veces más de riesgo de desarrollar la enfermedad a lo largo de la vida y más de 10 veces, con una penetrancia casi completa, en los individuos homocigotos *APOE ε4*.(15–17)

Los síntomas clínicos de la EA incluyen alteración en la memoria anterógrada, afasia, apraxia, agnosia, trastornos visoespaciales y visoperceptivos y alteraciones anímicas y conductuales. El fenotipo clínico más frecuente de inicio de la EA es la variante amnésica o típica, en la que el problema de memoria es el síntoma predominante desde el inicio de la enfermedad, pudiendo afectarse otros dominios cognitivos durante la progresión de la enfermedad, pero siendo el déficit mnésico el primero en aparecer y el más relevante. En cambio, en la variante no amnésica o atípica, se afectan de forma más precoz y predominante áreas cognitivas distintas a la memoria, siendo las más frecuentes las alteraciones del lenguaje en forma de afasia logopéica, las visoespaciales y visoperceptivas y la disfunción ejecutivo-conductual. La variante amnésica o típica es la forma más frecuente de presentación de la EA, suponiendo aproximadamente el 90% de los casos de EA de inicio tardío y el 65-70% de la EA de inicio precoz. Por contra, la variante no amnésica es más frecuente en pacientes con EA de inicio precoz y se asocia a un mayor error diagnóstico comparado con las presentaciones amnésicas.(15,16,18)

Neuropatológicamente la EA se define por el acúmulo anormal de proteína beta-amiloide ( $A\beta$ ) extracelular (placas seniles y neuríticas) y de proteína tau fosforilada (en forma de ovillos neurofibrilares). Según la teoría fisiopatológica más aceptada en la actualidad, la llamada hipótesis amiloide, se produciría inicialmente un aumento progresivo de los niveles de  $A\beta_{1-42}$  debido a un fallo de los mecanismos de eliminación y/o a una producción aumentada de  $A\beta_{1-42}$  que conduciría a su acúmulo, inicialmente en forma de monómeros y oligómeros no fibrilares (placas difusas) y luego de agregados fibrilares (placas neuríticas). Dicho acúmulo patológico produciría de forma progresiva en el tejido neuronal circundante una activación microglial y astrocítica, daño oxidativo y una alteración en la actividad de las kinasas y fosfatasas que a su vez facilitarían la formación de ovillos neurofibrilares de tau y la consiguiente disfunción neuronal y sináptica con muerte neuronal. La patología tau, siendo su acúmulo en forma hiperfosforilada en ovillos neurofibrilares la característica de la EA, provoca una disfunción de los microtúbulos y una disfunción axonal, sináptica y neuronal progresivas, además de mediar parcialmente y amplificar la toxicidad de  $A\beta$ . A su vez, la presencia de

copatología como la vascular o la patología por cuerpos de Lewy, provoca y amplifica la disfunción sináptica, glial y neuronal de A $\beta$  y tau. Toda esta cascada de eventos ocurriría durante años en la fase a(pre)sintomática de la EA y acabaría causando eventualmente los déficits cognitivos y demencia, es decir, las manifestaciones clínicas.(19–21)

Clásicamente, se consideraba la EA como una entidad clínico-patológica, es decir, para su diagnóstico se debían cumplir los criterios sindrómicos de demencia en un paciente con una presentación amnésica/típica y el estudio neuropatológico era la única herramienta de confirmación diagnóstica. Los criterios diagnósticos incluían una valoración clínica y cognitiva y pruebas complementarias (TC o RM; electroencefalograma o análisis básico del líquido cefalorraquídeo [LCR] en algunos casos) para confirmar demencia y descartar otras etiologías, de forma que el diagnóstico *in vivo* se realizaba por exclusión y no por evidencia del proceso fisiopatológico de la enfermedad.(22,23) El hecho de realizar un diagnóstico mediante criterios clínicos y de pruebas complementarias solamente de exclusión, sin disponer de biomarcadores específicos de enfermedad, supone una baja precisión diagnóstica incluso en centros especializados en deterioro cognitivo, con una sensibilidad (S) y especificidad (E) en la correlación clínico-patológica en torno al 80 y 70%, respectivamente.(24)

Actualmente el diagnóstico definitivo de EA sigue siendo el análisis neuropatológico mediante los criterios diagnósticos de la NIA-AA 2012, donde se combinan las puntuaciones A (presencia y distribución de placas difusas de A $\beta$  [Thal]), B (presencia y distribución de ovillos neurofibrilares de tau [Braak]) y C (frecuencia en determinadas regiones de placas neuríticas de A $\beta$  [CERAD]) en los llamados “niveles de cambio neuropatológico de EA”, que van de ninguno a elevado, siendo los niveles intermedio y elevado suficientes para explicar por sí mismos la demencia.(23) En las últimas décadas, se han desarrollado nuevos biomarcadores de EA que permiten demostrar *in vivo* el proceso fisiopatológico de enfermedad de Alzheimer (A $\beta$  y tau) con una buena correlación con la neuropatología, mediante biomarcadores en LCR y técnicas de PET, lo que ha aumentado enormemente la precisión diagnóstica. El hecho de disponer de estos biomarcadores específicos ha permitido realizar estudios de historia natural de la EA, donde se ha demostrado que los primeros cambios en los biomarcadores de A $\beta$  y tau se producen unos 15-20 años antes del inicio clínico de los síntomas.(25,26) Por tanto, el proceso fisiopatológico de EA empieza años antes de las manifestaciones clínicas de la enfermedad (la llamada fase preclínica) y este proceso se puede detectar mediante

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

biomarcadores específicos. Este hecho ha cambiado la conceptualización de la EA desde una entidad clínico-patológica a ser actualmente entendida como un *continuum* clínico-biológico, que se iniciaría con el depósito gradual de A $\beta$  y tau en fases presintomáticas y se seguiría de disfunción sináptica, glial y neuronal (neurodegeneración) y las manifestaciones clínicas progresivas (DCL y posteriormente las fases de demencia).(19,20) Dicha conceptualización de la EA enfatiza aún más la importancia de un diagnóstico basado en biomarcadores específicos del proceso fisiopatológico/biológico de la enfermedad debido a sus implicaciones pronósticas y de tratamiento, al establecer a una persona dentro o fuera del *continuum* de la enfermedad independientemente del estadio clínico (asintomático, DCL, demencia).

Estos biomarcadores específicos de la EA han permitido el desarrollo de los criterios diagnósticos de 2011, según los cuales se puede realizar un diagnóstico con mejor correlación clínico-patológica, contemplando el diagnóstico, a diferencia de en los criterios anteriores, en pacientes en fases de DCL y con presentaciones no amnésicas/atípicas y aumentando la precisión diagnóstica si hay evidencia de alteración en dichos biomarcadores.(3,27) El avance en los biomarcadores diagnósticos y el cambio de paradigma de la EA hacia ser entendida como un *continuum* clínico-biológico, llevó a los criterios de investigación NIA-AA 2018, donde se enmarca a cada persona en la estructura AT(N)(C).(28) La "A" (amiloidosis) se refiere a la evidencia *in vivo* mediante biomarcadores del proceso neuropatológico de acúmulo anormal de A $\beta$  y su positividad implicaría que un individuo se encuentra dentro del *continuum* del Alzheimer al haber evidencia del proceso fisiopatológico de esta enfermedad, independientemente de la presencia o grado de síntomas. La "T" (taupatía) marcaría la evidencia de depósito anormal de tau fosforilada cerebral del tipo Alzheimer y su positividad asociada a biomarcadores positivos de A implicaría la presencia de enfermedad de Alzheimer y una mayor correlación con la presencia de síntomas. La positividad en "N" denotaría alteración en biomarcadores de neurodegeneración y la "C", alteración clínica/cognitiva (sin deterioro cognitivo, DCL o demencia). Así, A y T indicarían los cambios neuropatológicos específicos y definitorios de la EA, mientras que N y C denotarían eventos inespecíficos (producidos por EA o a otra etiología) y tardíos en el *continuum* clínico-biológico debidos a la EA. Por ejemplo, A+T+N+C+ sería indicativo de deterioro cognitivo debido a EA, A-T-N+C+ de deterioro cognitivo y cambios patológicos no relacionados con la EA y A+T+N-C- de EA preclínica.(28,29)

## *Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

En línea con la concepción de la EA como un *continuum* clínico-biológico, los muy recientemente publicados criterios diagnósticos revisados de la EA (2024) apoyan un diagnóstico basado en biomarcadores específicos que traducen la presencia de cambios neuropatológicos de la enfermedad, independientemente de los síntomas. Dentro de los nuevos criterios diagnósticos, los llamados biomarcadores “Core 1”, que incluyen el PET de amiloide y los biomarcadores en LCR de amiloidosis (A) y tau fosforilada (T1), suponen cuando están alterados los primeros cambios biológicos en el *continuum* de la EA y se asocian a cambios neuropatológicos en grado intermedio o elevado. Por tanto, su positividad implica que la EA es la (o una de las principales) etiologías subyacentes del deterioro cognitivo ante un paciente con síntomas y permite detectar EA en pacientes asintomáticos. Por contra, los biomarcadores “Core 2” en contexto de positividad de los Core 1 (*i.e.*, en individuos dentro del *continuum* de la EA), que incluyen aquellos que se alteran cuando ya hay depósito establecido de tau en fases biológicamente más avanzadas de la enfermedad (PET de tau y algunos epítomos de tau en LCR) -los llamados T2-, aumentarían la certeza de que los síntomas de un paciente con varias etiologías posibles sean debidos a EA, tendrían valor pronóstico en pacientes sintomáticos y permitirían predecir el riesgo de inicio de síntomas en pacientes asintomáticos. Además, por primera vez, se establece la posibilidad de realizar el diagnóstico de EA mediante biomarcadores plasmáticos, sustituyendo a los de LCR y PET solamente si el biomarcador plasmático en cuestión tiene una precisión mayor del 90%.<sup>(30)</sup>

A continuación, se detallan los distintos biomarcadores establecidos hasta la fecha de inicio de la investigación de la presente tesis:

### *Biomarcadores de amiloidosis, agregación de A $\beta$ o “A”*

La proteína A $\beta$  es el principal componente de las placas difusas o seniles y neuríticas y proviene de la escisión anormal de la proteína precursora del amiloide (APP), una proteína transmembrana expresada en las neuronas y con funciones fisiológicas varias como la adhesión y el trofismo celular. La APP puede ser procesada mediante dos vías, la no-amiloidogénica y la amiloidogénica. En la vía no amiloidogénica, la alfa-secretasa separa la APP en un fragmento soluble que es liberado al espacio extracelular y en otro C-terminal que se mantiene anclado a la membrana plasmática, siendo a su vez separado éste último por la

gamma-secretasa en una parte soluble extracelular y una citoplasmática. En la vía amiloidogénica, es la beta-secretasa la que fragmenta inicialmente la APP, liberando al espacio extracelular un fragmento soluble y manteniéndose en la membrana plasmática el resto de la APP; en un segundo tiempo, la gamma-secretasa escinde el fragmento C-terminal anclado a la membrana plasmática, liberándose la proteína A $\beta$  (patológica y amiloidogénica) al espacio extracelular. Se liberan dos subtipos de A $\beta$ , definidos según su longitud C-terminal, A $\beta$ 1-42 y A $\beta$ 1-40, siendo el primero más amiloidogénico.(31,32) Este depósito progresivo de A $\beta$  anormal es, según la mencionada hipótesis amiloide, el evento más precoz conocido y su presencia sitúa a un individuo dentro del *continuum*/proceso fisiopatológico de Alzheimer y como A+ en el constructo AT(N).(19–21,28,29)

El PET amiloide, mediante distintos trazadores de proteína amiloide (florbetaben, florbetapir o flutemetamol), ha demostrado una excelente capacidad para detectar *in vivo* la presencia de A $\beta$  fibrilar depositada en forma de placas y su distribución anatómica, con una alta correlación entre positividad de PET amiloide y depósito neuropatológico parenquimatoso de A $\beta$  y con S y E iguales o superiores al 90%.(33–35) Por otra parte, un descenso en los niveles absolutos de A $\beta$ 1-42 o relativos a A $\beta$ 1-40 (ratio A $\beta$ 1-42/A $\beta$ 1-40 disminuido) en el LCR se han correlacionado con el depósito cerebral de A $\beta$  en placas y con el diagnóstico clínico de EA, con S y E en torno al 88-90%. Se cree que esto es debido al secuestro de A $\beta$  en placas, disminuyendo la concentración de A $\beta$  soluble en LCR.(36–39) Los biomarcadores de amiloidosis mediante PET y LCR muestran una correlación entre ellos superior al 90%. Esta leve discordancia se debe, en parte, a que se alteran primero los niveles de A $\beta$  en LCR comparado con el PET de amiloide, hecho relevante en el caso de sujetos asintomáticos, pero siendo esta discordancia menor una vez se han iniciado los síntomas. Por otra parte, la combinación de biomarcadores en LCR y PET de amiloide no es superior al uso de cada biomarcador por separado. El análisis de LCR tiene la ventaja de poder analizar otros biomarcadores (como p-tau), de un menor coste y de una mayor disponibilidad, mientras que el PET de amiloide es menos invasivo, no tiene contraindicaciones en ciertos pacientes (p. ej. uso de anticoagulantes) y permite el estudio regional/topográfico cerebral de depósito fibrilar de A $\beta$  y no solo de sus medidas globales. Dada la superposición en precisión diagnóstica entre ambos biomarcadores, el uso de uno u otro acaba dependiendo de estas características diferenciales y de las preferencias de cada centro y paciente. (20,38,40–42)

*Biomarcadores de ovillos neurofibrilares, agregación de tau o "T"*

La proteína asociada a microtúbulos tau está codificada por el gen *MAPT*, tiene seis isoformas predominantes en el cerebro con una longitud de 352-441 aminoácidos y su secuencia se divide en las zonas N-terminal, media, la de unión a microtúbulos y la C-terminal. Debido a modificaciones post-transcripcionales, la región de unión a microtúbulos puede tener tres o cuatro dominios pseudo-repetidos, dando lugar en caso de patología a las llamadas taupatías 3R, 4R ó 3/4R, siendo la última la característica de la EA. Tau es una proteína esencial para el mantenimiento de la estructura y estabilización de los microtúbulos y necesita para su correcta función la fosforilación de ciertos residuos de treonina y serina. La fosforilación excesiva de tau incrementa la probabilidad de que esta proteína sufra proteólisis con la generación de formas truncadas que son más propensas a agregarse de forma patológica en forma de filamentos helicoidales pareados insolubles intraneuronales y que a la vez acabarán formando los ovillos neurofibrilares característicos de la EA, con la disfunción neuronal, sináptica y cognitiva resultantes. En el proceso de agregación de tau fosforilada (p-tau), algunas formas solubles (especialmente las de las regiones N-terminales y medias) se secretarán en el LCR, pudiendo detectarse con su cuantificación en fluidos, mientras que las formas insolubles (C-terminales) se detectarán en la neuropatología y en los estudios de PET de tau. La forma hiperfosforilada patológica de tau puede estar fosforilada en múltiples epítomos, incluyendo los aminoácidos 181, 202, 205, 217, 231 y 235, usándose actualmente la nomenclatura "p-tauX" que se refiere a tau fosforilada en el aminoácido X.(43,44)

Los trazadores de PET de tau se unen de forma selectiva a los filamentos helicoidales pareados de tau hiperfosforilada, específicos de la EA, con una buena asociación con la presencia y distribución regional de ovillos neurofibrilares de tau en la neuropatología. Dentro de los distintos trazadores de PET de tau, [<sup>18</sup>F]flortaucipir (aprobado por la FDA) y los más recientes [<sup>18</sup>F]MK6240, [<sup>18</sup>F]RO948 y [<sup>18</sup>F]PI2620 son los que han demostrado una mayor especificidad y precisión diagnóstica para identificar sujetos con demencia debido a EA (áreas bajo la curva ROC [AUC] 0.87-0.97), siendo menor en el caso de DCL debido a EA (AUC 0.76-0.86). Los trazadores de Tau PET tienen una mayor correlación con la presencia y topografía de las manifestaciones clínicas y los biomarcadores de neurodegeneración que el resto de biomarcadores de A y T, considerándose un método diagnóstico que detecta fases más

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

avanzadas dentro del *continuum* del Alzheimer, dando información pronóstica tanto en individuos sintomáticos como asintomáticos y habiéndose utilizado este hecho como optimización en la selección de participantes en los ensayos clínicos recientes con anticuerpos monoclonales antiamiloides como donanemab. Es por ello que el PET de tau se considera un biomarcador “Core 2” dentro de los criterios diagnósticos de la EA de 2024.(29,30,45–47)

Las concentraciones de tau fosforilada en LCR, cuantificadas mediante inmunoensayos con pares de anticuerpos dirigidos tanto al lugar de fosforilación específico como a otro residuo de la región media de tau, siendo p-tau181 la más usada actualmente, han demostrado su utilidad para detectar el proceso fisiopatológico de Alzheimer, elevándose solamente en la EA y no en otras taupatías y siendo por tanto muy específico y con una buena correlación con la presencia de ovillos neurofibrilares de tau en la neuropatología. El aumento de sus concentraciones, en combinación con biomarcadores positivos de amiloidosis (niveles bajos de A $\beta$ 1-42 en LCR), aumenta la precisión diagnóstica de ambos por separado, por lo que su uso clínico radica en la combinación con los otros biomarcadores en LCR, con S y E por encima del 90%.(36–39,42,44,48–50) A pesar de la buena correlación con ovillos neurofibrilares en la neuropatología y de ser considerada un marcador de “T”, en estudios en pacientes presintomáticos o en fases muy iniciales del *continuum* de la EA, p-tau181 empieza a aumentar en LCR poco después del inicio de la formación de placas de amiloide pero años antes de que se produzca un depósito significativo de ovillos neurofibrilares detectables por PET de tau, por lo que se ha propuesto que podría reflejar la disfunción neuronal en respuesta a las placas de amiloide más que ser un marcador preciso de taupatía tipo Alzheimer.(19–21) Además, p-tau181 en LCR muestra mayor concordancia con PET de amiloide que con el de tau, siendo este último como se ha mencionado un evento más tardío dentro del *continuum* y correlacionando mucho mejor con la presencia de ovillos neurofibrilares en la neuropatología y su distribución topográfica y con las manifestaciones clínicas.(25,43) Por ello, en los criterios revisados de EA de 2024, p-tau en LCR se considera un biomarcador de taupatía inicial (T1) y se incluye dentro de los “Core 1” junto con los marcadores de amiloidosis, situando a un paciente dentro o fuera del proceso biológico de la EA, mientras que el PET de tau se altera en fases más avanzadas y se considera como taupatía tardía (T2) dentro de los “Core 2”, como marcador pronóstico y evolutivo de la EA.(30)

*Biomarcadores de neurodegeneración o "N"*

El aumento de la concentración de proteína tau total (t-tau) en LCR se considera un biomarcador de presencia de daño neuronal, que provocaría la liberación de proteína tau (en sus distintas formas y fracciones) al espacio extracelular. Se eleva de forma inespecífica en caso de daño neuronal, independientemente de la etiología (p. ej., gran elevación en enfermedades priónicas), por lo que tiene una especificidad más baja para detectar pacientes en el *continuum* de la EA y, dentro de este *continuum*, su elevación es un evento más tardío y correlaciona con la progresión e inicio de los síntomas. Su uso clínico actualmente en la EA es en combinación con el resto de los biomarcadores en LCR, aumentando su precisión diagnóstica en combinación con A $\beta$ , aunque siendo mejor la combinación de esta última con p-tau que con t-tau.(38,43,49,50)

La atrofia en RM también se considera un biomarcador inespecífico de neurodegeneración, al estar relacionado con la pérdida neuronal, pudiendo producirse atrofia debido a múltiples enfermedades neurológicas. En el caso de la EA, el hipocampo es una de las regiones que se afectan de forma más precoz, por lo que su atrofia medida mediante escalas visuales o cuantificadas tiene una S para discriminar pacientes con EA de controles del 70-87% y una E para diferenciarla de otras enfermedades neurológicas del 62-82%, siendo su utilidad mucho menor en el caso de pacientes con inicio precoz de la enfermedad o en presentaciones no amnésicas.(51,52)

El PET-FDG cerebral permite conocer el grado de actividad sináptica y astrocítica a través de la cuantificación del metabolismo de la glucosa, habiéndose asociado determinados patrones de hipometabolismo a distintas enfermedades neurodegenerativas, aunque con cierto grado de superposición entre ellas. El patrón característico de la EA es el hipometabolismo temporo-parietal bilateral, aunque puede haber cierto hipometabolismo frontal, con S y E para detectar pacientes con confirmación biológica o patológica de EA del 76-80% y 63-74%, respectivamente. También se utiliza a nivel pronóstico, debido a que la presencia de hipometabolismo se ha asociado a mayor progresión clínica en los siguientes años, tanto en pacientes dentro como fuera del *continuum* del Alzheimer, como para diagnóstico diferencial con otras etiologías de deterioro cognitivo.(53–55)

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

Los neurofilamentos son estructuras helicoidales expresadas exclusivamente en las neuronas, presentes en las dendritas, soma y axones y abundantes en los axones mielinizados, donde les confieren estabilidad y permiten su crecimiento. En el sistema nervioso central, los neurofilamentos están formados de combinaciones de 4 tipos de subunidades, la cadena ligera (NfL), la cadena intermedia, la cadena pesada y la alfa-internexina, difiriendo entre ellos en la longitud/peso molecular de la región C-terminal. En condiciones fisiológicas, los axones liberan al espacio intersticial pequeñas cantidades de neurofilamentos, aumentando esta liberación con la edad. Por contra, cuando hay una lesión axonal del sistema nervioso central de cualquier etiología (inflamatoria, neurodegenerativa, traumática o vascular), se produce un incremento notable en la liberación de neurofilamentos al espacio intersticial y LCR y desde aquí, en menor concentración, a la sangre. Dado que la NfL es la subunidad más abundante y soluble de los neurofilamentos, ésta ha sido la más estudiada y fiable, pudiendo detectarse sus niveles en LCR mediante inmunoensayos. NfL han demostrado su utilidad como marcador de daño neuronal, elevándose de forma inespecífica en cualquier etiología que causa daño neuronal si bien las elevaciones son diferentes entre distintas entidades. En el caso de demencias neurodegenerativas, las mayores concentraciones de NfL se encuentran en las prionopatías seguidas del espectro de DFT (especialmente si asocia enfermedad de motoneurona). La EA presenta menores niveles que DFT pero mayores que controles y las menores elevaciones de NfL (variables, con discretas elevaciones o en rango de controles en algunos casos) se darían en la demencia por cuerpos de Lewy.

Los niveles de NfL en LCR aumentan según progresa el *continuum* de la EA, pudiendo diferenciarse pacientes en este *continuum* de controles mediante NfL en LCR con una precisión moderada de AUCs en torno al 0,73-0,84 (mejor discriminación en fases más avanzadas de EA), claramente inferior a los biomarcadores de A y T, al reflejar los NfL la pérdida neuronal tanto dependiente como independiente de amiloidosis. También han demostrado utilidad para discriminar pacientes con EA del espectro de DFT, con AUC del 0,80, aumentando la precisión diagnóstica de A $\beta$  y p-tau para este diagnóstico diferencial con AUCs de 0,89-0,92 cuando se añaden los NfL. Por contra, el rendimiento diagnóstico de NfL en LCR para diferenciar EA de otras patologías neurológicas distintas a DFT fue muy inferior, no recomendándose su uso para este fin en un metaanálisis. En un estudio previo de nuestro centro, la concentración de NfL en LCR discriminó con una AUC de 0,97, S 96% y E 92% a

controles de etiologías neurodegenerativas que incluían EA, DFT y enfermedad priónica, pero no a pacientes con DCLw, estableciendo su potencial utilidad para diferenciar etiologías degenerativas de no neurodegenerativas (NND) de deterioro cognitivo.(56–60)

El diagnóstico de EA apoyado por biomarcadores, especialmente los específicos de A y T, supone una gran mejoría en la precisión diagnóstica de esta enfermedad, especialmente en fases de DCL (donde el error diagnóstico puede llegar al 40-50%), con las implicaciones diagnósticas, pronósticas, terapéuticas y de investigación derivadas de ello.(61) En un estudio multicéntrico realizado en centros especializados de deterioro cognitivo, la sospecha diagnóstica y actitud terapéutica cambió en un 36% de los pacientes tras realizar un PET de amiloide.(62) En un estudio de nuestro centro, la sospecha diagnóstica y actitud terapéutica cambió en un 33% de casos tras realizar PET de amiloide/biomarcadores en LCR, aumentando la confianza diagnóstica en la sospecha clínica significativamente, mientras que la realización de RM o PET-FDG no la aumentó de forma relevante.(63) Además, el hecho de realizar PET de amiloide para el diagnóstico etiológico en un centro terciario redujo significativamente (independientemente del resultado del mismo) la mortalidad, institucionalización y costes sanitarios en comparación con aquellos pacientes a quienes no se realizaba esta prueba.(14) Todo ello recalca la necesidad e importancia de realizar un diagnóstico precoz, certero y accesible a toda la población basado en biomarcadores que reflejen el proceso fisiopatológico de Alzheimer.

### **Demencia por cuerpos de Lewy**

La demencia por cuerpos de Lewy es la segunda causa de demencia después de la EA, representando el 7-31% de los casos de demencia. Al igual que en la EA, su *gold standard* es la neuropatología, definiéndose por el acúmulo de alfa-sinucleína en los llamados cuerpos de Lewy y en neuritas y citoplasma, clasificándose actualmente como ausencia de patología, predominante en tronco cerebral, límbico (transicional), predominantemente amigdalario o neocortical (difusa), siendo ésta última una explicación suficiente para el deterioro cognitivo. La patología por cuerpos de Lewy es muy frecuente cuando hay cambios neuropatológicos de Alzheimer (i.e., dentro del *continuum* clínico-biológico del Alzheimer), especialmente en

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

estadios avanzados, habiendo cambios patológicos de EA en hasta un 80% de casos confirmados de DCLw y viceversa, encontrándose patología de cuerpos de Lewy en un 55-60% de pacientes con EA confirmada.(8,18,64,65)

Actualmente, el diagnóstico *in vivo* se basa en la combinación de criterios clínicos centrales (fluctuación cognitiva, alucinaciones visuales, trastorno de conducta del sueño REM [TCSR] y parkinsonismo) y de soporte y de biomarcadores indicativos (reducción en la captación de transportadores de dopamina en DaTSCAN, reducción en la captación miocárdica de 123I-MIBG y confirmación polisomnográfica de TCSR) y de soporte. El diagnóstico de DCLw en grado probable se realiza en un paciente en fase sindrómica de demencia en quien se cumplen dos criterios clínicos centrales y/o un criterio clínico central y uno de biomarcador indicativo. El diagnóstico clínico de DCLw sin biomarcadores (analizados criterios McKeith 2005, previos pero similares a los actuales de 2017) tuvo una precisión en la correlación clínico-patológica en torno al ~80%, con E y S dependiendo de si se usaban criterios en grado posible o probable y lo avanzado de la enfermedad, siendo peor en fases iniciales. En cuanto a los biomarcadores indicativos, en el contexto de cuadro clínico de demencia con al menos uno de los criterios clínicos centrales presentes, la hipocaptación en DaTSCAN tuvo una S del 78-90% y E del 88-91% y el MIBG cardíaco S 69-77% y E 87-94% para discriminar DCLw de controles y de EA; la presencia de TCSR confirmado por polisomnograma implica una probabilidad >90% de sinucleinopatía subyacente. En el caso de los biomarcadores de soporte, la preservación relativa de atrofia temporal medial en neuroimagen estructural para diferenciar DCLw de EA tiene unas S y E bajas en torno al 65%; el patrón en PET-FDG característico una S del 70% y E 74%; los hallazgos típicos en electroencefalograma, cuando están presentes, tienen una especificidad >90% para diferenciar de EA, pero una baja sensibilidad. Además, se han propuesto criterios para enfermedad por cuerpos de Lewy prodrómica, con presentaciones en forma de DCL debido a DCLw y presentaciones como delirium o trastorno psiquiátrico, usando los mismos biomarcadores que para la DCLw, con S, E y P menos estudiada pero generalmente aun menor.(66–70)

El diagnóstico biológico de la DCLw, es decir, la predicción *in vivo* de la presencia de depósitos neuropatológicos de alfa-sinucleína, primordial para avanzar en el conocimiento de esta enfermedad y poder desarrollar FME específicos, se encuentra pues, mediante los métodos actuales, en un estado subóptimo. Esto se complica aún más por el hecho de la alta frecuencia

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

de copatología con EA mencionada anteriormente, hecho confirmado también *in vivo*, con una prevalencia de PET amiloide positivo en pacientes con diagnóstico de DCLw de hasta el 68%; por tanto, los biomarcadores específicos de EA no son útiles para el diagnóstico diferencial de DCLw con EA dado que su positividad no excluye (ni es indicativa de) la posibilidad de depósito cerebral de alfa-sinucleína.(18,23,66,71) Además, la copatología EA y alfa-sinucleína empeora el pronóstico de ambas enfermedades por separado, con las implicaciones a nivel clínico, de desarrollo de estudios de potenciales FME específicos para cada una de las dos enfermedades y de tratamiento.(23,67,72)

Los niveles de NfL en LCR se encuentran en concentraciones similares a los controles en la enfermedad por cuerpos de Lewy (DCLw, enfermedad de Parkinson, demencia asociada a enfermedad de Parkinson), por lo que no son útiles para el diagnóstico diferencial de la DCLw con etiologías no neurodegenerativas/neurológicas de deterioro cognitivo. Tampoco son útiles para diferenciar de EA, ya que en esta enfermedad están discretamente elevados y su presencia puede representar copatología, por lo que resulta más preciso realizar biomarcadores de EA que la determinación de NfL. Donde sí se plantea la utilidad de NfL en LCR es para el diagnóstico diferencial de enfermedad por cuerpos de Lewy de parkinsonismos atípicos (atrofia multisistémica, degeneración cortico-basal [DCB] y parálisis supranuclear progresiva [PSP]), al estar elevados en estas últimas entidades.(56,60) Recientemente se han desarrollado técnicas de amplificación de semillas (como la conversión en tiempo real inducida por temblor [RT-QuIC]), basadas en el mecanismo priónico de la alfa-sinucleína en el cual la proteína patológica puede inducir la conversión de una proteína “sana” a patológica, pudiendo ser ésta detectada. La RT-QuIC de alfa-sinucleína en LCR ha demostrado un prometedor desempeño para diferenciar DCLw de controles y EA, con S y E superiores al 90%, siendo mayor cuando hay patología de cuerpos de Lewy neocortical/difusa en comparación con otros estadios neuropatológicos. También ha demostrado utilidad en fases prodrómicas con TCSR aislado, con S y E del 75% y 98%, respectivamente, y en enfermedad de Parkinson, con S 88% y E 96%.(68,73–76)

Así pues, el diagnóstico de DCLw mediante los criterios actuales no supone en muchos casos una precisión adecuada para diferenciar esta entidad de etiologías no neurodegenerativas ni de degenerativas como la EA, especialmente en fases sintomáticas iniciales, dada la superposición e inespecificidad de los elementos diagnósticos clínicos y de biomarcadores con

otras patologías. El análisis en LCR de alfa-sinucleína mediante RT-QuIC muestra resultados prometedores, al detectar el proceso fisiopatológico de la DCLw con una buena correlación con la neuropatología, pero dentro de sus limitaciones están la invasividad por la necesidad de punción lumbar y el requerimiento de técnicas específicas para su análisis que se encuentran solamente en algunos centros terciarios, reduciendo la generalización de la técnica.

### **Espectro de la demencia frontotemporal**

La demencia frontotemporal (DFT) agrupa a un conjunto de síndromes clínicos caracterizados por cambios progresivos en el comportamiento, lenguaje y/o funciones ejecutivas, siendo las formas más frecuentes la variante conductual de la DFT (vcDFT), la afasia primaria progresiva (APP) no fluente y la variante semántica, la parálisis supranuclear progresiva (PSP) y la degeneración córticobasal (DCB). El término degeneración lobular frontotemporal (DLFT) aún a su vez a un grupo de enfermedades neurodegenerativas que se manifiestanindrómicamente como DFT y son también proteinopatías debidas mayoritariamente al acúmulo de proteína tau o de TDP-43 y de forma menos frecuente a FUS, EWSR1 o TAF15. Además, aproximadamente un 20-30% de pacientes tienen una forma genética/familiar, siendo los genes más relevantes *MAPT*, *GRN* y *C9orf72*. De aquí en adelante se referirá a “DFT” como al conjunto de síndromes clínicos causados por DLFT.(77,78)

La incidencia y prevalencia de la DFT aumenta con la edad hasta la década de los 70-80 años, siendo la segunda y tercera causa de demencia por debajo y por encima de los 65 años, respectivamente. Debido a su mayor incidencia en edades relativamente jóvenes en comparación con la EA y la DCLw y a las consecuencias laborales, sociales, económicas y familiares de los trastornos conductuales y ejecutivos, la DFT genera un gran impacto en los pacientes y su entorno, con costes considerados incluso mayores al resto de etiologías de demencia. La DFT tiene una presentación clínica y unos hallazgos neuropatológicos heterogéneos, con un diagnóstico diferencial que suele incluir los trastornos no neurodegenerativos (p. ej., patología psiquiátrica primaria) y la EA, siendo difícil un diagnóstico clínico preciso, especialmente en fases iniciales. Al igual que con el resto de las etiologías de deterioro cognitivo, un diagnóstico precoz y certero de la DFT es primordial para

disminuir la incertidumbre, para el pronóstico, protección social, laboral y económica, consejo genético, avanzar en el conocimiento de la enfermedad y desarrollo e inicio de ensayos clínicos con FME específicos.(77,78)

El diagnóstico de la vcDFT se realiza en base a unos criterios clínicos con tres grados de evidencia. La vcDFT posible se diagnostica ante un paciente con un cuadro de deterioro conductual/cognitivo progresivo, en ausencia de patrón de déficits o biomarcadores altamente sugestivos de otra enfermedad neurológica (p. ej., EA), psiquiátrica o sistémica y con tres o más de los siguientes ítems: desinhibición, apatía, pérdida de empatía, comportamientos compulsivos o perseverativos, hiperoralidad o cambios dietéticos y/o test neuropsicológicos con déficits ejecutivos marcados y rendimiento relativamente conservado en memoria episódica y habilidades visoespaciales. La vcDFT probable requiere, además de los criterios de vcDFT posible, de un declinar funcional significativo y de hallazgos típicos en neuroimagen estructural (atrofia frontal y/o temporal anterior en TC o RM) y/o funcional con PET-FDG o SPECT (hipometabolismo frontal y/o temporal anterior). Finalmente, la vcDFT definitiva engloba aquellos casos posibles o probables en los cuales hay presencia de una mutación genética conocida de DFT y/o evidencia neuropatológica de DLFT. Tomando como *gold standard* la presencia neuropatológica de DLFT, los criterios posibles tuvieron una S del 86-95% y E del 27-84% y los probables una S 76-85% y E 68-95%, no pudiendo calcularse la sensibilidad en la definitiva (100% en caso de evidencia neuropatológica y probablemente muy elevada en paciente portador de mutación) debido al diseño de los estudios.(79,80) El diagnóstico de las APP (trastorno cognitivo progresivo en el cual la afasia supone el déficit más inicial y relevante del cuadro clínico) asociadas a DLFT, que son la variante semántica y la no fluente/agramática, se basa en criterios con tres niveles de evidencia. De forma similar a los criterios diagnósticos de vcDFT, el nivel I incluiría los criterios clínicos sugestivos y no sugestivos de cada variante, el II añadiría evidencia de neuroimagen estructural y/o hipometabolismo en PET-FDG o SPECT característico de cada variante y el III evidencia neuropatológica o presencia de mutación patogénica.(81) En el caso de la PSP y DCB, el diagnóstico se realiza en base a criterios clínicos y los biomarcadores tienen solamente utilidad para excluir otras enfermedades.(82,83)

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

Debido a la heterogeneidad clínica y patológica de la DFT, son necesarios biomarcadores que aumenten la precisión diagnóstica. Los biomarcadores desarrollados hasta la fecha han demostrado mayor utilidad en el diagnóstico de DFT como conjunto clínico-patológico que para predecir la neuropatología concreta de DLFT. La atrofia regional típica en neuroimagen estructural, tanto mediante escalas visuales como cuantificada, en un paciente con cuadro clínico compatible, aumenta la especificidad del diagnóstico de un 82% a un 95%, pero siendo la sensibilidad baja en torno al 70%, especialmente en casos genéticos o iniciales. Los hallazgos característicos de DFT en PET-FDG tienen una sensibilidad superior a la presencia de atrofia en neuroimagen estructural, en torno al 84%, aunque su especificidad puede ser relativamente baja, sobre el 68%, al haberse descrito hipometabolismo en sujetos con etiologías psiquiátricas NND o en algunas presentaciones atípicas de EA.(54,80,84,85) La concentración de A $\beta$  y p-tau en LCR y el PET amiloide son normales/negativos en la DFT, estando t-tau normal o elevada, lo que permite el diagnóstico diferencial de la DFT con la EA con E del 70-85%. Estos biomarcadores, al estar basados en la exclusión del proceso fisiopatológico de EA, presentan difícil interpretación en caso de positividad, siendo difícil discernir en estos casos si el diagnóstico primario es una EA o se trata de copatología asociada a DFT.(54,86,87) Los niveles de NfL en LCR se encuentran significativamente elevados en el espectro de la DFT en comparación a controles, etiologías NND de deterioro cognitivo (p. ej., trastornos psiquiátricos) y DCLw, con una buena discriminación en contextos clínicos compatibles, con AUCs 0,93-0,99. La concentración de NfL en LCR se encuentra ligeramente elevada en la EA, en menor medida que en la DFT pero con mayor solapamiento respecto a los controles, NND y DCLw, teniendo los NfL utilidad para diferenciar estas dos entidades cuando se combinan con biomarcadores específicos de EA (LCR o PET amiloide), con AUC >90.(56,57,60,84,87)

Por tanto, los métodos diagnósticos actuales para el diagnóstico de DFT no son los suficientemente precisos y/o accesibles fuera de las unidades especializadas de deterioro cognitivo, provocando un retraso y error diagnósticos demasiado elevados, siendo aún más complicado en el caso de esta patología en relación a otras etiologías de deterioro cognitivo debido al menor conocimiento sobre la enfermedad y al mayor impacto sobre pacientes y familias en los ámbitos social, económico, laboral y legal.

## **Biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo**

Los biomarcadores usados actualmente han mejorado sustancialmente el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo, con los grandes beneficios derivados del diagnóstico certero y precoz mencionados. A pesar de ello, los biomarcadores hasta la fecha presentan varios inconvenientes y necesidades no cubiertas que limitan su generalización y uso sistemático, hecho que será más necesario que nunca en la era actual en que los primeros FME están muy próximos, lo que requerirá de un diagnóstico etiológico preciso, precoz y en las fases más iniciales de las enfermedades para un mayor impacto clínico de las terapias. La invasividad, contraindicación o dificultad técnica en algunos pacientes y efectos secundarios menores limitan la generalización del análisis del LCR, mientras que el elevado coste, la radiación y la necesidad de equipos especializados y caros dificulta el acceso a técnicas de PET. Esto resulta en una polarización de estas pruebas hacia centros especializados, limitando su acceso a gran parte de la población, con la menor precisión diagnóstica y mayor retraso diagnóstico resultantes y siendo aún más importante esta disparidad e inequidad en zonas geográficas con menores recursos económicos. Además, los biomarcadores actuales presentan limitaciones a la hora de realizar determinaciones seriadas, hecho que podría resultar interesante con el objetivo de monitorización de progresión clínica o respuesta a tratamientos o ensayos clínicos.

Es por todo ello que en los últimos años se han desarrollado los primeros biomarcadores en sangre (de aquí en adelante, “biomarcadores plasmáticos” [BP], al medirse la gran mayoría de ellos en plasma), postulándose como biomarcadores mínimamente invasivos, de menor precio y mayor generalizabilidad a la población general, al no ser necesarios equipamientos específicos que estén disponibles solamente en centros terciarios. Este gran avance en los BP ha sido posible gracias al desarrollo y perfeccionamiento de técnicas ultrasensibles basadas en inmunoensayos o espectrometría de masas, capaces de detectar las bajas concentraciones a las que se encuentran las proteínas derivadas del sistema nervioso central en sangre. Una de las principales técnicas que ha permitido su desarrollo es la tecnología de matrices unimoleculares o SiMoA (*Single-Molecule Array*), mediante la cual se añaden partículas paramagnéticas combinadas con anticuerpos específicos que se unirán a la parte concreta de la proteína de la muestra de sangre y a este complejo se unirán anticuerpos de detección

fluorescentes; en un segundo tiempo, la muestra se cargará en matrices con pequeños pozuelos en que solamente cabrá un inmunocomplejo; la medición de la concentración se realizará de forma “digital/binaria”, de forma que se detectará la ausencia o presencia en cada micropozuelo de la proteína en cuestión.(88) Otra metodología usada para el desarrollo y cuantificación de los BP es la llamada tecnología de inmunoensayos enzimáticos quimioluminiscentes, basada en la cuantificación del señal luminiscente formado cuando un anticuerpo marcado con un componente químico (como la fosfatasa alcalina) se une a un inmunocomplejo específico que contiene la proteína plasmática a cuantificar. Esta última metodología es la empleada por una plataforma automatizada (Lumipulse G, Fujirebio), que es la más usada en la mayoría de centros para el análisis de biomarcadores de EA en LCR.(89–91)

La posibilidad de detectar en sangre las proteínas expresadas en el sistema nervioso central ha supuesto el primer paso en el desarrollo de los BP para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo, pero son necesarios varios pasos más antes de su implementación clínica. Para determinar su utilidad, debe estudiarse la distribución diferencial en la concentración de los BP entre pacientes con el diagnóstico etiológico concreto y sujetos sin el diagnóstico, tanto en controles como en otras causas de deterioro cognitivo, usando los criterios y métodos diagnósticos *gold standard* actuales. Para determinar cuáles son los BP más prometedores (*i.e.*, aquellos que muestren una distribución del BP más diferenciada entre individuos con y sin el diagnóstico en cuestión), se han realizado estudios en cohortes de investigación, con buenos resultados y gran potencial para algunos de ellos. A pesar de los resultados prometedores, quedan brechas en el conocimiento que requieren de más estudios antes de la implementación clínica.

Una de las brechas más importantes es el hecho de que la gran mayoría de estudios han estado realizados en cohortes de investigación altamente seleccionadas, con diagnóstico etiológico bien definido, con nulas/mínimas comorbilidades tanto sistémicas como neurológicas y con menor representación de pacientes de bajo nivel socioeconómico, lo que limita enormemente la generalizabilidad de los resultados. Por tanto, son necesarios estudios en cohortes de práctica clínica diaria, con un reclutamiento prospectivo y sin selección de participantes para poder ver la utilidad clínica de los BP en la población real donde se quiere aplicar dichos nuevos métodos diagnósticos. Además, dado que se mide la concentración en sangre de

proteínas derivadas del sistema nervioso central, diluidas en una miríada de otras proteínas y elementos sanguíneos, es necesario estudiar el potencial impacto en la concentración de BP de los distintos factores demográficos, personales y analíticos, así como de las comorbilidades y fármacos, ya que podrían suponer un factor confusor al modificar los niveles de BP independientemente de la enfermedad neurodegenerativa en cuestión. En relación a esto, debe estudiarse en las cohortes de práctica clínica real la utilidad de cada BP y combinación de ellos, junto con los factores confusores, para optimización del diagnóstico etiológico en cada escenario clínico concreto. Finalmente, una vez se rellenen estas brechas de conocimiento, deberán proponerse estrategias, algoritmos y puntos de corte para la implementación clínica.

Dada la rápida evolución en el campo de los BP en los últimos años, en el momento de concepción y redacción de los trabajos que componen la presente tesis doctoral, especialmente el 1 y 2, existían muy pocos estudios que abordaran las brechas de conocimiento mencionadas en el párrafo previo, habiéndose ido publicando más estudios paralelamente al desarrollo de esta tesis. Para dar un visión transversal y actualizada, a continuación, se detalla la evidencia y estudios de los principales BP en el momento de escritura de la presente tesis (2024), aunque algunos estudios se hayan publicado posteriormente a nuestros artículos.

### **P-tau**

Como se ha mencionado previamente, el procesamiento y fosforilación patológicos de tau promueve su agregación en forma de ovillos neurofibrilares insolubles, detectables mediante PET de tau y análisis neuropatológico, liberándose también fragmentos fosforilados solubles que se secretan al LCR y posteriormente a la sangre (p-tau soluble). Estos fragmentos fosforilados de forma patológica pueden ser detectados y cuantificados mediante inmunoensayos ultrasensibles o espectrometría de masas, usándose habitualmente pares de anticuerpos que tienen como objetivo el lugar de fosforilación concreto y otro en el segmento N-terminal no fosforilado.(44)

### *P-tau181*

La mayor evidencia con p-tau ha sido hasta la fecha con el epítipo fosforilado en posición treonina 181, debido en gran parte al ser el primero en comercializarse a través de la tecnología SiMoA de Quanterix. Los niveles de p-tau181 se encuentran específicamente elevados en aquellos individuos con proceso fisiopatológico de Alzheimer, estando en niveles bajos similares a controles en otras enfermedades neurológicas y neurodegenerativas sin copatología por Alzheimer. La concentración de p-tau181 en plasma, medidas hasta 8 años previos al fallecimiento, identificó el proceso fisiopatológico de Alzheimer y diferenció significativamente pacientes con demencia por EA de controles A $\beta$  negativos y otras enfermedades neurodegenerativas con confirmación neuropatológica, con precisión similar al LCR y muy superior al diagnóstico clínico.(92–98) P-tau181 presenta una gran asociación con la fisiopatología A $\beta$ , diferenciando personas A $\beta$  positivas de negativas (definido por A $\beta$  en LCR o PET amiloide) independientemente del estadio clínico, con gran precisión.(94,95,105,96,97,99–104) También correlacionó con la magnitud de depósito de trazador de PET amiloide cortical.(94–96,99,100,104) P-tau181 en plasma ha mostrado una buena asociación con marcadores de taupatía tipo Alzheimer, tanto con p-tau en LCR como con PET de tau. A pesar de la excelente discriminación y correlación con biomarcadores de taupatía, los niveles de p-tau181 fueron más elevados y mostraron mejor discriminación para biomarcadores de amiloidosis que de tau, siendo mayores en individuos A $\beta$ +/ $\tau$ - que en A $\beta$ -/ $\tau$ - y elevándose previamente a los cambios en PET de tau en estudios longitudinales. Estos datos sugieren que p-tau en plasma podría ser más un marcador de presencia de proceso fisiopatológico de EA que de estadio, es decir, sería aún más útil para identificar amiloidosis (A) que taupatía Alzheimer (T) en el constructo AT(N) y por tanto clasificado como Core 1 en los nuevos criterios diagnósticos.(30,94,106,107,95–97,99–102,104) En línea con su sensibilidad y especificidad en detectar proceso fisiopatológico de Alzheimer, p-tau181 discriminó con buen rendimiento pacientes con EA en fase de DCL o de demencia de sujetos controles y de otras etiologías de deterioro cognitivo en cohortes de investigación, con AUCs 0.80–0.98.(95–97,100,108–113) El impacto de demográficos y comorbilidades en los niveles de p-tau181 se ha analizado en algunos estudios, con resultados variables, que incluyen una ausencia significativa de asociación,(103) una relación entre un menor filtrado glomerular (FG) o enfermedad renal crónica (ERC) y concentraciones mayores de p-tau181,(102,112,114–116)

una asociación inversa con el índice de masa corporal (IMC)(112) y un incremento de niveles con la edad(102,117) o en historia reciente de ictus o infarto de miocardio.(102) Recientemente y con el objetivo de mejorar la generalización de los resultados de los estudios realizados en cohortes seleccionadas/de investigación, se han realizado algunos estudios en cohortes de práctica clínica habitual, mostrando resultados discretamente inferiores a los de cohortes de investigación, pero con un buen rendimiento para identificar aquellos individuos en el espectro biológico del Alzheimer (i.e., A $\beta$ +) y demostrando la potencial utilidad clínica de p-tau181.(102,103,105,114,118,119)

### *P-tau217*

La evidencia con p-tau217 ha ido incrementando en los últimos meses, debido a la observación de que su precisión diagnóstica y asociación con biomarcadores de A y T es similar o incluso superior a p-tau181 y al reciente inicio de su comercialización. P-tau217 identificó el proceso fisiopatológico de EA en cohortes con confirmación patológica, con una precisión similar al LCR y similar(117) o superior a p-tau181 plasmático.(94,98) También diferenció a sujetos A $\beta$  positivos de negativos, correlacionó con depósito de trazador en PET de amiloide de forma significativa y con p-tau en LCR y tau de PET, pero mostrando mayor asociación temporal/longitudinal y cuantitativa con A que con T (siendo también clasificado como biomarcador Core 1 en los nuevos criterios diagnósticos), todo ello con un rendimiento equivalente(101,117) o mayor(30,94,121–123,97,102,104–106,112,113,120) a p-tau181. Los estudios donde se ha analizado el impacto de comorbilidades y factores confusores en los niveles y rendimiento de p-tau217 plasmático muestran resultados similares a p-tau181, desde estudios sin un impacto significativo(117) a una correlación inversa con función renal(102,112,116,122,123) e índice de masa corporal (IMC),(112) correlación directa con la edad(102,117) o elevación en caso de historia reciente de ictus o infarto de miocardio.(102) Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio del rendimiento diagnóstico de p-tau217 en cohortes prospectivas de práctica clínica habitual, aunque sí se disponen de estudios de cohortes multicéntricas con excelentes resultados para identificar y discriminar a pacientes en el espectro de la EA, definidos mediante biomarcadores en LCR o PET de amiloide, con precisiones superiores a p-tau181 e incluso equivalentes a los biomarcadores establecidos en LCR.(105,119–123) Los tres estudios con mayor número de pacientes, realizados en cohortes

multicéntricas incluyendo tanto personas cognitivamente sanas como pacientes, muestran AUCs para discriminación de estado A $\beta$  del 0.92-0.97, con algoritmos con dos puntos de corte permitiendo clasificar con gran precisión (>90%) al 71-88% de sujetos y ahorrando potencialmente el uso de biomarcadores tradicionales (LCR o PET). La precisión superior al 90% de p-tau217 plasmático, en caso de confirmarse en cohortes de práctica clínica habitual, abriría la puerta a su uso como herramienta diagnóstica inicial, al cumplirse los requisitos de rendimiento de los BP de la Alzheimer's Association y de los nuevos criterios diagnósticos de EA.(30)(124) Los resultados fueron también buenos, aunque mínimamente inferiores, para discriminación de taupatía (definida por PET tau o p-tau181 en LCR), con AUCs del 0.92-0.97 y una clasificación óptima con dos puntos de corte del 80% de la muestra.(120,121) A pesar de estos excelentes resultados, en estos estudios las cohortes no fueron prospectivas ni se reclutaron de pacientes asistenciales en centros especializados de memoria, disminuyendo potencialmente la generalización de los resultados. Además, se usaron métodos de espectrometría de masas(121) e inmunoensayos desarrollados localmente(120,122) para determinación de p-tau217, técnicas asociadas a un mayor coste y/o disponibles solamente en algunos centros especializados, haciendo muy necesario el desarrollo y estudio del rendimiento diagnóstico de nuevos métodos de cuantificación de p-tau217 que estén disponibles comercialmente.

Asimismo, la concentración de p-tau217 empieza a incrementarse en fases muy precoces como respuesta a patología A $\beta$ , antes que p-tau181, y continúa aumentando longitudinalmente durante la fase clínica, hechos que podrían tener utilidad para detectar personas en fases preclínicas o muy iniciales de la EA para inclusión y monitorización de la respuesta del tratamiento en ensayos clínicos y con FME.(125,126) En esta línea, dado que p-tau217 aumenta a lo largo del *continuum* fisiopatológico de la EA (es mayor en personas A+T+ que en A+T-), un estudio reciente propuso su utilidad con varios puntos de corte según si se quisiera discriminar el estadio de amiloidosis (Core 1) o de taupatía medida por PET de tau (Core 2).(127)

### *P-tau231*

Si bien se dispone de aun menor evidencia y estudios debido a la ausencia hasta hace muy poco de disponibilidad comercial de ensayos con buen rendimiento, el epítipo p-tau231 medido en plasma demostró ser un marcador sensible y específico de amiloidosis (AUCs 0.85-0.88), con la particularidad de elevarse en fases muy iniciales del *continuum* de la EA (en individuos asintomáticos y en niveles bajos de amiloide medida por PET).(119,125,126) Por contra, p-tau231 muestra un incremento en estas fases iniciales con una meseta posterior a lo largo de la progresión del *continuum*, mientras que p-tau181 y p-tau217 siguen incrementándose, lo que conferiría a éstos últimos una potencial utilidad como monitorización de respuesta a FME que p-tau231 no tendría.(125,126) Debido a la no disponibilidad de ensayos comerciales de p-tau231 hasta muy recientemente y a la orientación de esta tesis hacia fases clínicas de deterioro cognitivo, donde este biomarcador no parece ser superior a los otros dos epítipos de p-tau, no se ha planteado su estudio ni determinación, aunque se ha considerado importante describirlo debido a su potencial utilidad en fases muy iniciales.

### **GFAP**

El proceso fisiopatológico del Alzheimer se asocia, desde fases preclínicas, a una remodelación morfológica, molecular y funcional de los astrocitos, conocida como astrogliosis reactiva.(128) La concentración de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un biomarcador de astrogliosis reactiva, aumenta tanto en sangre como en LCR a lo largo del *continuum* de la EA. Los niveles de GFAP plasmática han mostrado un rendimiento razonable para detectar personas dentro del espectro de la EA (i.e., A $\beta$ +), incluso mayores que su medición en LCR, especialmente en fases preclínicas o iniciales de la enfermedad. Los estudios hasta la fecha muestran una discriminación buena de GFAP plasmático para diferenciar pacientes A $\beta$ - de A $\beta$ +, con AUCs 0.69-0.86 y con rendimiento superior a NfL, superior(129) o similar(104,105,108,111,125) a p-tau181 e inferior a p-tau217.(105,112) La concentración de creatinina y el IMC se han asociado con la concentración de GFAP plasmática, ajustadas por estado amiloide, pero sin un impacto significativo en el rendimiento diagnóstico.(112) GFAP ha mostrado ser bastante específica, no elevándose en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas distintas de la EA,

aunque datos preliminares apuntan a un incremento en la DCLw independientemente de la presencia de copatología A $\beta$  y en la DLFT-tau.(111,120,130) Adicionalmente, GFAP plasmática se ha propuesto -como marcador de astrogliosis reactiva- para identificar a individuos asintomáticos A $\beta$ + que desarrollarán en un futuro próximo taupatía y manifestaciones clínicas, lo que podría tener importancia para selección de pacientes para ensayos clínicos y tratamientos con FME en fases presintomáticas de la EA.(131)

### **NfL**

Los avances en técnicas de detección ultrasensibles también han permitido la detección en sangre de la cadena ligera de neurofilamentos, mostrando una buena correlación con sus niveles en LCR tanto en controles como en pacientes con distintas enfermedades neurológicas.(132,133) De forma similar a los NfL en LCR y dada su elevación inespecífica en las distintas enfermedades neurodegenerativas, su determinación en sangre se ha propuesto para identificar a aquellos pacientes con etiologías neurodegenerativas de deterioro cognitivo, hecho que podría tener relevancia desde atención primaria o neurología general para triar a aquellos pacientes que se beneficiarían de derivación a un centro especializado de trastornos cognitivos. Los NfL en plasma se encuentran significativamente elevados en el espectro de la DFT, lo que permite diferenciarla con muy buen rendimiento de trastornos NND (trastorno psiquiátrico primario, depresión, etc.) con AUCs 0.81-0.88 y de pacientes con enfermedad de Parkinson y DCLw (AUCs 0.80-0.86), al encontrarse en éstos últimos en concentraciones bajas similares a controles.(109,111,130,132) Los NfL aumentan progresivamente a lo largo del *continuum* de la EA en comparación con controles y enfermedades NND, aunque de forma mucho menor al espectro de la DFT. En este sentido, los NfL plasmáticos diferenciaron a sujetos con DCL o demencia debida a EA de controles A $\beta$  negativos y de DFT con rendimiento moderado e inferior a otros BP como p-tau (AUCs 0.59-0.79 y 0.71-0.89, respectivamente), siendo aun menor su capacidad discriminativa para diferenciar pacientes con EA de DCLw (AUCs 0.53-0.58).(92,94,111,117,132)

En un estudio multicéntrico, los NfL diferenciaron a pacientes con enfermedades neurodegenerativas de controles y pacientes con etiologías NND de deterioro cognitivo con AUC 0.90 y 0.83 en sujetos menores y mayores de 65 años, respectivamente. Debido a los

niveles bajos de NfL en pacientes con DCLw/Parkinson, cuando se incluyeron éstos en el análisis, el rendimiento disminuyó a AUC del 0.74 y 0.75 para <65 y >65 años, respectivamente.(132) Existe evidencia de un aumento progresivo y significativo con la edad de la concentración de NfL, en sujetos tanto con como sin enfermedad neurológica, habiéndose propuesto incluso puntos de corte distintos ajustados por edad.(117,132–135) En cuanto a otros factores que pueden influir en sus niveles y potencialmente representar factores confusores, hay evidencia de una asociación inversa con el filtrado glomerular, índice de masa corporal y volumen sanguíneo y directa con la presencia de diabetes, hipertensión arterial, ictus o infarto de miocardio reciente, fibrilación auricular y cáncer activo con la concentración de NfL plasmáticos.(103,112,115,117,133,134,136,137)

### **A $\beta$**

La concentración de A $\beta$ 1-42 en plasma tenía una baja precisión para el diagnóstico diferencial de la EA o para identificar individuos A $\beta$ + definidos por LCR o PET de amiloide,(39) pero el uso del ratio A $\beta$ 1-42/1-40 y de técnicas de alto rendimiento han aumentado la precisión diagnóstica de este BP.(138,139) A pesar de ello, el ratio A $\beta$ 1-42/1-40 en plasma muestra solamente una diferencia del ~10% entre los grupos A $\beta$ - y A $\beta$ + (definidos por LCR/PET amiloide), en comparación con una diferencia del ~38% entre grupos (definidos según PET amiloide) para este mismo ratio medido en LCR, lo que supone un rendimiento diagnóstico solamente moderado, con AUCs del 0.70-0.86, e inferior a otros BP como p-tau.(44,103,117,118,138,139) Debido a estos datos preliminares, se ha decidido no determinar A $\beta$  en sangre en los estudios de la presente tesis, pero de igual forma que con p-tau231, se ha considerado importante mencionar la evidencia y estudios con este BP.

### **t-tau**

La proteína tau total (t-tau) en plasma, un biomarcador de neurodegeneración, ha demostrado resultados dispares en su utilidad para diferenciar sujetos A $\beta$ - de A $\beta$ +, que van desde una ausencia de diferencia en su concentración entre ambos grupos a diferencias muy leves con valor discriminativo bajo.(39,103,117,119) Los niveles de t-tau plasmáticos no

fueron estadísticamente distintos ni mostraron utilidad en el diagnóstico diferencial entre EA, DFT y controles.(140)

### **UCH-L1**

La hidrolasa-L1 C-terminal de la ubiquitina (UCH-L1) es una enzima que regula la degradación de las proteínas en el proteasoma. Su concentración se eleva en sangre y LCR después de un traumatismo craneoencefálico, habiendo sido estudiada ampliamente en este contexto y habiéndose propuesto como un biomarcador no específico de neurodegeneración.(141,142)

En resumen, los biomarcadores plasmáticos se han postulado como herramientas muy prometedoras para un diagnóstico etiológico preciso y precoz de pacientes con deterioro cognitivo -hecho ahora más importante que nunca debido a los primeros fármacos modificadores de enfermedad-, al ser relativamente baratos, accesibles y mínimamente invasivos, con un gran potencial para incorporarse en la práctica clínica habitual. Antes de su implementación clínica, son necesarios estudios en cohortes de práctica clínica habitual, que pueden diferir de las cohortes de investigación donde se han realizado hasta la fecha la gran mayoría de estudios, y teniendo en cuenta las comorbilidades y factores que puedan influir en los biomarcadores plasmáticos. La presente tesis pretende estudiar la utilidad de los biomarcadores plasmáticos más prometedores y plantear contextos de uso clínico para su implementación, a través de su estudio en una cohorte de práctica clínica habitual de un centro especializado en trastornos cognitivos.

## II. HIPÓTESIS

## HIPÓTESIS

1. Los biomarcadores plasmáticos p-tau181, GFAP, NfL, t-tau y UCH-L1 tendrán una validez diagnóstica moderada o alta para identificar la etiología del deterioro cognitivo en una cohorte prospectiva de práctica clínica habitual. El uso de algoritmos específicos basados en biomarcadores plasmáticos en tres escenarios clínicos (discriminación de depósito amiloide cerebral, diagnóstico de demencia frontotemporal e identificación de etiologías neurodegenerativas) tendrá una aplicación práctica que permitirá aumentar la precisión diagnóstica y disminuir la necesidad de otras pruebas complementarias.

En concreto, p-tau181 y GFAP estarán elevados de forma diferencial en pacientes con evidencia de proceso fisiopatológico de la enfermedad de Alzheimer, mientras que NfL, t-tau y UCH-L1 lo estarán en etiologías neurodegenerativas de deterioro cognitivo, especialmente en la demencia frontotemporal.

2. El impacto de algunos factores demográficos y analíticos, ciertas comorbilidades y la medicación concomitante en los niveles de biomarcadores plasmáticos p-tau181, p-tau217, GFAP y NfL podría suponer un cambio significativo en su capacidad diagnóstica para la discriminación de amiloidosis cerebral.
3. La concentración de p-tau217 plasmática estará elevada de forma diferencial en sujetos dentro del proceso fisiopatológico de la enfermedad de Alzheimer (definidos por LCR) y tendrá una elevada capacidad discriminatoria para la presencia del depósito cerebral de la proteína beta-amiloide (también evaluada por LCR), similar o superior a proteína p-tau181 plasmática.

Por ello, su aplicación mediante un algoritmo basado en dos puntos de corte permitirá un diagnóstico certero y robusto y el ahorro de un elevado número de las pruebas diagnósticas actuales (punciones lumbares o PET amiloide).

### III. OBJETIVOS

## OBJETIVOS

1. Estudiar la distribución diferencial y capacidad discriminadora de los niveles plasmáticos de p-tau181, GFAP, NfL, t-tau y UCH-L1 en las distintas etiologías de deterioro cognitivo en una cohorte prospectiva de práctica clínica habitual. Establecer algoritmos específicos de predicción individual basados en los biomarcadores plasmáticos y variables más útiles en tres escenarios clínicos frecuentes en la práctica clínica habitual: discriminación de estado amiloide (definido por biomarcadores en LCR o PET de amiloide), diagnóstico de demencia frontotemporal e identificación de etiologías neurodegenerativas de deterioro cognitivo (enfermedad de Alzheimer, demencia por cuerpos de Lewy y demencia frontotemporal).
2. Analizar el impacto de los factores demográficos, personales y analíticos y de las enfermedades sistémicas y la toma de fármacos en la concentración plasmática de p-tau181, p-tau217, GFAP y NfL y cómo estos factores alteran la precisión diagnóstica de los biomarcadores plasmáticos para la discriminación de amiloidosis.
3. Estudiar la distribución, la capacidad discriminadora del estado amiloide y comparar el rendimiento de p-tau217 y p-tau181 plasmáticos en una cohorte prospectiva de práctica clínica habitual en un centro especializado de deterioro cognitivo. Establecer y analizar el rendimiento y la robustez en relación con potenciales factores confusores de un algoritmo diagnóstico basado en p-tau217 plasmático, con puntos de corte específicos, para discriminación de estado amiloide.

## IV. MATERIAL MÉTODOS Y RESULTADOS

## MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

### Trabajo número 1

#### **Diagnostic Performance and Clinical Applicability of Blood-Based Biomarkers in a Prospective Memory Clinic Cohort**

**Jordi Sarto**, Raquel Ruiz-García, Núria Guillén, Óscar Ramos-Campoy, Neus Falgàs, Diana Esteller-Gauxax, José Contador, Guadalupe Fernández, Yolanda González, Adrià Tort-Merino, Jordi Juncà-Parella, Bea Bosch, Sergi Borrego-Écija, Laura Molina-Porcel, Magda Castellví, Miguel Vergara, Anna Antonell, Josep María Augé, Laura Naranjo, Raquel Sánchez-Valle, Albert Lladó, Mircea Balasa

*Neurology*. 2023 Feb 21;100(8):e860-e873. doi: 10.1212/WNL.000000000201597.

Factor de impacto: 7,7; Cuartil: 1, Decil: 1 (Clinical Neurology, JCR 2023).

#### **Resumen estructurado**

**Introducción:** Los biomarcadores plasmáticos han emergido como opciones mínimamente invasivas para la evaluación del deterioro cognitivo. La mayoría de estudios hasta la fecha ha estudiado su desempeño en cohortes de investigación, limitando la capacidad de generalización a la práctica clínica diaria. En este estudio, se evaluó su capacidad diagnóstica y aplicabilidad clínica en una cohorte prospectiva de práctica clínica habitual en un centro especializado de deterioro cognitivo.

**Métodos:** Todos los pacientes que fueron derivados para valoración cognitiva a la Unitat d'Alzheimer i altres Trastorns Cognitius del Hospital Clínic entre julio de 2019 y junio de 2021 fueron invitados a participar en el estudio de forma prospectiva. Se cuantificaron cinco biomarcadores plasmáticos (tau fosforilada en la treonina 181 [p-tau181], proteína glial ácida fibrilar [GFAP], cadena ligera de neurofilamentos [NfL], tau total [t-tau] y ubiquitina hidrolasa L1 C-terminal [UCH-L1]) mediante un ensayo uni-molecular de alta precisión (SiMoA). El desempeño de los biomarcadores plasmáticos se comparó con el diagnóstico

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

clínico (realizado de forma ciega a los biomarcadores plasmáticos) y con el estado amiloide (definido por LCR o PET de amiloide). También se incluyó a un grupo de personas control sin quejas cognitivas.

**Resultados:** Se incluyeron a 349 participantes (media de edad 68, desviación estándar 8,3 años) y 36 controles (media de edad 61,7 años, desviación estándar 8,2 años). En la subcohorta (n=268) con biomarcadores de enfermedad de Alzheimer (EA) disponibles (LCR o PET de amiloide), p-tau181 y GFAP plasmáticos tuvieron una muy buena capacidad diagnóstica para diferenciar a pacientes con EA de individuos con etiologías no neurodegenerativas (NND) de deterioro cognitivo (áreas bajo la curva ROC [AUC] de 0,94 y 0,92, respectivamente), con p-tau181 sistemáticamente superando a GFAP. Los niveles plasmáticos de p-tau181 predijeron el estado amiloide con un 85% de sensibilidad y especificidad y, mediante un algoritmo con dos puntos de corte, tuvieron una elevada predicción individual en el 60% de los participantes. Los NfL plasmáticos diferenciaron a los pacientes con demencia frontotemporal (DFT) de los controles (AUC 0,90) y de los NND (AUC 0,93), aunque su capacidad para diferenciarlos de individuos con EA y de discriminar a los pacientes con etiologías neurodegenerativas de deterioro cognitivo de las no neurodegenerativas fue menos precisa. Mediante un algoritmo que combina p-tau181 y NfL plasmáticos, se identificó a pacientes con DFT con una sensibilidad del 82% y una especificidad del 85%. Otro algoritmo con estos dos biomarcadores plasmáticos tuvo un valor predictivo negativo del 86% para etiologías neurodegenerativas, descartando la mitad de los NND. En la subcohorta sin biomarcadores de EA disponibles, se obtuvieron resultados similares. T-tau y UCH-L1 plasmáticos no ofrecieron valor diagnóstico añadido.

**Discusión:** P-tau181 plasmático predijo el estado amiloide con elevada precisión y podría haber ahorrado un 60% de las punciones lumbares o PET de amiloide en un centro especializado de deterioro cognitivo. Los NfL fueron útiles para diferenciar pacientes con DFT de NND, pero fueron inferiores a p-tau181 en el resto de comparaciones. La combinación de p-tau181 y NfL en dos algoritmos mejoró la capacidad diagnóstica de estos biomarcadores para el diagnóstico de DFT y para la discriminación de etiologías neurodegenerativas de NND, aunque dado el 14% de falsos negativos para el último supuesto no recomendamos su implementación para este fin en el momento actual.

# Diagnostic Performance and Clinical Applicability of Blood-Based Biomarkers in a Prospective Memory Clinic Cohort

Jordi Sarto, MD, Raquel Ruiz-García, MD, PhD, Núria Guillén, MD, Óscar Ramos-Campoy, MD, Neus Falgàs, MD, PhD, Diana Esteller, MD, José Contador, MD, Guadalupe Fernández, BSc, Yolanda González, BSc, Adrià Tort-Merino, BSc, PhD, Jordi Juncà-Parella, BSc, Bea Bosch, BSc, PhD, Sergi Borrego-Écija, MD, PhD, Laura Molina-Porcel, MD, PhD, Magda Castellví, BSc, Miguel Vergara, BSc, Anna Antonell, BSc, PhD, Josep María Augé, MD, PhD, Laura Naranjo, BSc, Raquel Sanchez-Valle, MD, PhD,\* Albert Lladó, MD, PhD,\* and Mircea Balasa, MD, PhD\*

**Correspondence**  
Dr. Balasa  
mbalasa@clinic.cat

*Neurology*® 2023;100:e860-e873. doi:10.1212/WNL.0000000000201597

## Abstract

### Background and Objectives

Blood-based biomarkers have emerged as minimally invasive options for evaluating cognitive impairment. Most studies to date have assessed them in research cohorts, limiting their generalization to everyday clinical practice. We evaluated their diagnostic performance and clinical applicability in a prospective, real-world, memory clinic cohort.

### Methods

All patients referred with suspected cognitive impairment between July 2019 and June 2021 were prospectively invited to participate. Five plasma biomarkers (tau phosphorylated at threonine 181 [p-tau181], glial fibrillary acidic protein [GFAP], neurofilament light chain [NfL], total tau [t-tau], and ubiquitin C-terminal hydrolase L1 [UCH-L1]) were determined with single-molecule array. Performance was assessed in comparison to clinical diagnosis (blinded to plasma results) and amyloid status (CSF/PET). A group of cognitively unimpaired (CU) controls was also included.

### Results

Three hundred forty-nine participants (mean age 68, SD 8.3 years) and 36 CU controls (mean age 61.7, SD 8.2 years) were included. In the subcohort with available Alzheimer disease (AD) biomarkers (n = 268), plasma p-tau181 and GFAP had a high diagnostic accuracy to differentiate AD from non-neurodegenerative causes (area under the receiver operating characteristic curve 0.94 and 0.92, respectively), with p-tau181 systematically outperforming GFAP. Plasma p-tau181 levels predicted amyloid status (85% sensitivity and specificity) with accurate individual prediction in approximately 60% of the patients. Plasma NfL differentiated frontotemporal dementia (FTD) syndromes from CU (0.90) and non-neurodegenerative causes (0.93), whereas the discriminative capacity with AD and between all neurodegenerative and non-neurodegenerative causes was less accurate. A combination of p-tau181 and NfL identified FTD with 82% sensitivity and 85% specificity and had a negative predictive value for neurodegenerative diagnosis of 86%, ruling out half of the non-neurodegenerative diagnoses. In the subcohort without AD biomarkers, similar results were obtained. T-tau and UCH-L1 did not offer added diagnostic value.

### Discussion

Plasma p-tau181 predicted amyloid status with high accuracy and could have potentially avoided CSF/amyloid PET testing in approximately 60% of subjects in a memory clinic setting. NfL was useful for identifying FTD from non-neurodegenerative causes but behaved worse than p-tau181

\*These authors contributed equally to this work and share senior authorship.

From the Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit (J.S., N.G., O.R.-C., N.F., D.E., J.C., G.F., Y.G., A.T.-M., J.J.-P., B.B., S.B.-É., L.M.-P., M.C., M.V., A.A., R.S.-V., A.L., M.B.), Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona; Immunology Service (R.R.-G., L.N.), Biomedical Diagnostic Center, Hospital Clínic de Barcelona, Spain; Atlantic Fellow for Equity in Brain Health (N.F., M.B.), Global Brain Health Institute, University of California, San Francisco and Trinity College, Dublin, Ireland; Neurological Tissue Bank of the Biobank-Hospital Clínic-IDIBAPS (L.M.-P.); and Biochemistry and Molecular Genetics Department (J.M.A.), Hospital Clínic de Barcelona, Spain.

Go to [Neurology.org/N](https://www.neurology.org/N) for full disclosures. Funding information and disclosures deemed relevant by the authors, if any, are provided at the end of the article.

## MORE ONLINE

### Class of Evidence

Criteria for rating therapeutic and diagnostic studies

[NPub.org/coe](https://www.npub.org/coe)

### CME Course

[NPub.org/cmelist](https://www.npub.org/cmelist)

## Glossary

**A $\beta$**  =  $\beta$ -amyloid; **AD** = Alzheimer disease; **AUC** = area under the ROC curve; **bvFTD** = behavioral variant FTD; **CBS** = corticobasal syndrome; **CJD** = Creutzfeldt-Jakob disease; **CU** = cognitively unimpaired; **FTD** = frontotemporal dementia; **GFAP** = glial fibrillary acidic protein; **LBD** = Lewy body dementia; **MCI** = mild cognitive impairment; **MMSE** = Mini-Mental State Examination; **NfL** = neurofilament light chain; **nfPPA** = nonfluent variant PPA; **NPV** = negative predictive value; **PM** = parsimonious model; **PPA** = primary progressive aphasia; **PPV** = positive predictive value; **PSP** = progressive supranuclear palsy; **p-tau181** = tau phosphorylated at threonine 181; **ROC** = receiver operating characteristic; **SCD** = subjective cognitive decline; **SiMoA** = single-molecule array; **SND** = suspected nondegenerative cognitive impairment; **svPPA** = semantic variant PPA; **t-tau** = total tau; **UCH-L1** = ubiquitin C-terminal hydrolase L1.

in all other comparisons. Combining p-tau181 and NfL improved diagnostic performance for FTD and non-neurodegenerative diagnoses. However, the 14% false-negative results suggest that further improvement is needed before implementation outside memory clinics.

### Classification of Evidence

This study provides Class I evidence that plasma p-tau181 correlates with the presence or absence of AD and a combination of plasma p-tau181 and NfL correlates moderately well with a diagnosis of FTD.

Cognitive impairment is one of the biggest challenges of today's society, with a prediction of 150 million cases worldwide by 2050.<sup>1</sup> A prompt and accurate diagnosis is essential for initiating treatment, care planning, and avoiding complications.<sup>2</sup> Current diagnostic criteria for Alzheimer disease (AD) and other neurodegenerative dementias include the use of biomarkers (biochemical in CSF and neuroimaging) for increasing diagnostic certainty.<sup>3-12</sup> However, widespread use of PET and CSF biomarkers is limited due to their economic cost, invasiveness, and limitations of access. There is a stringent need for validation and implementation in clinical practice of accessible and scalable biomarkers. The best candidates for this role are blood-based biomarkers. The development of highly sensitive techniques, like the single-molecule array (SiMoA), where analytes are captured by antibody-coated magnetic beads and trapped in femtoliter-sized microcavities with a digital ELISA readout,<sup>13</sup> has allowed an accurate measurement of distinct brain-derived proteins in blood.

Blood  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) and total tau (t-tau) biomarkers have shown conflicting results depending on the technique and cohort analyzed.<sup>14-16</sup> Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1), an enzyme that regulates protein degradation in the proteasome, is increased in CSF and blood following brain injury and has been proposed as a nonspecific marker of neurodegeneration.<sup>17</sup> Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is a marker of astrocytic activation and proliferation. Plasma GFAP increases throughout the AD continuum and in Lewy body dementia (LBD), predicts A $\beta$  positivity even in preclinical stages, and is associated with cognitive decline in AD.<sup>18,19</sup> Plasma neurofilament light chain (NfL), a structural component of the neural cytoskeleton, has shown high correlation with CSF levels, disease severity, longitudinal decline in cognitive and behavioral deficits and atrophy. Furthermore, plasma NfL levels are higher in neurodegenerative disorders compared with non-neurodegenerative diseases, especially in frontotemporal

dementia (FTD).<sup>16,20-23</sup> Plasma levels of tau phosphorylated at threonine 181 (p-tau181), 217 (p-tau217), and 231 (p-tau231) have shown good diagnostic discrimination between the AD continuum and other diagnosis such as cognitively unimpaired (CU) controls, non-neurodegenerative causes of cognitive impairment, LBD, and FTD. Moreover, p-tau181 predicts greater cognitive decline, MRI atrophy, FDG-PET hypometabolism, and amyloid and tau-PET positivity.<sup>19,22-33</sup> Although advancing in knowledge, most of prior studies focused on highly selected research cohorts. Therefore, data from routine clinical settings are needed for pushing forward the implementation of blood-based biomarkers as diagnosis tools in clinical practice.<sup>32,33</sup>

In this study, our primary research goals were to assess the discriminative capacities of 5 blood-based biomarkers (p-tau181, t-tau, NfL, GFAP, and UCH-L1) and to explore their potential utility in real clinical practice scenarios. To do so, we measured these 5 blood-based biomarkers in a real clinical practice cohort of subjects referred for suspected cognitive impairment. We hypothesized that p-tau181 and GFAP would be differentially increased in the AD group and could discriminate between AD and the other diagnostic categories. In contrast, the other biomarkers would differentiate between neurodegenerative and non-neurodegenerative diagnoses.

## Methods

### Study Population

All subjects who were referred for diagnosis with suspected cognitive impairment to the Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Hospital Clínic Barcelona, between July 1, 2019, and June 30, 2021, were prospectively invited to participate in the study. Patients with severe

dementia at the first evaluation and subjects referred for a second opinion or genetic counseling were excluded. In addition, CU control participants, aged 50 years or older, were retrospectively included.

## Clinical Assessment

Subjects underwent the same clinical diagnostic protocol irrespective of whether they were included in the study or not. This included a neurologic assessment, neuropsychological testing, and structural neuroimaging. AD biomarkers were systematically performed, according to current guidelines, to subjects with mild cognitive impairment (MCI) below 75 years of age, early-onset dementia, and nonamnestic phenotypes. At our site, CSF is the first-line AD biomarker used; amyloid PET is performed when lumbar puncture is contraindicated or technically difficult. When deemed appropriate to reach a final diagnosis, other diagnostic procedures, such as fluorodeoxyglucose (FDG) PET or dopamine transporter scan, were also performed.

Diagnosis was established according to current diagnostic criteria by the treating neurologist and blinded to plasma biomarkers. In the whole cohort, syndromic diagnostic categories included subjective cognitive decline (SCD), MCI (irrespective of suspected etiology, both AD and non-AD), probable AD dementia, probable LBD, semantic variant primary progressive aphasia (svPPA), nonfluent variant PPA (nfPPA), behavioral variant FTD (bvFTD), progressive supranuclear palsy (PSP), corticobasal syndrome (CBS), and Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). SvPPA, nfPPA, bvFTD, PSP, and CBS were unified under the umbrella FTD term.

In the subcohort with AD biomarkers performed (CSF/amyloid PET), participants were classified depending on suspected etiology of cognitive impairment: suspected non-neurodegenerative cognitive impairment (SND), AD (MCI due to AD + probable AD dementia with positive AD biomarkers), probable LBD, and FTD. SND was defined as stable cognitive impairment that was not suggestive of any neurodegenerative disease and with negative AD biomarkers (grouping subjects from SCD and MCI initial syndromic diagnostic categories). All controls had no cognitive complaints, normal neuropsychological testing, and CSF analysis (A-T-N-).

## Procedures and Measurements

A blood sample was obtained from all participants at the time of inclusion, centrifuged to obtain plasma, aliquoted, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Plasma biomarkers concentrations were measured using the Quanterix Simoa Neurology 4-Plex A (including t-tau, GFAP, NfL, and UCH-L1) and the Quanterix Simoa p-tau181 Advantage V2 assays following the manufacturer's protocol (Quanterix, Billerica, MA). Blood sample measurements were performed after finalizing recruitment, during November and December 2021. Laboratory technicians running the SiMoA analysis had no access to clinical or demographic information. *APOE* genotype was determined through analysis of 2 single nucleotide variations

(formerly single nucleotide polymorphisms) (rs429358 and rs7412) by Sanger sequencing.

Lumbar puncture was performed according to current clinical guidelines. CSF amyloid  $\beta_{1-42}$ , p-tau181, and t-tau were measured with Lumipulse following the manufacturer's instructions (Fujirebio, Belgium) and using local cutoffs. Amyloid positive ( $A\beta+$ ) status was defined as CSF amyloid  $\beta_{1-42}$  below 600 pg/mL. In cases with borderline results of amyloid  $\beta_{1-42}$  in CSF, a ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40} < 0.07$  was used to define the  $A\beta+$  status. CSF NfL was measured with the ELISA kit of Uman Diagnostics (IBL International, Hamburg, Germany). Amyloid PET images were acquired in a Biograph molecular CT PET (Siemens) using florbetaben or flutemetamol ligands, and its status ( $A\beta+$  or  $A\beta-$ ) was evaluated by a nuclear medicine specialist in accordance with current guidelines.

## Statistical Analyses

We assessed normality with Kolmogorov-Smirnov or Shapiro-Wilk tests. Continuous variables were compared depending on the normality tests using the *t* test/analysis of variance or the Mann-Whitney *U*/Kruskal-Wallis test with Dunn multiple comparison test. The Fisher exact test and  $\chi^2$  test were used for categorical variables. Because plasma biomarker levels were not normally distributed, they were log10 transformed for normality, which allowed linear modeling and parametric testing. Plasma biomarker concentrations were compared using an analysis of covariance to test for the effect of the diagnostic group, with age and sex as covariates and the adjusted  $\eta^2$  as a measure of effect size, with Bonferroni correction for pairwise comparisons. Correlations between plasma and CSF results and demographics were calculated using the Spearman rank correlation test. To test for the potential effect of sample storage time on plasma biomarkers results, we used linear regression analyses with each individual plasma biomarker as the dependent variable and time from collection to analysis (in days) as the independent variable, for each separate diagnostic group, both with and without adjustment for demographic variables. To analyze the diagnostic and CSF/amyloid PET status prediction performance of blood biomarkers, the area under the receiver operating characteristic (ROC) curves (AUC) was assessed. To study the performance of plasma biomarkers in distinct clinical scenarios, models were calculated using binary logistic regression, including a parsimonious model (the minimum number of variables that maximized predictive power) with the stepwise forward selection method based on the probability of a likelihood ratio statistic based on conditional parameter estimates. The predicted probability of each model was used to calculate the resulting AUCs. Cutoffs were first selected when they maximized sensitivity and specificity per Youden index. Also, new cutoff values were chosen for optimized sensitivity or specificity to evaluate the biomarkers in distinct clinical practice scenarios. SPSS (version 25) and GraphPad Prism (version 9) were used for statistical analyses, and significance was set at  $p < 0.05$ .

**Table 1** Demographic, Cognitive, APOE, and Plasma Biomarker Characteristics of the Whole Cohort According to the Clinical Syndromic Diagnosis (n = 385)

	CU (n = 36)	SCD (n = 39)	MCI (n = 183)	AD dementia (n = 54)	LBD (n = 28)	FTD (n = 41)	CJD (n = 4)	p Value
Age, y	61.7 (8.2)	64.9 (8.7)	69.2 (7.6)	66.9 (7.9)	69.9 (6.9)	65.6 (10.4)	65.2 (11.2)	<0.001 <sup>a</sup>
Disease duration, y	NA	2.8 (2.7)	2.5 (2.1)	2.7 (1.9)	3 (2.4)	2.8 (2)	0 (0)	NS <sup>b</sup>
Sex, female	78	54	55	63	32	44	75	0.005 <sup>c</sup>
Education, y	10.3 (4.8)	11.7 (3.8)	10.6 (4.9)	10 (4.1)	10.5 (4.7)	11.1 (4.6)	10 (3.5)	NS
MMSE	28.8 (1.1)	28.2 (2.9)	25 (3.4)	20.4 (4.6)	24.1 (3.9)	23.6 (5.3)	16 (2.8)	<0.001 <sup>d</sup>
APOE ε4 carriers	22	35	46	56	29	26	50	0.009 <sup>e</sup>
AD biomarkers available (CSF/PET)	100	21	68	72	71	80	75	NA
Plasma p-tau181, pg/mL	0.8 (0.3)	1.2 (0.5)	1.8 (1)	2.6 (1.2)	1.4 (0.7)	1.4 (0.8)	2.1 (1.1)	<0.001
Plasma t-tau, pg/mL	3.8 (1.6)	3.3 (1.3)	3.7 (1.5)	4.1 (1.5)	3.8 (1.6)	4 (1.5)	30.5 (45.2)	<0.001 <sup>f</sup>
Plasma NfL, pg/mL	9.2 (3.9)	8.5 (3.4)	12.1 (5.7)	15.6 (5.7)	14 (7.4)	33.1 (22.4)	91.8 (68.5)	<0.001
Plasma GFAP, pg/mL	98 (58.2)	97.8 (47.3)	156.1 (89.6)	222.3 (114.5)	133.5 (81.1)	157.1 (90.5)	1,019.9 (763.5)	<0.001
Plasma UCH-L1, pg/mL	15.6 (18.6)	16 (13)	18.1 (13.1)	16.4 (9.6)	17.6 (10.4)	20.4 (14.3)	48 (16.3)	0.012 <sup>f</sup>

Abbreviations: AD = Alzheimer disease; CJD = Creutzfeldt-Jakob disease; CU = cognitively unimpaired; FTD = frontotemporal dementia; GFAP = glial fibrillary acidic protein; LBD = dementia with Lewy bodies; MCI = mild cognitive impairment; MMSE = Mini-Mental State Examination; NA = not applicable; NfL = neurofilament light chain; NS = not significant; p-tau181 = tau phosphorylated at threonine 181; SCD = subjective cognitive decline; t-tau = total tau; UCH-L1 = ubiquitin C-terminal hydrolase L1.

Data are shown as mean (SD) or percent.

<sup>a</sup> Subjects with MCI and LBD were older than CU participants.

<sup>b</sup> Patients with CJD were excluded from this analysis.

<sup>c</sup> There were more women in the CU group and more men with LBD.

<sup>d</sup> MMSE was higher in the CU and SCD groups, whereas the AD group had the lowest MMSE scores.

<sup>e</sup> There were more APOE ε4 allele carriers in the MCI and the AD dementia group.

<sup>f</sup> Plasma t-tau and UCH-L1 concentrations were only significantly different in CJD compared with the other diagnostic groups.

## Standard Protocol Approvals, Registrations, and Patient Consents

All participants gave written informed consent for participation in the study. The study protocol was approved by the Hospital Clínic de Barcelona Research Ethics Committee (HCB/2019/0600).

## Data Availability

Anonymized data will be shared on reasonable request from any qualified investigator if approved by the local Research Ethics Committee.

## Results

### Whole Cohort

#### Demographics

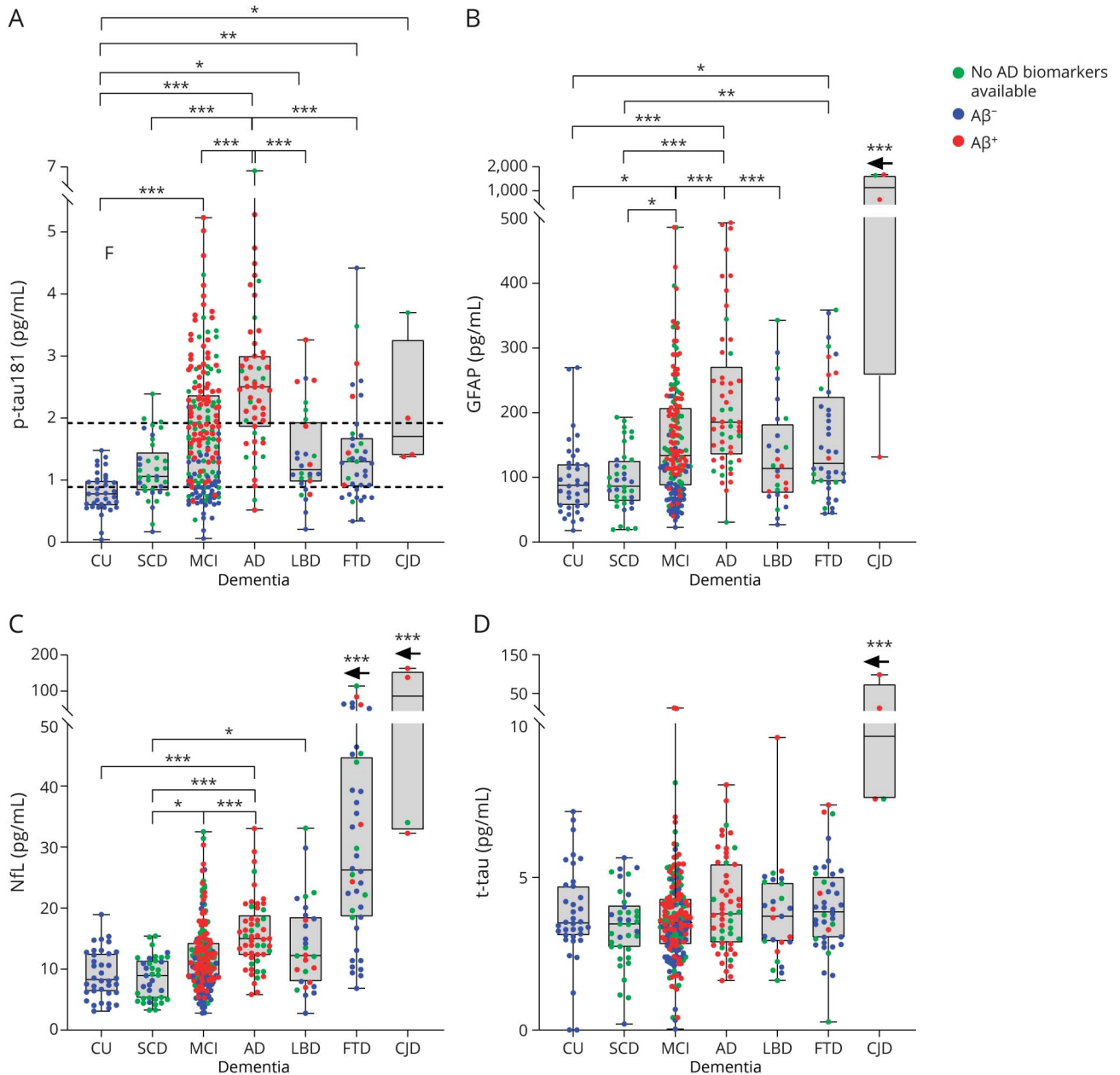
Three hundred forty-nine participants (39 SCD, 183 MCI, 54 AD dementia, 28 LBD, 41 FTD [26 bvFTD, 8 svPPA, 5 nfPPA, 1 CBS, and 1 PSP], and 4 CJD) were prospectively included, plus an additional 36 CU controls, accounting for a total of 385 subjects. One patient with cognitive impairment related to multiple sclerosis, 3 with recent brain hemorrhage, and 1 diagnosed with end-stage pancreatic cancer shortly after inclusion were initially recruited but were excluded from analysis.

Demographic, cognitive, APOE, and biomarker characteristics are summarized in Table 1. Symptomatic subjects (n = 349) had a mean age (SD) of 68 (8.3) years and were older than CU participants (61.7 [8.2]) years ( $p < 0.001$ ). The control group had more women compared with symptomatic participants (78% vs 53%,  $p = 0.004$ ) and less APOE ε4 allele carriers (22% vs 43%,  $p = 0.015$ ).

#### Plasma Biomarkers

Plasma p-tau181, GFAP, NfL, and t-tau biomarker concentrations are plotted for each diagnostic group in Figure 1 with a color code depending on amyloid status: not performed, Aβ+ or Aβ-. In the whole cohort, all 5 biomarker concentrations were different among the diagnostic groups. P-tau181 levels were higher in AD dementia compared with the other diagnoses, except for CJD; MCI also had higher concentrations than CU participants. A pattern of higher p-tau181 levels for Aβ+ compared with Aβ- subjects was observed for each diagnostic category. GFAP behaved similar to p-tau181, with higher concentrations in AD and for Aβ+ patients in each diagnostic category. NfL was higher in FTD compared with the other groups and in AD compared with CU, SCD, and MCI. In CJD, GFAP, NfL, t-tau, and UCH-L1 levels

**Figure 1** Plasma Concentrations of P-Tau181, GFAP, NfL, and T-Tau in the Whole Cohort per Diagnostic Syndromic Group



(A-D) Box-and-whisker plots with the central horizontal box line showing the median plasma concentration (p-tau181 [A]; GFAP [B]; NfL [C]; t-tau [D]) in each diagnostic group and lower and upper box boundaries showing the 25th and 75th percentiles, respectively. Plasma biomarker concentrations between diagnostic groups were log10 transformed and compared using an analysis of covariance, adjusting for age and sex, and pairwise comparisons were assessed with the Bonferroni correction method. For visualization purposes, raw (not log10 transformed) biomarker concentrations were plotted in the graph, and the scale of the upper segment of the y axis was adjusted, as marked by a discontinuous line. Participants were represented by a different color depending on amyloid status (not performed/negative/positive). Two additional horizontal discontinuous lines were represented in A, corresponding to a plasma p-tau181 concentration of 0.89 and 1.92, which were the ones with an optimized negative and positive predictive value for  $\beta$ -amyloid status discrimination, respectively (see the Results section). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ . Brackets indicate the diagnostic groups compared and a left-pointing arrow marks that all diagnostic categories to the left have the same statistical significance.  $A\beta^{-/+}$  =  $\beta$ -amyloid negative/positive; AD = Alzheimer disease; CJD = Creutzfeldt-Jakob disease; CU = cognitively unimpaired; FTD = frontotemporal dementia; GFAP = glial fibrillary acidic protein; LBD = dementia with Lewy bodies; MCI = mild cognitive impairment; NfL = neurofilament light chain; p-tau181 = tau phosphorylated at threonine 181; SCD = subjective cognitive decline; t-tau = total tau.

were increased the most, and p-tau181 levels were similar to AD dementia. T-tau and UCH-L1 levels were only differentially elevated in the CJD group compared with the other diagnostic categories.

### Subcohort With AD Biomarkers (CSF/Amyloid PET) Performed

The subcohort with available AD biomarkers (235 subjects with cognitive impairment and 36 CU) was used to evaluate the

**Table 2** Demographic, Cognitive, APOE, and Plasma Biomarker Characteristics of the Subcohort With AD Biomarkers Available (CSF or Amyloid PET) by Diagnostic Etiologic Category (n = 268)

	CU (n = 36)	SND (n = 60)	AD (n = 119)	LBD-A $\beta$ - (n = 13)	LBD-A $\beta$ + (n = 7)	FTD-A $\beta$ - (n = 28)	FTD-A $\beta$ + (n = 5)	p Value
Age, y	61.7 (8.2)	63.4 (8)	68.2 (6.1)	69.9 (6.8)	65.9 (6.1)	65.2 (9.8)	71.6 (4.6)	<0.001 <sup>a</sup>
Disease duration, y	NA	2.5 (1.9)	2.7 (2.1)	3 (2.8)	3.6 (2.1)	2.8 (2.1)	3.2 (1.6)	0.699
Sex, female	78	47	61	39	15	46	40	0.001 <sup>b</sup>
Education, y	10.3 (4.8)	10.3 (4.8)	10.8 (4.5)	11.1 (5.5)	11.4 (4.4)	11.4 (4.6)	9.6 (7)	0.945
MMSE	28.7 (1.1)	26.8 (3.2)	22.7 (4.4)	25.4 (4.1)	23.3 (4.2)	23.6 (5.6)	21.8 (5.7)	<0.001 <sup>c</sup>
APOE $\epsilon$ 4 carriers	22	19	63	18	80	19	67	<0.001 <sup>d</sup>
Plasma p-tau181, pg/mL	0.8 (0.3)	0.9 (0.4)	2.4 (1)	1.1 (0.5)	1.9 (0.9)	1.4 (0.8)	1.7 (0.9)	<0.001
Plasma t-tau, pg/mL	3.8 (1.6)	3.2 (1.3)	4 (1.7)	3.6 (1.1)	4.4 (2.4)	3.9 (1.1)	5.2 (1.9)	0.038
Plasma NfL, pg/mL	9.2 (4)	8.6 (4.2)	14 (5.6)	14.2 (7.8)	11 (3.6)	29.3 (17.2)	42.6 (30.1)	<0.001
Plasma GFAP, pg/mL	98 (58)	81.9 (35.6)	203.8 (101.7)	137.2 (85.1)	95.6 (21.2)	144.4 (83.3)	210.1 (81.6)	<0.001
Plasma UCH-L1, pg/mL	15.5 (18.5)	18.9 (13.9)	17.9 (14.2)	18.7 (10.6)	19.3 (11.6)	21.4 (14.9)	18.7 (9.3)	0.309

Abbreviations: A $\beta$ -/+ =  $\beta$ -amyloid negative/positive; AD = Alzheimer disease; CU = cognitively unimpaired; FTD = frontotemporal dementia; GFAP = glial fibrillary acidic protein; LBD = dementia with Lewy bodies; MCI = mild cognitive impairment; MMSE = Mini-Mental State Examination; NA = not applicable; NfL = neurofilament light chain; p-tau181 = tau phosphorylated at threonine 181; SND = suspected nondegenerative cognitive impairment; t-tau = total tau; UCH-L1 = ubiquitin C-terminal hydrolase L1.

Please note that in the subcohort with AD biomarkers available, diagnostic categories are grouped depending on the etiology of cognitive impairment, in contrast to the syndromic category used for the whole cohort. Data are shown as mean (SD) or percent.

<sup>a</sup> CU individuals were younger than AD and LBD-A $\beta$ - participants, and the AD group was older than the SND one.

<sup>b</sup> There were significantly more women in the CU and AD diagnostic categories.

<sup>c</sup> MMSE was higher in the CU and SND groups compared with the other groups.

<sup>d</sup> There were more APOE  $\epsilon$ 4 allele carriers in the AD, LBD-A $\beta$ +, and FTD-A $\beta$ + groups.

diagnostic performance and establish cutoffs. Subjects with CJD were excluded from further analysis due to low sample size. Therefore, a total of 268 subjects were analyzed.

In the subcohort with AD biomarkers available, etiologic diagnostic categories included CU and SND (A $\beta$ - SCD and MCI), AD (including MCI-A $\beta$ + and AD dementia A $\beta$ +), and clinical diagnosis of LBD and FTD (most subjects A $\beta$ -, with some A $\beta$ + cases interpreted as copathology). Demographic, cognitive, APOE, and biomarker characteristics are summarized in Table 2.

### Diagnostic Performance of Individual Plasma Biomarkers

P-tau181, GFAP, and NfL concentrations of participants with AD biomarkers available are plotted for each diagnostic group in the left part of Figure 2 (p-tau181 and NfL) and eFigure 1 (GFAP) ([links.ww.com/WNL/C493](https://www.ww.com/WNL/C493)), whereas the corresponding AUCs are represented on heatmaps on the right part of the figures.

#### P-Tau181

P-tau181 levels were different between diagnostic categories (adjusted  $\eta^2 = 0.426$ ,  $p < 0.001$ ) and were higher in AD. There were no differences between AD and A $\beta$ + LBD or FTD. P-tau181 levels discriminated AD from CU and SND participants with high accuracy (AUC of 0.96 and 0.94, respectively) and with moderate accuracy from LBD and FTD (0.79 and 0.80, respectively). There was only low to moderate accuracy to differentiate between the other diagnostic groups.

#### GFAP

GFAP concentrations were different between groups (adjusted  $\eta^2 = 0.308$ ,  $p < 0.001$ ) and were higher in AD compared with CU, SND, and LBD. GFAP levels were similar in AD and A $\beta$ + LBD or FTD. GFAP discriminated AD from CU and SND with high accuracy (AUC 0.85 and 0.92, respectively) but with low-moderate accuracy between AD and LBD (0.76) and FTD (0.65) and between the rest of the diagnoses. Diagnostic performance was globally inferior compared with p-tau181.

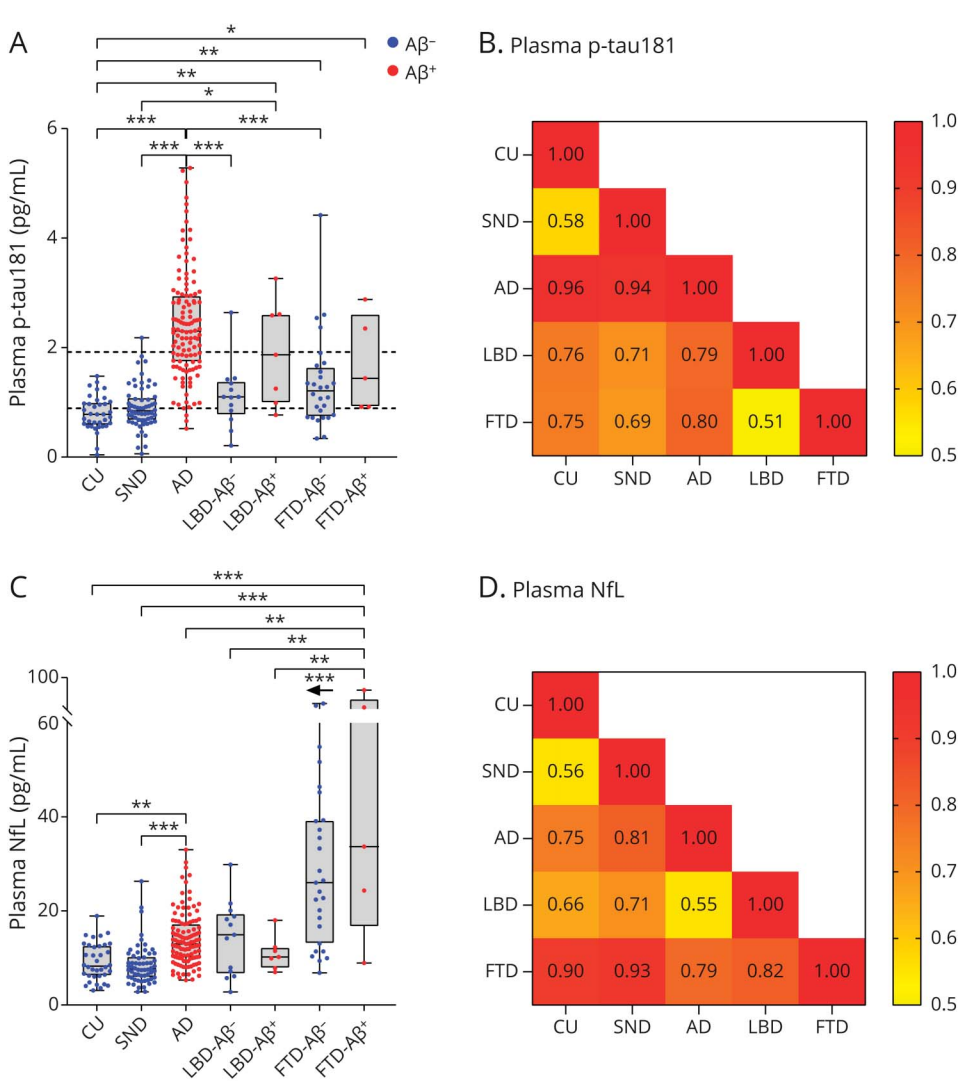
#### NfL

NfL had different concentrations between diagnoses (adjusted  $\eta^2 = 0.364$ ,  $p < 0.001$ ) and was increased the most in patients with FTD. NfL was also increased in AD compared with CU and SND participants. NfL levels were similar between LBD, CU, and SND. NfL had an excellent diagnostic performance when differentiating FTD from CU and SND (AUC 0.90 and 0.93, respectively) and a moderate performance to discriminate FTD from AD (0.79) and LBD (0.82). NfL also had moderate performance for differentiating AD from CU and SND (AUC 0.75 and 0.81, respectively) with a diagnostic accuracy inferior to p-tau181 and GFAP.

#### T-Tau

T-tau levels were different between diagnoses (adjusted  $\eta^2 = 0.054$ ,  $p = 0.038$ ). They were only statistically higher in AD

**Figure 2** Plasma P-Tau181 and NfL Concentrations in the Subcohort With AD Biomarkers Performed per Diagnostic Group (Left) and Area Under the ROC Curve for Discrimination Between Diagnostic Etiologic Categories (Right)



(A and C) Box-and-whisker plots with the central horizontal box line showing the median plasma concentration (p-tau181 [A]; NfL [C]) in each diagnostic group and lower and upper box boundaries showing the 25th and 75th percentile, respectively. Plasma biomarker concentrations between diagnostic groups were log10 transformed and compared using an analysis of covariance, adjusting for age and sex, and pairwise comparisons were assessed with the Bonferroni correction method. For visualization purposes, raw (not log10 transformed) biomarker concentrations were plotted in the graph, and the scale of the upper segment of the y axis was adjusted for plasma NfL (C), as marked by a discontinuous line. Participants were represented by a different color depending on  $\beta$ -amyloid positivity or negativity, which was defined using our center definitions (see the Methods section). Two additional horizontal discontinuous lines were represented in A, corresponding to a plasma p-tau181 concentration of 0.89 and 1.92, which were the ones with an optimized negative and positive predictive value for  $\beta$ -amyloid status discrimination, respectively (see the Results section). (B and D) Diagnostic accuracy of plasma biomarkers to differentiate between each pair of diagnoses is represented by a heatmap of each AUC, with a value of 0.5 meaning no discrimination and a value of 1 a perfect discrimination. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ . Brackets indicate the diagnostic groups compared and a left-pointing arrow marks that all diagnostic categories to the left have the same statistical significance.  $A\beta^{-/+}$  =  $\beta$ -amyloid negative/positive; AD = Alzheimer disease; AUC = area under the ROC curve; CU = cognitively unimpaired; FTD = frontotemporal dementia; LBD = dementia with Lewy bodies; NfL = neurofilament light chain; p-tau181 = tau phosphorylated at threonine 181; ROC = receiver operating curve; SND = suspected neurodegenerative cognitive impairment.

compared with the SND diagnostic category, with a low diagnostic accuracy (AUC of 0.65).

### UCH-L1

UCH-L1 concentrations were not statistically different between diagnostic groups (adjusted  $\eta^2 = 0.019$ ,  $p = 0.309$ ).

### Correlations Between Plasma Biomarkers, Demographic Data, Cognition, Time From Blood Collection to Measurement, and CSF Biomarkers

In the AD group, only a low correlation of age with plasma p-tau181 was found ( $\rho = -0.31$ ). In the non-neurodegenerative group (CU + SND), age correlated with NfL ( $\rho = 0.53$ ) and GFAP ( $\rho = 0.3$ ) but not with p-tau181. Plasma p-tau181 and NfL were correlated with Mini-Mental State Examination (MMSE) in AD ( $\rho = -0.3$  and  $-0.28$ , respectively). No correlation between cognition, sex, or education with plasma biomarkers was found in

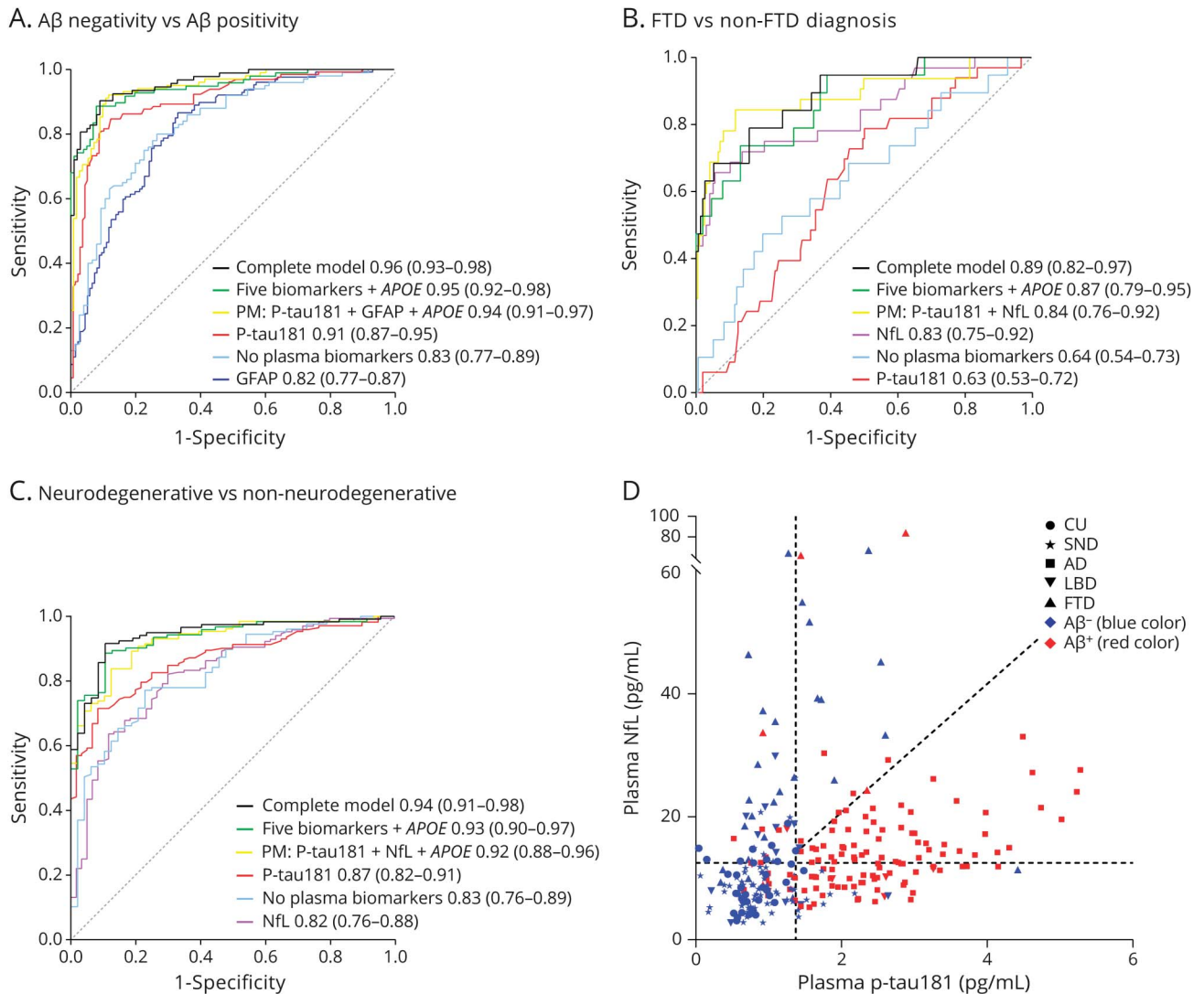
the CU and SND groups. Time from blood sample collection to measurement did not significantly influence the concentration of any plasma biomarker (linear regressions), nor was this variable significantly correlated with blood biomarker levels.

Moderate correlations (eFigure 2, [links.lww.com/WNL/C493](https://links.lww.com/WNL/C493)) were observed between plasma p-tau181 and CSF  $A\beta_{1-42}$ , p-tau, and t-tau ( $\rho = 0.52-0.57$ ), between plasma GFAP and CSF biomarkers ( $\rho = 0.43-0.56$ ), and between plasma NfL and CSF t-tau ( $\rho = 0.36$ ) and NfL ( $\rho = 0.63$ ). Partial correlations adjusting for age and sex yielded minimal differences in correlation coefficients.

### Plasma Biomarkers in Distinct Practical Clinical Scenarios

To study the practical clinical utility of plasma biomarkers, we calculated distinct predictive models and cutoffs to address different clinical questions (Figure 3).

**Figure 3** Receiver Operating Characteristic Plots of Predictive Models and Individual Plasma Biomarkers for Distinct Clinical Scenarios and Scatter Plot for Clinical and  $\beta$ -Amyloid Status Classification Using Plasma NfL and P-Tau181



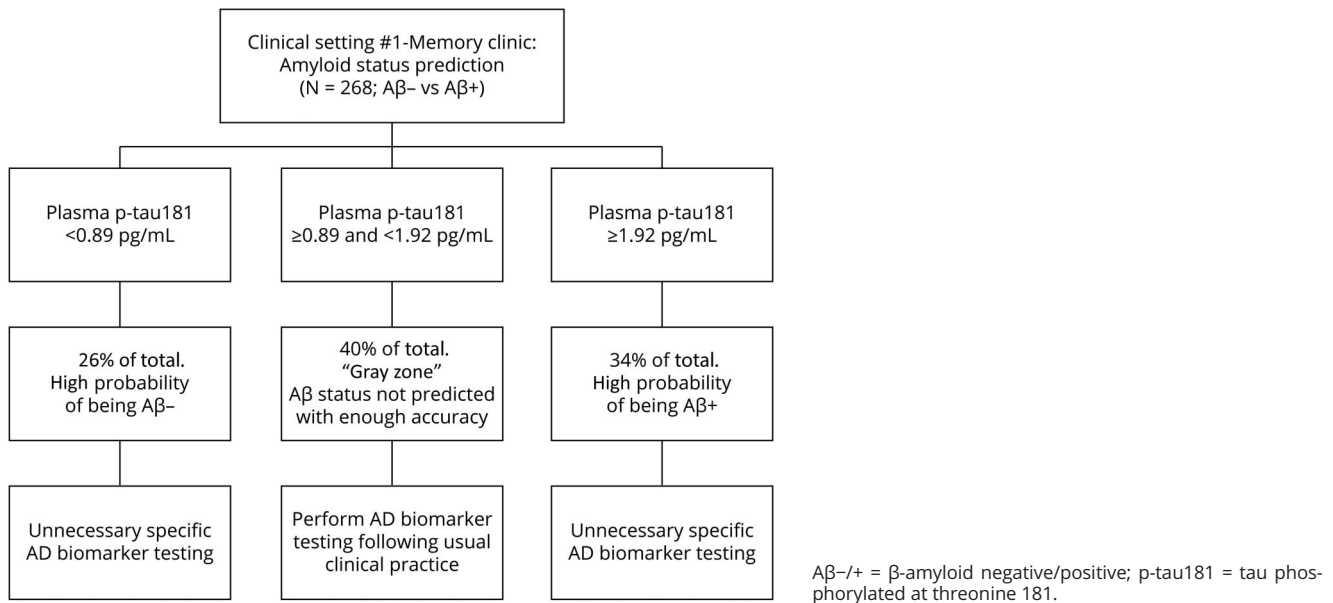
(A, B, and C) Receiver operating characteristic plots showing the area under the curve of the predicted probability of distinct logistic regression models and individual plasma biomarkers in the proposed practical scenarios, with 95% CI in brackets. The complete model included age, sex, APOE, MMSE, and the 5 plasma biomarkers, whereas the model without biomarkers included only age, sex, APOE, and MMSE. (D) Scatter plot showing the distribution of diagnoses (represented by shape) and  $\beta$ -amyloid status (represented by color) by plasma p-tau181 and NfL concentrations. Three cutoffs are represented in the scatter plot by dotted lines: plasma p-tau181 1.37 pg/mL (balanced cutoff for  $\beta$ -amyloid status discrimination), plasma NfL 11.3 pg/mL (balanced cutoff for FTD diagnosis when p-tau181 is below 1.37 pg/mL, for optimal differentiation of FTD from SND), and plasma NfL/p-tau181 ratio of 10.3 (balanced cutoff for FTD diagnosis when p-tau181 is equal or higher than 1.37 pg/mL, for optimal differentiation of FTD from AD). For visualization purposes, the scale of the upper segment of the y axis was adjusted, as marked by a discontinuous line.  $A\beta^{-/+}$  =  $\beta$ -amyloid negative/positive; AD = Alzheimer disease; CU = cognitively unimpaired; FTD = frontotemporal dementia; GFAP = glial fibrillary acidic protein; LBD = dementia with Lewy bodies; MMSE = Mini-Mental State Examination; NfL = neurofilament light chain; PM = parsimonious model; p-tau181 = tau phosphorylated at threonine 181; SND = suspected nondegenerative cognitive impairment.

### Clinical Scenario 1: Amyloid Status Prediction

A combination of the 5 plasma biomarkers, age, sex, MMSE, and APOE (complete model) predicted  $A\beta$  status with an AUC of 0.96 (Figure 3A). The parsimonious model (PM) included p-tau181, GFAP, and APOE (AUC 0.94). P-tau181 had a greater explanatory power than GFAP, which in turn was better than APOE (AUCs 0.91, 0.82, and 0.72, respectively). A model with no biomarkers, using only sex, age, MMSE, and APOE, had an AUC of 0.83, similar to GFAP but worse than p-tau181 alone.

Because plasma p-tau181 was the biomarker with a higher explanatory power to predict  $A\beta$  status, our next goal was to establish useful cutoffs in clinical practice in individual subjects. A balanced cutoff of 1.37 pg/mL had 85% sensitivity and specificity to predict  $A\beta$  status. We established 2 other cutoff values, 1 inferior with optimized sensitivity and negative predictive value (NPV) (cutoff 0.89, sensitivity 97%, and NPV 95%) and 1 superior with optimized specificity and positive predictive value (PPV) (cutoff 1.92, specificity 96%, and PPV 94%). Values below 0.89 pg/mL were deemed to have a high

**Figure 4** Proposed Algorithm for Amyloid Status Prediction Using Plasma P-Tau181



probability of being Aβ<sup>-</sup>, and those above 1.92 pg/mL probably would be Aβ<sup>+</sup>. The algorithm is represented in Figure 4, and both thresholds are plotted in Figures 1A and 2A.

Twenty-six percent of all individuals with AD biomarkers available had p-tau181 levels below the threshold of 0.89 pg/mL, with 4 (5%) Aβ<sup>+</sup> subjects misclassified (3 MCI due to AD and 1 Aβ<sup>+</sup> LBD). Conversely, 34% of all participants with available AD biomarkers had p-tau181 above the cutoff of 1.92 pg/mL, with 5 Aβ<sup>-</sup> subjects (6%) misclassified (3 Aβ<sup>-</sup> FTD, 1 Aβ<sup>-</sup> LBD, and 1 SND). In sum, using an inferior and a superior cutoff for plasma p-tau181, in 60% of all subjects, Aβ status could have been predicted with reasonable high accuracy, and more advanced biomarker testing (CSF/amyloid PET) could have been potentially avoided. The remaining 40% of subjects fell in the gray zone, with no added value of p-tau181 in the decision of performing or not CSF/PET biomarkers.

P-tau181 had a better accuracy in young (age <65 years, 37% of subjects, AUC of 0.98) than in older (age ≥65 years, AUC of 0.85) participants. The optimized p-tau181 cutoff for predicting Aβ status for <65 years was 1.58 pg/mL and had a 97% sensitivity and 96% specificity.

#### Clinical Scenario 2: FTD Diagnosis

The complete predictive model could discriminate subjects with FTD from all other participants (AUC 0.89, Figure 3B). The PM (AUC 0.84) included plasma NfL (AUC 0.83) and plasma p-tau181 (AUC 0.63). NfL was able to differentiate FTD from subjects with SND (AUC 0.93, balanced cutoff of 11.3 pg/mL, 84% sensitivity, and specificity). Diagnostic performance was lower when differentiating FTD from AD (AUC 0.79, balanced

cutoff 16.6, 75% sensitivity, and 74% specificity). Combining both biomarkers improved diagnostic performance, with an NfL/p-tau181 ratio differentiating AD from FTD (AUC 0.93, cutoff 10.3, 88% sensitivity, and 89% specificity).

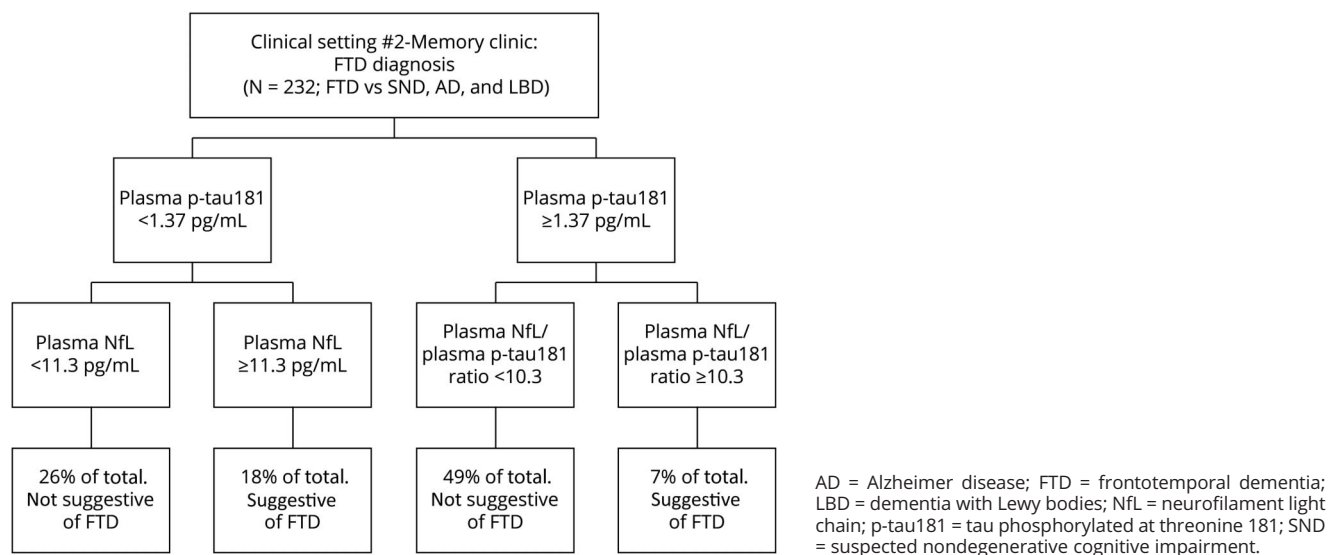
Based on these results, in our cohort, participants with low p-tau181 (<1.37 pg/mL) would be suggestive of FTD if NfL is elevated (≥11.3 pg/mL). In cases with p-tau181 above the cutoff ≥1.37 pg/mL, the NfL/p-tau181 ratio would be used, with a ratio ≥10.3 being suggestive of FTD. The proposed algorithm identified FTD diagnosis with a sensitivity of 82%, a specificity of 85%, and an NPV of 97%. The distribution of p-tau181 and NfL concentrations between clinical diagnoses and Aβ status and proposed cutoffs are represented in Figure 3D; the algorithm is schematized in Figure 5.

#### Clinical Scenario 3: Screening for Neurodegenerative Causes of Cognitive Impairment

We studied the diagnostic performance of distinct plasma biomarkers to differentiate between neurodegenerative (AD, LBD, and FTD) and non-neurodegenerative (SND) etiologies. The complete model (Figure 3C) had an AUC of 0.94, whereas the PM (AUC 0.92) included p-tau181, NfL, and APOE (individual AUCs of 0.87, 0.82, and 0.68, respectively). The model with no biomarkers had an AUC of 0.83, similar to NfL but inferior to p-tau181 alone.

A sensitivity-optimized p-tau181 cutoff had 78% NPV for identifying non-neurodegenerative causes of cognitive impairment, whereas NPV was only 67% for NfL. Because these individual values were not deemed good enough to be effectively used for screening, we evaluated a combined algorithm of both p-tau181 and NfL. Fifteen percent of subjects (including half of

**Figure 5** Proposed Algorithm for FTD Diagnosis Using Plasma P-Tau181 and NfL



SND diagnoses), had a negative result (i.e., p-tau181 and NfL levels below their respective cutoffs), with a sensitivity of 97% and a NPV of 86%. However, 5 (14% of all negative results) participants with a neurodegenerative disease (2 AD and 3 LBD) would have been misclassified as non-neurodegenerative. In subjects <65 years of age, NfL performed better than p-tau181 (AUC 0.88 and 0.84, respectively), with specific cutoffs for this younger subgroup having an NPV of 82% for NfL and 73% for p-tau181, and, combining both biomarkers in a similar algorithm, 28% would have tested negative, resulting in a 91% NPV.

### Subcohort Without AD Biomarkers

Prospectively included patients without AD biomarkers (n = 113) were older than those with AD biomarkers (mean age 70.6 vs 66.7, respectively,  $p < 0.001$ ). The rest of demographic, cognitive, and plasma biomarkers data were distributed similarly between both groups (Figure 1 and eTable 1, [links.lww.com/WNL/C493](https://www.lww.com/WNL/C493)).

We then applied the cutoffs and algorithms calculated previously to the subcohort without AD biomarkers performed (Figures 4 and 5). Applying algorithm 1, based on individual p-tau181 results, 18% subjects could be classified as probably A $\beta$ - (32% of SCD diagnoses, 14% of MCI, 7% AD dementia, 13% LBD, and 13% FTD), and 35% could be classified as probably A $\beta$ + (9% of SCD, 44% of MCI, 60% AD dementia, 38% LBD, and 13% FTD). In total, in 53% of participants, A $\beta$  status could have been predicted with a probably high accuracy based on plasma p-tau181 results (Figure 1A).

Algorithm 2, for FTD diagnosis, was suggestive of FTD in all cases of FTD (100% sensitivity and NPV), whereas specificity was 77%. The third algorithm, for identifying neurodegenerative causes of cognitive impairment, was suggestive of a non-neurodegenerative etiology in only 11% of patients (69% participants with SCD and 31% participants with MCI).

### Classification of Evidence

This study provides Class I evidence that plasma p-tau181 correlates with the presence or absence of AD, and a combination of plasma p-tau181 and NfL correlates moderately well with a diagnosis of FTD.

### Discussion

In this prospective, everyday clinical practice cohort in a memory clinic, we have evaluated the diagnostic performance of several plasma biomarkers and have proposed specific algorithms for implementation in daily clinical routine. Plasma p-tau181 has been established as an AD pathophysiologic process biomarker, even in presymptomatic individuals.<sup>24,27,34</sup> In our cohort, p-tau181 levels could accurately identify symptomatic patients in the AD continuum and differentiate them from subjects with a non-neurodegenerative cause of cognitive impairment, with AUCs above 0.90, in line with previous studies.<sup>26,28,30</sup> Diagnostic performance was inferior when trying to differentiate AD from LBD and FTD, probably due to the presence of concomitant AD pathology.

Plasma GFAP also had a good diagnostic performance when differentiating patients with a non-neurodegenerative cognitive impairment from AD. We found no elevated GFAP levels in LBD, as opposed to a recent work,<sup>19</sup> which could be due to our lower number of participants with LBD. Overall, GFAP diagnostic performance was inferior to p-tau181 in all comparisons. Previous studies also found a higher performance of p-tau181 in subjects with cognitive decline,<sup>19,26</sup> in contrast with studies with CU participants, where plasma GFAP had a similar or better performance than p-tau181,<sup>18</sup> suggesting that p-tau181 might be better in symptomatic AD, whereas GFAP could be more valuable in preclinical disease.

Plasma NfL discriminated with high accuracy FTD from subjects with a non-neurodegenerative cause but performed worse for the contrast FTD vs AD, as NfL was also mildly elevated in most subjects with AD. The proposed NfL/p-tau181 ratio clearly improved the diagnostic accuracy between AD and FTD, in line with the body of evidence available from CSF biomarkers where combined biomarkers improve the diagnostic accuracy of individual results.

Finally, plasma UCH-L1 and t-tau levels showed poor diagnostic performance. A recent study using assays targeting other t-tau epitopes found better accuracy for identifying the AD pathophysiologic process, which suggests that other plasma t-tau assays could be useful.<sup>35</sup> All plasma biomarkers were higher in CJD, in line with the rapid and massive neuronal death characteristic to this condition. Plasma markers could not accurately discriminate LBD from AD or other diagnoses, stressing out the need for validation of new biochemical biomarkers for LBD.

Diagnostic performance evaluated with the AUC values shows the biomarker performance at a group level. For a successful implementation in clinical practice, the added value for individual subjects in different clinical scenarios should be tested.

In our cohort, plasma p-tau181 could predict A $\beta$  status with high sensitivity and specificity. Based on individually predicted results, we do not propose to substitute CSF AD biomarkers or amyloid PET by plasma p-tau181 but to reduce the number of subjects requiring CSF/PET biomarkers based on p-tau181 levels. Patients below the lower cutoff would probably be A $\beta$ - (in our cohort, 97% sensitivity and 95% NPV), whereas those above the upper cutoff would probably be A $\beta$ + (in our cohort, 96% specificity and 94% PPV). Both groups represent 60% of the subjects in our cohort, and in these patients, plasma p-tau181 levels would potentially make unnecessary CSF AD biomarkers and/or amyloid PET for diagnostic purposes.

As in other high prevalence diseases such as diabetes, it is imperative to develop biochemical screening tools that allow an effective triaging of subjects with a higher probability of underlying neurodegeneration to be referred to specialized settings.<sup>32,33</sup> Previous studies have suggested that plasma NfL might identify neurodegenerative causes.<sup>21</sup> Although we confirmed the good discriminative capacity of NfL levels, our results suggest that NfL is not ready yet to be systematically used as a stand-alone screening tool for this purpose previous to clinical assessment in specialized memory clinics. Plasma NfL showed an AUC value of 0.83, similar to the model using only demographic data and APOE, for discriminating neurodegenerative (AD, LBD, and FTD) from non-neurodegenerative etiologies. This can be due to several factors. First, the LBD group had relatively low NfL levels, as in previous studies with LBD/Parkinson disease dementia, and second, as seen in a recent study plasma NfL accuracy was better in younger (<65 years) participants if specific cutoffs for this age range were

calculated.<sup>21</sup> In our cohort, plasma p-tau181 had greater diagnostic value than NfL for this aim (i.e., neurodegenerative vs non-neurodegenerative diagnosis), probably biased by the high number of participants with AD. Adding plasma p-tau181 to NfL and optimizing cutoffs improved diagnostic performance, screening out half of subjects with a non-neurodegenerative cause but at the cost of 1 in 7 (14%) false-negative results in subjects with a neurodegenerative diagnosis. Specific cutoffs for individuals aged <65 years slightly improved the diagnostic performance of the algorithm to approximately 1 in 10 false negatives (9%). In this sense, we do not believe that NfL is ready to be used at this point to screen out patients in the primary care for referral to a memory clinic due to the potential high number of false-negative results.

The main strength of our study is its prospective design and the routine clinical practice methodology used. There is a clear need for real-world data for a successful implementation of plasma biomarkers in daily clinical practice. As for limitations, we do not have postmortem pathologic confirmation of any participant or AD biomarkers performed in the whole cohort, and A $\beta$  positivity was evaluated with a mix of CSF and PET results (inherent to the routine clinical practice methodology used). Second, the mean age of patients referred to our center is relatively young, and our data may not necessarily be valid in older populations (i.e., above 80 years). Third, subjects with other neurologic disorders and cognitive complaints (e.g., epilepsy, multiple sclerosis, and large-vessel stroke) are not usually referred to our clinic and thus were not represented in our cohort. Fourth, the cutoffs proposed here are based on the results of 1 laboratory, and as such, should be individualized in each center. Fifth, some diagnostic categories were relatively underpowered, and we used the FTD umbrella term to unify several clinical entities. Finally, having measured all plasma biomarkers following completion of study recruitment diverges from usual clinical laboratory practice and potentially could have decreased the variability of results compared with repeated measurements.

In conclusion, in a prospective real-world memory clinic cohort, we have shown that plasma p-tau181 is an excellent biomarker for identifying amyloid positivity, outperforming the other plasma biomarkers studied. Using an algorithm with 2 p-tau181 cutoffs, 60% participants could potentially have avoided undergoing further specific AD biomarker (CSF/amyloid PET) testing. NfL differentiated FTD from non-neurodegenerative causes, and a combination of plasma p-tau181 and NfL improved differential diagnosis of FTD from AD. Our results do not support implementation of plasma biomarkers for routine screening for neurodegenerative disease previous to specialized clinical evaluation. Further studies are needed with real-world data to validate these results, especially in older patients.

### Study Funding

This work was supported by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the projects 19/00198 (M. Balasa), 19/00449 (A. Lladó) and 20/00448 (R. Sánchez-Valle) and co-funded by the European Union. J. Sarto received funding from

a PFIS grant (FI21/00015). N. Guillén received funding from a PFIS grant (FI20/00076). O. Ramos-Campoy received funding from a PFIS grant (FI18/00121). N. Falgàs received funding from a Rio Hortega grant (CM21/00024), Alzheimer's Association grant (ALZASSOC\_CSF\_21\_01) and Global Brain Health Institute grant (GBHI ALZ UK-21-723831). S. Borrego-Ecija is a recipient of the Joan Rodés-Josep Baselga grant from the FBBVA.

## Disclosure

The authors report no disclosures relevant to the manuscript. Go to [Neurology.org/N](https://www.neurology.org/N) for full disclosures.

## Publication History

Received by *Neurology* June 16, 2022. Accepted in final form October 6, 2022. Submitted and externally peer reviewed. The handling editor was Linda Hershey, MD, PhD, FAAN.

## Appendix Authors

Name	Location	Contribution
<b>Jordi Sarto, MD</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; study concept or design; and analysis or interpretation of data
<b>Raquel Ruiz-García, MD, PhD</b>	Immunology Service, Biomedical Diagnostic Center, Hospital Clínic de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
<b>Núria Guillén, MD</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; and analysis or interpretation of data
<b>Óscar Ramos-Campoy, MD</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; and analysis or interpretation of data
<b>Neus Falgàs, MD, PhD</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain; Atlantic Fellow for Equity in Brain Health, Global Brain Health Institute, University of California, San Francisco and Trinity College, Dublin, Ireland	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; and analysis or interpretation of data

## Appendix (continued)

Name	Location	Contribution
<b>Diana Esteller, MD</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
<b>José Contador, MD</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
<b>Guadalupe Fernández, BSc</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
<b>Yolanda González, BSc</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
<b>Adrià Tort-Merino, BSc, PhD</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
<b>Jordi Juncà-Parella, BSc</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
<b>Bea Bosch, BSc, PhD</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
<b>Sergi Borrego-Ecija, MD, PhD</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and analysis or interpretation of data

Continued

## Appendix (continued)

Name	Location	Contribution
<b>Laura Molina-Porcel, MD, PhD</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona; Neurological Tissue Bank of the Biobank-Hospital Clínic-IDIBAPS, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
<b>Magda Castellví, BSc</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
<b>Miguel Vergara, BSc</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
<b>Anna Antonell, BSc, PhD</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
<b>Josep Maria Auge, MD, PhD</b>	Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clínic de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
<b>Laura Naranjo, BSc</b>	Immunology Service, Biomedical Diagnostic Center, Hospital Clínic de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
<b>Raquel Sanchez-Valle, MD, PhD</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; study concept or design; and analysis or interpretation of data
<b>Albert Lladó, MD, PhD</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; study concept or design; and analysis or interpretation of data
<b>Mircea Balasa, MD, PhD</b>	Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain; Atlantic Fellow for Equity in Brain Health, Global Brain Health Institute, University of California, San Francisco and Trinity College, Dublin, Ireland	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; study concept or design; and analysis or interpretation of data

## References

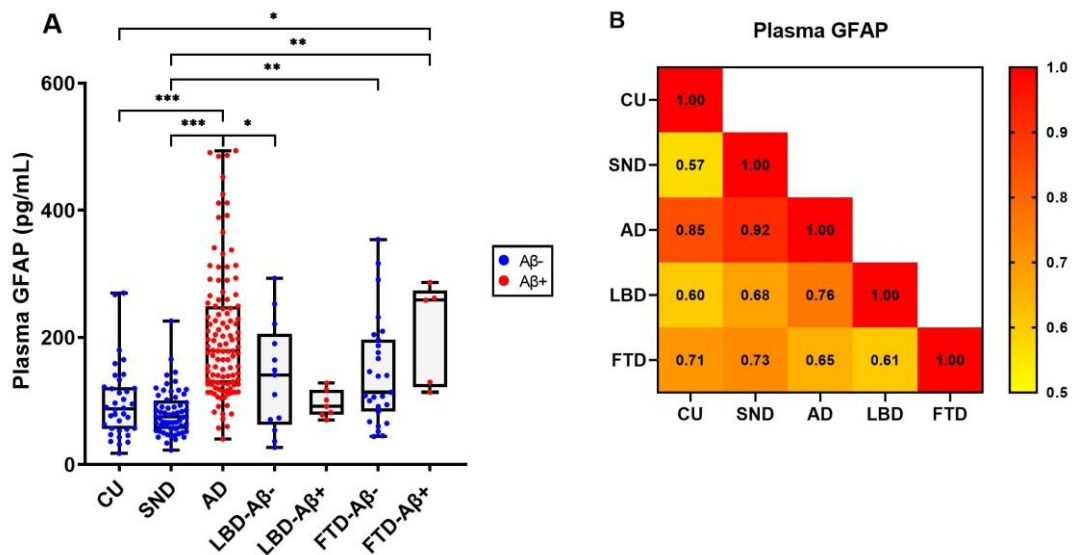
- Patterson C. *The State of the Art of Dementia Research: New Frontiers*. World Alzheimer Report 2018. Alzheimer's Disease International, 2018.
- Alzheimer's Association. 2018 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2018;14(2):367-429.
- Blennow K, Zetterberg H. Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. *J Intern Med*. 2018;284(6):643-663. doi:10.1111/joim.12816.
- 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*. 2013;11(1):96-106. doi:10.1176/appi.focus.11.1.96.
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):263-269. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.005.
- Jack CR Jr, Bennett DA, Blennow K, et al. NIA-AA research framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018;14(4):535-562. doi:10.1016/j.jalz.2018.02.018.
- McKeith IG, Boeve BF, Dickson DW, et al. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: fourth consensus report of the DLB Consortium. *Neurology*. 2017;89(1):88-100. doi:10.1212/WNL.0000000000004058.
- McKeith IG, Ferman TJ, Thomas AJ, et al. Research criteria for the diagnosis of prodromal dementia with Lewy bodies. *Neurology*. 2020;94(17):743-755. doi:10.1212/wnl.00000000000009323.
- Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, et al. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain*. 2011;134(pt 9):2456-2477. doi:10.1093/brain/awr179.
- Höglinger GU, Respondek G, Stamelou M, et al. Clinical diagnosis of progressive supranuclear palsy: the movement disorder society criteria. *Mov Disord*. 2017;32(6):853-864. doi:10.1002/mds.26987.
- Armstrong MJ, Litvan I, Lang AE, et al. Criteria for the diagnosis of corticobasal degeneration. *Neurology*. 2013;80(5):496-503. doi:10.1212/WNL.0b013e31827f0fd1.
- Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, et al. Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology*. 2011;76(11):1006-1014. doi:10.1212/WNL.0b013e31821103e6.
- Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol*. 2010;28(6):595-599. doi:10.1038/nbt.1641.
- 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. doi:10.1016/s1474-4422(16)00070-3.
- Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, et al. High performance plasma amyloid- $\beta$  biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*. 2018;554(7691):249-254. doi:10.1038/nature25456.
- Illán-Gala I, Lleó A, Karydas A, et al. Plasma tau and neurofilament light in frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer disease. *Neurology*. 2021;96(5):e671-e683. doi:10.1212/WNL.0000000000001226.
- Wang KK, Yang Z, Sarkis G, Torres J, Raghavan V. Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1) as a therapeutic and diagnostic target in neurodegeneration, neurotrauma and neuro-injuries. *Expert Opin Ther Targets*. 2017;21(6):627-638. doi:10.1080/14728222.2017.1321635.
- Benedet AL, Milà-Alomà M, Vrillon A, et al. Differences between plasma and cerebrospinal fluid glial fibrillary acidic protein levels across the Alzheimer Disease Continuum. *JAMA Neurol*. 2021;78(12):1471-1483. doi:10.1001/jamaneurol.2021.3671.
- Chouliaras L, Thomas A, Malpetti M, et al. Differential levels of plasma biomarkers of neurodegeneration in Lewy body dementia, Alzheimer's disease, frontotemporal dementia and progressive supranuclear palsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2022;93(6):651-658. doi:10.1136/jnnp-2021-327788.
- Bridel C, van Wieringen WN, Zetterberg H, et al. Diagnostic value of cerebrospinal fluid neurofilament light protein in neurology: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Neurol*. 2019;76(9):1035-1048. doi:10.1001/jamaneurol.2019.1534.
- Ashton NJ, Janelidze S, al Khleifat A, et al. A multicentre validation study of the diagnostic value of plasma neurofilament light. *Nat Commun*. 2021;12(1):3400. doi:10.1038/s41467-021-23620-z.
- Benusi A, Karikari TK, Ashton N, et al. Diagnostic and prognostic value of serum NFL and p-Tau 181 in frontotemporal lobar degeneration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020;91(9):960-967. doi:10.1136/jnnp-2020-323487.
- Moscoco A, Grothe MJ, Ashton NJ, et al. Longitudinal associations of blood phosphorylated tau181 and neurofilament light chain with neurodegeneration in Alzheimer disease. *JAMA Neurol*. 2021;78(4):396-406. doi:10.1001/jamaneurol.2020.4986.
- Pereira JB, Janelidze S, Stomrud E, et al. Plasma markers predict changes in amyloid, tau, atrophy and cognition in non-demented subjects. *Brain*. 2021;144(9):2826-2836. doi:10.1093/brain/awab163.
- Brickman AM, Manly JJ, Honig LS, et al. Plasma p-tau181, p-tau217, and other blood-based Alzheimer's disease biomarkers in a multi-ethnic, community study. *Alzheimers Dement*. 2021;17(8):1353-1364. doi:10.1002/alz.12301.
- Simrén J, Leuzay A, Karikari TK, et al. The diagnostic and prognostic capabilities of plasma biomarkers in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2021;17(7):1145-1156. doi:10.1002/alz.12283.
- Palmqvist S, Tideman P, Cullen N, et al. Prediction of future Alzheimer's disease dementia using plasma phospho-tau combined with other accessible measures. *Nat Med*. 2021;27(6):1034-1042. doi:10.1038/s41591-021-01348-z.

28. Janelidze S, Mattsson N, Palmqvist S, et al. Plasma P-tau181 in Alzheimer's disease: relationship to other biomarkers, differential diagnosis, neuropathology and longitudinal progression to Alzheimer's dementia. *Nat Med*. 2020;26(3):379-386. doi:10.1038/s41591-020-0755-1.
29. Leuzy A, Janelidze S, Mattsson-Carlgen N, et al. Comparing the clinical utility and diagnostic performance of CSF p-tau181, p-tau217, and p-tau231 assays. *Neurology*. 2021;97(17):e1681-e1694. doi:10.1212/wnl.00000000000012727.
30. Thijssen EH, la Joie R, Strom A, et al. Plasma phosphorylated tau 217 and phosphorylated tau 181 as biomarkers in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration: a retrospective diagnostic performance study. *Lancet Neurol*. 2021;20(9):739-752. doi:10.1016/s1474-4422(21)00214-3.
31. Karikari TK, Pascoal TA, Ashton NJ, et al. Blood phosphorylated tau 181 as a biomarker for Alzheimer's disease: a diagnostic performance and prediction modelling study using data from four prospective cohorts. *Lancet Neurol*. 2020;19(5):422-433. doi:10.1016/s1474-4422(20)30071-5.
32. Karikari TK, Ashton NJ, Brinkmalm G, et al. Blood phospho-tau in Alzheimer disease: analysis, interpretation, and clinical utility. *Nat Rev Neurol*. 2022;18(7):400-418. doi:10.1038/s41582-022-00665-2.
33. Teunissen CE, Verberk IMW, Thijssen EH, et al. Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease: towards clinical implementation. *Lancet Neurol*. 2022;21(1):66-77. doi:10.1016/S1474-4422(21)00361-6.
34. Suárez-Calvet M, Karikari TK, Ashton NJ, et al. Novel tau biomarkers phosphorylated at T181, T217 or T231 rise in the initial stages of the preclinical Alzheimer's continuum when only subtle changes in A $\beta$  pathology are detected. *EMBO Mol Med*. 2020;12(12):e12921. doi:10.15252/emmm.202012921.
35. Snellman A, Lantero-Rodriguez J, Emeršič A, et al. N-terminal and mid-region tau fragments as fluid biomarkers in neurological diseases. *Brain*. 2022;145(8):2834-2848. doi:10.1093/brain/awab481.

**eFigure 1. Plasma GFAP concentrations in the sub-cohort with AD biomarkers performed per diagnostic group (left) and area under the ROC curve for discrimination between diagnostic etiological categories (right).**

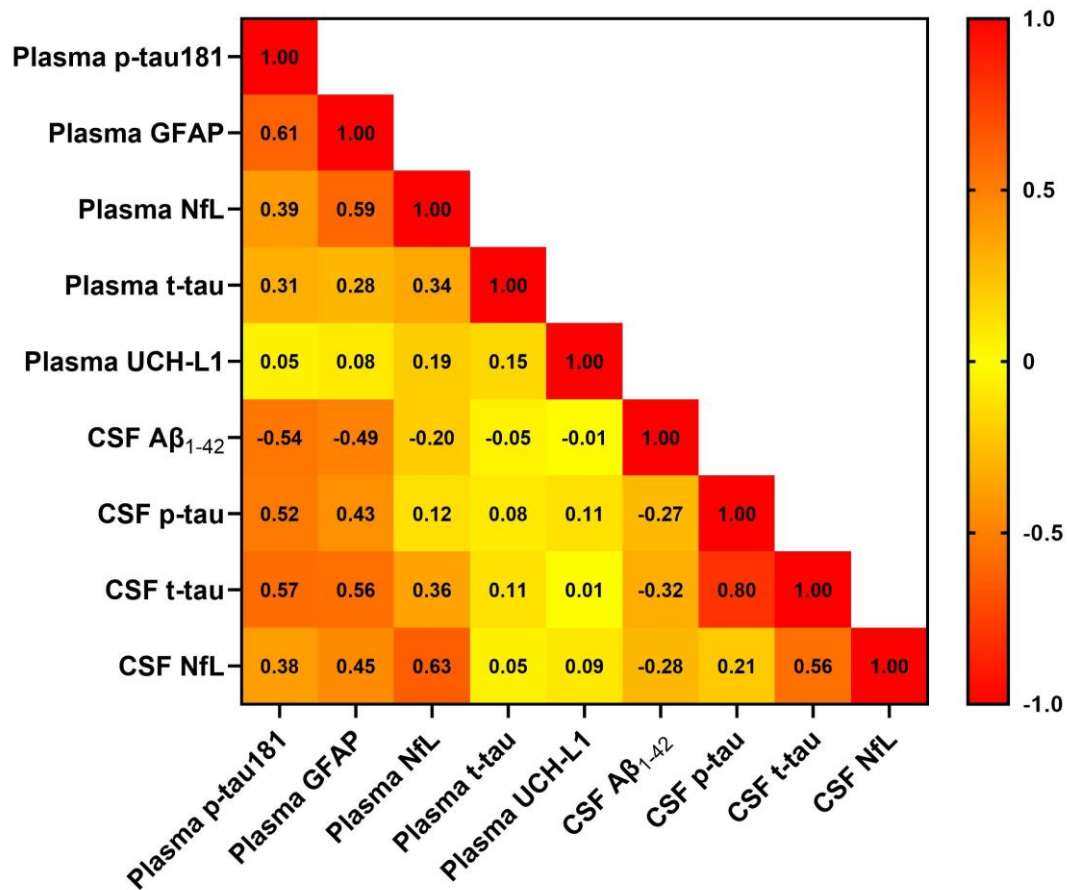
A. Box-and-whisker plots with the central horizontal box line showing the median plasma concentration in each diagnostic group and lower and upper box boundaries showing the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentile, respectively. Plasma GFAP concentrations between diagnostic groups were log<sub>10</sub> transformed and compared using an analysis of covariance, adjusting for age and sex, and pairwise comparisons were assessed with the Bonferroni correction method. For visualization purposes, raw (not log<sub>10</sub>-transformed) GFAP concentrations were plotted in the graph. Participants were represented by a different color depending on amyloid beta positivity or negativity, which was defined using our center definitions (see methods section). B. Diagnostic accuracy of plasma GFAP to differentiate between each pair of diagnoses is represented by a heatmap of each AUC, with a value of 0.5 meaning no discrimination and a value of 1 a perfect discrimination.

\*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001. Brackets indicate the diagnostic groups. **Abbreviations:** CU, cognitively unimpaired; SND, suspected nondegenerative cognitive impairment; AD, Alzheimer’s disease; LBD, dementia with Lewy bodies; FTD, frontotemporal dementia; GFAP, glial fibrillary acidic protein; Aβ-/+ , amyloid beta negative/positive; ROC, receiver operating curve; AUC, area under the ROC curve.



**eFigure 2. Heatmap of correlations between plasma and CSF biomarkers.**

Heatmaps show correlation coefficients (Spearman  $\rho$ ) between plasma and CSF biomarkers. **Abbreviations:** p-tau181, tau phosphorylated at threonine 181; t-tau, total tau; NfL, neurofilament light chain; GFAP, glial fibrillary acidic protein; UCH-L1, Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1;  $A\beta$ , amyloid beta; CSF, cerebrospinal fluid.



**eTable 1. Comparison of demographic, cognitive, APOE and plasma biomarkers characteristics between prospectively included participants with and without AD biomarkers (CSF/amyloid PET) performed.**

AD biomarkers performed (n)	Total		SCD		MCI		AD dementia		LBD		FTD	
	No (113)	Yes (232)	No (32)	Yes (7)	No (49)	Yes (134)	No (15)	Yes (39)	No (8)	Yes (20)	No (9)	Yes (32)
Age (years)	70.6 (9.1)*	66.7 (7.5)*	64.3 (9.3)	66.9 (5.4)	73.7 (6.1)*	67.1 (7.4)*	69.4 (11)*	66.2 (6)*	73.4 (6.3)*	68.5 (6.7)*	63.2 (14.3)	66.2 (9.4)
Disease duration (years)	2.6 (2.3)	2.7 (2.1)	3.1 (3)	1.8 (0.8)	2.3 (2.2)	2.6 (2)	2.3 (0.7)	2.9 (2.2)	2.5 (1.8)	3.2 (2.6)	3.2 (2.3)	2.9 (2)
Sex (female)	52%	53%	52%	62%	54%	55%	60%	62%	38%	30%	38%	46%
Education (years)	10.6 (4.7)	10.8 (4.7)	11.6 (4.1)	12 (2.8)	10.5 (4.7)	10.7 (4.9)	9.9 (5.1)	10.3 (3.8)	8.9 (3.6)	11.2 (5)	10.9 (2.9)	11.2 (4.9)
MMSE	25.1 (3.7)**	24 (4.6)**	28 (3.1)	29.1 (0.8)	25.3 (3)	24.9 (3.5)	21.4 (3.7)	19.9 (4.9)	22.8 (2.9)	24.7 (4.1)	25.8 (1.7)	23.3 (5.6)
APOE ε4 carriers	42%	44%	31%	60%	47%	46%	53%	60%	13%	38%	25%	26%
Plasma p-tau181 (pg/mL)	1.7 (1)	1.8 (1.1)	1.2 (0.5)	1.3 (0.5)	1.8 (0.9)	1.8 (1.1)	2.5 (1.5)	2.6 (1)	1.5 (0.6)	1.4 (0.8)	1.6 (0.8)	1.4 (0.8)
Plasma t-tau (pg/mL)	3.6 (1.4)	3.8 (1.6)	3.1 (1.1)	3.9 (1.5)	3.7 (1.4)	3.6 (1.6)	3.8 (1.3)	4.2 (1.7)	3.5 (1.4)	3.9 (1.7)	3.8 (2)	4.1 (1.3)
Plasma NfL (pg/mL)	14.7 (12.2)	14.9 (11.3)	8.2 (3.7)	9.4 (2.2)	13.7 (6)^	11.3 (5.4)^	14.9 (4.8)	16 (6)	16.4 (8.7)	13.1 (6.7)	39.8 (31.7)	31.4 (19.7)
Plasma GFAP (pg/mL)	157.1 (88)	157.5 (98.5)	98.1 (51.2)	96.6 (29.7)	177.1 (88.8)^	146.4 (88.9)^	168.6 (76.5)^	238.4 (121.3)^	160.8 (101.3)	122.6 (71.6)	167 (115.5)	154.6 (85.2)
Plasma UCH-L1 (pg/mL)	16 (9.2)	18.7 (13.8)	15.9 (12.8)	16.4 (14.8)	15.8 (7.6)	19.2 (14.8)	19.1 (10.1)	15 (9.2)	14.2 (9.6)	18.9 (10.7)	18 (15.8)	21 (14.1)

Data are shown as mean (standard deviation) or percent. Note that patients with CJD were excluded in this analysis due to low numbers and that only prospectively included patients are included here, so CU are also excluded. \*Participants without AD biomarkers performed were older globally ( $p < 0.001$ ), as well as in the MCI ( $p < 0.001$ ), AD dementia ( $p = 0.035$ ) and LBD ( $p = 0.018$ ) groups. \*\*MMSE was higher in the group without AD biomarkers ( $p = 0.009$ ). ^NfL and GFAP concentrations of patients with MCI were higher in the group without AD biomarkers ( $p = 0.006$  and  $p = 0.012$ , respectively). ^^In the AD dementia diagnostic group, patients with AD biomarkers had higher GFAP concentrations. \***Abbreviations:** CU, cognitively unimpaired; SCD, subjective cognitive decline; MCI, mild cognitive impairment; AD, Alzheimer’s disease; LBD, dementia with Lewy bodies; FTD, frontotemporal dementia; MMSE, mini-mental state examination; p-tau181, tau phosphorylated at threonine 181; t-tau, total tau; NfL, neurofilament light chain; GFAP, glial fibrillary acidic protein; UCH-L1, Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1.

## Trabajo número 2

### **Impact of demographics and comorbid conditions on plasma biomarkers concentrations and their diagnostic accuracy in a memory clinic cohort.**

**Jordi Sarto**, Diana Esteller-Gauxax, Adrià Tort-Merino, Nuria Guillén, Agnès Pérez-Millan, Neus Falgàs, Sergi Borrego-Écija, Guadalupe Fernández-Villullas, Bea Bosch, Jordi Juncà-Parella, Anna Antonell, Laura Naranjo, Raquel Ruiz-García, Josep María Augé, Raquel Sánchez-Valle, Albert Lladó, Mircea Balasa.

*Journal of Neurology*. 2024 Apr;271(4):1973-1984. doi: 10.1007/s00415-023-12153-8.

Factor de impacto: 4,8; Cuartil: 1, Decil: 2 (Clinical Neurology, JCR 2023).

#### **Resumen estructurado**

**Introducción:** Los biomarcadores plasmáticos han emergido como herramientas muy prometedoras y accesibles para la identificación de patología beta amiloide cerebral (A $\beta$ ). Previo a su implementación en la práctica clínica diaria, se deben identificar los factores potencialmente confusores que puedan modificar los niveles de biomarcadores plasmáticos más allá de la presencia de enfermedad neurodegenerativa.

**Métodos:** Se estudió la asociación de una exhaustiva lista de factores demográficos, comorbilidades, medicación y parámetros de laboratorio con los niveles plasmáticos de tau fosforilada en la treonina 181 (p-tau181), proteína glial ácida fibrilar (GFAP) y cadena ligera de neurofilamentos (NfL) en una cohorte prospectiva de un centro especializado en deterioro cognitivo y se analizó su impacto en la precisión diagnóstica de los biomarcadores plasmáticos para la discriminación del estado A $\beta$  definido por LCR o PET de amiloide.

**Resultados:** Se incluyeron a 369 individuos (media de edad de 66,5 años, 55% mujeres, 53% A $\beta$  positivos). En modelos de regresión lineal ajustados por género, edad y estado A $\beta$ , solamente el filtrado glomerular (FG) se asoció significativamente a los niveles de p-tau181 ( $\beta$  estandarizado -0,115 [-0,192 a -0,035], p=0,005), aunque su tamaño de efecto sobre p-tau181

fue mucho menor comparado con el del estado A $\beta$  (0,685 [0,607-0,763],  $p < 0,001$ ). La edad, el género, el índice de masa corporal, el índice de comorbilidad de Charlson y el FG se asociaron a la concentración plasmática de GFAP, mientras que la edad, el volumen sanguíneo y el FG lo hicieron con los niveles de NfL. P-tau181 plasmático predijo el estado A $\beta$  con una sensibilidad y especificidad del 87%, sin un aumento en la capacidad diagnóstica al añadir ninguno de los factores confusores. Mediante un algoritmo con dos puntos de corte, p-tau181 plasmático podría haber ahorrado un 62% de las punciones lumbares/PET de amiloide realizados. Al excluir a los pacientes con enfermedad renal crónica, no hubo cambios relevantes en los puntos de corte ni en la precisión diagnóstica del algoritmo.

**Discusión:** En una cohorte de un centro especializado en deterioro cognitivo, la edad, el género, el FG, el índice de masa corporal, el volumen sanguíneo y el índice de comorbilidad de Charlson modificaron levemente los niveles plasmáticos de p-tau181, GFAP y NfL, pero su impacto en la precisión diagnóstica de los biomarcadores plasmáticos para discriminación del estado A $\beta$  fue mínima.



# Impact of demographics and comorbid conditions on plasma biomarkers concentrations and their diagnostic accuracy in a memory clinic cohort

Jordi Sarto<sup>1</sup> · Diana Esteller-Gauxax<sup>1</sup> · Adrià Tort-Merino<sup>1</sup> · Núria Guillén<sup>1</sup> · Agnès Pérez-Millan<sup>1</sup> · Neus Falgàs<sup>1</sup> · Sergi Borrego-Écija<sup>1</sup> · Guadalupe Fernández-Villullas<sup>1</sup> · Beatriz Bosch<sup>1</sup> · Jordi Juncà-Parella<sup>1</sup> · Anna Antonell<sup>1</sup> · Laura Naranjo<sup>2</sup> · Raquel Ruiz-García<sup>2</sup> · Josep María Augé<sup>3</sup> · Raquel Sánchez-Valle<sup>1,4</sup> · Albert Lladó<sup>1,4</sup> · Mircea Balasa<sup>1</sup>

Received: 22 October 2023 / Revised: 5 December 2023 / Accepted: 7 December 2023 / Published online: 27 December 2023  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany 2023

## Abstract

Plasma biomarkers have emerged as promising tools for identifying amyloid beta (A $\beta$ ) pathology. Before implementation in routine clinical practice, confounding factors modifying their concentration beyond neurodegenerative diseases should be identified. We studied the association of a comprehensive list of demographics, comorbidities, medication and laboratory parameters with plasma p-tau181, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neurofilament light chain (NfL) on a prospective memory clinic cohort and studied their impact on diagnostic accuracy for discriminating CSF/amyloid PET-defined A $\beta$  status. Three hundred sixty patients (mean age 66.5 years, 55% females, 53% A $\beta$  positive) were included. Sex, age and A $\beta$  status-adjusted models showed that only estimated glomerular filtration rate (eGFR, standardized  $\beta$   $-0.115$  [ $-0.192$  to  $-0.035$ ],  $p = 0.005$ ) was associated with p-tau181 levels, although with a much smaller effect than A $\beta$  status ( $0.685$  [ $0.607$ – $0.763$ ],  $p < 0.001$ ). Age, sex, body mass index (BMI), Charlson comorbidity index (CCI) and eGFR significantly modified GFAP concentration. Age, blood volume (BV) and eGFR were associated with NfL levels. p-tau181 predicted A $\beta$  status with 87% sensitivity and specificity with no relevant increase in diagnostic performance by adding any of the confounding factors. Using two cut-offs, plasma p-tau181 could have spared 62% of amyloid-PET/CSF testing. Excluding patients with chronic kidney disease did not change the proposed cut-offs nor the diagnostic performance. In conclusion, in a memory clinic cohort, age, sex, eGFR, BMI, BV and CCI slightly modified plasma p-tau181, GFAP and NfL concentrations but their impact on the diagnostic accuracy of plasma biomarkers for A $\beta$  status discrimination was minimal.

**Keywords** Blood biomarkers · Neurodegenerative diseases · Dementia · Comorbidities · Diagnostic performance

Albert Lladó and Mircea Balasa are share senior authorship.

✉ Mircea Balasa  
mbalasa@clinic.cat

- <sup>1</sup> Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Fundació de Recerca Clínic - Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain
- <sup>2</sup> Immunology Service, Biomedical Diagnostic Center, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain
- <sup>3</sup> Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain
- <sup>4</sup> Department of Medicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, Institute of Neurosciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

## Introduction

Blood-based biomarkers have shown great promise as accessible, relatively cheap and minimally invasive tools for the diagnosis of Alzheimer's disease (AD) and will be crucial in the new era of disease-modifying therapies [1–7]. Plasma phosphorylated tau protein at different positions (p-tau181, p-tau217 or p-tau231) appears to be the best blood biomarker to detect amyloid in vivo and correlates with amyloid positron emission tomography (PET) and cerebrospinal fluid (CSF) findings, thus having an excellent diagnostic performance for identifying patients in the AD continuum and may be useful for clinical trials enrolment and disease-modifying therapies treatment monitoring [1, 5, 8–17]. Plasma glial fibrillary acidic protein (GFAP) has

good diagnostic performance in identifying patients in the AD continuum (although outperformed by p-tau in most studies), can predict rapid progressors and could prove valuable as a marker of astrocytic activation [8, 17–21]. Plasma neurofilament light chain (NfL) levels are increased in neurodegenerative diseases compared to non-neurodegenerative disorders, especially in frontotemporal dementia (FTD) and have been proposed as surrogate biomarkers for predicting disease onset in some genetic neurodegenerative diseases [8, 17, 19, 20, 22–24].

Plasma biomarkers are brain-derived proteins diluted into peripheral blood with a myriad of other proteins and blood cells and are potentially more prone to be altered by systemic comorbidities. Studies to date have shown relevant associations of comorbid conditions like chronic kidney disease (CKD) and myocardial infarction and other factors like estimated glomerular filtration rate (eGFR), body mass index (BMI), APOE genotype, age and sex on plasma biomarkers, with the magnitude of the associations generally being greater with NfL [11, 12, 25–35]. Most of the studies have been performed on cognitively unimpaired (CU) cohorts and/or without AD core biomarkers (CSF/amyloid PET) [11, 25, 27, 29, 34, 35], making it difficult to know if there is a significant impact of these factors on the diagnostic accuracy. Real world data from well-characterized clinical practice cohorts is still needed.

We have recently studied the clinical applicability of five blood-based biomarkers (p-tau181, GFAP, NfL, total tau [t-tau] and ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 [UCH-L1]) in a prospective real-world memory clinic cohort and found that p-tau181 had good diagnostic performance to identify CSF/amyloid PET-defined amyloid beta-positive ( $A\beta$ +) individuals, with around 60% of patients that could have potentially been spared further amyloid status testing (CSF/amyloid PET) based on plasma p-tau181 results and that NfL identified patients in the FTD spectrum with good diagnostic performance [8]. In the present study, we aimed to investigate the impact of demographic factors, comorbidities, concomitant medication and laboratory parameters on plasma p-tau181, GFAP and NfL levels and on their diagnostic accuracy in discriminating  $A\beta$  status defined by CSF/amyloid PET.

## Methods

### Study population

We prospectively included subjects with suspected cognitive impairment referred for a first visit to the Alzheimer's disease and other cognitive disorders unit, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona (Spain) between July 1st, 2019 and December 31st, 2022, who agreed to participate in the

study. Additionally, 36 CU research volunteers unrelated to the patients, aged 50 years or older, without cognitive complaints, neurological disorders or relevant medical conditions and with available CSF biomarkers were retrospectively included.

All subjects underwent the diagnostic work-up according to the local clinical protocols including a neurological and neuropsychological assessment and structural neuroimaging (computed tomography or magnetic resonance imaging). AD biomarkers were performed to subjects with amnesic mild cognitive impairment below 75 years of age, early-onset dementia and non-amnesic phenotypes irrespective of age. CSF was the preferred diagnostic biomarker while amyloid PET was performed only when lumbar puncture was contraindicated.

The treating neurologist established the diagnosis according to current diagnostic criteria and the suspected etiology of the cognitive impairment [36–42], blinded to plasma biomarkers results. Diagnostic categories included: CU controls, suspected non-neurodegenerative cognitive impairment (SND), AD, Lewy body dementia (LBD) and FTD. SND was defined as stable cognitive impairment that was not suggestive of any neurodegenerative disease and with normal AD biomarkers. Controls had no cognitive complaints, normal neuropsychological testing and CSF analysis (A-T-N-). The umbrella term FTD included all the clinical variants associated with frontotemporal lobar degeneration (language, behavioral, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration phenotypes).

### Procedures and measurements

Demographic, medical history and medication data were retrospectively reviewed from electronic medical records. Charlson comorbidity index (CCI) [43] was calculated from these data; BMI and blood volume (BV, Nadler's formula) were calculated using each of the defined formulas. Estimated glomerular filtration rate (eGFR), glycated hemoglobin (HbA1c), vitamin B12, folic acid, hemoglobin, platelet count and thyroid stimulating hormone (TSH) were measured on a fasting blood sample in a certified clinical laboratory. Data on weight, height and blood tests were only included in the analysis if there was less than 6 months between their assessment and blood sampling for plasma biomarkers.

Blood samples were obtained from all participants at first visit, centrifuged to obtain plasma, aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Plasma biomarkers concentrations (p-tau181, GFAP and NfL) were measured in four batches: during November and December 2021 using the Quanterix Simoa Neurology 4-Plex A #102153 (GFAP, NfL, t-tau and UCH-L1) and the p-tau181 Advantage V2.0 #103714 assays, and on November 2022 and February 2023 with the Neurology p-tau181

Advantage V2.1 #104111 and Neurology 2-plex B #103520 (GFAP and NfL), following the manufacturer's protocol (Quanterix, USA). V2.0 plasma p-tau181 concentration values were harmonized to V2.1 following the provided formula by Quanterix, with some samples measured with both assays to verify reliability between kits. Simoa data analysis was performed by blinded investigators. *APOE* genotype was determined through analysis of two single nucleotide polymorphisms (rs429358 and rs7412) by Sanger sequencing.

Lumbar puncture was performed according to current clinical guidelines. CSF amyloid  $\beta_{1-42}$ , p-tau181 and t-tau were measured with Lumipulse following manufacturer's instructions (Fujirebio, Belgium). Amyloid positive ( $A\beta+$ ) status was defined, according to local cut-offs, as CSF amyloid  $\beta_{1-42}$  below 600 pg/mL. In cases with borderline results of amyloid  $\beta_{1-42}$  in CSF, a ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40} < 0.07$  was used to define the  $A\beta+$  status. Amyloid PET images were acquired in a Biograph molecular computed tomography PET (Siemens) using florbetaben or flutemetamol ligands. Its status ( $A\beta+$  or  $A\beta-$ ) was evaluated by a nuclear medicine specialist according to current guidelines.

### Statistical analyses

We assessed normality with Kolmogorov–Smirnov or Shapiro–Wilk tests. Continuous variables were compared depending on the normality tests using *t* test/analysis of variance or Mann–Whitney *U*/Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison test with Bonferroni adjustment for multiple comparisons. Fisher's exact test and  $\chi^2$  were used for categorical variables. As plasma biomarker levels were not normally distributed, they were log-transformed to allow linear modeling and parametric testing. Plasma biomarker concentrations were compared using an analysis of covariance, with age and sex as covariates and Bonferroni correction for pairwise comparisons.

We used age- and sex-adjusted linear regression models to study the association of each demographic factor, comorbidity, medication and laboratory parameter of interest (independent variables or regressors) with each plasma biomarker (dependent variables). All variables were *z*-scored to calculate the standardized linear regression  $\beta$  coefficient of the regressor of interest as an outcome and effect measure and to allow comparison between coefficients. Since CSF/amyloid PET-defined  $A\beta$  status (negative or positive) was one of the strongest predictors of plasma biomarker concentrations, those associations that were significant were further adjusted for  $A\beta$  status to test if the associations remained significant irrespective of  $A\beta$  pathology. Finally, we ran and compared distinct binary logistic regression models for predicting CSF/amyloid PET-defined amyloid status to study the potential implications in the diagnostic performance of variables that significantly altered plasma

biomarkers concentration. We included a complete model (with the three plasma biomarkers, demographics, *APOE* and all variables significantly associated with plasma biomarkers levels), a parsimonious model (with the minimum number of variables that maximized predictive power based on a stepwise forward selection method of the probability of a likelihood-ratio statistic of conditional parameter estimates) and additional models with fewer variables. The predicted probability of each model was used to calculate and compare the resulting AUCs. Sensitivity and specificity for each model were assessed based on a balanced (maximizing Youden index) cut-off. SPSS (version 27) and GraphPad Prism (version 9) were used for statistical analyses and figure design. Significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

### Whole cohort demographics

A total of 360 participants (36 CU, 67 SND, 174 AD, 21 LBD and 62 FTD), with a mean (standard deviation) age of 66.5 (7.7) years and 55% females were included (Tables 1, 2). There was a relatively low frequency of comorbidities with a mean (standard deviation) number of 1.6 (1.3) comorbidities per patient and 21%, 32%, 24% and 23% of the cohort having 0, 1, 2 and 3 or more comorbidities, respectively. Plasma p-tau181 was higher in the AD group compared to the rest of the diagnostic categories and for LBD (including 38%  $A\beta$  positive individuals) compared to CU and SND. Plasma GFAP had the highest concentration in the AD group and was also higher for FTD (15%  $A\beta+$ ) than CU and SND. Participants with FTD showed the highest NfL levels of all groups, and they were also higher in AD compared to CU and SND and for LBD relative to SND participants.

### Comparison between amyloid beta negative and positive individuals

Subjects were dichotomized into  $A\beta$  positive and negative groups depending on core AD biomarkers (CSF or amyloid PET) to enable further study of variables impacting plasma biomarker concentrations since  $A\beta$  status had one of the strongest impacts on their levels. Compared to  $A\beta$ -subjects,  $A\beta+$  patients were older (mean [standard deviation] 68.7 [6.3] vs. 64 [8.3] years,  $p < 0.001$ ), were more frequently *APOE*  $\epsilon 4$  carriers (57% vs. 19%,  $p < 0.001$ ), had lower MMSE (23 [4.3] vs. 26.3 [4.0],  $p < 0.001$ ) and had higher concentrations of plasma p-tau181, GFAP and NfL (Table 2). Amyloid beta-positive participants also had lower BMI (25.5 [3.9] vs. 27.3 [4.0],  $p < 0.001$ ) and BV (4107 [721] vs. 4401 [773],  $p < 0.001$ ), were more frequently

**Table 1** Demographic, cognitive, APOE and plasma biomarkers characteristics according to the clinical diagnosis ( $n=360$ )

	CU ( $n=36$ )	SND ( $n=67$ )	AD ( $n=174$ )	LBD ( $n=21$ )	FTD ( $n=62$ )	<i>p</i> value
Age (years)	61.7 (8.2) <sup>c,d</sup>	63.6 (7.9) <sup>c,d</sup>	68.8 (6.1) <sup>a,b</sup>	68.7 (6.6) <sup>a,b</sup>	65.4 (8.9)	< 0.001
Disease duration (years)	NA	2.7 (2.8) <sup>e</sup>	2.9 (2)	3.2 (2.5)	3.5 (2.6) <sup>b</sup>	0.044
Sex (female)	78% <sup>b,d,e</sup>	43% <sup>a,c</sup>	60% <sup>b,d,e</sup>	29% <sup>a,c</sup>	50% <sup>a,c</sup>	< 0.001
Education (years)	10.3 (4.8)	10.6 (5.1)	10.7 (4.5)	11.2 (4.9)	10.9 (4.3)	NS
MMSE	28.8 (1.1) <sup>c,d,e</sup>	26.6 (3.1) <sup>c,d,e</sup>	22.8 (4.3) <sup>a,b</sup>	24.9 (4.2) <sup>a,b</sup>	24.0 (5.1) <sup>a,b</sup>	< 0.001
APOE $\epsilon 4$ carriers	22% <sup>c,d</sup>	18% <sup>c,d</sup>	56% <sup>a,b,e</sup>	35% <sup>a,b,e</sup>	23% <sup>c,d</sup>	< 0.001
A $\beta$ positive*	0%	0%	100%	38%	15%	NA
Plasma p-tau181 (pg/mL)	10.8 (8.6–13.2) <sup>c,d</sup>	11.9 (9.6–14.2) <sup>c,d</sup>	27 (20.9–33.6) <sup>a,b,d,e</sup>	15.5 (12.1–23.0) <sup>a,b,c</sup>	12.4 (10.9–18.7) <sup>c</sup>	< 0.001 <sup>^</sup>
Plasma GFAP (pg/mL)	87.7 (55.9–121.7) <sup>c,e</sup>	79.9 (58.5–112.9) <sup>c,e</sup>	206.1 (138.8–311) <sup>a,b,d,e</sup>	110.1 (72.0–170.6) <sup>c</sup>	139.2 (92.7–220.8) <sup>a,b,c</sup>	< 0.001 <sup>^</sup>
Plasma NfL (pg/mL)	8.3 (6.2–12.7) <sup>c,e</sup>	7.5 (5.8–10.4) <sup>c,d,e</sup>	13.5 (10.1–18.0) <sup>a,b,e</sup>	12.3 (7.5–18.1) <sup>b,e</sup>	23.1 (14.8–36.0) <sup>a,b,c,d</sup>	< 0.001 <sup>^</sup>

Data are shown as mean (standard deviation) or percent, except for plasma biomarker concentration that are displayed as median (interquartile range). APOE genotype was missing for 12 SND, 25 AD, 4 LBD and 19 FTD subjects. Plasma GFAP concentration was unavailable for 2 SND, 4 AD and 29 FTD patients.

CU, Cognitively unimpaired; SND, Suspected non-neurodegenerative cognitive impairment; AD, Alzheimer's disease; LBD, Dementia with Lewy bodies; FTD, Frontotemporal dementia; MMSE, Mini-mental state examination; A $\beta$ , Amyloid beta; p-tau181, Tau phosphorylated at threonine 181; GFAP, Glial fibrillary acidic protein; NfL, Neurofilament light chain; NS, Not significant; NA, Not applicable.

\*CSF or amyloid PET-defined amyloid positivity.

<sup>^</sup>Comparison of plasma biomarkers per group were adjusted for age and sex.

<sup>a</sup>Significantly different from CU.

<sup>b</sup>Significantly different from SND.

<sup>c</sup>Significantly different from AD.

<sup>d</sup>Significantly different from LBD. <sup>e</sup>Significantly different from FTD

dyslipidemic (44% vs. 31%,  $p=0.014$ ) and on hypolipidemic drugs (41% vs. 25%,  $p=0.02$ ), had lower rates of peripheral artery disease (0% vs. 2%,  $p=0.033$ ), higher CCI (3.3 [1.2] vs. 2.8 [1.4],  $p<0.001$ ) and lower eGFR (78.2 [13] vs. 82 [12.2] mL/min,  $p=0.006$ ) and platelet count (234 [60] vs. 249 [66]  $\times 10^9/L$ ,  $p=0.021$ ).

### Plasma biomarkers' association with different individual and clinical variables

We used age- and sex-adjusted linear regression models to study the association of each variable with plasma biomarkers (Fig. 1 and Online Resource). An A $\beta$  positive status had a high association with increased p-tau181 (standardized  $\beta$  [95% confidence interval] 0.685 [0.607–0.763],  $p<0.001$ ), GFAP (0.502 [0.411–0.598],  $p<0.001$ ) and NfL (0.161 [0.058–0.264],  $p=0.002$ ) concentration. Therefore, in cases where the regressor of interest was statistically significant, we further adjusted for A $\beta$  status, to ensure that the variable was associated with the plasma biomarker irrespective of A $\beta$  pathology.

Older age, female sex, APOE  $\epsilon 4$  carriership, peripheral artery disease and lower BV, BMI, eGFR and platelet count were associated with higher plasma p-tau181 levels

in age- and sex-adjusted regression models. After adjusting for A $\beta$  status, only eGFR ( $-0.115$  [ $-0.192$  to  $-0.035$ ],  $p=0.005$ ) remained significant.

Older age, female sex, lower BV, BMI and eGFR and higher CCI were predictors of increased plasma GFAP concentration. After A $\beta$  status adjustment, age (0.191 [0.099–0.286],  $p<0.001$ ), sex (0.094 [0.006–0.183],  $p=0.037$ ), BMI ( $-0.104$  [ $-0.209$  to  $-0.006$ ],  $p=0.039$ ), CCI (0.179 [0.065–0.285],  $p=0.002$ ) and eGFR ( $-0.123$  [ $-0.214$  to  $-0.029$ ],  $p=0.01$ ) remained significant.

Older age, CKD, lower BV, BMI, eGFR and hemoglobin and higher CCI were associated with higher plasma NfL levels. Age (0.258 [0.172–0.343],  $p<0.001$ ), blood volume ( $-0.155$  [ $-0.291$  to  $-0.007$ ],  $p=0.04$ ) and eGFR ( $-0.115$  [ $-0.195$  to  $-0.030$ ],  $p=0.008$ ) remained significant after further adjusting for A $\beta$  status.

We then tested for an interaction between A $\beta$  status and the clinical variable of interest in predicting plasma biomarkers levels for those regressors that remained significant after A $\beta$  status adjustment. A $\beta$  status modified the association between NfL and age ( $p$  for interaction = 0.009). We did not find a statistically significant interaction of A $\beta$  status in the association between eGFR

**Table 2** Demographic, cognitive, APOE, plasma biomarkers, comorbidities and medication characteristics according to amyloid beta status

	Total (n = 360)	A $\beta$ negative* (n = 169)	A $\beta$ positive* (n = 191)	p value
Age (years)	66.5 (7.7)	64 (8.3)	68.7 (6.3)	<0.001
Disease duration (years)	3 (2.3)	3.1 (2.8)	2.9 (2.0)	NS
Sex (female)	55%	52%	58%	NS
Education (years)	10.7 (4.6)	10.8 (4.8)	10.7 (4.5)	NS
Blood volume (mL)	4243 (758)	4401 (773)	4107 (721)	0.002
Body mass index	26.4 (4.0)	27.3 (4.0)	25.5 (3.9)	<0.001
MMSE	24.6 (4.5)	26.3 (4.0)	23 (4.3)	<0.001
APOE $\epsilon$ 4 carriers	39%	19%	57%	<0.001
Plasma p-tau181 (pg/mL)	17.9 (12–28)	12 (9.7–14.9)	26.6 (20.7–33.4)	<0.001 <sup>^</sup>
Plasma GFAP (pg/mL)	141 (88.8–236.8)	89.4 (61.1–140.4)	197.8 (129.7–291.3)	<0.001 <sup>^</sup>
Plasma NfL (pg/mL)	12.5 (8.3–18.3)	10.4 (6.8–18.4)	13.6 (10.1–18.3)	<0.001 <sup>^</sup>
<i>Comorbidities</i>				
No. of comorbidities	1.6 (1.3)	1.5 (1.3)	1.7 (1.3)	NS
Active smoker	15%	16%	13%	NS
Heavy alcohol use	10%	9%	11%	NS
Hypertension	40%	40%	40%	NS
Dyslipidemia	38%	31%	44%	0.014
Diabetes mellitus	12%	11%	13%	NS
Chronic kidney disease	9%	9%	10%	NS
Hematologic or solid malignancy	3%	4%	3%	NS
Thyroid disease	10%	9%	11%	NS
Liver disease	1.0 (0.3%)	0 (0%)	1.0 (0.5%)	NS
Myocardial infarction < 1 year	4%	4%	5%	NS
Cerebrovascular disease	3%	2%	4%	NS
Peripheral artery disease	1%	2%	0%	0.033
Arrhythmia	3%	2%	3%	NS
Chronic obstructive pulmonary disease	5%	4%	6%	NS
Rheumatologic disease	2%	1%	3%	NS
Psychiatric disease	28%	31%	26%	NS
Charlson comorbidity index	3.1 (1.3)	2.8 (1.4)	3.3 (1.2)	<0.001
<i>Concomitant medication</i>				
Antihypertensive	40%	40%	40%	NS
Hypolipidemic	34%	25%	41%	0.02
Antidiabetic	11%	11%	12%	NS
Antithrombotic	20%	18%	22%	NS
Phosphocalcic metabolism	13%	11%	15%	NS
Benzodiazepines	22%	20%	25%	NS
Antidepressants	33%	34%	31%	NS
<i>Laboratory parameters</i>				
Estimated glomerular filtration rate (mL/min)	80.0 (12.7)	82.0 (12.2)	78.2 (13)	0.006
Glycated hemoglobin (%)	6.2 (1.4)	6.1 (1.4)	6.4 (1.4)	NS
B12 vitamin (pg/mL)	412.8 (174.5)	395.4 (160.5)	424.3 (182.8)	NS
Folic acid (ng/mL)	9.2 (4.6)	8.7 (4.5)	9.6 (4.7)	NS
Hemoglobin (g/L)	141.3 (14.2)	142.3 (13.4)	140.4 (14.8)	NS
Platelet count ( $\times 10^9/L$ )	240.6 (63.0)	248.8 (65.5)	233.5 (60.0)	0.021
Thyroid stimulating hormone (mIU/L)	2.2 (1.7)	2.4 (1.9)	2.1 (1.5)	NS

Data are shown as mean (standard deviation) or percent, except for plasma biomarker concentration that are displayed as median (interquartile range). Missing data: blood volume and body mass index were missing for 35 A $\beta$ - and 35 A $\beta$ +; APOE genotype for 31 A $\beta$ - and 29 A $\beta$ +; plasma GFAP in 27 A $\beta$ - and 8 A $\beta$ +; glomerular filtration rate for 4 A $\beta$ - and 3 A $\beta$ +; glycated hemoglobin in 129 A $\beta$ - and 143 A $\beta$ +; B12 vitamin 64 A $\beta$ - and 33 A $\beta$ +; folic acid 76 A $\beta$ - and 42 A $\beta$ +; hemoglobin 4 A $\beta$ - and 1 A $\beta$ +; platelet count 4 A $\beta$ - and 2 A $\beta$ + and thyroid stimulating hormone 55 A $\beta$ - and 33 A $\beta$ +

MMSE, mini-mental state examination; A $\beta$ , amyloid beta; p-tau181, tau phosphorylated at threonine 181; GFAP, glial fibrillary acidic protein; NfL, neurofilament light chain; NS, not significant

\*CSF or amyloid PET-defined amyloid positivity

**Table 2** (continued)

<sup>^</sup>Comparison of plasma biomarkers per group were adjusted for age and sex

and p-tau181 or for any other of the plasma biomarkers and the demographic and clinical variables studied.

### Impact of demographic factors, comorbidities and laboratory parameters on amyloid beta status discrimination

After studying which factors modified plasma biomarkers concentration, we wanted to know the impact of these changes in clinical practice. To that end, we ran distinct binary logistic regression models with plasma biomarkers and the variables of interest predicting CSF/amyloid PET-defined A $\beta$  status and compared their diagnostic performance through resulting AUCs, sensitivities and specificities. To avoid multicollinearity with BMI and BV, separate models with either BMI or BV were assessed, and we chose the one with the highest predictive value (BMI).

The complete model yielded an AUC of 0.95, with plasma p-tau181 being the strongest predictor (Table 3; Fig. 2) for A $\beta$  status. The parsimonious model included p-tau181, GFAP, APOE and BMI as significant regressors, in decreasing prediction strength, and had the same AUC as the complete model. When simplifying the model, p-tau181 alone resulted in an AUC of 0.93 and sensitivity and specificity of 87%, was non-inferior to combining p-tau181 with GFAP, BMI or with eGFR (despite this variable significantly modifying p-tau181 levels in linear regression models) and was superior to GFAP alone. Even though models with 3 to 4 regressors were superior to p-tau181 alone, they were so at the cost of approximately 1 more variable for 0.01 increase in AUC, clearly making the model more difficult and expensive to implement in clinical practice.

To further measure the impact of eGFR on p-tau181 for amyloid status prediction, we calculated the balanced cut-off and diagnostic accuracy of plasma p-tau181 for the whole cohort and after excluding patients with chronic kidney disease. For the whole cohort, a 17.56 pg/mL cut-off resulted in a sensitivity and specificity of 87%, a positive predictive value (PPV) of 89%, a negative predictive value (NPV) of 86% and an accuracy of 87%. After excluding the 32 (19 A $\beta$ +) patients with CKD, we obtained similar results, with a balanced cut-off of 17.54 pg/mL and sensitivity, specificity, PPV, NPV and accuracy of 87%, 88%, 89%, 86% and 87%, respectively. Despite low numbers precluding significant results, the p-tau181 cut-off for patients with CKD was 17.25 pg/mL, with sensitivity 90% and specificity 87%.

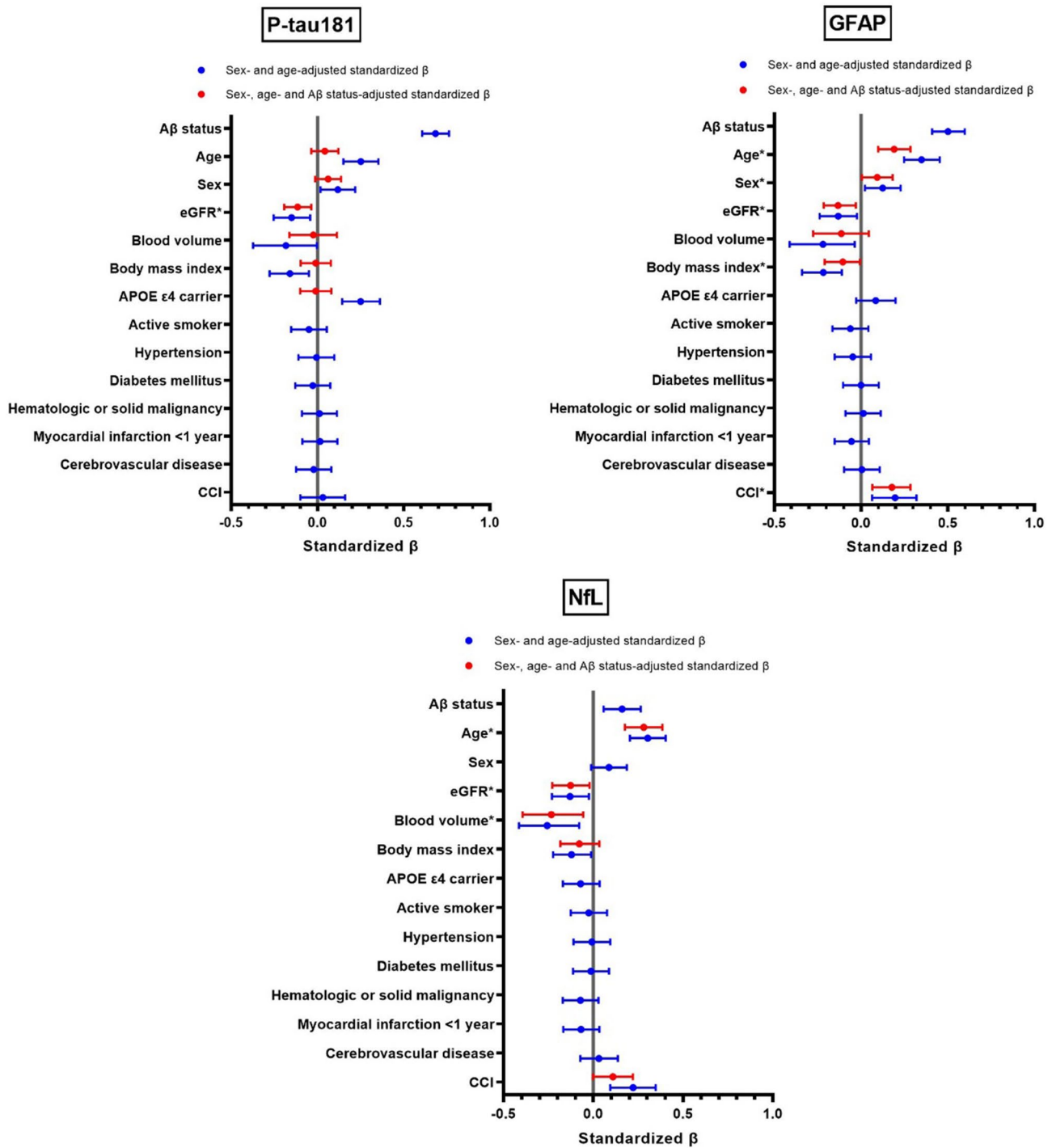
Using an algorithm with two cut-offs, one inferior with a high NPV and one superior with a high PPV for A $\beta$  status (Fig. 3), 25% percent of subjects were below the lower

cut-off of 11.91 pg/mL (sensitivity 97%, NPV 95%) and 37% above the upper 22.29 pg/mL cut-off (specificity 97%, PPV 96%). Thus, in 62% of participants, amyloid status would have been predicted with high accuracy and could have been spared further CSF/amyloid testing based solely on plasma p-tau181 levels. Excluding patients with CKD did not change the results. Twelve percent of patients with CKD were below the lower cut-off (sensitivity 95%, NPV 75%) and 38% were above the upper cut-off (specificity and PPV 100%).

### Discussion

This study evaluated the association of demographics, comorbidities, concomitant medication and laboratory parameters with plasma p-tau181, GFAP and NfL in a memory clinic cohort. We found that, although plasma biomarkers levels were significantly impacted by several factors (estimated glomerular filtration rate, age, sex, body mass index, blood volume, and Charlson comorbidity index), the magnitude of effect was much lower than the impact of A $\beta$  status. Accordingly, the impact of these factors on the diagnostic performance of plasma biomarkers in a clinical setting for discriminating A $\beta$  status was also minimal, making it probably unnecessary in daily clinical practice to adjust plasma biomarkers cut-offs in most subjects with overt cognitive impairment. We have also confirmed the clinical applicability, utility and confounding factor-related robustness of plasma p-tau181 to detect A $\beta$  pathology in a memory clinic cohort.

As blood biomarkers are close to implementation in clinical practice, identifying which factors modify their concentrations beyond brain pathology and their practical impact on A $\beta$  status discrimination has become a pressing need. To that end, plasma p-tau species have proven to be very useful both in research and memory clinic cohorts. However, few studies to date have studied the impact of confounding factors on their clinical applicability. In our study, we found that A $\beta$  status was the main driver of p-tau181 concentration and that, of a comprehensive list of demographics, concomitant comorbid conditions, medications and laboratory parameters, only eGFR significantly modified p-tau181 levels. However, the real impact of eGFR on the diagnostic performance of p-tau181 for A $\beta$  status discrimination was minimal. Our findings are in line with other studies that also found an association between lower renal function and higher p-tau levels [11, 12, 30–33, 44]. When looking at the clinical impact of kidney function on A $\beta$  prediction, three



**Fig. 1** Forest plots of beta coefficients of linear regression models for the main variables predicting plasma biomarker concentrations. Forest plot shows each regressors' standardized  $\beta$  linear regression coefficient, with 95% confidence interval, predicting plasma biomarker concentrations. All variables were z-scored to enable them to be compared. All models were age- and sex-adjusted. Since the strongest predictor for plasma biomarkers was A $\beta$  status, when the independent variable of interest was significant in age- and sex-adjusted

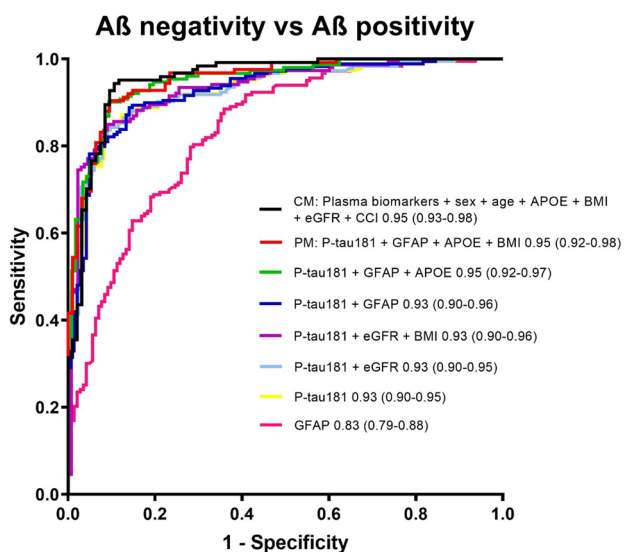
models, a new model was calculated, further adjusting for A $\beta$  status to see if the regressor remained significant. \*Linear regression  $\beta$  coefficient remained significant after A $\beta$  status adjustment. p-tau181, tau phosphorylated at threonine 181; GFAP, glial fibrillary acidic protein; NfL, neurofilament light chain; A $\beta$  status, CSF or amyloid-PET defined amyloid status; eGFR, estimated glomerular filtration rate; CCI, Charlson Comorbidity Index

**Table 3** Diagnostic accuracy of binary logistic regression models for amyloid beta status discrimination using distinct predictors

	AUC	95% CI	Sensitivity (%)	Specificity (%)	p value compared to p-tau181 alone
CM: Plasma biomarkers + sex + age + APOE + BMI + eGFR + CCI	0.95	0.93–0.98	93	91	0.006
PM: P-tau181 + GFAP + APOE + BMI	0.95	0.92–0.98	91	91	0.017
p-tau181 + GFAP + APOE	0.95	0.92–0.97	90	90	0.027
p-tau181 + GFAP	0.93	0.90–0.96	87	87	NS
p-tau181 + BMI + eGFR	0.93	0.90–0.96	87	87	NS
p-tau181 + eGFR	0.93	0.90–0.95	87	87	NS
p-tau181	0.93	0.90–0.95	87	87	NA
GFAP	0.83	0.79–0.88	79	78	<0.001

Table shows the area under the curve (AUC) and 95% confidence interval of the predicted probability of distinct binary logistic regression models for amyloid beta status discrimination. First, we studied a complete model (CM) with all three biomarkers, demographics, APOE, BMI, eGFR and CCI. Then, we assessed the resulting parsimonious model (PM) that included p-tau181, GFAP, APOE and BMI, and additional models with fewer variables. Additionally, the sensitivity and specificity of each model with balanced (maximizing Youden index) cut-offs and the difference in AUCs between each model and plasma p-tau181 alone (the single best predictor) are shown

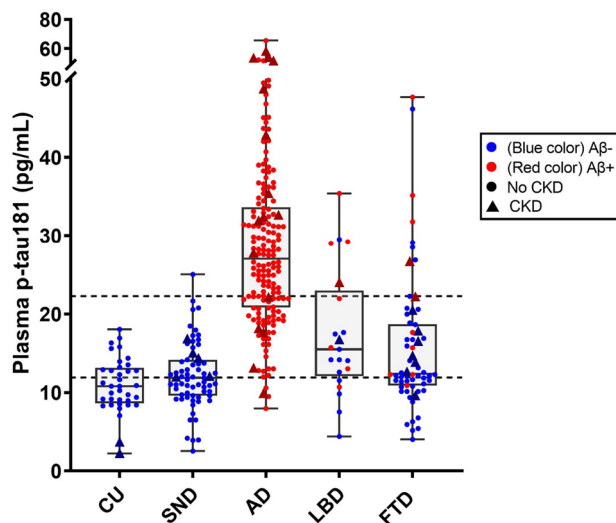
p-tau181, tau phosphorylated at threonine 181; GFAP, glial fibrillary acidic protein; eGFR, estimated glomerular filtration rate; BMI, body mass index; CCI, Charlson Comorbidity Index



**Fig. 2** Receiver operating characteristic curves of predictive models and individual plasma biomarkers for amyloid beta status discrimination. Receiver operating characteristic plots showing the area under the curve (AUC) of the predicted probability of distinct logistic regression models and individual plasma biomarkers for amyloid beta status discrimination, with 95% CI in brackets. The complete model (CM) included all three biomarkers, demographics, APOE, BMI, eGFR and CCI, while the parsimonious model (PM) kept p-tau181, GFAP, APOE and BMI. A $\beta$  status, CSF or amyloid-PET defined amyloid status; p-tau181, tau phosphorylated at threonine 181; GFAP, glial fibrillary acidic protein; eGFR, estimated glomerular filtration rate; BMI, body mass index; CCI, Charlson Comorbidity Index

studies found an increased performance of p-tau when specific cut-offs for distinct eGFR groups were calculated [11, 30, 31], while three found minimal effects of renal function on diagnostic performance of p-tau [12, 32, 33], as was the case in our results where the impact of A $\beta$  status on p-tau181 had a much higher magnitude than eGFR (standardized  $\beta$  0.658 vs.  $-0.115$ ). The prior study that showed the most important impact of glomerular filtration on diagnostic performance of p-tau181 [11] was mainly composed of cognitively unimpaired individuals. Few of them had current PET/CSF A $\beta$  biomarkers performed. When taking these findings into account and in line with a recent study [32] that found an increased impact of renal function in p-tau181 levels in cognitively unimpaired compared to cognitively impaired individuals, we hypothesize that in subjects typically seen in a memory clinic (i.e., with overt cognitive impairment), the greater magnitude of the effect of A $\beta$  pathology on p-tau181 concentrations makes the potential confounding impact of kidney function insignificant on the diagnostic performance of this plasma biomarker. Furthermore, in line with other studies [12, 25, 27, 28, 31, 33, 44], there was also a significant inverse association between eGFR and GFAP and NfL. However, despite eGFR not having a clinical impact on A $\beta$  status prediction, the impact of eGFR and chronic kidney disease on GFAP and NfL should be studied in other settings where there is a major role for these two biomarkers (e.g., astrocytic activation for GFAP and FTD diagnosis for NfL).

Body mass index and blood volume have also been inversely associated with plasma biomarkers concentrations in previous studies, with the magnitude of the association higher for plasma NfL compared to p-tau181 and



**Fig. 3** Plasma p-tau181 concentrations per diagnostic group, amyloid beta status and chronic kidney disease diagnosis. Box-and-whisker plots with the central horizontal box line showing the median plasma p-tau181 concentration in each diagnostic group and lower and upper box boundaries showing the 25th and 75th percentile, respectively. Participants were represented by a different color depending on amyloid  $\beta$  positivity or negativity, which was defined using our center definitions (see the Methods section), and by a different shape based on absence or presence of chronic kidney disease (eGFR <60 mL/min). For visualization purposes, the scale of the upper segment of the y axis was adjusted, as marked by a discontinuous line. Two additional horizontal discontinuous lines were represented, corresponding to a plasma p-tau181 concentration of 11.91 and 22.29 pg/mL, which were the ones with an optimized negative and positive predictive value for amyloid  $\beta$  status discrimination, respectively. CU, cognitively unimpaired; SND, suspected non-neurodegenerative cognitive impairment; AD, Alzheimer's disease; LBD, dementia with Lewy bodies; FTD, frontotemporal dementia; A $\beta$ , amyloid beta; p-tau181, tau phosphorylated at threonine 181; CKD, chronic kidney disease

GFAP [11, 27, 33, 45]. We found that BMI was associated with GFAP and BV with NfL, but they did not significantly modify p-tau181 levels. Accordingly, adding BMI or BV to the p-tau181 model for predicting A $\beta$  status did not improve accuracy. Nevertheless, since GFAP and NfL are not the main factors for amyloid status prediction, the effect of BMI and BV on specific GFAP and NfL cut-offs should be considered in other clinical scenarios (i.e., FTD diagnosis).

We found that plasma GFAP and NfL levels were increased in older individuals, while age did not affect p-tau181. Older age has been associated with increased plasma p-tau181 and GFAP mainly in cognitively unimpaired and A $\beta$ -negative individuals or in studies not adjusting for A $\beta$  status; their association diminished for symptomatic or A $\beta$ -positive patients [11, 27, 30, 45]. On the other hand, there is ample evidence of NfL levels increasing with age irrespective of brain pathology, as was the case with our study where age had one of the strongest impacts on NfL levels (even greater than A $\beta$  status) so that age-specific

cut-offs or age-adjusted NfL levels have been recommended when using this plasma biomarker [24, 27, 45, 46]. Accordingly, we found no need for age adjustment for A $\beta$  status discrimination, where the main predictor is p-tau181, which was not associated with age. Again, further studies evaluating the impact of age on the diagnostic performance of NfL in other clinical settings (FTD diagnosis) should be performed, given the greater association of age with this biomarker.

As with other similar studies, we did not find sex differences in p-tau181 and NfL levels, although women have been associated with worse imaging and CSF biomarker profiles and faster cognitive decline with increasing p-tau181 concentrations compared to men [11, 26, 45]. Conversely, we found higher GFAP concentration in women, in line with a recent work [44], but the discrimination for A $\beta$  status was not increased when adjusting for sex.

We did not find a significant association between any other comorbid condition, concomitant medication, or laboratory parameter and plasma biomarker concentrations, as in previous publications [33]. Other studies found an association of hypertension, stroke and myocardial infarction with p-tau181 [11], diabetes with GFAP [44] and diabetes, stroke, atrial fibrillation, hypertension, active cancer and myocardial infarction with NfL [25]. However, prior studies focused mainly on cognitively unimpaired participants and/or were not adjusted by amyloid beta status, which we again hypothesize could be the cause of the difference in results, as the magnitude of the effect of A $\beta$  pathology on plasma biomarkers could minimize the potential confounding effect of other factors.

In an era where the first disease-modifying treatments for AD are beginning to emerge, accurate and early identification of subjects in the AD continuum has become even more important. In our previous work, we proposed an algorithm to implement in clinical practice consisting of two cut-offs, one inferior with a high negative predictive value and one superior with a high positive predictive value for A $\beta$  status, leaving only a minority of subjects between both cut-offs (the “grey zone”) with further CSF/amyloid PET testing being needed [8]. We replicated very similar findings in our expanded cohort. Applying this algorithm, A $\beta$  status could have been predicted with high confidence in 62% of subjects and, therefore, more invasive and/or expensive diagnostic testing could have been spared. Importantly, we found that chronic kidney disease did not have a significant impact on the diagnostic accuracy nor the proposed cut-offs of the algorithm. Our findings add evidence to the clinical utility of plasma p-tau181 for identifying CSF/amyloid PET-defined amyloid beta status and its robustness to other confounding factors.

The main strength of our study is the fact that we included a well-characterized prospective memory clinic cohort, with

all subjects having confirmed A $\beta$  status through current gold standards (amyloid PET/CSF), and a comprehensive study of comorbid conditions, concomitant medication and laboratory parameters that are routine clinical practice in most memory clinics, which maximizes generalizability. Furthermore, treating neurologists and lab technicians were blinded to plasma biomarker results, reducing the risk of bias.

As for limitations, most patients are referred to our memory clinic when a neurodegenerative cause of cognitive impairment is suspected, so we cannot rule out that some patients with severe comorbid diseases (e.g., cirrhosis, end-stage kidney disease) are not referred and thus not represented in our study. In this line, although our cohort is representative of a memory clinic population, it comprises mostly individuals with a relatively low number of comorbidities. Moreover, at our memory clinic, CSF/amyloid PET are only routinely performed in patients with amnesic mild cognitive impairment younger than 75 years old, so further studies with older participants are needed to assess the generalizability of our findings to older cohorts. Additionally, we measured plasma biomarkers in batches at four distinct time points and not prospectively as they were collected, as would have been done in typical clinical practice, which could have potentially decreased the variability of our results. Finally, we studied the practical clinical impact of potential plasma biomarker-modifying factors for A $\beta$  status discrimination where p-tau181 was the best-performing biomarker, so their impact on other clinical scenarios with a main role of GFAP or NfL (e.g., FTD diagnosis) should be assessed in further studies.

## Conclusions

In a memory clinic cohort population evaluating the impact of a comprehensive list of demographics, comorbidities, medication and laboratory parameters on plasma biomarkers, we found that age, estimated glomerular filtration rate, body mass index, and blood volume were the main factors modifying biomarkers levels. However, the strength of the association of these variables was far lower than CSF/amyloid PET-defined A $\beta$  status. Consequently, the practical impact of these factors on A $\beta$  status discrimination using plasma biomarkers was minimal. Furthermore, we have confirmed the utility, practical clinical applicability, and robustness related to confounding factors of plasma p-tau181 as the best biomarker to discriminate A $\beta$  status, potentially avoiding most of the currently performed A $\beta$  status testing.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00415-023-12153-8>.

**Authors' contribution** All authors contributed to the study's conception and design. Data collection was performed by Jordi Sarto, Diana

Esteller and Mircea Balasa. Material preparation and analysis were performed by Jordi Sarto and Mircea Balasa. The first draft of the manuscript was written by Jordi Sarto and Mircea Balasa and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding** This work was supported by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the projects 19/00198 (Mircea Balasa), 19/00449 (Albert Lladó) and 20/00448 (Raquel Sánchez-Valle) and co-funded by the European Union. Diana Esteller was funded by the Emili Letang-Josep Font Hospital Clínic grant. N. Falgàs received funding from a Juan Rodés grant (JR22/00014), Alzheimer's Association grant (AACSF-21–723056) and Global Brain Health Institute grant (GBHI ALZ UK-21–723831). Sergi Borrego-Écija is a recipient of the Joan Rodés-Josep Baselga grant from the FBBVA.

**Data availability** Anonymized data will be shared upon reasonable request from any qualified investigator if approved by the local Research Ethics Committee.

## Declarations

**Conflicts of interest** RSV has served in Advisory boards Meetings for Wave Life Sciences, Ionis, UCB, Prevail, Pfizer and Novo Nordisk and received personal fees for participating in educational activities from Roche Diagnostics and Neuraxpharm. The other authors declare no conflict of interest.

**Ethical standards** All participants gave written informed consent for participation in the study. The study protocol was approved by the Hospital Clínic de Barcelona Research Ethics Committee (HCB/2019/0600).

## References

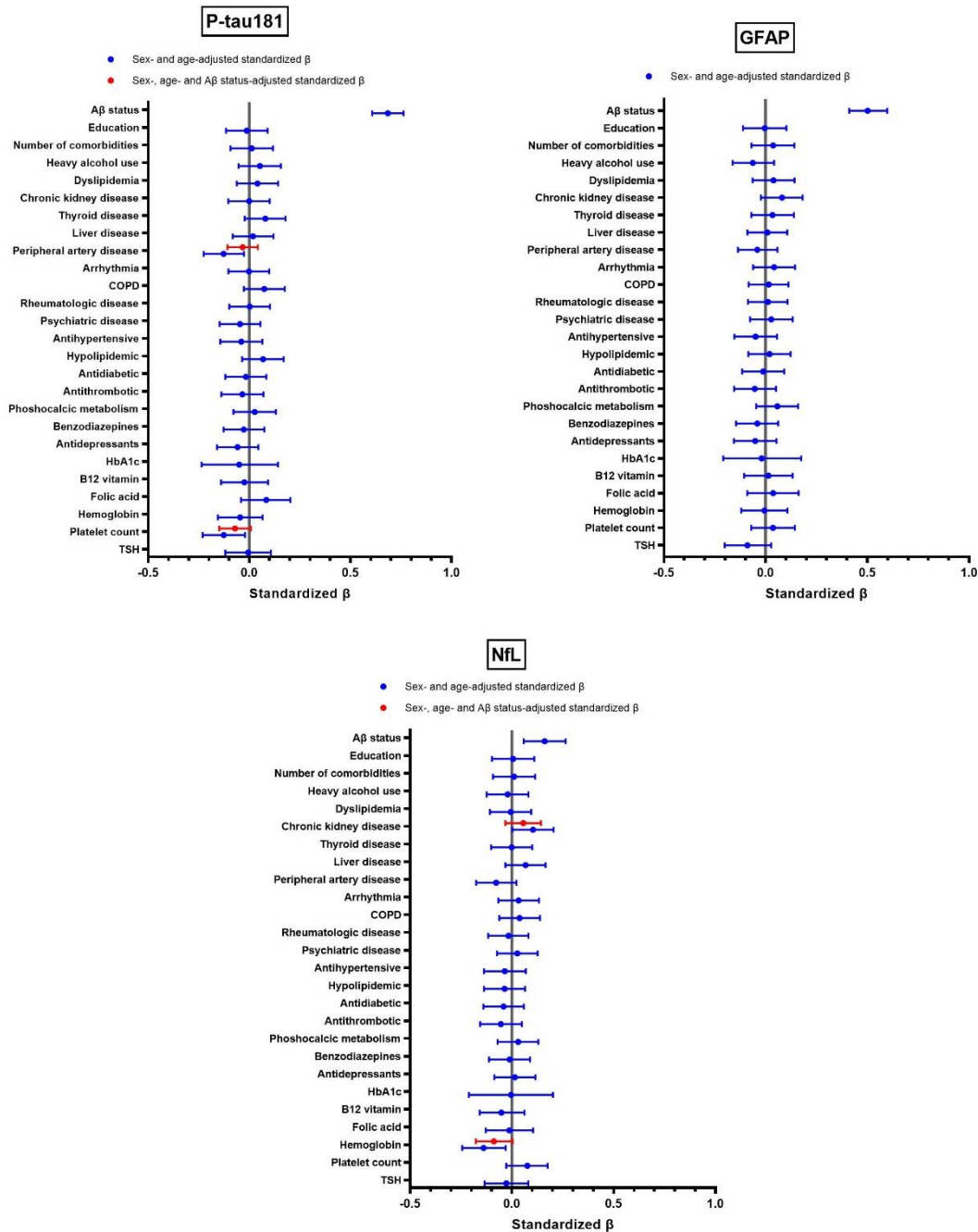
- Gonzalez-Ortiz F, Kac PR, Brum WS et al (2023) Plasma phospho-tau in Alzheimer's disease: towards diagnostic and therapeutic trial applications. *Mol Neurodegener* 18:1–12. <https://doi.org/10.1186/s13024-023-00605-8>
- Hansson O, Edelmayer RM, Boxer AL et al (2022) The Alzheimer's Association appropriate use recommendations for blood biomarkers in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. <https://doi.org/10.1002/alz.12756>
- Ashton NJ, Janelidze S, Mattsson-Carlsson N et al (2022) Differential roles of A $\beta$ 42/40, p-tau231 and p-tau217 for Alzheimer's trial selection and disease monitoring. *Nat Med*. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02074-w>
- Teunissen CE, Verberk IMW, Thijssen EH et al (2022) Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease: towards clinical implementation. *Lancet Neurol* 21:66–77
- Karikari TK, Ashton NJ, Brinkmalm G et al (2022) Blood phospho-tau in Alzheimer disease: analysis, interpretation, and clinical utility. *Nat Rev Neurol* 18:400–418. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00665-2>
- van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P et al (2023) Lecanemab in early Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 388:9–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2212948>
- Sims JR, Zimmer JA, Evans CD et al (2023) Donanemab in early symptomatic Alzheimer disease. *JAMA* 330:512. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.13239>
- Sarto J, Ruiz-García R, Guillén N et al (2022) Diagnostic performance and clinical applicability of blood-based biomarkers

- in a prospective memory clinic cohort. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.000000000201597>
9. Karikari TK, Pascoal TA, Ashton NJ et al (2020) Blood phosphorylated tau 181 as a biomarker for Alzheimer's disease: a diagnostic performance and prediction modelling study using data from four prospective cohorts. *Lancet Neurol* 19:422–433. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30071-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30071-5)
  10. Moscoso A, Grothe MJ, Ashton NJ et al (2021) Longitudinal associations of blood phosphorylated tau181 and neurofilament light chain with neurodegeneration in Alzheimer disease. *JAMA Neurol* 78:396–406. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.4986>
  11. Mielke MM, Dage JL, Frank RD et al (2022) Performance of plasma phosphorylated tau 181 and 217 in the community. *Nat Med* 28:1398–1405. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01822-2>
  12. Planche V, Bouteloup V, Pellegrin I et al (2022) Validity and performance of blood biomarkers for Alzheimer disease to predict dementia risk in a large clinic-based cohort. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.000000000201479>
  13. Altomare D, Stampacchia S, Ribaldi F et al (2023) Plasma biomarkers for Alzheimer's disease: a field-test in a memory clinic. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 94:420–427. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2022-330619>
  14. Mattsson-Carlgen N, Salvadó G, Ashton NJ et al (2023) Prediction of longitudinal cognitive decline in preclinical Alzheimer disease using plasma biomarkers. *JAMA Neurol* 80:360–369. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2022.5272>
  15. Jack CR, Wiste HJ, Algeciras-Schimmich A et al (2023) Predicting amyloid PET and tau PET stages with plasma biomarkers. *Brain* 146:2029–2044. <https://doi.org/10.1093/brain/awad042>
  16. Janelidze S, Palmqvist S, Leuzy A et al (2022) Detecting amyloid positivity in early Alzheimer's disease using combinations of plasma A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 and p-tau. *Alzheimer's Dement* 18:283–293. <https://doi.org/10.1002/alz.12395>
  17. Chouliaras L, Thomas A, Malpetti M et al (2022) Differential levels of plasma biomarkers of neurodegeneration in Lewy body dementia, Alzheimer's disease, frontotemporal dementia and progressive supranuclear palsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2021-327788>
  18. Bellaver B, Povala G, Ferreira PCL et al (2023) Astrocyte reactivity influences amyloid- $\beta$  effects on tau pathology in preclinical Alzheimer's disease. *Nat Med*. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02380-x>
  19. Ebenau JL, Pelkmans W, Verberk IMW et al (2022) Association of CSF, plasma, and imaging markers of neurodegeneration with clinical progression in people with subjective cognitive decline. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.000000000200035>
  20. Cousins KAQ, Shaw LM, Chen-Plotkin A et al (2022) Distinguishing frontotemporal lobar degeneration tau from TDP-43 using plasma biomarkers. *JAMA Neurol*. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2022.3265>
  21. Benedet AL, Milà-Alomà M, Vrillon A et al (2021) Differences between plasma and cerebrospinal fluid glial fibrillary acidic protein levels across the Alzheimer disease continuum. *JAMA Neurol* 78:1471–1483. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.3671>
  22. del Campo M, Zetterberg H, Gandy S et al (2022) New developments of biofluid-based biomarkers for routine diagnosis and disease trajectories in frontotemporal dementia. *Alzheimer's Dement*. <https://doi.org/10.1002/alz.12643>
  23. Mok TH, Nihat A, Majbour N et al (2023) Seed amplification and neurodegeneration marker trajectories in individuals at risk of prion disease. *Brain* 146:2570–2583. <https://doi.org/10.1093/brain/awad101>
  24. Ashton NJ, Janelidze S, Al Khleifat A et al (2021) A multicentre validation study of the diagnostic value of plasma neurofilament light. *Nat Commun*. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23620-z>
  25. O'Bryant SE, Petersen M, Hall J, Johnson LA (2022) Medical comorbidities and ethnicity impact plasma Alzheimer's disease biomarkers: important considerations for clinical trials and practice. *Alzheimer's Dement*. <https://doi.org/10.1002/alz.12647>
  26. Tsiknia AA, Edland SD, Sundermann EE et al (2022) Sex differences in plasma p-tau181 associations with Alzheimer's disease biomarkers, cognitive decline, and clinical progression. *Mol Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01675-8>
  27. Syrjanen JA, Campbell MR, Algeciras-Schimmich A et al (2022) Associations of amyloid and neurodegeneration plasma biomarkers with comorbidities. *Alzheimer's Dement* 18:1128–1140. <https://doi.org/10.1002/alz.12466>
  28. Dittrich A, Ashton NJ, Zetterberg H et al (2023) Association of chronic kidney disease with plasma NfL and other biomarkers of neurodegeneration: the H70 Birth Cohort Study in Gothenburg. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/wnl.000000000207419>
  29. Malek-Ahmadi M, Su Y, Ghisays V et al (2023) Plasma NfL is associated with the APOE  $\epsilon$ 4 allele, brain imaging measurements of neurodegeneration, and lower recall memory scores in cognitively unimpaired late-middle-aged and older adults. *Alzheimer's Res Ther* 15:1–10. <https://doi.org/10.1186/s13195-023-01221-w>
  30. Lehmann S, Schraen-Maschke S, Vidal J-S et al (2023) Plasma phosphorylated tau 181 predicts amyloid status and conversion to dementia stage dependent on renal function. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 94:411–419. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2022-330540>
  31. Zhang B, Zhang C, Wang Y et al (2023) Effect of renal function on the diagnostic performance of plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1150510>
  32. Janelidze S, Barthélemy NR, He Y et al (2023) Mitigating the associations of kidney dysfunction with blood biomarkers of Alzheimer disease by using phosphorylated tau to total tau ratios. *JAMA Neurol*. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2023.0199>
  33. Pichet Binette A, Janelidze S, Cullen N et al (2022) Confounding factors of Alzheimer's disease plasma biomarkers and their impact on clinical performance. *Alzheimer's Dement*. <https://doi.org/10.1002/alz.12787>
  34. Berry K, Asken BM, Grab JD et al (2022) Hepatic and renal function impact concentrations of plasma biomarkers of neuropathology. *Alzheimer's Dement Diagnosis Assess Dis Monit*. <https://doi.org/10.1002/dad2.12321>
  35. Rebelos E, Rissanen E, Bucci M et al (2022) Circulating neurofilament is linked with morbid obesity, renal function, and brain density. *Sci Rep* 12:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11557-2>
  36. McKhann G (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* 7:263–269. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
  37. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D et al (2011) The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Dement* 11:96–106. <https://doi.org/10.1176/appi.focus.11.1.96>
  38. McKeith IG, Boeve BF, Dickson DW et al (2017) Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies. *Neurology* 89:88–100. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004058>
  39. Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D et al (2011) Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain* 134:2456–2477. <https://doi.org/10.1093/brain/awr179>
  40. Höglinger GU, Respondek G, Stamelou M et al (2017) Clinical diagnosis of progressive supranuclear palsy: the movement

- disorder society criteria. *Mov Disord* 32:853–864. <https://doi.org/10.1002/mds.26987>
41. Armstrong MJ, Litvan I, Lang AE et al (2013) Criteria for the diagnosis of corticobasal degeneration. *Neurology* 80:496–503. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31827f0fd1>
  42. Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S et al (2011) Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology* 76:1006–1014. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31821103e6>
  43. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR (1987) A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *J Chronic Dis* 40:373–383. [https://doi.org/10.1016/0021-9681\(87\)90171-8](https://doi.org/10.1016/0021-9681(87)90171-8)
  44. Ramanan VK, Graff-Radford J, Syrjanen J et al (2023) Association of plasma biomarkers of Alzheimer disease with cognition and medical comorbidities in a biracial cohort. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.000000000207675>
  45. Brickman AM, Manly JJ, Honig LS et al (2021) Plasma p-tau181, p-tau217, and other blood-based Alzheimer’s disease biomarkers in a multi-ethnic, community study. *Alzheimer’s Dement* 17:1353–1364. <https://doi.org/10.1002/alz.12301>
  46. Vermunt L, Otte M, Verberk IMW et al (2022) Age- and disease-specific reference values for neurofilament light presented in an online interactive support interface. *Ann Clin Transl Neurol* 9:1832–1837. <https://doi.org/10.1002/acn3.51676>

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

**Online resource 1** Forest plots of beta coefficients of linear regression models for the rest of the variables studied predicting plasma biomarker concentrations



Forest plot shows each regressors' standardized  $\beta$  linear regression coefficient, with 95% confidence interval, predicting plasma biomarker concentrations. All variables were z-scored to enable them to be compared. All models were age- and sex- adjusted. Since the strongest predictor for plasma biomarkers was A $\beta$  status, when the independent variable of interest was significant in age- and sex-adjusted models, a new model was calculated, further adjusting for A $\beta$  status to see if the regressor remained significant. **Abbreviations:** p-tau181, tau phosphorylated at threonine 181; GFAP, glial fibrillary acidic protein; NfL, neurofilament light chain; A $\beta$  status, CSF or amyloid-PET defined amyloid status; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; HbA1c, glycated hemoglobin; TSH, Thyroid stimulating hormone.

## Trabajo número 3

### **Accuracy and clinical applicability of plasma tau 181 and 217 for Alzheimer's disease diagnosis in a memory clinic cohort**

Jordi Sarto, Diana Esteller-Gauxax, Núria Guillén, Neus Falgàs, Sergi Borrego-Écija, Miquel Massons, Guadalupe Fernández-Villullas, Yolanda González, Adrià Tort-Merino, Beatriz Bosch, Magda Castellví, Gerard Piñol-Ripoll, Jordi Juncà-Parella, Andrea del Val, Agnès Pérez-Millan, Aina Comas, Anna Antonell, Laura Naranjo, Raquel Ruiz-García, Josep María Augé, Raquel Sánchez-Valle, Albert Lladó, Mircea Balasa.

*Journal of Neurology*. Epub 2025 Jan 23;272(2):160. doi: 10.1007/s00415-025-12897-5

Factor de impacto: 4,8; Cuartil (Clinical Neurology): 1, Decil: 2 (JCR 2023).

#### **Resumen estructurado**

**Introducción:** Los biomarcadores plasmáticos tau fosforilada en las treoninas 181 (p-tau181) y 217 (p-tau217) han demostrado una elevada precisión para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA), definida por la positividad de amiloide beta en LCR o PET de amiloide (A $\beta$ /A), pero la mayoría de estudios han sido realizados en cohortes de investigación, lo que limita su generalización. Se estudió la aplicabilidad clínica de p-tau181 y p-tau217 plasmáticos para discriminación del estado A $\beta$  definido por LCR mediante ensayos comercialmente disponibles en una cohorte de un centro especializado de deterioro cognitivo.


**Métodos:** Se incluyeron, de forma consecutiva, a todos los pacientes que fueron derivados a nuestro centro para valoración cognitiva entre julio de 2019 y junio de 2024 y a quienes se realizaron biomarcadores en LCR de EA como parte del proceso diagnóstico habitual. El estado A $\beta$  se definió mediante un punto de corte local de A $\beta$ 1-42, mientras que en aquellos pacientes con resultados de A $\beta$ 1-42 cerca del punto de corte o cuando había una discordancia entre el estado A $\beta$  y el estado T (definido mediante p-tau181 en LCR), se usó la ratio A $\beta$ 1-42/A $\beta$ 1-40. Ptau217 y p-tau181 plasmáticos se cuantificaron, de forma retrospectiva a través de extracciones de sangre en la primera visita, mediante tecnología Lumipulse de Fujirebio y Simoa de Quanterix, respectivamente.

**Resultados:** Se incluyeron 468 pacientes (media de edad 67 años, 50% mujeres, 61% A $\beta$  positivos). P-tau217 fue superior a p-tau181 para la discriminación del estado A $\beta$  definido por LCR (AUC 0,95 vs 0,90,  $p=0,005$ ). Un algoritmo de p-tau217 plasmático con una sensibilidad y especificidad preespecificadas del 97,5%, dividiendo a los pacientes en tres grupos de probabilidad de positividad A $\beta$  (baja, intermedia o alta), clasificó a un 67% de los pacientes en los grupos de baja o elevada probabilidad, resultando en una predicción de estado A $\beta$  (negativo o positivo, respectivamente) con una elevada precisión del 96%. El 33% restante en el grupo intermedio no tendrían su estado A $\beta$  predicho mediante p-tau217 con elevada precisión y serían candidatos a realización de biomarcadores de EA en LCR o PET de amiloide. Un modelo que asumió un 10% de variación en los niveles de p-tau217 plasmático resultó en mínimos cambios en la precisión del algoritmo (95%), con un ligero aumento en el número de pacientes dentro del grupo de probabilidad intermedia de positividad A $\beta$  (38%).

**Discusión:** P-tau217 plasmático podría haber discriminado con muy elevada precisión el estado A $\beta$  definido por LCR en dos tercios de los pacientes de una cohorte de práctica clínica habitual en un centro terciario. Estos resultados respaldan la implementación de p-tau217 plasmática como herramienta inicial en centros terciarios para el diagnóstico de la EA, reduciendo la necesidad de pruebas más invasivas y caras y menos accesibles a la población general.



# Accuracy and clinical applicability of plasma tau 181 and 217 for Alzheimer's disease diagnosis in a memory clinic cohort

Jordi Sarto<sup>1,2</sup> · Diana Esteller-Gauxax<sup>1</sup> · Núria Guillén<sup>1,2</sup> · Neus Falgàs<sup>1,2</sup> · Sergi Borrego-Écija<sup>1,2</sup> · Miquel Massons<sup>1</sup> · Guadalupe Fernández-Villullas<sup>1,2</sup> · Yolanda González<sup>1</sup> · Adrià Tort-Merino<sup>1,2</sup> · Beatriz Bosch<sup>1,2</sup> · Magda Castellvi<sup>1</sup> · Gerard Piñol-Ripoll<sup>1,3</sup> · Jordi Juncà-Parella<sup>1,2</sup> · Andrea del Val<sup>1</sup> · Agnès Pérez-Millan<sup>1,2</sup> · Aina Comas<sup>1</sup> · Anna Antonell<sup>1,2</sup> · Laura Naranjo<sup>4</sup> · Raquel Ruiz-García<sup>4</sup> · Josep María Augé<sup>5</sup> · Raquel Sánchez-Valle<sup>1,2,6</sup> · Albert Lladó<sup>1,2,6</sup> · Mircea Balasa<sup>1,2</sup> 

Received: 18 October 2024 / Revised: 17 December 2024 / Accepted: 2 January 2025 / Published online: 23 January 2025  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2025

## Abstract

Plasma tau phosphorylated at threonine 181 (p-tau181) and 217 (p-tau217) have demonstrated high accuracy for Alzheimer's disease (AD) diagnosis, defined by CSF/PET amyloid beta ( $A\beta$ ) positivity, but most studies have been performed in research cohorts, limiting their generalizability. We studied plasma p-tau217 and p-tau181 for CSF  $A\beta$  status discrimination in a cohort of consecutive patients attending an academic memory clinic in Spain (July 2019–June 2024). All patients had CSF AD biomarkers performed as part of their routine clinical assessment.  $A\beta$  positivity was defined with a local cut-off of CSF  $A\beta_{1-42} < 600$  pg/mL; in patients with borderline  $A\beta_{1-42}$  values or when there was a mismatch between the  $A\beta$  and the T status (T + if CSF p-tau181  $\geq 65$  pg/mL), a ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40} < 0.07$  was used. Plasma p-tau217 and p-tau181 were measured retrospectively, from blood samples collected at first visit, with Fujirebio Lumipulse and Quanterix Simoa assays, respectively. We included 468 patients (mean age 67 years, 50% female, 61%  $A\beta$  positive). Plasma p-tau217 outperformed plasma p-tau181 in discriminating CSF  $A\beta$  status (AUC 0.95 vs 0.90,  $p = 0.005$ ). A 97.5% sensitivity and specificity plasma p-tau217 algorithm, classifying patients into three groups of  $A\beta$  probability (Low, Intermediate and High), resulted in 67% of patients in the Low and High groups, having their  $A\beta$  status predicted (as negative and positive, respectively) with 96% accuracy. The remaining 33% in the Intermediate group were candidates to undergo CSF/PET testing. A model with a 10% variation in p-tau217 levels yielded small changes in accuracy (95%). In conclusion, plasma p-tau217 could have discriminated CSF  $A\beta$  status in two-thirds of patients with very high accuracy in a memory clinic cohort. These results support the implementation of plasma p-tau217 as an initial diagnostic tool in memory clinics for AD diagnosis, reducing the need for more invasive/expensive testing.

**Keywords** Blood biomarkers · Neurodegenerative diseases · Dementia · Alzheimer's disease · Diagnostic performance

Albert Lladó and Mircea Balasa have shared senior authorship.

✉ Mircea Balasa  
mbalasa@clinic.cat

<sup>1</sup> Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Fundació de Recerca Clínic – Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

<sup>3</sup> Unitat Trastorns Cognitius, Cognition and Behaviour Study Group, Santa Maria University Hospital, IRBLleida, Lleida, Spain

<sup>4</sup> Immunology Service, Biomedical Diagnostic Center, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>5</sup> Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>6</sup> Department of Medicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, Institute of Neurosciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

## Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the leading cause of dementia worldwide, with a predicted increase in the number of cases in the upcoming years [1]. A prompt and accurate diagnosis is essential for care planning, avoiding complications, clinical trial enrolment and initiating treatment [2, 3]. To increase diagnostic certainty, current diagnostic criteria for AD include the use of specific biomarkers (biochemical in cerebrospinal fluid [CSF] and amyloid and tau positron emission tomography [PET]) [4–7]. These biomarkers correlate with AD neuropathological changes and allow for the *in vivo* identification of individuals on the AD *continuum*, with CSF amyloid beta ( $A\beta$ ) and amyloid PET established as markers of amyloidosis (A or  $A\beta$  pathology) and CSF p-tau and tau PET representing AD-specific tauopathy (T) [7–12]. Widespread use of CSF and PET biomarkers is hindered by their economic cost, invasiveness and availability in specialized centers.

Blood-based biomarkers (BBM) have emerged as minimally invasive, accessible and relatively inexpensive (cheaper than PET and similar in cost to AD CSF biomarkers but without the need of lumbar puncture-associated expenses) tools for diagnosing AD. Some of these biomarkers have shown high accuracy for identifying individuals on the AD *continuum* as defined by CSF/PET and thus have been proposed as diagnostic tools to avoid more expensive/invasive AD biomarker testing [13–15]. Recently published updated AD diagnostic criteria contemplate a biomarker-based AD diagnosis using only BBM, with the caveat that only those high-performing BBM with an accuracy > 90% should be used [7]. Plasma phosphorylated tau (p-tau) species increase along the AD *continuum*, are found in low concentrations in other neurodegenerative (frontotemporal dementia [FTD] or dementia with Lewy bodies [LBD]) or non-neurodegenerative etiologies of cognitive impairment and have demonstrated excellent performance in identifying patients with an underlying AD pathophysiological process *in vivo* [15–25]. Furthermore, plasma p-tau species have shown to systematically outperform other blood biomarkers, like glial fibrillary acidic protein (GFAP), neurofilament light chain (NfL) and the amyloid beta 42/40 ratio ( $A\beta_{42/40}$ ), in discriminating CSF/amyloid PET-defined amyloid beta ( $A\beta$ ) status both in cognitively unimpaired and impaired individuals [15, 17, 19–24, 26–30]. The p-tau181 epitope has been the most studied, owing to being commercially available for longer. Recent studies with in-house and commercial p-tau217 assays have demonstrated excellent performance in discriminating both  $A\beta$  and T status, even exceeding the former in direct comparisons [23, 24, 31–36]. There is evidence that demographic and analytical

factors [e.g., age, body mass index (BMI) or kidney function] may modify p-tau181 and p-tau217 levels, but the real impact of these factors on the diagnostic performance of these plasma biomarkers has been conflicting between studies [18, 22, 25, 27, 29, 36–39].

There is a need for more real-world data in multiples settings and populations regarding the diagnostic performance and robustness of distinct commercially available p-tau assays and epitopes before systematic implementation in clinical practice. We previously studied the diagnostic performance of plasma p-tau181 in a memory clinic cohort and found that an algorithm with p-tau181 could have potentially avoided 60% of CSF/amyloid PET testing without a significant impact of confounding factors on diagnostic performance [21, 22]. In the present study, we aimed to study in a larger sample the diagnostic accuracy and clinical applicability of plasma p-tau181 and p-tau217, measured with commercially available assays, for identifying patients with CSF-defined AD pathophysiological process. To do so, we measured these biomarkers in a prospectively recruited memory clinic cohort of consecutive patients referred for suspected cognitive impairment in whom CSF AD biomarkers were assessed as part of routine clinical practice. We hypothesized that both p-tau181 and p-tau217 would have an excellent performance in identifying  $A\beta$  positive individuals, with p-tau217 outperforming the former, that an algorithm with two cut-offs would allow to potentially avoid performing around two-thirds of CSF tests and that there would be no significant clinical impact of confounding factors in biomarker diagnostic performance.

## Methods

### Study population

All individuals with suspected cognitive impairment referred for a first visit to the Alzheimer's disease and other Cognitive Disorders Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona (Spain), between July 1st, 2019 and 30th June, 2024, who agreed to participate in the study were consecutively included. Patients with cognitive complaints or suspected cognitive impairment are referred to our memory center by other clinicians (mainly primary care physicians) for specialized assessment. Although patients at any clinical stage can be referred to our center, the vast majority of individuals are at a mild dementia or a less severe stage at first visit.

All participants underwent routine diagnostic work-up, including neurologic and cognitive evaluations and structural neuroimaging. Specific AD biomarkers (CSF or amyloid PET) were performed, according to local protocols, to subjects with amnesic mild cognitive impairment/mild dementia below 80 years of age, early-onset dementia and

non-amnesic phenotypes. CSF was the preferred AD diagnostic biomarker, while amyloid PET was performed when lumbar puncture was contraindicated or unsuccessful. For this study, we selected all participants from the prospective cohort who had CSF AD biomarkers performed as part of their routine diagnostic work-up.

The treating neurologists determined the diagnosis based on current diagnostic criteria (including CSF/PET biomarkers) [5, 6, 40–44], blinded to plasma biomarkers results. Diagnostic categories included suspected non-neurodegenerative cognitive impairment (SND), AD, LBD and FTD. SND was defined as a stable cognitive impairment that was not suggestive of any neurodegenerative disease and with normal/negative CSF AD biomarkers. The umbrella term FTD included all the clinical variants associated with frontotemporal lobar degeneration (language, behavioral, progressive supranuclear palsy and corticobasal syndrome phenotypes) [41–44]. Clinical staging of cognitive impairment at first visit was defined as mild cognitive impairment (MCI) vs dementia, according to all-cause MCI and all-cause dementia NIA-AA 2011 criteria [5, 6].

## Procedures and measurements

Demographic, medical and laboratory data were retrospectively reviewed from electronic medical records. Blood samples were collected from all patients at the first visit, centrifuged to obtain plasma within two hours after blood extraction at 2000 $\times$ g during 10 min at 4 °C, aliquoted and stored at – 80 °C. Plasma p-tau181 was measured retrospectively in five batches: during November and December 2021 using the Quanterix Simoa p-tau181 Advantage 2.0 and on November 2022, February 2023 and September 2023 with the Neurology p-tau181 Advantage V2.1 (Quanterix, USA). V2.0 plasma p-tau181 concentration values were harmonized to V2.1 with the formula provided by Quanterix. Plasma p-tau217 levels were measured with commercially available Lumipulse G pTau 217 (Fujirebio, Japan) assay retrospectively in four batches (January to February 2024) for 84.2% of patients, while the rest (March to June 2024) were performed prospectively every two weeks as it was implemented as a routine assay in our local laboratory. Manufacturer's intra and inter-assay coefficients of variation (CV) for Lumipulse G pTau 217 were < 10%. Manufacturer's protocols were followed in all cases with lab technicians blinded to demographic and clinical data. In all cases, plasma p-tau181 and p-tau217 were measured by duplicate on the same blood sample and the same assay, with the final result being the mean of both concentrations. *APOE* genotype was determined through analysis of two single nucleotide polymorphisms (rs429358 and rs7412) by Sanger sequencing.

Lumbar puncture was performed according to current clinical guidelines. CSF amyloid  $\beta$ 1–42, amyloid  $\beta$ 1–40, p-tau181 and total tau were measured with the Lumipulse platform (Fujirebio, Belgium). Amyloid positive ( $A\beta+$ ) and tau positive ( $T+$ ) status were defined, according to local cut-offs, as CSF amyloid  $\beta$ 1–42 below 600 pg/mL and p-tau181 equal or above 65 pg/mL, respectively. In cases with borderline results of amyloid  $\beta$ 1–42 or a mismatch between the  $A\beta$  and  $T$  status (i.e.,  $A+T-$  or  $A-T+$ ) a ratio  $A\beta$ 1–42/ $A\beta$ 1–40 < 0.07 was used to define the  $A\beta+$  status. From here on, the terms “ $A\beta-/+$ ” and “ $T-/+$ ” will be used throughout the text, tables and figures to refer to “CSF-defined  $A\beta$  negativity/positivity” and “CSF-defined  $T$  negativity/positivity”, respectively.

## Statistical analysis

Normal distribution was assessed with the Kolmogorov–Smirnov test. Demographic, clinical and laboratory biomarker continuous variables were compared between groups using the  $t$  test/analysis of variance (ANOVA) or the Mann–Whitney  $U$ /Kruskal–Wallis with Dunn multiple comparison test, while  $\chi^2$  test was used for categorical variables. Biomarker concentrations were compared using an analysis of covariance, with age and sex as covariates and Bonferroni correction for pairwise comparisons. Plasma biomarker concentrations were log-transformed to allow linear modeling and parametric testing. Correlations between biomarkers were tested with Spearman's rank correlation test. The diagnostic performance of plasma p-tau217 and p-tau181 and the combination models with demographic and laboratory variables to discriminate between the  $A\beta-$  and  $A\beta+$  groups were analyzed by computing the area under the curve (AUCs) of the receiver-operating characteristic analysis of the predicted probability of binary logistic regression models. AUCs were compared using the DeLong test. The association of demographic, clinical and laboratory factors with plasma biomarkers was studied through age, sex and CSF-defined  $A\beta$  status-adjusted linear regression models; all variables were  $z$ -scored to calculate the standardized linear regression  $\beta$  coefficient as an effect measure and to allow comparison between coefficients.

To study the clinical applicability of plasma p-tau181 and p-tau217, we first determined a Youden index-optimized cut-off to calculate each plasma biomarker's balanced sensitivity and specificity. The potential impact on diagnostic performance of those confounding factors identified with linear regression models was assessed with binary logistic regression models for predicting CSF-defined  $A\beta$  status. Then, we studied the performance of two dual plasma biomarker cut-off algorithms to stratify patients into low, intermediate and high probability of CSF-defined  $A\beta$  positivity, based on prespecified 95% and 97.5% sensitivity and specificity

thresholds. The accuracy of this approach was calculated as true negatives in the low probability group plus true positives in the high group, divided by the total number of participants in the low and high groups. To test the robustness of the 97.5% algorithm further, we assumed a 10% variation margin on the plasma p-tau217 concentrations results, accounting for the intra and inter-assay CVs and potential confounding preanalytical and individual factors that may be encountered in routine clinical practice, and studied its impact on the performance of the algorithm. Finally, we assessed the distribution of plasma p-tau217 along the CSF-defined AT ( $A-T-$ ,  $A-T+$ ,  $A+T-$  and  $A+T+$ ) categories. SPSS (version 27) and GraphPad Prism (version 9) were used for statistical analyses and figure design. Significance was set at  $p < 0.05$ .

### Standard protocol approvals, registrations, and patient consents

All participants gave written informed consent to participate in the study and to have blood samples drawn, stored and analyzed. The study protocol was approved by the Hospital Clínic de Barcelona Research Ethics Committee (HCB/2019/0600).

## Results

### Demographics

Four hundred and sixty-eight patients, with a mean (standard deviation [s.d.]) age of 66.5 [8.0] years, 49.6% female, 61.1% CSF-defined  $A\beta$  positive, 62.4% MCI and an etiological diagnosis of 92 SND, 256 AD, 50 LBD (38.0%  $A\beta+$ ) and 70 FTD (15.7%  $A\beta+$ ) were included. All participants, except for one Asian (Chinese) and two Arabic (Moroccan) individuals, were Caucasian. Compared to  $A\beta-$ ,  $A\beta+$  individuals were older (67.6 [7.8] vs 65.0 [8.1] years old,  $p < 0.001$ ), more frequently female (54.2% vs 42.3%,  $p = 0.012$ ), MCI (67.4% vs 54.5%,  $p = 0.004$ ) and APOE  $\epsilon 4$  allele carriers (56.2% vs 19.3%,  $p < 0.001$ ) and had lower body mass index (BMI, 25.5 [3.9] vs 27.0 [4.5],  $p = 0.002$ ), estimated glomerular filtration rate (eGFR, 79.2 [12.9] vs 81.4 [12.0] mL/min,  $p = 0.003$ ) and CSF  $A\beta 1-42$  concentrations (416.4 [125.1] vs 891.1 [287.4] pg/mL,  $p < 0.001$ ). The demographic, cognitive, laboratory and biomarkers characteristics according to amyloid beta status and etiological diagnosis can be found in Table 1 and Online resource 1, respectively.

**Table 1** Demographic, cognitive, laboratory and biomarkers characteristics according to amyloid beta status

	Total ( $n=468$ )	$A\beta$ negative <sup>a</sup> ( $n=182$ )	$A\beta$ positive <sup>a</sup> ( $n=286$ )	P value <sup>b</sup>
Age (years)	66.5 (8.0)	65.0 (8.1)	67.6 (7.8)	$p < 0.001$
Disease duration (years)	3.0 (2.4)	3.2 (2.8)	2.9 (2.1)	NS
Sex (female)	232 (49.6%)	77 (42.3%)	155 (54.2%)	$p = 0.012$
Education (years)	10.7 (4.6)	11.1 (4.7)	10.5 (4.5)	NS
MMSE	23.9 (4.4)	25.5 (4.0)	22.7 (4.3)	$p < 0.001$
Clinical staging (MCI) <sup>c</sup>	292 (62.4%)	99 (54.4%)	193 (67.4%)	$p = 0.004$
APOE $\epsilon 4$ carriers	166 (43.7%)	25 (19.3%)	141 (56.2%)	$p < 0.001$
BMI	26.1 (4.2)	27.0 (4.5)	25.5 (3.9)	$p = 0.002$
eGFR (mL/min)	80.1 (12.6)	81.4 (12.0)	79.2 (12.9)	$p = 0.003$
CSF $A\beta 1-42$ (pg/mL)	607.5 (311.1)	891.1 (287.4)	416.4 (125.1)	$p < 0.001$
CSF p-tau181 (pg/mL)	75.5 (60.5)	39.2 (15.8)	100.0 (66.9)	$p < 0.001$
T positive <sup>a</sup>	212 (45.3%)	17 (9.3%)	195 (68.2%)	$p < 0.001$
Plasma p-tau217 (pg/mL)	0.557 (0.626)	0.129 (0.116)	0.845 (0.664)	$p < 0.001^d$
Plasma p-tau181 (pg/mL)	22.21 (12.20)	12.77 (5.69)	28.51 (11.20)	$p < 0.001^d$

Data are shown as mean (standard deviation) or number (percentage). MMSE was missing for 35  $A\beta-$  and 55  $A\beta+$  participants, APOE genotype for 53  $A\beta-$  and 35  $A\beta+$  subjects, BMI for 31  $A\beta-$  and 51  $A\beta+$  individuals, eGFR for 4  $A\beta-$  and 4  $A\beta+$  and plasma p-tau181 in 36  $A\beta-$  and 86  $A\beta+$  patients

$A\beta$ , amyloid beta; MMSE, Mini-Mental State Examination; BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate; CSF, cerebrospinal fluid; T, Alzheimer-type tauopathy; p-tau181, tau phosphorylated at threonine 181; p-tau217, tau phosphorylated at threonine 217; NS, not statistically significant

<sup>a</sup> $A\beta$  and T status (negative/positive) were defined by local CSF cut-offs

<sup>b</sup>Comparison between the  $A\beta$  negative and  $A\beta$  positive groups

<sup>c</sup>Clinical staging of cognitive impairment was defined as mild cognitive impairment (MCI) vs dementia stage

<sup>d</sup>Comparison of plasma biomarkers per group was adjusted for age and sex

## Distribution, correlation and association with other variables of plasma biomarkers

Both plasma p-tau217 (0.845 [0.664] vs 0.129 [0.116] pg/mL,  $p < 0.001$ ) and p-tau181 (28.51 [11.20] vs 12.77 [5.69] pg/mL,  $p < 0.001$ ) were significantly higher in  $A\beta+$  compared to the  $A\beta-$  subjects. The distribution of plasma biomarkers between diagnostic and  $A\beta$  status groups is shown in Fig. 1.

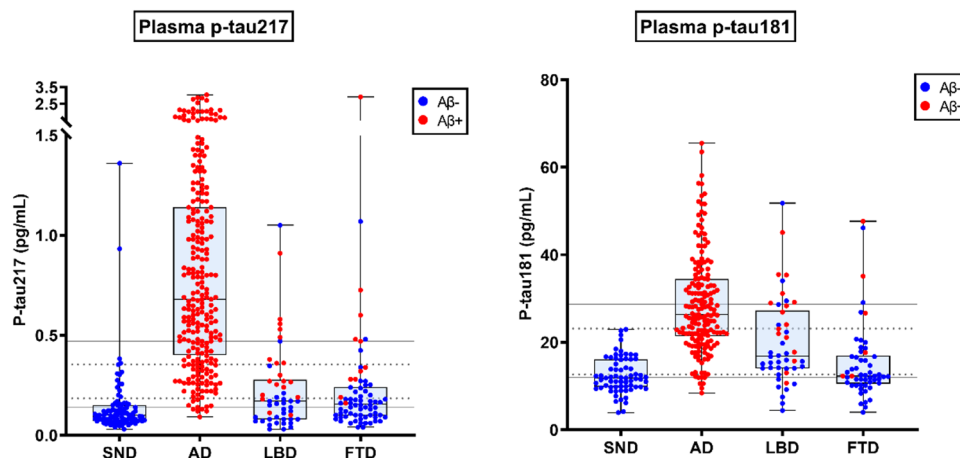
Moderate to strong correlations were observed between plasma p-tau217 and p-tau181 and CSF  $A\beta_{1-42}$  ( $\rho = -0.59$  and  $-0.52$ , respectively,  $p < 0.001$ ) and p-tau181 ( $\rho = 0.69$  and  $0.58$ , respectively,  $p < 0.001$ ) and between them ( $\rho = 0.78$ ,  $p < 0.001$ ), as seen in Online resource 2.

In linear regression models adjusted for age, sex and  $A\beta$  status, eGFR was associated with both plasma biomarkers and BMI with p-tau217, while age, sex, clinical staging (MCI vs dementia), MMSE scores and APOE  $\epsilon 4$  carriership were not (Fig. 2). However, the magnitude of the association (standardized  $\beta$  [95% confidence interval] of eGFR ( $-0.20$  [ $-0.28$ ,  $-0.13$ ],  $p < 0.001$ ) and BMI ( $-0.12$  [ $-0.21$ ,  $-0.04$ ],  $p = 0.03$ ) with p-tau217 was much lower than that of the CSF-defined  $A\beta$  status (0.59 [0.52–0.67],  $p < 0.001$ ). Similar findings were observed between eGFR ( $-0.20$  [ $-0.29$ ,  $-0.11$ ],  $p < 0.001$ ) and  $A\beta$  status (0.60 [0.51, 0.68],  $p < 0.001$ ) with p-tau181.

## Amyloid status discrimination

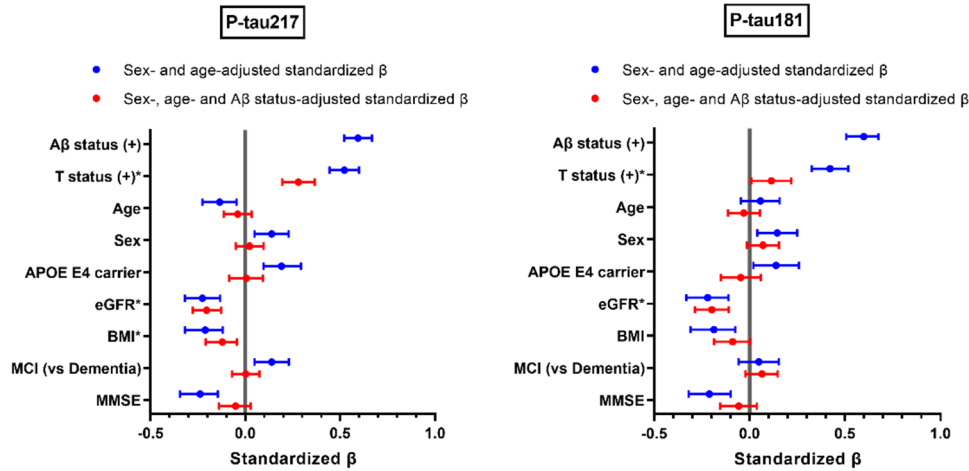
We first compared p-tau181 and p-tau217 in the subset of subjects with both results available ( $n = 346$ ). Plasma p-tau217 demonstrated high performance in predicting CSF-defined  $A\beta$  status (AUC 0.95 [95% confidence interval 0.93, 0.97]), outperforming plasma p-tau181 (AUC 0.90 [0.87, 0.93],  $p = 0.005$ ). The parsimonious binary logistic regression model predicting  $A\beta$  status (selecting the minimal number of variables with greater explanatory power) identified plasma p-tau217, plasma p-tau181 and APOE genotype (in decreasing order of explanatory power) as the main variables (Fig. 3). The diagnostic performance of plasma p-tau217 alone was not inferior to that of any other combination of variables between them or with p-tau217, including age, sex, APOE genotype, plasma p-tau181, MMSE, clinical staging (MCI vs dementia), BMI and/or eGFR.

A balanced (optimizing Youden index) p-tau217 cut-off resulted in 89% sensitivity, 90% specificity and 89% accuracy, while a p-tau181 cut-off had 85% sensitivity, specificity and accuracy. Next, we studied the performance of two dual plasma cut-off algorithms for p-tau217 and p-tau181, one lower with high sensitivity and negative predictive value (NPV) for  $A\beta$  positivity and one higher with high specificity and positive predictive value (PPV), resulting in three groups of probability (low, intermediate and high) of CSF-defined  $A\beta$  positivity (Online resource 3). Those individuals in the low and high probability groups would be diagnosed as  $A\beta$  negative or positive, respectively, based solely on



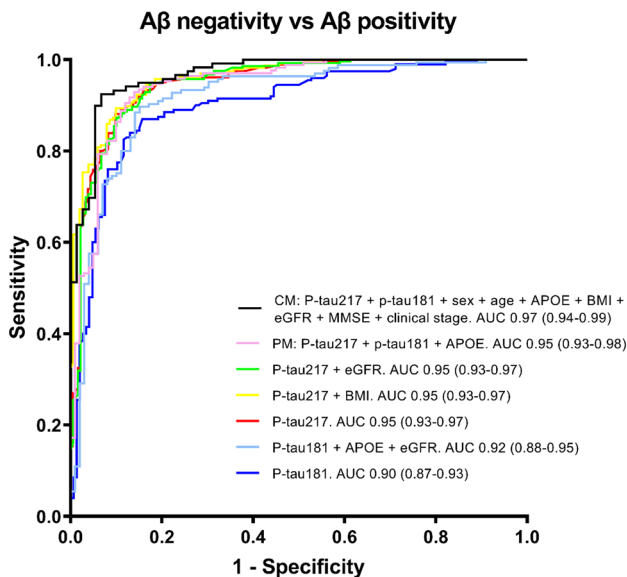
**Fig. 1** Plasma p-tau181 and p-tau217 per diagnostic group and amyloid beta status. Box-and-whisker plots with the central horizontal box line showing the median plasma biomarker concentration in each diagnostic group and lower and upper box boundaries showing the 25th and 75th percentile, respectively. Participants were represented by a different color depending on amyloid  $\beta$  positivity or negativity, as defined by cerebrospinal fluid. For visualization purposes, the scale of the upper segment of the y-axis was adjusted for p-tau217. Four horizontal lines were represented for each biomarker, the lower

discontinuous and continuous ones corresponding to a cut-off with 95% and 97.5% sensitivity, respectively, and the higher discontinuous and continuous ones to a cut-off with 95% and 97.5% specificity, respectively, for amyloid status discrimination. *SND*, suspected non-neurodegenerative cognitive impairment; *AD*, Alzheimer's disease; *LBD*, dementia with Lewy bodies; *FTD*, frontotemporal dementia;  $A\beta-/+$ , amyloid beta negative/positive; *p-tau181*, plasma tau phosphorylated at threonine 181; *p-tau217*, plasma tau phosphorylated at threonine 217



**Fig. 2** Association of plasma biomarkers with cerebrospinal fluid-defined amyloid and tauopathy status, age, sex, APOE  $\epsilon 4$  carrier-ship, renal function, body mass index and cognition. Forest plots show cerebrospinal fluid-defined amyloid and tauopathy status, age, sex, renal function, body mass index, clinical staging (mild cognitive impairment vs dementia) and MMSE standardized  $\beta$  linear regression coefficient with 95% confidence intervals predicting each plasma bio-

marker concentration. All regressors were adjusted for age and sex (in blue) and for age, sex and A $\beta$  status (in red). \*Linear regression  $\beta$  coefficient remained significant after A $\beta$  status adjustment. A $\beta$ , amyloid beta; T, CSF tauopathy status; *p-tau181*, tau phosphorylated at threonine 181; *p-tau217*, tau phosphorylated at threonine 217; *eGFR*, estimated glomerular filtration rate; *BMI*, body mass index; *MCI*, mild cognitive impairment; *MMSE*, Mini-Mental State Examination



**Fig. 3** Receiver operating characteristic curves of predictive models and individual plasma biomarkers for amyloid beta status discrimination. Receiver operating characteristic plots showing the area under the curve (AUC) of the predicted probability of distinct logistic regression models and individual plasma biomarkers for amyloid beta status discrimination, with 95% CI in brackets. The complete model (CM) included plasma p-tau217 and p-tau181, age, sex, APOE genotype, BMI, eGFR, MMSE score and clinical stage (mild cognitive impairment vs dementia), while the parsimonious model (PM) kept p-tau217, p-tau181 and APOE genotype. A $\beta$  status, CSF or amyloid-PET defined amyloid status; p-tau217, tau phosphorylated at threonine 217; *p-tau181*, tau phosphorylated at threonine 181; eGFR, estimated glomerular filtration rate; *BMI*, body mass index; *MMSE*, Mini-Mental State Examination

plasma p-tau levels. In contrast, patients in the intermediate probability group or “grey zone” could not have their A $\beta$  status predicted with high confidence. A plasma p-tau217 algorithm with prespecified 95% sensitivity and specificity thresholds resulted in 93.8% accuracy and 16.2% of patients in the intermediate zone, compared to a 91.5% accuracy and 35.3% of individuals in the intermediate group when applying the 95% algorithm for p-tau181. A stricter algorithm, with prespecified 97.5% sensitivity and specificity cut-offs, had a 95.9% accuracy and 29.8% individuals fell in the intermediate group for p-tau217, compared with a 92.5% accuracy and 54% of participants in the grey zone for p-tau181.

Since plasma p-tau217 had the best performance, the following analyses were focused on this plasma biomarker in the whole cohort of 468 patients. P-tau217 had an AUC of 0.95 [0.93, 0.97] in discriminating A $\beta$  status, with a balanced cut-off of 0.253 pg/mL resulting in 89% sensitivity, specificity and accuracy. There was no significant difference in diagnostic performance between patients in whom p-tau217 was measured retrospectively in batches ( $n = 394/468$ , 84.2%) and those with p-tau217 determined prospectively (74/468, 15.8%; AUC 0.95 [0.93–0.97] vs 0.96 [0.91–1.00], respectively,  $p = 0.79$ ). The 95% sensitivity and specificity threshold approach resulted in a 93.8% accuracy, with 34.8%, 16.9%, 48.3% of the participants in the low, intermediate and high probability groups, respectively (Fig. 1, Table 2). The stricter 97.5% algorithm had a 96.2% accuracy, with 26.0%, 32.9%, 41.1% of patients falling in the low, intermediate and high probability groups, respectively. Despite both algorithms

**Table 2** Models and algorithms evaluating the performance of plasma p-tau217 for cerebrospinal fluid-defined amyloid status prediction

Algorithm	Lenient (95%)	Strict (97.5%)	Strict (97.5%) with 10% variation margin
Lower cut-off (pg/mL)	0.184	0.139	0.125–0.153
Sensitivity (%)	95	97.5	96.2
False negatives ( <i>n</i> ), NPV (%)	15, 90.7%	7, 94.3%	11, 92.0%
Patients below cut-off/low A $\beta$ probability group ( <i>n</i> , %)	163, 34.8%	122, 26.0%	111, 23.8%
Higher cut-off (pg/mL)	0.354	0.471	0.424–0.518
Specificity (%)	95	97.5	96.2
False positives ( <i>n</i> ), PPV (%)	9, 96.0%	5, 97.4%	7, 96.5%
Patients above cut-off/high A $\beta$ probability group ( <i>n</i> , %)	226, 48.3%	192, 41.1%	177, 37.8%
Patients between cut-offs/intermediate A $\beta$ probability group ( <i>n</i> , %)	79, 16.9%	154, 32.9%	180, 38.4%
Further testing spared ( <i>n</i> , %)	389, 83.1%	314, 67.1%	288, 61.6%
Accuracy (%)	93.8	96.2	94.7

The second and third columns indicate the performance of a two-cut-off approach for predicting amyloid beta status with p-tau217, one lower with 95% and 97.5% sensitivity and one higher with 95% and 97.5% specificity, respectively, stratifying patients into low, intermediate or high probability of A $\beta$  positivity groups. Patients in the low and high probability groups would be diagnosed as A $\beta$ - or A $\beta$ +, respectively, based solely on plasma p-tau217, while those falling into the intermediate category would not have their A $\beta$  status predicted with enough confidence and could undergo routine cerebrospinal or amyloid PET testing. The fourth column shows the performance of the 97.5% algorithm assuming a 10% error margin; results show the worst-case scenario, with all patients with p-tau217 within 10% of the cut-off changing probability groups. Accuracy was calculated as true negatives in the Low A $\beta$  probability group + true positives in the High group divided by the total number of patients in the Low + High groups

NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; A $\beta$ , CSF-defined amyloid beta status

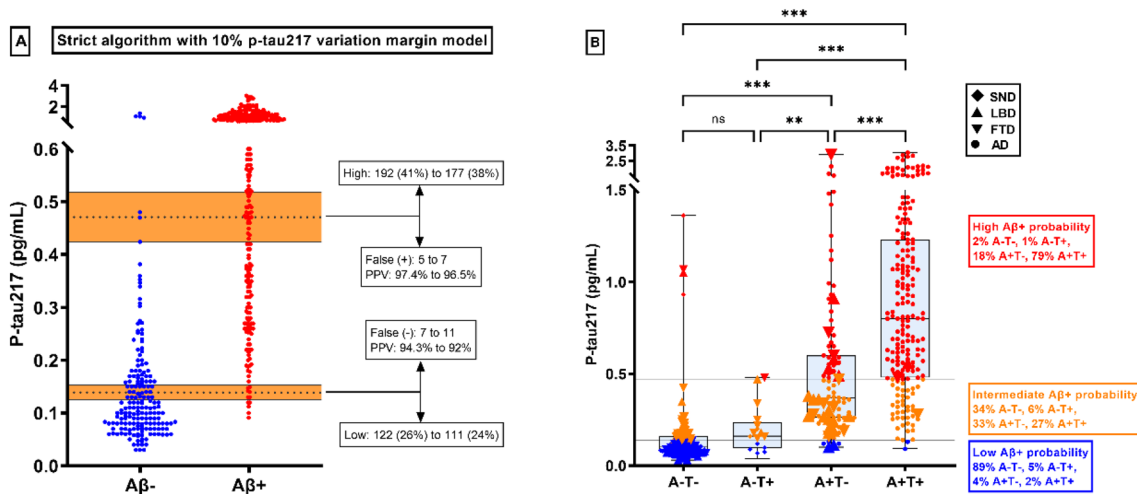
having an accuracy above 90%, we propose the stricter (97.5%) one for routine clinical implementation in memory clinics, where we believe a very precise diagnosis is of paramount importance. Even though less CSF/amyloid PET tests would be avoided compared to the 95% algorithm (67.1% vs 83.1%), false positives and negatives would be minimized, decreasing the number of patients who would not receive a timely AD diagnosis and those who would be misdiagnosed as having AD.

To further test the robustness of the 97.5% algorithm, accounting for potential confounding preanalytical, analytical and individual factors that may be encountered in routine clinical practice, we assumed a 10% variation margin of the p-tau217 results and studied the potential impact of this variation in patients changing the probability category (low/intermediate/high) and on diagnostic accuracy. Even assuming the worst-case scenario, with all patients with p-tau217 results in our cohort within 10% of both cut-offs changing A $\beta$  probability groups, the 97.5% algorithm demonstrated little changes in performance (Table 2, Fig. 4A), with slight decreases of NPV (94.3–92%, 7–11 false negatives), PPV (97.4–96.5%, 5–7 false positives) and accuracy (96.2–94.7%) -metrics that were still better than the 95% algorithm-, and with a slight increase on the number of patients in the intermediate probability group (32.9% vs 38.4%, 154–180 patients).

### Plasma p-tau217 along the A and T categories

Plasma p-tau217 was higher in A + T + subjects than in A + T - ones ( $p < 0.001$ ), which in turn showed increased concentrations compared to A - T - ( $p < 0.001$ ) and A - T + ( $p = 0.004$ ) subjects, as shown in Fig. 4B. However, p-tau217 demonstrated low accuracy in predicting T positivity in A $\beta$  positive individuals (A + T - vs A + T +, AUC 0.74 [0.67–0.80],  $p < 0.001$ ).

Then, we wanted to explore if A $\beta$  + patients in the intermediate probability group, defined through the 97.5% p-tau217 algorithm, had a differential representation of T status compared to the “high probability” group. Fifty (54.9%) and 36 (39.6%) A + T - patients were classified in the intermediate and high probability groups, respectively, compared to 42 (21.5%) and 151 (77.4%) A + T + participants that were catalogued in the intermediate and high probability groups, respectively (Fig. 4, Table 3). These results were statistically significant, implying that the intermediate group had an increased representation of A + T - patients compared to A + T +, which in turn were more frequently classified as “high probability” in the algorithm ( $\chi^2 = 35.6$ ,  $p < 0.001$ ). Accordingly, the performance of p-tau217 and of the 97.5% algorithm for A $\beta$  status discrimination was better when comparing A $\beta$  - individuals (A - T - and A - T +) with A + T + patients (AUC 0.96 [0.95–0.98], 98.3% NPV, 96.8%



**Fig. 4** Plasma p-tau217 distribution in the ten percent variation margin model of the strict 97.5% algorithm and by AT and amyloid probability groups. **(A)** Distribution of plasma p-tau217 concentration per amyloid status group. Discontinuous lines mark both 97.5% algorithm cut-offs and continuous ones, which mark the 10% p-tau217 values below and above each cut-off. The area between the continuous lines is shaded orange, delineating all patients whose amyloid probability group would change in the worst-case scenario, assuming a 10% variation margin of p-tau217 values. Boxes show the changes in accuracy and patients in the low and high Aβ probability groups from the original 97.5% algorithm to the model assuming the 10% variation. **(B)** Box-and-whisker plots showing plasma biomarker levels in each A and T group defined by CSF. Horizontal lines, corresponding to the 97.5% approach cut-offs, delineate the low (depicted in blue),

intermediate (orange) and high (red) plasma p-tau217 defined amyloid beta probability groups. The scale of the upper segment of the yaxis was adjusted. Boxes show the percentage of each AT group in each amyloid beta probability group. Biomarker concentrations were compared between AT groups using an analysis of covariance, with age and sex as covariates and Bonferroni correction for pairwise comparisons. Etiological diagnoses are depicted by different shapes. Low, Intermediate and High amyloid beta probability groups are defined through the plasma p-tau217 97.5% approach. A, amyloid beta status; T, tauopathy status; A and T status groups are defined by CSF results, as seen in Methods; NS, not statistically significant; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; SND, suspected non-neurodegenerative cognitive impairment; AD, Alzheimer’s disease; LBD, dementia with Lewy bodies; FTD, frontotemporal dementia

**Table 3** Distribution of A-T-, A-T+, A+T- and A+T+ patients in the amyloid probability groups defined by the strict 97.5% plasma p-tau217 algorithm

		AT status (CSF defined)				Total
		A-T-	A-T+	A+T-	A+T+	
Amyloid positivity probability group (Plasma p-tau217 defined)	Low	109, 66.1%	6, 35.3%	5, 5.5%	2, 1%	122
	Intermediate	52, 31.5%	10, 58.8%	50, 54.9%	42, 21.5%	154
	High	4, 2.4%	1, 5.9%	36, 39.6%	151, 77.4%	192
	Total	165	17	91	195	468

Results are shown as number of patients in each category and the percent they represent of the AT group. Amyloid beta (A) and tauopathy (T) status groups are defined by CSF results, as seen in Methods. Amyloid positivity groups are stratified by the dual cut-off 97.5% plasma p-tau217 algorithm

PPV, 97.4% accuracy, 27.6% patients in the intermediate group) than with A+T- individuals (AUC 0.91 [0.88–0.94], 95.8% NPV, 87.8% PPV, 93.7% accuracy, 41.0% patients in the intermediate group). There were more individuals with a non-AD diagnosis (LBD or FTD) in the A+T- group compared to the A+T+ one (27/91 [29.7%] vs 3/195 [1.5%],  $\chi^2 = 52.3, p < 0.001$ ). However, excluding LBD and FTD patients resulted in minimal changes in the performance of the 97.5% algorithm for differentiating Aβ- individuals from both A+T- and A+T+ patients.

### Discussion

In this study, in a real-world memory clinic cohort of consecutively included patients over 5 years, we evaluated the diagnostic performance and clinical applicability of plasma p-tau217 and p-tau181 using commercially available assays to discriminate CSF-defined Aβ status and found that p-tau217 had a higher discrimination accuracy than p-tau181. An algorithm with two p-tau217 cut-offs

could have potentially avoided around two-thirds of AD CSF testing, while achieving a high accuracy of 96%. This algorithm also demonstrated robustness, as only minor changes occurred when assuming a 10% margin of variation of p-tau217 concentrations that may be encountered in clinical practice.

Envisioning a near-future implementation of plasma p-tau in routine clinical practice for a biomarker-based AD diagnosis, algorithms with two cut-offs instead of one have been proposed with the goal of avoiding most of the CSF/PET testing by achieving high diagnostic accuracy in the low and high probability groups [7, 14, 21, 23–25, 45]. Most studies have been performed in research cohorts, including cognitively unimpaired participants and/or using in-house or non-commercially available assays [23–25, 31]. We used commercially available assays to study the diagnostic performance of p-tau181 and p-tau217 for CSF-defined  $A\beta$  status in a consecutively recruited memory clinic cohort (5-year period).

In line with other studies, p-tau217 outperformed p-tau181 in discriminating CSF-defined  $A\beta$  status [23, 32–36], both in single (89% vs 85% accuracies) and dual (94–96% vs 92–93% accuracies but with 70–84% vs 46–65% individuals outside the grey zone). By applying a two p-tau217 cut-off algorithm, patients could be classified into three distinct CSF-defined  $A\beta$  positivity probability groups (low, intermediate and high). Those patients in the low and high groups would be deemed  $A\beta$  negative and positive, respectively, with management and further testing for other etiologies of cognitive impairment depending on the treating physician. Patients in the intermediate group would not have  $A\beta$  status predicted with enough accuracy with plasma p-tau217 alone and could be referred for additional  $A\beta$  testing (CSF/amyloid PET). We studied the performance of two dual p-tau217 cut-off algorithms, one with 95% sensitivity and specificity and one with 97.5%. The lenient (95%) approach resulted in a 93.8% accuracy and 16.9% of patients falling in the intermediate probability group, while the stricter (97.5%) algorithm yielded a 96.2% accuracy, with 32.9% participants in the intermediate group. These results are very similar to three recent studies. In the first one, another commercially available p-tau217 assay was used, with 92.0–95.9% accuracy, 12.3–22.9% of participants into the intermediate probability group by using a 95% approach in three research cohorts with both cognitively impaired and unimpaired participants [23]. In the second one, 16.3% of cognitively impaired patients were classified in the intermediate category using a 95% p-tau217 (p-tau217/non-phosphorylated tau, measured through mass spectrometry) algorithm with 95% accuracy [24]. In the last one, a 95% and 97.5%  $A\beta$  positivity model (including a p-tau217 immunoassay, age and APOE genotype) resulted in 29.0% and 41.1% of cognitively impaired patients in the intermediate zone,

with 90.5% and 92.7% accuracies [25]. The performance of the dual cut-off approaches of plasma p-tau217 in our cohort and the aforementioned studies exceeds the >90% accuracy recommended by the 2024 AD diagnostic criteria for clinical implementation as a stand-alone test in AD diagnosis, greatly decreasing the need for CSF/PET AD testing [7, 14].

In a memory clinic setting, the 97.5% algorithm could be more appropriate than the 95% approach: despite having more patients that will fall in the intermediate probability group with the subsequent need for CSF/PET testing (32.9% vs 16.9%), false negatives (5.7% vs 9.3%) and positives (2.6% vs 4.0%) would decrease, minimizing patients with AD who would not receive a timely diagnosis and treatment and patients without AD who would be misdiagnosed and potentially started with specific AD treatment, respectively.

Concerns about the impact of comorbid conditions in the brain derived plasma biomarkers concentrations have been reported. We found an inverse association between eGFR and BMI with p-tau217 concentrations. However, these associations had a much lower impact than that of  $A\beta$  status on p-tau217 and did not improve  $A\beta$  status prediction models when added to plasma p-tau217, suggesting a lack of relevance on diagnostic performance. Other studies also found an inverse association between kidney function and BMI and p-tau217, with most of them concluding a lack of significant impact on the diagnostic performance of p-tau217 [25, 36, 39], with only one suggesting the opposite [18]. Interestingly, our results show that plasma p-tau217 levels and diagnostic performance for  $A\beta$  status discrimination is not significantly altered by the clinical stage of cognitive impairment (*i.e.*, it is similar between patients with mild cognitive impairment and patients with dementia), increasing the potential applicability of this biomarker into clinical practice, where an accurate diagnosis is needed in early stages of cognitive impairment. In this line, a recent article also did not find differences in plasma p-tau217 performance between patients with mild cognitive impairment and dementia [46]. We believe that the available data indicate that, in the population that is usually attended in memory clinics, none of the confounding factors studied would have a significant impact on the diagnostic performance of plasma p-tau217 for  $A\beta$  status discrimination and, therefore, algorithms for clinical implementation would not need to be systematically adjusted for them. However, we acknowledge that caution should be taken in individual patients with extreme eGFR and/or BMI with p-tau217 levels near cut-off values. The interpretation of the results and the decision to undergo further testing in these individuals should be made on a case-by-case basis.

To further test the clinical applicability and robustness of the p-tau217 97.5% approach, we accounted for potential individual confounding factors and intra- and inter-assay variability that could be encountered in routine clinical practice

and modify p-tau217 concentrations, and we assumed a 10% variation margin in p-tau217 levels (which was greater than the coefficients of variability provided from the manufacturer). Even under the worst-case scenario (all patients with p-tau217 concentrations  $\pm$  10% the lower or upper cut-offs changing groups in the most harmful direction), the algorithm still had an excellent performance, with a 94.7% accuracy (outperforming the 95% algorithm) and 38.4% patients in the intermediate group, demonstrating robustness despite the assumed variability.

Furthermore, we found that plasma p-tau217 increased along the AT continuum and was higher in  $A+T+$  subjects as compared to  $A+T-$  ones. Discriminating tau positivity ( $T+$ ) in  $A\beta$  positive ( $A+$ ) individuals has diagnostic, prognostic and therapeutic implications, as  $A+T+$  patients will probably have a cognitive syndrome that can be attributed to AD and a higher grade of AD neuropathological change compared to  $A+T-$  subjects and amyloid-lowering therapies may be less effective in the former, owing to more advanced disease [7, 8, 47–49]. However, despite increased p-tau217 concentration in  $A+T+$  patients, p-tau217 had low accuracy in predicting  $T$  status in  $A+$  individuals (AUC 0.74). These findings contrast with AUCs of 0.87–0.90 and an accuracy of 94% in recent studies. However,  $T+$  was defined through tau PET and not with CSF p-tau as in our case. Soluble fluid (CSF/blood) p-tau seems to be more closely related to  $A\beta$  deposition than to tau pathology, is deemed more useful as an AD diagnostic than an AD staging biomarker (belonging to Core 1— $T_1$  diagnostic biomarkers in the 2024 revised AD criteria) and starts to increase before tau PET, which in turn better reflects AD tau aggregates and belongs to Core 2— $T_2$  biomarkers for staging AD in the new criteria [7, 23, 24, 50]. Moreover, a recent study found increasing plasma p-tau217 concentrations with increasing tau burden (staged with tau PET) in  $A\beta+$  individuals, with optimal p-tau217 thresholds differing for each specific comparison (e.g., one for discriminating amyloid PET status and a different one for differentiating moderated/high neocortical tau from no tau/mesial-temporal lobe restricted) [51]. Therefore, we think that the relatively low performance of p-tau217 for CSF  $T$  status discrimination found in our study could be related to different tau burden status within the  $A+T+$  group that could not be correctly identified using CSF p-tau (i.e., CSF p-tau positive individuals that could still be tau PET negative), as CSF p-tau181 is not a good biomarker for staging tau burden, and that specific thresholds for  $T$  staging should be explored in further plasma p-tau217 studies using tau PET. Finally, in order to explore the differential characteristics of patients with intermediate p-tau217 levels (grey zone), we compared the distribution of  $A+T-$  and  $A+T+$  subjects in the intermediate and high probability  $A\beta$  probability groups and found that more than half (54.9%) of  $A+T-$  patients would be classified as intermediate, compared to only ~1/5

(21.5%) of  $A+T+$  participants. Accordingly, the diagnostic performance of the algorithm for  $A\beta$  status discrimination was better when excluding the  $A+T-$  group. Given that only 50–73% of CSF-defined  $A+T-$  brain donors have neuropathologically confirmed AD, compared to 100% of  $A+T+$  patients [48], our findings suggest that the intermediate/grey zone group may be enriched with patients with early AD neuropathological changes, whose intermediate p-tau217 concentrations would be a result of transitional/borderline AD pathology and not a p-tau217 “error” per se. In line with our reasoning, another study found that individuals with intermediate p-tau217 concentrations had values for amyloid and tau PET that were near the cut-offs for abnormality [24]. Therefore, we recommend that patients with intermediate p-tau217 levels should be managed on a case-by-case basis. Those patients in the intermediate group in whom a very accurate  $A\beta$  status is needed (e.g., eligible for amyloid-lowering therapy or clinical trial, younger age or with an atypical clinical presentation) should be further tested with established AD biomarkers (CSF/PET). However, in clinical practice, the treating physician may choose to give a diagnosis without further CSF/PET testing in individuals with typical AD symptoms and p-tau217 levels in the upper range of the intermediate zone or viceversa (signs and symptoms not suggestive of AD and p-tau217 in the lower range of the intermediate zone). In these cases, the diagnostic confidence of the physician would have been increased without the need for more invasive and expensive testing.

The main strengths of our study are the fact that all patients were recruited consecutively at the first visit in a memory clinic, decreasing the selection bias, that plasma p-tau determination was performed with a commercially-available assay in a fully automated platform already available in many centers for CSF biomarkers diagnosis making the results easily scalable and that the standard-of-truth (diagnosis and CSF results) were determined blinded to plasma p-tau concentrations, resulting in increased generalizability of the results. Limitations include the absence of amyloid PET data, which could prove useful in CSF/plasma discordant patients (CSF  $A\beta$  positive and low plasma p-tau or the opposite), tau PET testing, and of neuropathological data, the gold standard for AD diagnosis. Additionally, CSF  $A\beta$  status was defined with local  $A\beta$ 1-42 cut-offs, while the  $A\beta$ 1-42/1-40 ratio was only used in cases with borderline  $A\beta$ 1-42 values and/or mismatch between the  $A$  and  $T$  status, which diverges from the manufacturer’s recommended cut-offs and the preferred usage of the ratio over  $A\beta$ 1-42. Therefore, our results, especially the exact plasma p-tau217 cut-off values found on our study, should be validated in other memory clinic cohorts using the manufacturer’s recommended guidelines for  $A\beta$  status determination. Furthermore, since this cohort included patients referred to a memory clinic,

these results are not entirely generalizable to primary care cohorts, as they could include patients with more comorbidities or with less ease-of-access to tertiary centers that would not have been referred by primary care physicians or other specialists, as well as a probably higher number of  $A\beta$  negative individuals. Moreover, since almost all participants in our study were Caucasian, an analysis of the potential impact of ethnicity on plasma p-tau181 and p-tau217 levels and on their diagnostic performance could not be performed, so our results should be interpreted with caution in people with other ethnicities, warranting further studies in more diverse populations. Finally, all plasma p-tau181 and most of the p-tau217 determinations were performed retrospectively in batches, as opposed to the prospective measurement that would be performed in clinical practice, potentially mitigating analytical variability. However, we believe there would not be a significant decrease in diagnostic performance when measuring p-tau217 prospectively, since a recent study demonstrated a similar high performance of plasma %p-tau217 in a primary and secondary care cohort without significant differences when the assay was done by batches or prospectively [46], we found only small changes in our  $\pm 10\%$  variability analysis and there was no significant difference in AUCs between patients with p-tau217 measured retrospectively and those with a prospective approach.

In conclusion, in a memory clinic cohort of consecutively-included patients over a time-period of 5 years, a commercially available plasma p-tau217 assay outperformed plasma p-tau181 and could be used, through a dual cut-off algorithm, as a stand-alone test for discriminating CSF-defined  $A\beta$  positivity with a 96% accuracy in two-thirds of patients, reducing the need for CSF testing. This algorithm demonstrated robustness to potential confounding factors that could be encountered in clinical practice, as assuming a 10% variation in p-tau217 levels resulted only in minor changes. CSF amyloid positive and tau negative patients were more frequently classified in the p-tau217 intermediate probability group compared to CSF amyloid and tau positive individuals, which in turn more frequently fell on the high probability group, implying that some patients in the intermediate p-tau217 group (those who would probably be referred for CSF/PET AD biomarkers testing) could represent subjects with early AD changes. Our results support the routine use of plasma p-tau217 as an initial diagnostic tool in memory clinics for AD diagnosis, reducing the need for more invasive and expensive testing.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00415-025-12897-5>.

**Author contributions** All authors contributed to the study's conception and design. Data collection was performed by Jordi Sarto, Diana Esteller and Mircea Balasa. Material preparation and analysis were performed by Jordi Sarto and Mircea Balasa. The first draft of the

manuscript was written by Jordi Sarto and Mircea Balasa and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding** This work was supported by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the projects 19/00198 and 22/00343 (Mircea Balasa), 19/00449 and 23/00173 (Albert Lladó) and 20/00448 (Raquel Sánchez-Valle) and co-funded by the European Union. Diana Esteller was funded by the Emili Letang-Josep Font Hospital Clínic grant and a Rio Hortega grant (CM23/00137). Neus Falgàs received funding from a Juan Rodés grant (JR22/00014), Alzheimer's Association grant (AACSF-21-723056). Sergi Borrego-Écija is a recipient of the Joan Rodés-Josep Baselga grant from the FBBVA.

**Data availability** Anonymized data will be shared upon reasonable request from any qualified investigator if approved by the local Research Ethics Committee.

## Declarations

**Conflicts of interest** RSV has served in Advisory Boards Meetings for Wave Life Sciences, Ionis, and Novo Nordisk and received personal fees for participating in educational activities from Janssen, Roche Diagnostics, and Neuroxpharma and funding to her institution for Investigator Initiated studies from Biogen and Sage Pharmaceuticals. The rest of the authors report no relevant disclosures.

**Ethical approval** The study protocol was approved by the Hospital Clínic de Barcelona Research Ethics Committee (HCB/2019/0600).

## References

- Nichols E, Szeke CEI, Vollset SE et al (2019) Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* 18:88–106. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30403-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30403-4)
- Association A (2018) 2018 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement* 14:367–429. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.001>
- van Maurik IS, Broulikova HM, Mank A et al (2023) A more precise diagnosis by means of amyloid PET contributes to delayed institutionalization, lower mortality, and reduced care costs in a tertiary memory clinic setting. *Alzheimer's Dement* 19:2006–2013. <https://doi.org/10.1002/alz.12846>
- Beach TG, Monsell SE, Phillips LE, Kukull W (2012) Accuracy of the Clinical Diagnosis of Alzheimer Disease at National Institute on aging alzheimer disease centers, 2005–2010. *J Neuropathol Exp Neurol* 71:266–273. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31824b211b>
- Albert MS, DeKosky ST, Dickson D et al (2011) The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the national institute on aging-Alzheimer's association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* 11:96–106. <https://doi.org/10.1176/appi.focus.11.1.96>
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H et al (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* 7:263–269. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>

7. Jack CR, Andrews JS, Beach TG et al (2024) Revised criteria for diagnosis and staging of Alzheimer's disease: Alzheimer's Association Workgroup. *Alzheimers Dement*. <https://doi.org/10.1002/alz.13859>
8. Jack CR Jr, Bennett DA, Blennow K et al (2018) NIA-AA research framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 14:535–562. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>
9. Chiotis K, Saint-Aubert L, Boccardi M et al (2017) Clinical validity of increased cortical uptake of amyloid ligands on PET as a biomarker for Alzheimer's disease in the context of a structured 5-phase development framework. *Neurobiol Aging* 52:214–227. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.07.012>
10. Leuzy A, Ashton NJ, Mattsson-Carlgrén N et al (2021) 2020 update on the clinical validity of cerebrospinal fluid amyloid, tau, and phospho-tau as biomarkers for Alzheimer's disease in the context of a structured 5-phase development framework. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 48:2121–2139. <https://doi.org/10.1007/s00259-021-05258-7>
11. Olsson B, Lautner R, Andreasson U et al (2016) CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 15:673–684. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00070-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00070-3)
12. Ossenkoppele R, van der Kant R, Hansson O (2022) Tau biomarkers in Alzheimer's disease: towards implementation in clinical practice and trials. *Lancet Neurol* 21:726–734. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(22\)00168-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(22)00168-5)
13. Gonzalez-Ortiz F, Kac PR, Brum WS et al (2023) Plasma phospho-tau in Alzheimer's disease: towards diagnostic and therapeutic trial applications. *Mol Neurodegener* 18:1–12. <https://doi.org/10.1186/s13024-023-00605-8>
14. Hansson O, Edelmayer RM, Boxer AL et al (2022) The Alzheimer's Association appropriate use recommendations for blood biomarkers in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. <https://doi.org/10.1002/alz.12756>
15. Karikari TK, Ashton NJ, Brinkmalm G et al (2022) Blood phospho-tau in Alzheimer disease: analysis, interpretation, and clinical utility. *Nat Rev Neurol* 18:400–418. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00665-2>
16. Thijssen EH, La Joie R, Strom A et al (2021) Plasma phosphorylated tau 217 and phosphorylated tau 181 as biomarkers in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration: a retrospective diagnostic performance study. *Lancet Neurol* 20:739–752. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00214-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00214-3)
17. Palmqvist S, Janelidze S, Quiroz YT et al (2020) Discriminative accuracy of plasma phospho-tau217 for Alzheimer disease vs other neurodegenerative disorders. *JAMA J Am Med Assoc* 324:772–781. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.12134>
18. Mielke MM, Dage JL, Frank RD et al (2022) Performance of plasma phosphorylated tau 181 and 217 in the community. *Nat Med* 28:1398–1405. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01822-2>
19. Altomare D, Stampacchia S, Ribaldi F et al (2023) Plasma biomarkers for Alzheimer's disease: a field-test in a memory clinic. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 94:420–427. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2022-330619>
20. Karikari TK, Pascoal TA, Ashton NJ et al (2020) Blood phosphorylated tau 181 as a biomarker for Alzheimer's disease: a diagnostic performance and prediction modelling study using data from four prospective cohorts. *Lancet Neurol* 19:422–433. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30071-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30071-5)
21. Sarto J, Ruiz-García R, Guillén N et al (2022) Diagnostic performance and clinical applicability of blood-based biomarkers in a prospective memory clinic cohort. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000201597.10.1212/wnl.0000000000201597>
22. Sarto J, Esteller-Gauxax D, Tort-Merino A et al (2023) Impact of demographics and comorbid conditions on plasma biomarkers concentrations and their diagnostic accuracy in a memory clinic cohort. *J Neurol*. <https://doi.org/10.1007/s00415-023-12153-8>
23. Ashton NJ, Brum WS, Di Molfetta G et al (2024) Diagnostic accuracy of a plasma phosphorylated tau 217 immunoassay for Alzheimer disease pathology. *JAMA Neurol*. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2023.5319>
24. Barthélemy NR, Salvadó G, Schindler SE et al (2024) Highly accurate blood test for Alzheimer's disease is similar or superior to clinical cerebrospinal fluid tests. *Nat Med*. <https://doi.org/10.1038/s41591-024-02869-z>
25. Brum WS, Cullen NC, Janelidze S et al (2023) A two-step workflow based on plasma p-tau217 to screen for amyloid  $\beta$  positivity with further confirmatory testing only in uncertain cases. *Nat Aging* 3:1079–1090. <https://doi.org/10.1038/s43587-023-00471-5>
26. Simrén J, Leuzy A, Karikari TK et al (2021) The diagnostic and prognostic capabilities of plasma biomarkers in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* 17:1145–1156. <https://doi.org/10.1002/alz.12283>
27. Planche V, Bouteloup V, Pellegrin I et al (2023) Validity and performance of blood biomarkers for Alzheimer disease to predict dementia risk in a large clinic-based cohort. *Neurology* 100:E473–E484. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000201479>
28. Chouliaras L, Thomas A, Malpetti M et al (2022) Differential levels of plasma biomarkers of neurodegeneration in Lewy body dementia, Alzheimer's disease, frontotemporal dementia and progressive supranuclear palsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2021-327788>. (JNPN-2021-327788)
29. Brickman AM, Manly JJ, Honig LS et al (2021) Plasma p-tau181, p-tau217, and other blood-based Alzheimer's disease biomarkers in a multi-ethnic, community study. *Alzheimer's Dement* 17:1353–1364. <https://doi.org/10.1002/alz.12301>
30. Ashton NJ, Janelidze S, Mattsson-Carlgrén N et al (2022) Differential roles of A $\beta$ 42/40, p-tau231 and p-tau217 for Alzheimer's trial selection and disease monitoring. *Nat Med*. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02074-w>
31. Gonzalez-Ortiz F, Ferreira PCL, González-Escalante A et al (2023) A novel ultrasensitive assay for plasma p-tau217: performance in individuals with subjective cognitive decline and early Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. <https://doi.org/10.1002/alz.13525>
32. Jack CR, Wiste HJ, Algeciras-Schimnich A et al (2023) Predicting amyloid PET and tau PET stages with plasma biomarkers. *Brain* 146:2029–2044. <https://doi.org/10.1093/brain/awad042>
33. Ashton NJ, Puig-Piñó A, Milà-Alomà M et al (2023) Plasma and CSF biomarkers in a memory clinic: head-to-head comparison of phosphorylated tau immunoassays. *Alzheimer's Dement* 19:1913–1924. <https://doi.org/10.1002/alz.12841>
34. Bayoumy S, Verberk IMW, den Dulk B et al (2021) Clinical and analytical comparison of six Simoa assays for plasma P-tau isoforms P-tau181, P-tau217, and P-tau231. *Alzheimer's Res Ther*. <https://doi.org/10.1186/s13195-021-00939-9>
35. Salvadó G, Ossenkoppele R, Ashton NJ et al (2023) Specific associations between plasma biomarkers and postmortem amyloid plaque and tau tangle loads. *EMBO Mol Med* 15:1–16. <https://doi.org/10.15252/emmm.202217123>
36. Pichet Binette A, Janelidze S, Cullen N et al (2022) Confounding factors of Alzheimer's disease plasma biomarkers and their impact on clinical performance. *Alzheimer's Dement*. <https://doi.org/10.1002/alz.12787>
37. Lehmann S, Schraen-Maschke S, Vidal JS et al (2023) Plasma phosphorylated tau 181 predicts amyloid status and conversion to dementia stage dependent on renal function. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 94:411–419. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2022-330540>

38. Zhang B, Zhang C, Wang Y et al (2023) Effect of renal function on the diagnostic performance of plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1150510>
39. Janelidze S, Barthélemy NR, He Y et al (2023) Mitigating the associations of kidney dysfunction with blood biomarkers of Alzheimer disease by using phosphorylated tau to total tau ratios. *JAMA Neurol.* <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2023.0199>
40. McKeith IG, Boeve BF, Dickson DW et al (2017) Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies. *Neurology* 89:88–100. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004058>
41. Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D et al (2011) Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain* 134:2456–2477. <https://doi.org/10.1093/brain/awr179>
42. Armstrong MJ, Litvan I, Lang AE et al (2013) Criteria for the diagnosis of corticobasal degeneration. *Neurology* 80:496–503. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31827f0fd1>
43. Höglinger GU, Respondek G, Stamelou M et al (2017) Clinical diagnosis of progressive supranuclear palsy: the movement disorder society criteria. *Mov Disord* 32:853–864. <https://doi.org/10.1002/mds.26987>
44. Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S et al (2011) Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology* 76:1006–1014. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31821103e6>
45. Hansson O, Blennow K, Zetterberg H, Dage J (2023) Blood biomarkers for Alzheimer's disease in clinical practice and trials. *Nat Aging* 3:506–519. <https://doi.org/10.1038/s43587-023-00403-3>
46. Palmqvist S, Tideman P, Mattsson-Carlgren N et al (2024) Blood biomarkers to detect Alzheimer disease in primary care and secondary care. *JAMA* 20502:1–13. <https://doi.org/10.1001/jama.2024.13855>
47. Ossenkoppele R, Schonhaut DR, Schöll M et al (2016) Tau PET patterns mirror clinical and neuroanatomical variability in Alzheimer's disease. *Brain* 139:1551–1567. <https://doi.org/10.1093/brain/aww027>
48. Vromen EM, De Boer SCM, Teunissen CE et al (2023) Biomarker A+T-: is this Alzheimer's disease or not? A combined CSF and pathology study. *Brain* 146:1166–1174. <https://doi.org/10.1093/brain/awac158>
49. Sims JR, Zimmer JA, Evans CD et al (2023) Donanemab in early symptomatic Alzheimer disease. *JAMA* 330:512. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.13239>
50. Groot C, Smith R, Stomrud E et al (2022) Phospho-tau with sub-threshold tau-PET predicts increased tau accumulation rates in amyloid-positive individuals. *Brain* 146:1580–1591. <https://doi.org/10.1093/brain/awac329>
51. Feizpour A, Doecke JD, Doré V et al (2024) Detection and staging of Alzheimer's disease by plasma pTau217 on a high throughput immunoassay platform. *eBioMedicine* 109:105405. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2024.105405>

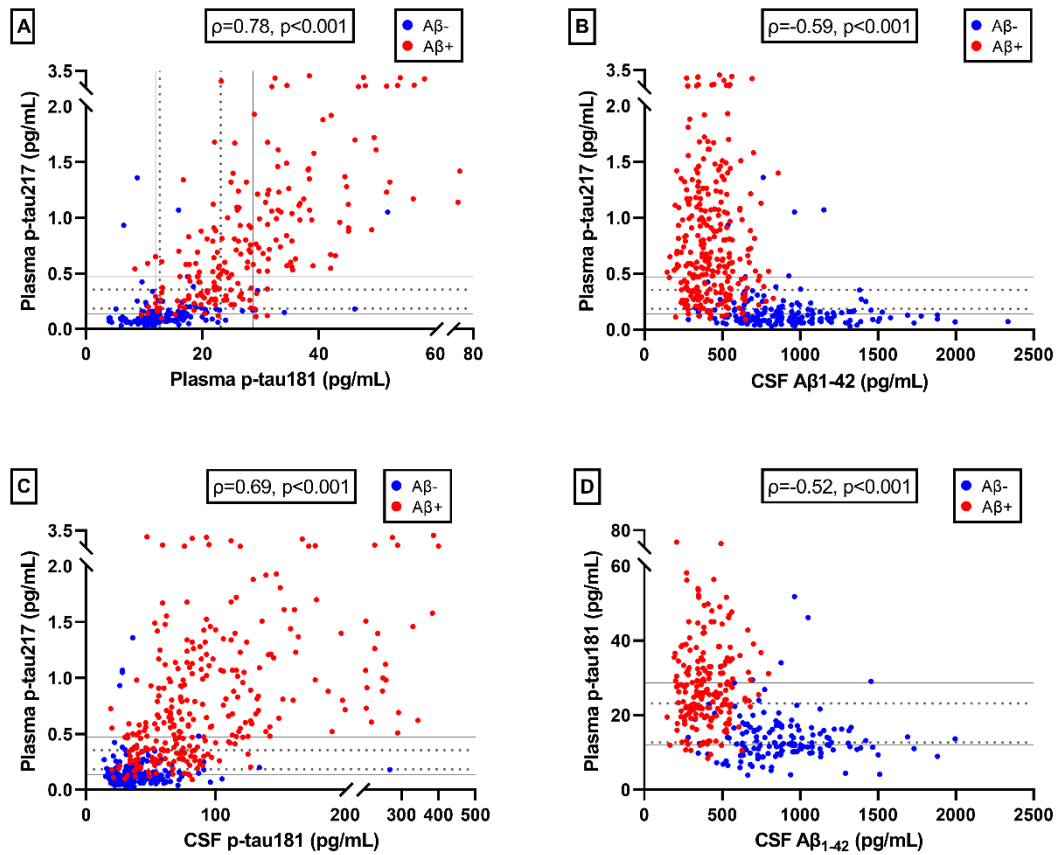
Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

**Online resource 1** Demographic, cognitive, laboratory and biomarkers characteristics according to etiological diagnosis

	SND (n=92)	AD (n=256)	LBD (n=50)	FTD (n=70)	p-value <sup>e</sup>
Age (years)	63.5 (8.3) <sup>b</sup>	67.7 (7.9) <sup>a</sup>	67.3 (6.8)	65.9 (7.8)	P<0.001
Disease duration (years)	3.1 (3.0)	2.9 (2.1)	3.1 (2.4)	3.4 (2.6)	NS
Sex (female)	38 (41.3%) <sup>b,c</sup>	145 (56.6%) <sup>a,c</sup>	13 (26.0%) <sup>a,b,d</sup>	36 (51.4%) <sup>c</sup>	p<0.001
Education (years)	10.8 (5.0)	10.2 (4.6)	11.7 (4.6)	11.2 (4.3)	NS
MMSE	25.8 (4.5) <sup>b,d</sup>	22.5 (4.3) <sup>a</sup>	25.8 (2.5)	24.4 (4.4) <sup>a</sup>	p<0.001
APOE ε4 carriers	11 (15.9%) <sup>b</sup>	130 (56.8%) <sup>a,d</sup>	13 (36.1%)	12 (26.1%) <sup>b</sup>	p<0.001
BMI	26.9 (4.7) <sup>b</sup>	25.3 (3.9) <sup>a,c</sup>	27.3 (4.3) <sup>b</sup>	26.7 (4.2)	p=0.003
eGFR (mL/min)	83.1 (9.4)	79.7 (12.8)	79.0 (12.6)	78.1 (15.2)	NS
CSF Aβ1-42 (pg/mL)	936.6 (318.2) <sup>b,c,d</sup>	415.3 (126.8) <sup>a,c,d</sup>	657.6 (311.9) <sup>a,b,d</sup>	812.8 (244.9) <sup>a,b,c</sup>	p<0.001
CSF p-tau181 (pg/mL)	39.3 (15.0) <sup>b</sup>	107.2 (67.4) <sup>a,c,d</sup>	40.9 (16.6) <sup>b</sup>	38.7 (15.3) <sup>b</sup>	p<0.001
Aβ positive <sup>f</sup>	0 (0.0%) <sup>b,c,d</sup>	256 (100.0%) <sup>a,c,d</sup>	19 (38.0%) <sup>a,b,d</sup>	11 (15.7%) <sup>a,b,c</sup>	p<0.001
T positive <sup>f</sup>	7 (7.6%) <sup>b</sup>	192 (75.0%) <sup>a,c,d</sup>	3 (6.0%) <sup>b</sup>	10 (14.3%) <sup>b</sup>	p<0.001
A-T-	85 (92.4%)	0 (0.0%)	29 (58.0%)	51 (72.9%)	NA
A-T+	7 (7.6%)	0 (0.0%)	2 (4.0%)	8 (11.4%)	NA
A+T-	0 (0.0%)	64 (25.0%)	18 (36.0%)	9 (12.9%)	NA
A+T+	0 (0.0%)	192 (75.0%)	1 (2.0%)	2 (2.9%)	NA
Plasma p-tau217 (pg/mL)	0.116 (0.130) <sup>b</sup>	0.884 (0.653) <sup>a,c,d</sup>	0.213 (0.197) <sup>b</sup>	0.259 (0.495) <sup>b</sup>	p<0.001 <sup>g</sup>
Plasma p-tau181 (pg/mL)	12.28 (4.24) <sup>b,c</sup>	28.79 (11.18) <sup>a,c,d</sup>	18.19 (9.44) <sup>a,b,d</sup>	14.94 (10.16) <sup>b,c</sup>	p<0.001 <sup>g</sup>

Data are shown as mean (standard deviation) or number (percent). MMSE was missing for 90 participants, APOE genotype for 88 subjects, BMI for 82 individuals, eGFR for 8 and plasma p-tau181 in 122 patients. <sup>a</sup>Significantly different from SND. <sup>b</sup>Significantly different from AD. <sup>c</sup>Significantly different from LBD. <sup>d</sup>Significantly different from FTD. <sup>e</sup>Comparison between etiological diagnostic groups. <sup>f</sup>Aβ and T status (negative/positive) were defined by local CSF cut-offs. <sup>g</sup>Comparison of plasma biomarkers per group were adjusted for age and sex. **Abbreviations:** Aβ, amyloid beta; MMSE, Mini-Mental State Examination; BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate; CSF, cerebrospinal fluid; T, Alzheimer-type tauopathy; p-tau181, tau phosphorylated at threonine 181; p-tau217, tau phosphorylated at threonine 217; NS, not statistically significant; NA, not applicable.

**Online resource 2** Scatterplots of plasma p-tau181 and p-tau217 with CSF biomarkers and between both plasma biomarkers.



Scatter plots show the distribution of both plasma biomarkers (A), of plasma p-tau217 with CSF Aβ<sub>1-42</sub> (B) and CSF p-tau181 (C) and of plasma p-tau181 with CSF Aβ<sub>1-42</sub> (D). Patients were color-coded for the cerebrospinal fluid-defined amyloid beta status group (blue color for amyloid negative and red color for amyloid positive). Correlations for each pair of biomarkers (ρ) were tested with Spearman's rank correlation test. Four horizontal lines were plotted for each biomarker, the lower discontinuous and continuous ones corresponding to a cut-off with 95% and 97.5% sensitivity, respectively, and the higher discontinuous and continuous ones to a cut-off with 95% and 97.5% specificity, respectively, for amyloid status discrimination. In some cases, the axis scale was adjusted for visualization purposes. **Abbreviations:** Aβ, amyloid beta; CSF, cerebrospinal fluid; p-tau181, tau phosphorylated at threonine 181; p-tau217, tau phosphorylated at threonine 217.

**Online resource 3** Algorithms evaluating the performance of plasma p-tau217 and p-tau181 for cerebrospinal fluid-defined amyloid status prediction in individuals with both plasma biomarkers measured

Algorithm	Plasma p-tau217		Plasma p-tau181	
	Lenient (95%)	Strict (97.5%)	Lenient (95%)	Strict (97.5%)
Lower cut-off (pg/mL)	0.179	0.139	12.68	11.96
Sensitivity (%)	95	97.5	95	97.5
False negatives (n), NPV (%)	11, 91.7%	6, 94.3%	11, 87.9%	7, 90.1%
Patients below cut-off/low A $\beta$ probability group (n, %)	133, 38.4%	105, 30.3%	91, 26.3%	71, 20.6%
Higher cut-off (pg/mL)	0.349	0.471	23.16	28.69
Specificity (%)	95	97.5	95	97.5
False positives (n), PPV (%)	7, 95.5%	4, 97.3%	8, 94.0%	5, 94.3%
Patients above cut-off/high A $\beta$ probability group (n, %)	157, 45.4%	138, 39.9%	133, 38.4%	88, 25.4%
Patients between cut-offs/intermediate A $\beta$ probability group (n, %)	56, 16.2%	103, 29.8%	122, 35.3%	187, 54.0%
Further testing spared (n, %)	290, 83.8%	243, 70.2%	224, 64.7%	159, 46.0%
Accuracy (%)	93.8	95.9	91.5	92.5

Table shows the performance of a two-cut-off approach for predicting amyloid beta status with p-tau217 and p-tau181, one lower with 95% and 97.5% sensitivity and one higher with 95% and 97.5% specificity, respectively, stratifying patients into low, intermediate or high probability of A $\beta$  positivity groups. Accuracy was calculated as true negatives in the Low A $\beta$  probability group + true positives in the High group divided by the total number of patients in the Low + High groups. **Abbreviations:** NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; A $\beta$ , CSF-defined amyloid beta status.

## V. DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

Los estudios de esta tesis doctoral pretenden analizar el rendimiento y potencial aplicabilidad clínica de los biomarcadores plasmáticos (BP) en la práctica clínica diaria en un centro especializado en deterioro cognitivo. En el momento de inicio de la tesis doctoral, existía evidencia preliminar muy prometedora sobre los BP para su uso como herramientas diagnósticas accesibles, relativamente baratas y mínimamente invasivas en personas con deterioro cognitivo. La principal limitación de dichos estudios era que habían estado realizados en cohortes de investigación, altamente seleccionadas y con una menor frecuencia de pacientes con heterogeneidad sociocultural, comorbilidades y presentaciones clínicas que no eran enteramente representativas de la población general. Además, debido a la misma idiosincrasia del desarrollo de cualquier biomarcador, estos primeros estudios estaban realizados mediante ensayos *in-house*, es decir, no disponibles comercialmente. Estos dos factores constituían las principales brechas de conocimiento de los BP, sobre la cual se enmarca la presente tesis. Mediante el estudio de una cohorte prospectiva, incluyendo a todos los pacientes a quienes se realizó una primera visita durante un periodo de tiempo determinado en un centro especializado de deterioro cognitivo, la Unitat d'Alzheimer i altres Trastorns Cognitius (UATC) del Hospital Clínic de Barcelona, se ha pretendido estudiar la capacidad y precisión diagnóstica de la etiología del deterioro cognitivo de cinco BP. Debido a la metodología empleada, prospectiva y de práctica clínica habitual, al no haberse realizado ningún procedimiento adicional a los protocolos diagnóstico-terapéuticos asistenciales habituales en la UATC que pudieran generar un sesgo significativo (BP analizados de forma ciega al diagnóstico etiológico y sindrómico de cada paciente por su neurólogo/a tratante), los datos y análisis resultantes se pueden considerar altamente generalizables a poblaciones similares.

Además, debido a la alta capacidad de generalización y transferibilidad de los resultados a la práctica clínica habitual, se han pretendido estudiar, a través de distintos modelos con varios BP y factores, algoritmos -proponiendo puntos de corte específicos- que ayuden al facultativo en el diagnóstico y manejo clínico de pacientes individuales en tres supuestos clínicos

frecuentemente encontrados en la práctica clínica diaria: i. Discriminación de estatus amiloide ( $A\beta^-$  vs  $A\beta^+$ ) definido por los biomarcadores disponibles hasta la fecha (LCR y PET amiloide), ii. Diagnóstico de DFT (espectro de DFT vs diagnóstico alternativo) y iii. Identificación de etiologías neurodegenerativas de deterioro cognitivo (EA, DCLw o DFT vs diagnóstico alternativo). El escenario clínico i. se ha estudiado en los trabajos 1 y 3 (y en menor medida en el 2), mientras que los números ii. y iii. se han estudiado en el trabajo 1. Dado que los BP son proteínas derivadas del sistema nervioso central, pero medidas en sangre, disueltas en una miríada de otras proteínas, los estudios 2 y 3 analizan qué factores, más allá de la presencia o ausencia de patología neurodegenerativa concreta, impactan en la concentración de los BP y en su precisión diagnóstica para discriminación de estado amiloide. Finalmente, dados los resultados de los estudios 1 y 2, donde se demuestra que p-tau181 es el BP con mayor aplicabilidad clínica para discriminación de estado amiloide y con potencial para evitar la realización de muchas punciones lumbares y PET de amiloide, a la creciente literatura donde se propone p-tau217 como BP con similar o mayor rendimiento diagnóstico a p-tau181 y a la reciente disponibilidad de p-tau217 en un ensayo comercial, el estudio 3 pretende comparar ambos epítomos y proponer algoritmos para la implementación en la práctica clínica habitual.

En la práctica clínica habitual, ante un paciente con deterioro cognitivo, es primordial establecer un diagnóstico etiológico certero y de forma precoz, ya que éste determinará el pronóstico, necesidad de pruebas complementarias adicionales, manejo clínico y tratamiento farmacológico y no farmacológico. Debido a que la EA es la etiología más frecuente de deterioro cognitivo y demencia en nuestro medio, a la disponibilidad de tratamiento no farmacológico y farmacológico específico para esta enfermedad (inhibidores de la acetilcolinesterasa y memantina), a los avances en investigación en forma de ensayos clínicos de potenciales FME y a los primeros FME que se empezarán a usar en nuestro país a corto plazo, sumado a la relativamente baja correlación clínico-patológica de un diagnóstico sin biomarcadores específicos, especialmente en fases iniciales, el escenario clínico más habitual en que nos encontramos en los centros especializados de memoria es el de discriminar si un paciente está dentro del *continuum* de la EA (*i.e.*, la etiología de su deterioro cognitivo es debida, al menos en gran parte, a la EA). Para ello, actualmente se dispone de biomarcadores específicos en LCR o PET de amiloide. En los 3 estudios de la presente tesis, se ha pretendido estudiar la potencial utilidad de los BP como herramientas diagnósticas para la discriminación

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

de pacientes con evidencia biológica de proceso fisiopatológico de Alzheimer ( $A\beta^-$  vs  $A\beta^+$ , definidos mediante LCR o PET de amiloide) y establecer algoritmos de manejo individualizados para cada paciente y, para ello, se han estudiado en una cohorte de práctica clínica habitual en la UATC, es decir, en la que no se han realizado más pruebas diagnósticas distintas a las realizadas de forma asistencial habitual.

Los estudios 1 y 2 muestran una buena sensibilidad de p-tau181 y GFAP para identificar a aquellos sujetos dentro del proceso fisiopatológico de la EA (i.e.,  $A\beta^+$ ), además de una buena especificidad para diferenciarlos de aquellos sujetos  $A\beta^-$ , hallazgos en línea con los resultados de la literatura hasta la fecha.(99,108,110,111,117,129) Esta capacidad discriminativa es aún mayor cuando se compara pacientes con diagnóstico clínico-biológico de EA con controles y etiologías no neurodegenerativas de deterioro cognitivo, pero manteniéndose una tendencia a estar más elevadas sus concentraciones en el caso de copatología de EA con DCLw y DFT ( $DCLw-A\beta^+$  y  $DFT-A\beta^+$  vs  $DCLw-A\beta^-$  y  $DFT-A\beta^-$ ), hecho observado en los estudios 1, 2 y 3. Por tanto, p-tau181 y GFAP serían útiles para identificar la presencia o ausencia de amiloidosis cerebral, sea en la EA o como copatología asociada a DCLw y DFT, de forma similar a lo que ocurre con los biomarcadores específicos de EA en LCR o con el PET de amiloide. Estos resultados de p-tau181 y GFAP como marcadores de proceso fisiopatológico de EA son similares a otros estudios, a excepción de un estudio en que se observa un aumento de GFAP en el grupo de DCLw independientemente de copatología  $A\beta$  medida por PET de amiloide, sugiriendo una elevación diferencial de este biomarcador plasmático específica de DCLw,(111) y de otro en que se observa elevación específica de GFAP en DLFT-tau en comparación con DLFT-TDP43.(130) Esta elevación diferencial de GFAP en DCLw y DLFT-tau no ha sido observada en nuestros estudios, probablemente por el relativo bajo número de sujetos con DCLw y de DFT con mutación patogénica o confirmación neuropatológica que permita diferenciar la patología subyacente.

En los estudios 1 y 2, los NfL en plasma se encuentran muy elevados en el espectro de la DFT y leve-moderadamente elevados en el grupo EA, en comparación con los niveles bajos similares a controles  $A\beta^-$  de los grupos de etiologías NND de deterioro cognitivo y DCLw, en consonancia con la literatura.(111,132,140) Esta elevación diferencial resulta en una buena capacidad discriminativa de los NfL para identificar pacientes con DFT, siendo menor en el caso de pacientes con EA o copatología  $A\beta$ , al estar en estos casos también elevados los NfL.

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

Por contra, los NfL son claramente inferiores a p-tau181 y GFAP para discriminación del estado amiloide: en el estudio 1 con una AUC inferior y exclusión en los modelos de regresión logística binaria parsimoniosos en favor de otras variables y otros BP y en el estudio 2 en un menor impacto del estado amiloide definido por biomarcadores ( $A\beta^-$  vs  $A\beta^+$ ) en la concentración de los NfL en los modelos de regresión lineal comparado con p-tau181 y GFAP (betas estandarizados de 0,161 vs 0,658 y 0,502, respectivamente).

Los BP UCH-L1 y t-tau demostraron un mal rendimiento para el diagnóstico sindrómico y etiológico del deterioro cognitivo y para la detección del proceso fisiopatológico de la EA, mostrando una superposición en sus concentraciones entre grupos y sin una aplicabilidad previsible en la práctica clínica diaria, por lo que ante estos resultados en el estudio 1 se decidió no cuantificarlos en los nuevos pacientes para los siguientes estudios. Estos hallazgos son similares a otros trabajos,(103,117,119,140) aunque recientes estudios sugieren que la determinación de t-tau mediante inmunoensayos dirigidos a regiones N-terminales (NTA) o a la región de unión a microtúbulos (MTBR) de tau podrían tener, al estar elevados de forma específica en personas dentro del *continuum* de la EA pero en fases más avanzadas y con una mayor correlación con la clínica, utilidad pronóstica y para predicción de PET de tau en comparación con p-tau181, p-tau217 y p-tau231, para selección de individuos para inclusión en ensayos clínicos y/o indicación de tratamiento con FME una vez estén aprobados.(46,126,143,144)

Los cinco BP estuvieron diferencialmente elevados en los cuatro casos de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en el trabajo 1, especialmente NfL, t-tau y UCH-L1, en probable relación con la masiva y rápida muerte neuronal asociada a esta enfermedad. Debido al bajo número de pacientes en nuestra cohorte con este diagnóstico, lo que imposibilita un análisis robusto de los BP en esta enfermedad y a la existencia de criterios y pruebas diagnósticas (como el RT-QuIC de proteína priónica) sensibles y específicos, se decidió excluir a pacientes con esta enfermedad de los siguientes análisis y trabajos, aunque GFAP y NfL plasmáticos han demostrado potencial utilidad como biomarcadores de inicio de la fase sintomática en enfermedades priónicas genéticas, lo que debe explorarse en futuros estudios diseñados para este fin.(145,146)

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

Conocida la distribución entre grupos diagnósticos de los BP en una cohorte habitual, para estudiar la aplicabilidad clínica de estos biomarcadores, hay que analizar qué BP o combinación de BP entre ellos y con otras variables clínicas y de laboratorio es el óptimo para cada escenario clínico diagnóstico concreto. Una vez conocidos cuáles son, el último paso previo a la implementación clínica es el de diseñar algoritmos con puntos de corte específicos que guíen al personal médico tratante en el diagnóstico y manejo clínico de cada paciente de forma individualizada.

En el caso de la DCLw, ningún BP, solo o en combinación con otros BP y otras variables, tuvo un rendimiento aceptable en los modelos de regresión logística binaria ni en los algoritmos estudiados para identificar de forma suficientemente específica y sensible a aquellos pacientes con un diagnóstico de DCLw. Esto probablemente se deba en gran parte, tal y como se ha mencionado previamente, al hecho de que p-tau181 y GFAP identifican la presencia o ausencia de copatología A $\beta$  pero no la alfa-sinucleína (patología subyacente específica de la DCLw) y a que los NfL no se encuentran diferencialmente elevados en la DCLw en comparación con etiologías no neurodegenerativas y controles. Por tanto, consideramos que los BP estudiados no tienen utilidad práctica para implementación clínica en el diagnóstico de DCLw más allá de identificar la presencia de copatología por beta-amiloide.(73,74,76,147)

En el estudio 1 se analizó la utilidad clínica potencial de los biomarcadores plasmáticos para predicción individual del diagnóstico de demencia frontotemporal (DFT vs diagnóstico alternativo). El modelo parsimonioso de la regresión logística binaria (aquel que minimiza el número de variables predictoras, maximizando el poder explicativo de ellas) identificó como variables óptimas para este fin p-tau181 y NfL plasmáticos. Teniendo en cuenta los resultados del estudio, esto se explica probablemente debido a que NfL discriminaría de forma óptima a pacientes con diagnóstico de DFT de sujetos controles y con enfermedades NND (AUCs 0.90-0.93), siendo el rendimiento menor usando este BP en la comparación DFT con EA y DCLw (probablemente en parte debido a la elevada frecuencia de copatología A $\beta$ ), al estar los NfL discretamente elevados también en el caso de presencia de proceso fisiopatológico de Alzheimer y resultando en AUCs 0.79-0.82. P-tau181 cobraría importancia para la identificación de proceso fisiopatológico de Alzheimer. Combinando ambos BP y con el objetivo de mejorar la predicción individual de pacientes concretos, proponemos un algoritmo en que se usaría el punto de corte de NfL que mejor discrimina DFT de NND, pero cuando p-

tau181 plasmático estuviera elevado (sospecha de EA o proceso fisiopatológico de Alzheimer), se usaría la ratio NfL/p-tau181. De esta manera, se mejoraría la precisión en el diagnóstico de DFT en casos A $\beta$  positivos, ya que una ratio NfL/p-tau181 elevado sugeriría un incremento desproporcionado de NfL en comparación con el grado de elevación de p-tau181 que iría a favor del diagnóstico de DFT, mientras que una ratio baja implicaría una elevación “esperable” de NfL dentro del *continuum* del Alzheimer, sin evidencia de DFT. La aplicación de este algoritmo para diagnóstico diferencial de DFT resultó en una S y E del 82 y 85%, respectivamente, con un alto VPN y bajo VPP en la subcohorte con biomarcadores específicos de EA (LCR o PET de amiloide) y en una elevada S y VPN pero baja E y VPP en la subcohorte sin biomarcadores específicos. Estos resultados son prometedores, demostrando una potencial aplicabilidad clínica de p-tau181 y NfL para el diagnóstico de DFT en un centro especializado de memoria, pero deben interpretarse con cautela, al haber un relativo bajo número de pacientes con diagnóstico de DFT en nuestra cohorte prospectiva (dada la baja prevalencia de esta entidad en comparación con otras etiologías como la EA) y al haberse usado el grupo “DFT” como un término general que aúna distintas entidades clínico-patológicas. Por tanto, se considera que antes de su aplicación clínica rutinaria son necesarios más estudios “enriquecidos” en pacientes con DFT y fenocopias y con una caracterización fenotípica, biológica y genética exhaustiva que permita validar los resultados del estudio 1 y explorar el contexto de uso de los BP, así como estudiar el potencial impacto de las comorbilidades y factores confusores. Debido a que la presente tesis se ha centrado en el estudio de una cohorte de práctica clínica real, se decidió no incluir estudios centrados específicamente en pacientes con DFT, no realizándose en los trabajos 2 y 3 análisis concretos en estos pacientes, pero abriéndose interesantes líneas de investigación futuras.

Al igual que ocurre con otras enfermedades prevalentes, como la diabetes mellitus, la emergencia de los BP plantea su potencial uso como herramientas de cribaje que podrían usarse desde consultas generales de neurología o incluso desde atención primaria para hacer un cribado de aquellos pacientes en que se sospecharía una etiología neurodegenerativa de sus déficits cognitivos para ser derivados a la unidad específica de deterioro cognitivo correspondiente. Esto permitiría reducir la lista de espera de los centros terciarios y aumentaría el acceso de la población a una valoración especializada en pacientes con alta sospecha de etiología neurodegenerativa de sus déficits y cobraría más importancia cuando

los primeros FME estuvieran disponibles. Debido a la metodología prospectiva de nuestra cohorte, en el estudio 1 analizamos el potencial uso de variables clínicas y demográficas y de los BP para discriminar a aquellos pacientes con etiologías NND de las neurodegenerativas (EA, DCLw, DFT). Para este fin, el modelo parsimonioso identificó a p-tau181, NfL y APOE como las variables con mejor explicación del modelo, en orden decreciente. Los NfL, al estar a nivel grupal más elevados en etiologías neurodegenerativas en comparación con NND, se han propuesto como potencialmente útiles para esta discriminación en estudios previos,(132,133) pero en nuestro estudio su rendimiento fue demasiado bajo como para proponer su uso como único BP en el cribaje (AUC 0.83, similar al modelo únicamente con variables clínicas y demográficas sin BP). Este rendimiento de NfL, algo inferior al esperado, puede ser debido al hecho de que en los pacientes con DCLw los NfL están en valores similares a NND, a que en pacientes con EA, a pesar de estar los NfL ligeramente elevados, hay cierta superposición con los niveles de NfL en NND y al mayor rendimiento observado en estudios previos si se definen puntos de corte dependiendo de la edad (<65 años).(132) En línea con el elevado número de pacientes con EA en nuestra cohorte, p-tau181 mostró utilidad para identificar a aquellos pacientes con etiologías neurodegenerativas, probablemente al identificar a aquellos con EA o copatología A $\beta$ . Combinando NfL y p-tau181 en un algoritmo, en consonancia con lo propuesto en artículos de revisión y recomendaciones de sociedades (aunque no estudiado en cohortes de práctica clínica habitual hasta la fecha),(44,124,148) con el objetivo de identificar a aquellos pacientes con NfL y p-tau181 bajos y por tanto con una alta probabilidad de no tener una etiología neurodegenerativa de su déficit cognitivo y no ser candidatos a derivación para estudio en un centro terciario, se identificaron correctamente el 50% de pacientes con enfermedades NND pero con un 14% de falsos negativos (*i.e.*, pacientes a quien se les diría que no tienen ninguna enfermedad neurodegenerativa y no serían derivados a centro especializado, pero sí la tendrían, lo que retrasaría y dificultaría una valoración y diagnóstico especializado, precoz y certero). Por tanto, consideramos que actualmente con estos resultados no estaría indicado el uso de estos BP como cribado de enfermedades neurodegenerativas desde atención primaria o neurología general a centros especializados, debido al grado inaceptable de falsos negativos que tendría el algoritmo, tratándose de un método de cribaje donde es primordial un número muy bajo de falsos negativos. Estos resultados, prometedores, aunque subóptimos, abren la puerta a futuros estudios centrados en cohortes de deterioro cognitivo en atención primaria, donde se estudien distintos BP y

variables clínicas y demográficas en cohortes más representativas que capturen la realidad de la población en este escenario.

La discriminación del estado A $\beta$  (A $\beta$ - vs A $\beta$ +), como se ha mencionado, es el escenario clínico más habitual y con mayor relevancia en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento que nos encontramos en la práctica clínica habitual. Actualmente, el diagnóstico de EA se realiza clínicamente y, en algunos casos y centros concretos, basado en biomarcadores de LCR o PET de amiloide, lo que aumenta la precisión diagnóstica y permite situar a un paciente dentro o fuera del Alzheimer, con las implicaciones de tratamiento y manejo resultantes. Por contra, estos biomarcadores son caros e invasivos, lo que limita la generalización de su uso a la población general. La literatura y análisis entre grupos etiológicos del estudio 1 identifica a GFAP y p-tau181 como BP muy prometedores para la discriminación de estado amiloide (definido por LCR o PET de amiloide). Para la implementación clínica, donde es necesario puntos de corte y algoritmos específicos de uso en cada paciente concreto, se estudiaron mediante modelos de regresión logística binaria varias variables clínicas, demográficas y los cinco BP, identificándose como regresores más importantes p-tau181, GFAP y genotipo APOE. P-tau181 fue el que tuvo mejor rendimiento de forma aislada para discriminar el estado amiloide, resultando en una AUC de 0.91 (vs AUC de 0.82 de GFAP) y una S y E con un punto de corte balanceado del 85%. Esta mayor capacidad discriminativa de p-tau181 en comparación con GFAP va en línea con la literatura,(104,105,108,111,125) a excepción de un estudio donde era mejor el uso de GFAP,(129) aunque en dicho estudio había mayor representación de pacientes asintomáticos, sugiriendo una posible mayor utilidad de GFAP en fases preclínicas y de p-tau181 en fases sintomáticas de la enfermedad.

Dados los buenos resultados de p-tau181 plasmático en comparación con el resto de regresores para discriminación del estado A $\beta$  y en vistas a la utilidad clínica para implementación rutinaria, donde son necesarios algoritmos diagnósticos individualizados para cada paciente, se propone un algoritmo con dos puntos de corte en los tres trabajos, con la intención de que p-tau no sustituya por completo a los biomarcadores específicos de EA, sino que evite la necesidad de su realización en aquellos casos donde se pueda predecir con una fiabilidad elevada el estado A $\beta$ . De esta forma, se establecerían dos puntos de corte de concentración de p-tau plasmático: uno inferior, con una elevada sensibilidad para detectar

pacientes A $\beta$  positivos y otro superior, con elevada especificidad. Aquellos pacientes con p-tau181 por debajo del punto de corte inferior (el grupo de baja probabilidad de amiloidosis cerebral definida por LCR/PET amiloide) tendrían un alto VPN (95% en el trabajo 1) y serían con una alta probabilidad A $\beta$  negativos, mientras que aquellos con concentraciones de p-tau181 por encima del punto de corte superior (grupo de alta probabilidad de amiloidosis) serían probablemente A $\beta$  positivos (VPP 94%) y por tanto se podría establecer con suficiente seguridad su estado A $\beta$  solamente con p-tau181 plasmático y no sería necesario realizar biomarcadores en LCR o PET de amiloide. En cambio, en aquellos casos con p-tau181 entre ambos puntos de corte (la llamada zona gris o grupo de probabilidad intermedia), no se podría establecer con suficiente certeza el estado A $\beta$  solamente con el BP y se podría proceder al estudio en LCR o PET de amiloide como prueba “confirmatoria” en los casos en que se considerase indicado. Con este algoritmo en el trabajo 1, se calcula que se evitarían un 60 % de punciones lumbares/PET de amiloide determinando p-tau181, mientras que el 40 % tendría valores dentro de la zona gris y serían necesarios los biomarcadores de EA. Aplicando este mismo algoritmo en la subcohorte del trabajo 1 donde no se habían realizado biomarcadores de EA se obtuvieron resultados similares, con un 53% de pacientes con concentraciones de p-tau181 fuera de la zona gris.

Ante los resultados del estudio 1, la creciente literatura y el enfoque de la tesis en una cohorte de práctica clínica habitual, los artículos 2 y 3 se centraron en la discriminación del estado A $\beta$  definidos por biomarcadores (PET de amiloide y LCR) mediante BP.

El hecho de que los BP estudiados sean proteínas derivadas del sistema nervioso central, pero medidas periféricamente en sangre, donde están disueltas con otras proteínas y contenidas en un volumen sanguíneo que varía entre personas, hace necesario el estudio de qué factores pueden influir sobre las concentraciones de los BP más allá de la patología neurodegenerativa cerebral concreta, así como el impacto en la precisión diagnóstica de estas potenciales asociaciones. Para ello, en el estudio 2 se analizó la asociación entre una larga lista de potenciales variables confusoras demográficas, analíticas, clínicas y de comorbilidades médicas y toma de medicación con los BP p-tau181, GFAP y NfL. Estos análisis se realizaron en la subcohorte con biomarcadores de EA disponibles (LCR o PET de amiloide) para poder ajustar el potencial impacto de las variables en los BP según el estado amiloide definido por

biomarcadores. La cohorte analizada incluyó a todos los participantes del estudio 1 más aquellos incluidos de forma prospectiva hasta el 31 de diciembre de 2022.

En modelos ajustados por edad, sexo y estado amiloide definido por biomarcadores en LCR o PET de amiloide, solamente el filtrado glomerular (FG) se asoció significativamente a las concentraciones de p-tau181. En el caso de GFAP, la edad, el género, el índice de masa corporal (IMC), el índice de comorbilidad de Charlson y el FG modificaron significativamente su concentración plasmática, mientras que la edad, el volumen sanguíneo y el FG influyeron en los niveles de NfL. A pesar de ello, los coeficientes  $\beta$  de los modelos de regresión lineal estandarizados, como medida del tamaño de la asociación, fueron muy inferiores en las variables confusoras en comparación con el estado A $\beta$  para p-tau181 ( $\beta$  de -0.12 para FG vs 0.69 para estado A $\beta$ +) y GFAP, indicando que, aunque estadísticamente significativa, la asociación de estas variables con los niveles de p-tau181 y GFAP era de mucha menor magnitud que el estado A $\beta$ +. En el caso de los NfL, la magnitud de asociación de la edad, volumen sanguíneo y FG ( $\beta$  0.26, -0.16 y -0.12, respectivamente) fue similar o superior al estado A $\beta$ + ( $\beta$  0.16), hecho debido en parte al menor impacto del proceso fisiopatológico de Alzheimer en los NfL en comparación con p-tau181 y GFAP.

Para estudiar si estas variables confusoras asociadas a los niveles de BP podían tener un impacto en el rendimiento diagnóstico de los BP para la discriminación del estado A $\beta$ , se analizaron distintos modelos de regresión logística binaria con los tres BP con y sin estas variables. Los modelos confirmaron los resultados del estudio 1, siendo p-tau181 el BP con mayor rendimiento diagnóstico para la discriminación del estado A $\beta$ , con S y E del 87% y permitiendo ahorrar la realización de punción lumbar o PET de amiloide en un 62% de los participantes mediante el algoritmo con dos puntos de corte con VPN y VPP del 95 y 96%, respectivamente. Por otra parte, no se modificó la precisión diagnóstica de los modelos para discriminación A $\beta$  al incluir en éstos las variables confusoras (FG, IMC, etc.), ni hubo variación en el algoritmo con dos puntos de corte al excluir aquellos pacientes con insuficiencia renal (FG < 60 mL/min).

Un menor FG también ha sido asociado a concentraciones estadísticamente mayores de p-tau plasmático en otros estudios, probablemente debido a un menor aclaramiento renal de esta proteína plasmática con FG decrecientes.(102,103,112,114–116,149) En tres de estos estudios, el ajuste de los puntos de corte según el FG de cada paciente aumentó la precisión

diagnóstica de p-tau181 para la discriminación del estado amiloide,(102,114,115) mientras que en otros tres trabajos (como ocurre con el nuestro), no hubo cambio en el rendimiento diagnóstico de p-tau181 al ajustar por FG.(103,112,116) En los estudios en que hubo impacto significativo del FG en la precisión diagnóstica de p-tau181, la mayoría de los participantes eran cognitivamente sanos (i.e., controles) y/o el diagnóstico de EA se realizó en base a criterios clínicos, con un bajo porcentaje de disponibilidad de biomarcadores específicos en LCR o PET de amiloide. Por contra, en los otros tres estudios, al igual que en nuestro trabajo, había una predominancia de sujetos sintomáticos y una mayor disponibilidad de biomarcadores específicos de EA. En uno de estos estudios, el FG tuvo un mayor impacto en los niveles de p-tau181 en los pacientes cognitivamente sanos que en aquellos sintomáticos.(116) Con ello, hipotetizamos que en los pacientes que se visitan en centros especializados de deterioro cognitivo, la mayor magnitud de efecto de la patología A $\beta$  en p-tau181 comparada con el FG hace que el efecto confusor de este último sea insignificante en su rendimiento diagnóstico para discriminación de estado A $\beta$ .

Al igual que en nuestro trabajo, el FG también se ha asociado a GFAP y NfL en varios estudios, aunque sin un impacto significativo en la predicción del estatus amiloide de estos BP.(103,112,115,134,136,137,149) Dada la menor utilidad de GFAP y NfL para la discriminación del estatus amiloide comparado con p-tau, debe estudiarse este potencial impacto de FG en sus niveles plasmáticos en los distintos escenarios clínicos donde estos dos BP tengan una mayor utilidad, como son la activación astrocítica para GFAP y el diagnóstico de DFT para los NfL.

El volumen sanguíneo en el que se disuelven las proteínas derivadas del sistema nervioso central puede alterar su concentración plasmática. El IMC y volumen sanguíneo, como marcadores de este volumen en el que se disuelven los BP, se ha asociado sistemáticamente de forma inversa a los niveles de NfL, encontrándose una relación nula o mínima con GFAP y p-tau181,(102,112,117,136) de forma similar a lo que ocurre en nuestro trabajo, no encontrándose relación ni impacto en el rendimiento diagnóstico de p-tau181.

La edad se ha relacionado de forma débil a concentraciones crecientes de p-tau181 y GFAP, especialmente en estudios en pacientes cognitivamente asintomáticos, A $\beta$  negativos o sin biomarcadores específicos de EA, siendo aun menor en pacientes sintomáticos y/o A $\beta$  positivos.(102,114,117,136) Probablemente esto se deba, como con el FG, a la magnitud de

incremento en los niveles de estos dos BP del proceso fisiopatológico de Alzheimer que minimiza el impacto de la edad. En esta línea, en nuestro caso no hay asociación de edad con p-tau181 y ésta es mínima en GFAP, sin cambios en la precisión diagnóstica ni en los puntos de corte al introducir la edad como variable. En cambio, tanto en nuestro trabajo como en la literatura, la edad aumenta significativamente la concentración de NfL, incluso más que el estatus A $\beta$ , habiéndose recomendado incluso puntos de corte específicos según la edad.(117,132,135,136)

En el trabajo 2 no encontramos diferencias en la concentración de p-tau181 ni NfL según el género, en consonancia con estudios similares.(102,117,150) Sí estuvieron aumentados de forma leve los niveles de GFAP en mujeres, aunque sin un impacto en la discriminación A $\beta$  al ajustar por género, resultados también observados en un estudio reciente.(149) No se encontraron otros factores o variables confusoras que modificaran las concentraciones de p-tau181, GFAP ni NfL más allá del proceso fisiopatológico de Alzheimer, al igual que en un estudio similar.(112) En otros estudios, se encontró evidencia de asociación de hipertensión, ictus o infarto de miocardio reciente con p-tau181,(102) diabetes con GFAP(149) y diabetes, ictus o infarto de miocardio reciente, fibrilación auricular, hipertensión y cáncer activo con NfL,(134) aunque a diferencia de nuestro estudio, en éstos la mayoría eran pacientes cognitivamente sanos y/o sin biomarcadores de Alzheimer.

Así pues, los resultados del estudio 2 sugieren que, a pesar de que ciertos factores como el FG puedan modificar los niveles de los BP, la magnitud de asociación de éstos con los BP es mucho menor que la presencia del proceso fisiopatológico de Alzheimer (positividad A $\beta$ ) y su impacto en el rendimiento diagnóstico para la discriminación A $\beta$  de los BP es mínimo. Los resultados indican que probablemente no sea necesario ajustar de forma sistemática los algoritmos para implementación clínica de p-tau181 según FG, IMC ni ningún otro factor de los estudiados (si bien deberá individualizarse el manejo de los resultados de p-tau181 cercanos a los puntos de corte en pacientes con FG muy bajo), confirmando la robustez de este BP en relación con variables potencialmente confusoras. Por contra, es necesario estudiar en futuros estudios diseñados para este fin el impacto de factores como la edad, IMC o el FG en NfL o GFAP para supuestos clínicos distintos a la discriminación del estado A $\beta$ , como por ejemplo para el diagnóstico de DFT con NfL.

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

Varios trabajos publicados a finales de 2023 y principios de 2024 demostraron un excelente rendimiento de p-tau217 para discriminación del proceso fisiopatológico de Alzheimer, siendo en algunos casos superior a p-tau181, aunque con la limitación de usar métodos no disponibles comercialmente y no realizarse en cohortes prospectivas clínicas habituales. En línea con la importancia y potencial gran aplicabilidad en la práctica clínica diaria de la determinación del estado A $\beta$  mediante BP, de los buenos resultados obtenidos en los trabajos 1 y 2 con p-tau181, a la evidencia creciente de p-tau217 y a la muy reciente disponibilidad de cuantificación de p-tau217 mediante un inmunoensayo en una plataforma automatizada (Lumipulse G, Fujirebio) de forma comercial, el último trabajo de esta tesis doctoral ha pretendido centrarse en la comparación, estudio del rendimiento y diseño de algoritmos para implementación clínica de p-tau181 y p-tau217. Para ello, se incluyeron de forma prospectiva a todos aquellos pacientes (se excluyeron controles) derivados para valoración cognitiva en nuestra unidad, de julio de 2019 a junio de 2024, a quienes se realizó según protocolos asistenciales punción lumbar y se cuantificaron p-tau181 (Quanterix) y p-tau217 (Fujirebio) plasmáticos.

Los resultados del tercer trabajo demostraron la superioridad numérica y estadística de p-tau217 sobre p-tau181 para la discriminación del estado A $\beta$  definido por LCR en nuestra cohorte prospectiva de pacientes en un centro especializado de deterioro cognitivo, hallazgos en consonancia con los estudios previos en que se habían comparado ambos epítomos.(98,104,112,113,119,120) Debido a los resultados de los dos primeros estudios en que se identificaba a p-tau181 como el mejor BP para diagnóstico del estado A $\beta$  y a la superioridad en el tercer trabajo de p-tau217 sobre este primero, el resto de los análisis se centraron en este último.

El FG y el IMC se asociaron inversamente a la concentración de p-tau217 de forma significativa tras ajustar por edad, sexo y estado amiloide, sin un impacto relevante de la edad, sexo o APOE en sus niveles. A pesar de ello, al igual que en el trabajo 2, las asociaciones del FG e IMC con p-tau217 fueron de una magnitud muy inferior a la del estado A $\beta$  y no mejoraron la predicción de estatus amiloide del BP en los modelos de regresión logística binaria, sugiriendo la ausencia de un impacto significativo de estas variables en el rendimiento diagnóstico de p-tau217. Cuatro estudios recientes también encontraron asociación de FG e IMC con p-tau217, concluyéndose en tres de ellos la ausencia de impacto significativo en el rendimiento

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

diagnóstico,(112,116,122) mientras que en el otro sí se consideraba una magnitud de impacto relevante, si bien en este último había una mayor representación de individuos asintomáticos y/o sin diagnóstico biológico (LCR o PET amiloide).(102) De forma interesante, tampoco hubo asociación del test de estado cognitivo mini-mental (MMSE) ni del estadio clínico (DCL vs demencia) en los niveles de p-tau217 ni en su discriminación del estado A $\beta$ , hecho que respalda el uso de este BP incluso en las fases clínicas más precoces de DCL.

Con la evidencia en la literatura y nuestros resultados, consideramos que ninguno de los factores confusores estudiados tiene un impacto significativo en la precisión diagnóstica de discriminación A $\beta$  de p-tau217 en la población que normalmente se atiende en los centros especializados de memoria. Por tanto, concluimos que no es necesario un ajuste sistemático de los algoritmos y puntos de corte de p-tau217 por ninguna de estas variables. No obstante, el facultativo/a tratante deberá individualizar el manejo diagnóstico-terapéutico e interpretar con cautela aquellos pacientes con p-tau217 cerca de los puntos de corte y FG y/o IMC extremos.

La precisión de p-tau217 para discriminación A $\beta$  usando un único punto de corte fue del 89%, quedando por debajo de la precisión >90% de las recomendaciones del uso de BP y de las normas para diagnóstico de EA de los criterios revisados en 2024. Para aumentar la precisión diagnóstica y potencial aplicabilidad clínica, estudiamos el rendimiento de dos algoritmos con dos puntos de corte de p-tau217, basados en S y E predeterminadas del 95% y 97,5%, que de igual forma que en los trabajos 1 y 2, separarían a los pacientes en los grupos de baja, intermedia y alta probabilidad de ser A $\beta$ + (según LCR). Aquellos individuos en los grupos de baja y alta probabilidad serían clasificados como A $\beta$ - y A $\beta$ +, respectivamente, sin necesidad de realización de biomarcadores en LCR ni PET. En cambio, los pacientes en el grupo intermedio no tendrían el estatus A $\beta$  predicho con suficiente certeza solamente con p-tau217 plasmático. Los dos algoritmos tuvieron excelentes resultados, con una precisión del 93,8% y 96,2% y un 16,9% y 32,9% de los pacientes en el grupo intermedio en los algoritmos del 95% y 97,5%, respectivamente. Como referencia, el algoritmo estricto del 97,5% de p-tau181 plasmático tuvo una precisión del 92,5% y más de la mitad de los individuos tuvieron un resultado en zona intermedia.

Nuestros resultados con p-tau217 son muy similares a tres grandes y recientes estudios multicéntricos, con el valor añadido de nuestro estudio de ser realizado en una cohorte no

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

seleccionada de reclutamiento consecutivo en un centro especializado de deterioro cognitivo, sin incluir pacientes controles/cognitivamente sanos y con un método de determinación comercial y automatizado de p-tau217, aumentando la generalización de los resultados. En el primero se usó otro método disponible comercialmente de p-tau217 en tres cohortes que incluían tanto pacientes como controles, resultando en una precisión del 92-96% y 12-23% de participantes en el grupo intermedio mediante un algoritmo del 95%.(120) En el segundo, 16% de pacientes con deterioro cognitivo estuvieron en el grupo intermedio mediante un abordaje del 95% usando el porcentaje de p-tau217 sobre tau no-fosforilada (%p-tau217), medida mediante espectrometría de masas, que resultó en una precisión del 95%.(121) En el último, un modelo basado en otro inmunoensayo de p-tau217, edad y APOE tuvo una precisión del 91% y 93%, clasificando 29% y 41% de pacientes con deterioro cognitivo en el grupo intermedio mediante abordajes del 95% y 97,5%, respectivamente.(122) De esta forma, mediante un algoritmo basado en dos puntos de corte, p-tau217 plasmático superaría el umbral de una precisión del 90% para ser usado como biomarcador inicial para el diagnóstico de la EA, con confirmación solamente en aquellos casos en el grupo intermedio.(30)(124)

Consideramos que, en un centro especializado de deterioro cognitivo, se debería usar el estricto (97,5%), ya que pese a un aumento de pacientes en el grupo intermedio (33% vs 17%), los falsos negativos (5,7% vs 9,3%) y falsos positivos (2,6% vs 4%) disminuirían, minimizando los pacientes con EA que no recibirían un tratamiento precoz y los pacientes sin EA que serían mal diagnosticados y potencialmente iniciados con un tratamiento específico erróneo para su deterioro cognitivo.

Para estudiar la robustez del algoritmo del 97,5%, se asumió un modelo con una variabilidad del  $\pm 10\%$  en los valores de p-tau217, que podría encontrarse en la práctica clínica debido a factores individuales (variación intrapaciente, factores confusores) o de la prueba (variabilidad intra e interensayo). Como referencia, los coeficientes de variabilidad (CVs) del ensayo de p-tau217 de Fujirebio aportados por la compañía estuvieron entre el 3,3-7,4% (presentados en formato póster en la AAIC de 2023: “Manu Vandijck et al. Preliminary performance of the Lumipulse G pTau 217 Plasma prototype assay on plasma samples”). Aún asumiendo el peor escenario (todos los pacientes con valores de p-tau217  $\pm 10\%$  del punto de corte inferior o superior cambiando de grupo de probabilidad  $A\beta$  en la peor dirección posible), hubo pocos cambios en el rendimiento del algoritmo, con una precisión del 94,7% (superior incluso a la

del algoritmo del 95%) y con un total de 38% pacientes en el grupo intermedio. Consideramos que estos datos aportan confianza a la robustez del algoritmo de cara a la variabilidad que pueda encontrarse en la práctica clínica habitual.

En el tercer estudio también se observó un aumento progresivo de la concentración de p-tau217 a lo largo del *continuum* AT, estando sus niveles elevados significativamente en pacientes A+T+ comparado con los A+T-. La discriminación del estado T en pacientes A+ tiene implicaciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas.(28,30,47,48,151) Estudios recientes con p-tau217 plasmático encontraron un rendimiento aceptable (AUCs 0,87-0,90 y precisión del 94%) para la discriminación del estado T en pacientes A+, abriendo la puerta a la determinación de dicho estado mediante este biomarcador. Por contra, nuestros resultados fueron muy inferiores, con una AUC de 0,74. Debido a que p-tau en LCR (Core 1, T1) empieza a aumentar antes que el PET de tau (el cual correlaciona más con el depósito neuropatológico de proteína tau que la fracción soluble liberada en LCR – Core 2, T2) y a que en los estudios previos el estado T fue medido mediante PET a diferencia de en nuestro estudio, consideramos que la diferencia en resultados puede ser debidos a que nuestro grupo A+T+ incluye un mayor número de pacientes con cambios neuropatológicos de EA más iniciales (T+ por LCR que podrían ser aun T- por PET de tau).(30,120,121,152) Para estudiar la utilidad de p-tau217 como biomarcador de estado de taupatía (T2), deberían diseñarse nuevos estudios con datos de PET de tau. En esta línea, un estudio reciente apoya el uso de distintos puntos de corte de p-tau217 plasmático según se quiera discriminar el estado A/T1 o el estado T2, abriendo la puerta a su uso tanto como biomarcador Core 1 como Core 2.(127)

En relación con la elevación diferencial de p-tau217 en los distintos grupos AT, nos propusimos analizar las características diferenciales en el grupo de probabilidad intermedia de positividad A $\beta$ . Más de la mitad (55%) de los pacientes A+T- fueron clasificados en el grupo intermedio, comparado con tan solo el 22% de los individuos A+T+. Como era esperable, el rendimiento diagnóstico de p-tau217 para la discriminación del estado A $\beta$  fue mejor al excluir el grupo A+T-. Hubo más pacientes con un diagnóstico distinto a EA (DCLw o DFT con copatología A $\beta$ ) en el grupo A+T- (30%) en comparación con el grupo A+T+ (2%), aunque el rendimiento diagnóstico del algoritmo de p-tau217 para discriminar A- de A+T- y A- de A+T+ fue similar al excluir estos pacientes con diagnóstico no-EA. Estos resultados sugieren que el menor rendimiento diagnóstico de p-tau217 en el grupo A+T- comparado con A+T+ es debido a la pertenencia al

grupo A+T- *per se* y no a un diagnóstico etiológico no EA. Dado que solamente un 50-73% de donantes de tejido neurológico con LCR A+T- tuvieron EA confirmada patológicamente (cambios intermedios o elevados) en comparación con el 100% de donantes A+T+ en un estudio,(48) nuestros resultados sugieren que el grupo de probabilidad intermedia podría estar enriquecido con pacientes con cambios neuropatológicos de EA muy iniciales, cuyos resultados de p-tau217 intermedios podrían reflejar una neuropatología de EA inicial/transicional y no un “error” de p-tau217 *per se*. En esta línea, en uno de los recientes estudios de p-tau217 plasmático se encontró que los pacientes en el grupo intermedio tenían valores de PET de amiloide y de tau muy cercanos al punto de corte, añadiendo evidencia a la hipótesis de que el grupo de probabilidad intermedia incluye pacientes con cambios muy precoces de EA.(121)

Con los resultados del tercer estudio, recomendamos la aplicación del algoritmo del 97,5% de p-tau217 como prueba diagnóstica inicial en centros especializados de memoria. Los pacientes con niveles de p-tau217 dentro del rango de baja o alta probabilidad serían clasificados como A $\beta$ - y A $\beta$ +, respectivamente, sin necesidad de realización de biomarcadores en LCR ni PET, quedando a criterio del médico tratante la necesidad de pruebas adicionales y manejo terapéutico según sospecha clínica (EA, DCLw, DFT, depresión, etc.). En aquellos individuos con concentraciones de p-tau217 en el grupo intermedio, el estatus A $\beta$  no podría predecirse con suficiente certeza y el manejo clínico debería individualizarse para cada caso particular a criterio del facultativo/a tratante. En aquellos pacientes en el grupo intermedio en que fuera muy necesario un diagnóstico A $\beta$  preciso (p. ej., candidatos a ensayos clínicos o tratamiento con FME o cuadro clínico de presentación atípica), se realizarían los biomarcadores tradicionales de EA (LCR o PET de amiloide). En cambio, dentro de la práctica clínica habitual, habría casos donde el médico tratante podría realizar un diagnóstico de EA con resultados de p-tau217 en grupo intermedio sin necesidad de pruebas adicionales, cuando no fuera primordial un diagnóstico tan preciso como en los supuestos anteriores (cuadro clínico sugestivo de EA con p-tau217 en rango alto del grupo intermedio o viceversa). En estos últimos casos, la confianza diagnóstica habría aumentado con el uso de p-tau217 a pesar de un resultado intermedio, sin necesidad de LCR ni PET de amiloide. Una tercera opción, aunque no la recomendamos ya que enlentecería el diagnóstico, sería repetir p-tau217 plasmático en

unos 12 meses, ya que se ha documentado un aumento progresivo de sus niveles solamente en los pacientes A $\beta$  positivos y no en los negativos.(120)

En resumen, los resultados del trabajo 3 dan soporte al uso de p-tau217 plasmático a través de un algoritmo con dos puntos de corte como herramienta inicial para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, reduciendo la necesidad en un elevado número de sujetos de pruebas más invasivas y caras y menos accesibles. Estos resultados también abren líneas de investigación a estudiar la aplicabilidad clínica de los BP -especialmente p-tau217- en cohortes de atención primaria.

Las limitaciones principales del tercer trabajo en el primer caso y de los tres trabajos en los sucesivos, incluyen la ausencia de PET de amiloide (no realizado de forma asistencial si ya se realiza estudio en LCR) y estudio neuropatológico, ya que el primero tendría utilidad en aquellos casos discordantes entre p-tau plasmático y estatus A $\beta$  en LCR y el segundo serviría para comparar los resultados de p-tau plasmático, al ser los biomarcadores en LCR y PET de amiloide biomarcadores “derivados” de la neuropatología, que es el *gold standard* diagnóstico de la EA. Asimismo, disponer de PET de tau (tampoco realizado actualmente en la práctica clínica diaria donde se enmarca este trabajo) hubiera permitido explorar la utilidad de p-tau217 y del resto de BP para predecir la positividad/estadio de PET de tau en pacientes A $\beta$  positivos. Adicionalmente, si bien los resultados son altamente generalizables a pacientes atendidos en centros especializados de memoria, éstos pueden no serlo en cohortes de atención primaria, que podrían incluir a pacientes con más comorbilidades y mayor edad y/o disparidades socioeconómicas y posiblemente con una mayor probabilidad de individuos A $\beta$  negativos. Otra limitación es haber realizado todos los análisis de p-tau181, GFAP, NfL, UCH-L1 y t-tau y la gran mayoría de p-tau217 por lotes, lo que puede haber disminuido la variabilidad de la técnica a niveles inferiores a los de la práctica clínica habitual. A pesar de ello, no encontramos diferencias al comparar la precisión de p-tau217 entre los pacientes con este biomarcador medido por lotes o prospectivamente y un reciente estudio demostró una precisión diagnóstica de %p-tau217 plasmático en una cohorte de atención primaria y secundaria muy similar a la de nuestro estudio en una cohorte de centro de memoria, sin diferencias significativas cuando se cuantificaba el %p-tau217 plasmático de forma prospectiva o por lotes.(153)

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

Entre las fortalezas principales se incluyen la metodología de reclutamiento consecutivo y prospectivo en un centro especializado de memoria y el hecho de que las variables con que se compararon los BP (LCR y PET de amiloide) fueron determinadas de forma ciega, lo que reduce los potenciales sesgos a la vez que aumenta la generalización de los resultados. Además, el hecho de que p-tau217 sea cuantificado mediante el sistema Lumipulse G (Fujirebio), que usa un método de inmunoensayo enzimático quimioluminiscente totalmente automatizado, con resultados en menos de una hora, y que además es la plataforma mayoritaria que se usa en la mayoría de centros para la determinación de los biomarcadores de EA en LCR, mejora aún más su aplicabilidad clínica, abriendo la puerta a su uso en un elevado número de pacientes al ser automático y su generalización a la población general al estar ya disponible el equipamiento en la mayoría de centros.

La presente tesis, como se ha ido mencionando, abre la puerta a varias perspectivas futuras. En primer lugar, si bien se ha demostrado la utilidad de p-tau217 en un centro especializado de deterioro cognitivo, son necesarios estudios en cohortes de atención primaria para estudiar si se mantiene el alto rendimiento y validez para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo de este biomarcador plasmático. De forma similar, es necesario el desarrollo de nuevos BP o combinación de ellos que permitan realizar un cribaje desde las consultas de atención primaria o de neurología general de aquellos pacientes con quejas cognitivas con elevada sospecha de etiología neurodegenerativa (EA, DCLw, DFT) para ser derivados a centros terciarios de deterioro cognitivo, ya que la combinación de NfL y p-tau181 estudiada en el Trabajo 1 tenía un porcentaje demasiado elevado de falsos negativos. Además, son necesarios estudios en cohortes enriquecidas en pacientes con DFT y fenocopias de DFT para explorar y confirmar las mejores combinaciones de BP (con el ajuste pertinente según factores como la edad si se demuestra un impacto en su rendimiento) para el diagnóstico de este grupo de enfermedades neurodegenerativas. En la misma línea, es necesario el desarrollo de nuevos BP para el diagnóstico de DCLw, enfermedad de Parkinson y demencia asociada a la enfermedad de Parkinson, ya que ninguno de los estudiados en la presente tesis doctoral ha demostrado utilidad para su implementación en la práctica clínica. Finalmente, se están estudiando y desarrollando BP (principalmente epítomos de tau, incluyendo p-tau217) para su uso como biomarcadores de estado de taupatía de forma análoga al PET de tau, con utilidad

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

pronóstica tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos dentro del *continuum* de la EA y para selección de pacientes para ensayos clínicos y tratamientos con fármacos modificadores de enfermedad (como donanemab), lo que permitiría el ahorro de un elevado número de PET de tau.

## VI. CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1. Entre los biomarcadores plasmáticos p-tau181, GFAP, NfL, t-tau y UCH-L1, p-tau181, seguido de GFAP, fue el biomarcador con mejor rendimiento para la identificación de pacientes con proceso biológico de enfermedad de Alzheimer, definido por positividad de amiloide cerebral en líquido cefalorraquídeo o PET amiloide, en una cohorte prospectiva de un centro terciario de deterioro cognitivo. Mediante el uso de un algoritmo con dos puntos de corte de p-tau181 plasmático, se podrían haber evitado más de la mitad de las punciones lumbares o PET de amiloide realizados. Combinando p-tau181 y NfL, se habrían identificado los pacientes con demencia frontotemporal con moderada precisión. Ninguna combinación de biomarcadores plasmáticos analizados demostró utilidad práctica suficiente para discriminar el conjunto de los sujetos con etiologías no neurodegenerativas de deterioro cognitivo de las neurodegenerativas.
2. El filtrado glomerular se asoció a cambios significativos en la concentración de p-tau181 plasmático, mientras que el filtrado glomerular y el índice de masa corporal modificaron los niveles de p-tau217. No obstante, estas asociaciones no tuvieron impacto en el rendimiento de ambos biomarcadores plasmáticos para la discriminación del estado amiloide cerebral, no siendo necesario ajustar los puntos de corte de forma sistemática por ninguna de las variables confusoras estudiadas.

3. P-tau217 plasmático fue superior a p-tau181 para la discriminación del estado amiloide en una cohorte de reclutamiento consecutivo en un centro terciario de deterioro cognitivo. Usando un algoritmo con dos puntos de corte de p-tau217, se hubiera podido discriminar el estado de amiloidosis con muy alta precisión en más de dos tercios de los pacientes. Los resultados apoyan el uso de p-tau217 plasmático como herramienta diagnóstica de enfermedad de Alzheimer en los centros terciarios de deterioro cognitivo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Association A. 2018 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2018;14(3):367–429. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.001>
2. Bai W, Chen P, Cai H, Zhang Q, Su Z, Cheung T, et al. Worldwide prevalence of mild cognitive impairment among community dwellers aged 50 years and older: a meta-analysis and systematic review of epidemiology studies. *Age Ageing*. 2022;51(8):1–14.
3. 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. *Alzheimer's Dement*. 2011;11(1):96–106.
4. Gauthier S, Rosa-Neto P, Morais J, Webster C. World Alzheimer Report 2021. *Alzheimer's Dis Int* [Internet]. 2021; Available from: <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2021/>
5. Feigin VL, Krishnamurthi R V., Theadom AM, Abajobir AA, Mishra SR, Ahmed MB, et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol*. 2017;16(11):877–97.
6. Prince M, Bryce R, Ferri C. Alzheimer Report 2011 The benefits of early diagnosis and intervention. *World Alzheimer Rep 2011* [Internet]. 2011;1–68. Available from: <https://www.alzint.org/u/WorldAlzheimerReport2011.pdf>
7. Vega Alonso T, Miralles Espí M, Mangas Reina JM, Castrillejo Pérez D, Rivas Pérez AI, Gil Costa M, et al. Prevalencia de deterioro cognitivo en España. Estudio Gómez de Caso en redes centinelas sanitarias. *Neurología*. 2018;33(8):491–8.
8. van der Flier WM. Epidemiology and risk factors of dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2005 Dec 1;76(suppl\_5):v2–7. Available from: <https://jnnp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jnnp.2005.082867>
9. Seshadri S, Wolf PA. Lifetime risk of stroke and dementia: current concepts, and estimates from the Framingham Study. *Lancet Neurol*. 2007;6(12):1106–14.
10. Scheltens P, Vijverberg EGB. Aducanumab: Appropriate Use Recommendations. *J Prev Alzheimer's Dis*. 2021;8(4):412–3.
11. Cummings J, Apostolova L, Rabinovici GD, Atri A, Aisen P, Greenberg S, et al. Lecanemab: Appropriate Use Recommendations. *J Prev Alzheimer's Dis*. 2023;10(3):362–77.

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

12. Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, Guerchet M, Karagiannidou M. World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia. Coverage, Quality and costs now and in the future. *Alzheimer's Dis Int*. 2016;
13. Getsios D, Blume S, Ishak KJ, MacLaine G, Hernández L. An economic evaluation of early assessment for Alzheimer's disease in the United Kingdom. *Alzheimer's Dement*. 2012;8(1):22–30.
14. van Maurik IS, Broulikova HM, Mank A, Bakker ED, de Wilde A, Bouwman FH, et al. A more precise diagnosis by means of amyloid PET contributes to delayed institutionalization, lower mortality, and reduced care costs in a tertiary memory clinic setting. *Alzheimer's Dement*. 2023;19(5):2006–13.
15. McDade EM. Alzheimer Disease. *Contin Lifelong Learn Neurol* [Internet]. 2022 Jun;28(3):648–75. Available from: <https://journals.lww.com/10.1212/CON.0000000000001131>
16. Morris JC, Polsinelli AJ, Apostolova LG. Atypical Alzheimer Disease Variants. *Contin Lifelong Learn Neurol*. 2022;28(3):676–701.
17. Fortea J, Pegueroles J, Alcolea D, Belbin O, Dols-Icardo O, Vaqué-Alcázar L, et al. APOE4 homozygosity represents a distinct genetic form of Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2024;30(5):1284–91.
18. Sarto J, Mayà G, Molina-Porcel L, Balasa M, Gelpi E, Aldecoa I, et al. Evolution of Clinical-Pathological Correlations in Early-Onset Alzheimer's Disease Over a 25-Year Period in an Academic Brain Bank. *J Alzheimer's Dis*. 2022;87(4):1659–69.
19. Aisen PS, Cummings J, Jack CR, Morris JC, Sperling R, Frölich L, et al. On the path to 2025: Understanding the Alzheimer's disease continuum. *Alzheimer's Res Ther*. 2017;9(1):1–10.
20. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2016 Jun 29;8(6):595–608. Available from: [http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-81991-9\\_5](http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-81991-9_5)
21. Ittner LM, Götz J. Amyloid- $\beta$  and tau - A toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(2):67–72.
22. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology* [Internet]. 1984 Jul 2;34(7):939–939. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15528030.2015.1046631>
23. Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, 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.
24. Beach TG, Monsell SE, Phillips LE, Kukull W. Accuracy of the Clinical Diagnosis of Alzheimer Disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005–2010. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2012 Apr 1;71(4):266–73. Available from: <https://academic.oup.com/jnen/article->

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

lookup/doi/10.1097/NEN.0b013e31824b211b

25. Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, Fagan AM, Goate A, Fox NC, et al. Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Aug 30;367(9):795–804. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1202753>
26. Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis KA, Salvado O, et al. Amyloid  $\beta$  deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: A prospective cohort study. *Lancet Neurol* [Internet]. 2013;12(4):357–67. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70044-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70044-9)
27. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, 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. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2011 May 22;7(3):263–9. Available from: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
28. Jack Jr CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Budd Haeberlein S, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018;14(4):535–62.
29. Jack CR, Wiste HJ, Botha H, Weigand SD, Therneau TM, Knopman DS, et al. The bivariate distribution of amyloid- $\beta$  and tau: Relationship with established neurocognitive clinical syndromes. *Brain*. 2019;142(10):3230–42.
30. Jack CR, Andrews JS, Beach TG, Buracchio T, Dunn B, Graf A, et al. Revised criteria for diagnosis and staging of Alzheimer's disease: Alzheimer's Association Workgroup. *Alzheimers Dement* [Internet]. 2024;(February):1–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38934362>
31. Wilkins HM, Swerdlow RH. Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Res Bull* [Internet]. 2017 Jul;133(4):71–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923016302040>
32. Schneider JA. Neuropathology of Dementia Disorders. *Contin Lifelong Learn Neurol*. 2022;28(3):834–51.
33. Sabri O, Sabbagh MN, Seibyl J, Barthel H, Akatsu H, Ouchi Y, et al. Florbetaben PET imaging to detect amyloid beta plaques in Alzheimer's disease: Phase 3 study. *Alzheimer's Dement*. 2015;11(8):964–74.
34. Yeo JM, Waddell B, Khan Z, Pal S. A systematic review and meta-analysis of 18F-labeled amyloid imaging in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement Diagnosis, Assess Dis Monit* [Internet]. 2015;1(1):5–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dadm.2014.11.004>
35. Chiotis K, Saint-Aubert L, Boccardi M, Gietl A, Picco A, Varrone A, et al. Clinical validity of increased cortical uptake of amyloid ligands on PET as a biomarker for Alzheimer's disease in the context of a

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

- structured 5-phase development framework. *Neurobiol Aging*. 2017;52:214–27.
36. Seppälä TT, Nerg O, Koivisto AM, Rummukainen J, Puli L, Zetterberg H, et al. CSF biomarkers for Alzheimer disease correlate with cortical brain biopsy findings. *Neurology*. 2012;78(20):1568–75.
  37. Seeburger JL, Holder DJ, Combrinck M, Joachim C, Laterza O, Tanen M, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers distinguish postmortem-confirmed Alzheimer’s disease from other dementias and healthy controls in the OPTIMA cohort. *J Alzheimer’s Dis*. 2015;44(2):525–39.
  38. Leuzy A, Ashton NJ, Mattsson-Carlgren N, Dodich A, Boccardi M, Corre J, et al. 2020 update on the clinical validity of cerebrospinal fluid amyloid, tau, and phospho-tau as biomarkers for Alzheimer’s disease in the context of a structured 5-phase development framework. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021;48(7):2121–39.
  39. Olsson B, Lautner R, Andreasson U, Öhrfelt A, Portelius E, Bjerke M, et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer’s disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2016;15(7):673–84.
  40. Palmqvist S, Mattsson N, Hansson O. Cerebrospinal fluid analysis detects cerebral amyloid- $\beta$  accumulation earlier than positron emission tomography. *Brain*. 2016;139(4):1226–36.
  41. Mattsson N, Insel PS, Landau S, Jagust W, Donohue M, Shaw LM, et al. Diagnostic accuracy of CSF Ab42 and florbetapir PET for Alzheimer’s disease. *Ann Clin Transl Neurol*. 2014;1(8):534–43.
  42. Guillén N, Contador J, Buongiorno M, Álvarez I, Culell N, Alcolea D, et al. Agreement of cerebrospinal fluid biomarkers and amyloid-PET in a multicenter study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* [Internet]. 2023;(0123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s00406-023-01701-y>
  43. Barthélemy NR, Li Y, Joseph-Mathurin N, Gordon BA, Hassenstab J, Benzinger TLS, et al. A soluble phosphorylated tau signature links tau, amyloid and the evolution of stages of dominantly inherited Alzheimer’s disease. *Nat Med* [Internet]. 2020 Mar 11;26(3):398–407. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0781-z>
  44. Karikari TK, Ashton NJ, Brinkmalm G, Brum WS, Benedet AL, Montoliu-Gaya L, et al. Blood phospho-tau in Alzheimer disease: analysis, interpretation, and clinical utility. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2022 Jul 18;18(7):400–18. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41582-022-00665-2>
  45. Wolters EE, Dodich A, Boccardi M, Corre J, Drzezga A, Hansson O, et al. Clinical validity of increased cortical uptake of [18F]flortaucipir on PET as a biomarker for Alzheimer’s disease in the context of a structured 5-phase biomarker development framework. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* [Internet]. 2021 Jul 6;48(7):2097–109. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00259-020-05118-w>
  46. Ossenkoppele R, van der Kant R, Hansson O. Tau biomarkers in Alzheimer’s disease: towards implementation in clinical practice and trials. *Lancet Neurol* [Internet]. 2022;21(8):726–34. Available

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(22\)00168-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(22)00168-5)

47. Sims JR, Zimmer JA, Evans CD, Lu M, Ardayfio P, Sparks JD, et al. Donanemab in Early Symptomatic Alzheimer Disease: The TRAILBLAZER-ALZ 2 Randomized Clinical Trial. *Jama*. 2023;330(6):512–27.
48. Vromen EM, De Boer SCM, Teunissen CE, Rozemuller A, Sieben A, Bjerke M, et al. Biomarker A+T-: is this Alzheimer's disease or not? A combined CSF and pathology study. *Brain* [Internet]. 2023;146(3):1166–74. Available from: <https://doi.org/10.1093/brain/awac158>
49. Skillbäck T, Farahmand BY, Rosén C, Mattsson N, Nägga K, Kilander L, et al. Cerebrospinal fluid tau and amyloid- $\beta$ 1-42 in patients with dementia. *Brain*. 2015;138(9):2716–31.
50. Palmqvist S, Zetterberg H, Mattsson N, Johansson P, Minthon L, Blennow K, et al. Detailed comparison of amyloid PET and CSF biomarkers for identifying early Alzheimer disease. *Neurology*. 2015;85(14):1240–9.
51. ten Kate M, Barkhof F, Boccardi M, Visser PJ, Jack CR, Lovblad KO, et al. Clinical validity of medial temporal atrophy as a biomarker for Alzheimer's disease in the context of a structured 5-phase development framework. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2017;52:167-182.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.05.024>
52. Falgàs N, Sánchez-Valle R, Bargalló N, Balasa M, Fernández-Villullas G, Bosch B, et al. Hippocampal atrophy has limited usefulness as a diagnostic biomarker on the early onset Alzheimer's disease patients: A comparison between visual and quantitative assessment. *NeuroImage Clin* [Internet]. 2019;23(July):101927. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2019.101927>
53. Jagust W, Reed B, Mungas D, Ellis W, DeCarli C. What does fluorodeoxyglucose PET imaging add to a clinical diagnosis of dementia? *Neurology*. 2007;69(9):871–7.
54. Chételat G, Arbizu J, Barthel H, Garibotto V, Law I, Morbelli S, et al. Amyloid-PET and 18F-FDG-PET in the diagnostic investigation of Alzheimer's disease and other dementias. *Lancet Neurol* [Internet]. 2020;19(11):951–62. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30314-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30314-8)
55. Garibotto V, Herholz K, Boccardi M, Picco A, Varrone A, Nordberg A, et al. Clinical validity of brain fluorodeoxyglucose positron emission tomography as a biomarker for Alzheimer's disease in the context of a structured 5-phase development framework. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2017;52:183–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.03.033>
56. Gaetani L, Blennow K, Calabresi P, Di Filippo M, Parnetti L, Zetterberg H. Neurofilament light chain as a biomarker in neurological disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019;870–81.
57. Antonell A, Tort-Merino A, Ríos J, Balasa M, Borrego-Écija S, Auge JM, et al. Synaptic, axonal damage and inflammatory cerebrospinal fluid biomarkers in neurodegenerative dementias. *Alzheimer's Dement*. 2020;16(2):262–72.

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

58. Forgrave LM, Ma M, Best JR, DeMarco ML. The diagnostic performance of neurofilament light chain in CSF and blood for Alzheimer's disease, frontotemporal dementia, and amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Alzheimer's Dement Diagnosis, Assess Dis Monit* [Internet]. 2019;11:730–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2019.08.009>
59. Andersson E, Janelidze S, Lampinen B, Nilsson M, Leuzy A, Stomrud E, et al. Blood and cerebrospinal fluid neurofilament light differentially detect neurodegeneration in early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2020;95:143–53. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.07.018>
60. Bridel C, Van Wieringen WN, Zetterberg H, Tijms BM, Teunissen CE, Alvarez-Cermeño JC, et al. Diagnostic Value of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Protein in Neurology: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol.* 2019;76(9):1035–48.
61. Petersen RC, Aisen P, Boeve BF, Geda YE, Ivnik RJ, Knopman DS, et al. Mild cognitive impairment due to Alzheimer disease in the community. *Ann Neurol* [Internet]. 2013 Aug 24;74(2):199–208. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ana.23931>
62. Rabinovici GD, Gatsonis C, Apgar C, Chaudhary K, Gareen I, Hanna L, et al. Association of Amyloid Positron Emission Tomography with Subsequent Change in Clinical Management among Medicare Beneficiaries with Mild Cognitive Impairment or Dementia. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2019;321(13):1286–94.
63. Falgàs N, Tort-Merino A, Balasa M, Borrego-Écija S, Castellví M, Olives J, et al. Clinical applicability of diagnostic biomarkers in early-onset cognitive impairment. *Eur J Neurol.* 2019;26(8):1098–104.
64. Zaccai J, McCracken C, Brayne C. A systematic review of prevalence and incidence studies of dementia with Lewy bodies. *Age Ageing.* 2005;34(6):561–6.
65. Matej R, Tesar A, Rusina R. Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias in comorbidity: A clinical and neuropathological overview. *Clin Biochem* [Internet]. 2019;73(March):26–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.08.005>
66. McKeith IG, Boeve BF, Dickson DW, Halliday G, Taylor J-P, Weintraub D, et al. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies. *Neurology* [Internet]. 2017 Jul 4;89(1):88–100. Available from: <http://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000004058>
67. Outeiro TF, Koss DJ, Erskine D, Walker L, Kurzawa-Akanbi M, Burn D, et al. Dementia with Lewy bodies: An update and outlook. *Mol Neurodegener.* 2019;14(1):1–18.
68. Yamada M, Komatsu J, Nakamura K, Sakai K, Samuraki-Yokohama M, Nakajima K, et al. Diagnostic criteria for dementia with lewy bodies: Updates and future directions. *J Mov Disord.* 2020;13(1):1–10.
69. Rizzo G, Arcuti S, Copetti M, Alessandria M, Savica R, Fontana A, et al. Accuracy of clinical diagnosis of

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

- dementia with Lewy bodies: A systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(4):358–66.
70. McKeith IG, Ferman TJ, Thomas AJ, Blanc F, Boeve BF, Fujishiro H, et al. Research criteria for the diagnosis of prodromal dementia with Lewy bodies. *Neurology*. 2020;94(17):743–55.
  71. Petrou M, Dwamena BA, Foerster BR, Maceachern MP, Bohnen NI, Müller ML, et al. Amyloid deposition in Parkinson's disease and cognitive impairment: A systematic review. *Mov Disord*. 2015;30(7):928–35.
  72. Quadalti C, Palmqvist S, Hall S, Rossi M, Mammana A, Janelidze S, et al. Clinical effects of Lewy body pathology in cognitively impaired individuals. *Nat Med*. 2023;29(8):1964–70.
  73. Siderowf A, Concha-Marambio L, Lafontant DE, Farris CM, Ma Y, Urenia PA, et al. Assessment of heterogeneity among participants in the Parkinson's Progression Markers Initiative cohort using  $\alpha$ -synuclein seed amplification: a cross-sectional study. *Lancet Neurol [Internet]*. 2023;22(5):407–17. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(23\)00109-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(23)00109-6)
  74. Peña-Bautista C, Kumar R, Baquero M, Johansson J, Cháfer-Pericás C, Abelein A, et al. Misfolded alpha-synuclein detection by RT-QuIC in dementia with lewy bodies: a systematic review and meta-analysis. *Front Mol Biosci*. 2023;10(May).
  75. Iranzo A, Mammana A, Muñoz-Lopetegui A, Dellavalle S, Mayà G, Rossi M, et al. Misfolded  $\alpha$ -Synuclein Assessment in the Skin and CSF by RT-QuIC in Isolated REM Sleep Behavior Disorder. *Neurology*. 2023;100(18):E1944–54.
  76. Rossi M, Baiardi S, Teunissen CE, Quadalti C, Van De Beek M, Mammana A, et al. Diagnostic Value of the CSF  $\alpha$ -Synuclein Real-Time Quaking-Induced Conversion Assay at the Prodromal MCI Stage of Dementia With Lewy Bodies. *Neurology*. 2021;97(9):E930–40.
  77. Bang J, Spina S, Miller BL. Frontotemporal dementia. *Lancet [Internet]*. 2015;386(10004):1672–82. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00461-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00461-4)
  78. Morris JC, Boeve BF. Behavioral Variant Frontotemporal Dementia. *Contin Lifelong Learn Neurol*. 2022;28(3):702–25.
  79. Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, et al. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain*. 2011;134(9):2456–77.
  80. Harris JM, Gall C, Thompson JC, Richardson AMT, Neary D, Du Plessis D, et al. Sensitivity and specificity of FTDC criteria for behavioral variant frontotemporal dementia. *Neurology*. 2013;80(20):1881–7.
  81. Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, Kertesz A, Mendez M, Cappa SF, et al. Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology*. 2011;76(11):1006–14.
  82. Höglinger GU, Respondek G, Stamelou M, Kurz C, Josephs KA, Lang AE, et al. Clinical diagnosis of

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

- progressive supranuclear palsy: The movement disorder society criteria. *Mov Disord* [Internet]. 2017 Jun;32(6):853–64. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mds.26987>
83. Armstrong MJ, Litvan I, Lang AE, Bak TH, Bhatia KP, Borroni B, et al. Criteria for the diagnosis of corticobasal degeneration. *Neurology* [Internet]. 2013 Jan 29;80(5):496–503. Available from: <http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.0b013e31827f0fd1>
  84. Ducharme S, Dols A, Laforce R, Devenney E, Kumfor F, Van Den Stock J, et al. Recommendations to distinguish behavioural variant frontotemporal dementia from psychiatric disorders. *Brain*. 2020;143(6):1632–50.
  85. Taswell C, Villemagne VL, Yates P, Shimada H, Leyton CE, Ballard KJ, et al. 18F-FDG PET improves diagnosis in patients with focal-onset dementias. *J Nucl Med*. 2015;56(10):1547–53.
  86. Paterson RW, Slattery CF, Poole T, Nicholas JM, Magdalinou NK, Toombs J, et al. Cerebrospinal fluid in the differential diagnosis of Alzheimer’s disease: Clinical utility of an extended panel of biomarkers in a specialist cognitive clinic. *Alzheimer’s Res Ther*. 2018;10(1):1–11.
  87. del Campo M, Zetterberg H, Gandy S, Onyike CU, Oliveira F, Udeh-Momoh C, et al. New developments of biofluid-based biomarkers for routine diagnosis and disease trajectories in frontotemporal dementia. *Alzheimer’s Dement*. 2022;(August 2021):1–16.
  88. Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, Howes SC, Fournier DR, Song L, et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol*. 2010;28(6):595–9.
  89. Leitão MJ, Silva-Spínola A, Santana I, Olmedo V, Nadal A, Le Bastard N, et al. Clinical validation of the Lumipulse G cerebrospinal fluid assays for routine diagnosis of Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Res Ther*. 2019;11(1):1–12.
  90. Ortiz DA, Loeffelholz MJ. Evaluation of the lumipulse G TP-N chemiluminescent immunoassay as a syphilis screening test. *J Clin Microbiol*. 2017;55(11):3236–41.
  91. Lotierzo M, Urbain V, Dupuy AM, Cristol JP. Evaluation of a new automated immunoassay for the quantification of anti-Müllerian hormone. *Pract Lab Med*. 2021;25(December 2020).
  92. Grothe MJ, Moscoso A, Ashton NJ, Karikari TK, Lantero-Rodriguez J, Snellman A, et al. Associations of Fully Automated CSF and Novel Plasma Biomarkers With Alzheimer Disease Neuropathology at Autopsy. *Neurology*. 2021;97(12):E1229–42.
  93. Lantero Rodriguez J, Karikari TK, Suárez-Calvet M, Troakes C, King A, Emersic A, et al. Plasma p-tau181 accurately predicts Alzheimer’s disease pathology at least 8 years prior to post-mortem and improves the clinical characterisation of cognitive decline. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2020;140(3):267–78. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02195-x>

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

94. Palmqvist S, Janelidze S, Quiroz YT, Zetterberg H, Lopera F, Stomrud E, et al. Discriminative Accuracy of Plasma Phospho-tau217 for Alzheimer Disease vs Other Neurodegenerative Disorders. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2020;324(8):772–81.
95. Janelidze S, Mattsson N, Palmqvist S, Smith R, Beach TG, Serrano GE, et al. Plasma P-tau181 in Alzheimer’s disease: relationship to other biomarkers, differential diagnosis, neuropathology and longitudinal progression to Alzheimer’s dementia. *Nat Med [Internet].* 2020;26(3):379–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-0755-1>
96. Karikari T, Pascoal T, Ashton N, Janelidze S, Benedet A, Rodriguez J, et al. Plasma phospho-tau181 as a biomarker for Alzheimer’s disease: development and validation of a prediction model using data from four prospective cohorts. *Lancet Neurol.* 2020;19(5):422–33.
97. Thijssen EH, La Joie R, Strom A, Fonseca C, Iaccarino L, Wolf A, et al. Plasma phosphorylated tau 217 and phosphorylated tau 181 as biomarkers in Alzheimer’s disease and frontotemporal lobar degeneration: a retrospective diagnostic performance study. *Lancet Neurol [Internet].* 2021;20(9):739–52. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00214-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00214-3)
98. Salvadó G, Ossenkoppele R, Ashton NJ, Beach TG, Serrano GE, Reiman EM, et al. Specific associations between plasma biomarkers and postmortem amyloid plaque and tau tangle loads. *EMBO Mol Med.* 2023;15(5):1–16.
99. Karikari TK, Pascoal TA, Ashton NJ, Janelidze S, Benedet AL, Rodriguez JL, et al. Blood phosphorylated tau 181 as a biomarker for Alzheimer’s disease: a diagnostic performance and prediction modelling study using data from four prospective cohorts. *Lancet Neurol [Internet].* 2020;19(5):422–33. Available from: [www.thelancet.com/neurology](http://www.thelancet.com/neurology)
100. Karikari TK, Benedet AL, Ashton NJ, Lantero Rodriguez J, Snellman A, Suárez-Calvet M, et al. Diagnostic performance and prediction of clinical progression of plasma phospho-tau181 in the Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative. *Mol Psychiatry.* 2021;26(2):429–42.
101. Mielke MM, Frank RD, Dage JL, Jeromin A, Ashton NJ, Blennow K, et al. Comparison of Plasma Phosphorylated Tau Species with Amyloid and Tau Positron Emission Tomography, Neurodegeneration, Vascular Pathology, and Cognitive Outcomes. *JAMA Neurol.* 2021;78(9):1108–17.
102. Mielke MM, Dage JL, Frank RD, Algeciras-Schimmich A, Knopman DS, Lowe VJ, et al. Performance of plasma phosphorylated tau 181 and 217 in the community. *Nat Med.* 2022;28(7):1398–405.
103. Planche V, Bouteloup V, Pellegrin I, Mangin J-F, Dubois B, Ousset P-J, et al. Validity and Performance of Blood Biomarkers for Alzheimer Disease to Predict Dementia Risk in a Large Clinic-Based Cohort. *Neurology [Internet].* 2023 Jan 31;100(5):E473–84. Available from: <https://www.neurology.org/doi/10.1212/WNL.0000000000201479>
104. Jack CR, Wiste HJ, Algeciras-Schimmich A, Figdore DJ, Schwarz CG, Lowe VJ, et al. Predicting amyloid PET

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

- and tau PET stages with plasma biomarkers. *Brain* [Internet]. 2023;146(5):2029–44. Available from: <https://doi.org/10.1093/brain/awad042>
105. Gonzalez-Ortiz F, Ferreira PCL, González-Escalante A, Montoliu-Gaya L, Ortiz-Romero P, Kac PR, et al. A novel ultrasensitive assay for plasma p-tau217: Performance in individuals with subjective cognitive decline and early Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Dement*. 2023;(October 2023):1–11.
  106. Janelidze S, Berron D, Smith R, Strandberg O, Proctor NK, Dage JL, et al. Associations of Plasma Phospho-Tau217 Levels with Tau Positron Emission Tomography in Early Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*. 2021;78(2):149–56.
  107. Moscoso A, Grothe MJ, Ashton NJ, Karikari TK, Rodriguez JL, Snellman A, et al. Time course of phosphorylated-tau181 in blood across the Alzheimer’s disease spectrum. *Brain*. 2021;144(1):325–39.
  108. Simrén J, Leuzy A, Karikari TK, Hye A, Benedet AL, Lantero-Rodriguez J, et al. The diagnostic and prognostic capabilities of plasma biomarkers in Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Dement*. 2021 Jul 1;17(7):1145–56.
  109. Benussi A, Karikari TK, Ashton N, Gazzina S, Premi E, Benussi L, et al. Diagnostic and prognostic value of serum NfL and p-Tau 181 in frontotemporal lobar degeneration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020;91(9):960–7.
  110. Palmqvist S, Tideman P, Cullen N, Zetterberg H, Blennow K, Dage JL, et al. Prediction of future Alzheimer’s disease dementia using plasma phospho-tau combined with other accessible measures. *Nat Med* [Internet]. 2021; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-021-01348-z>
  111. Chouliaras L, Thomas A, Malpetti M, Donaghy P, Kane J, Mak E, et al. Differential levels of plasma biomarkers of neurodegeneration in Lewy body dementia, Alzheimer’s disease, frontotemporal dementia and progressive supranuclear palsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2022 Jan 25;jnnp-2021-327788. Available from: <https://jnnp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jnnp-2021-327788>
  112. Pichet Binette A, Janelidze S, Cullen N, Dage JL, Bateman RJ, Zetterberg H, et al. Confounding factors of Alzheimer’s disease plasma biomarkers and their impact on clinical performance. *Alzheimer’s Dement*. 2022;(July):1–12.
  113. Bayoumy S, Verberk IMW, den Dulk B, Hussainali Z, Zwan M, van der Flier WM, et al. Clinical and analytical comparison of six Simoa assays for plasma P-tau isoforms P-tau181, P-tau217, and P-tau231. *Alzheimer’s Res Ther* [Internet]. 2021;13(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s13195-021-00939-9>
  114. Lehmann S, Schraen-Maschke S, Vidal JS, Delaby C, Blanc F, Paquet C, et al. Plasma phosphorylated tau 181 predicts amyloid status and conversion to dementia stage dependent on renal function. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2023;94(6):411–9.

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

115. Zhang B, Zhang C, Wang Y, Chen L, Qiao Y, Wang Y, et al. Effect of renal function on the diagnostic performance of plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2023;15(March).
116. Janelidze S, Barthélemy NR, He Y, Bateman RJ, Hansson O. Mitigating the Associations of Kidney Dysfunction With Blood Biomarkers of Alzheimer Disease by Using Phosphorylated Tau to Total Tau Ratios. *JAMA Neurol* [Internet]. 2023;1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36987840><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC10061310>
117. Brickman AM, Manly JJ, Honig LS, Sanchez D, Reyes-Dumeyer D, Lantigua RA, et al. Plasma p-tau181, p-tau217, and other blood-based Alzheimer's disease biomarkers in a multi-ethnic, community study. *Alzheimer's Dement.* 2021 Aug 1;17(8):1353–64.
118. Altomare D, Stampacchia S, Ribaldi F, Tomczyk S, Chevalier C, Poulain G, et al. Plasma biomarkers for Alzheimer's disease: a field-test in a memory clinic. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2023 Jun;94(6):420–7. Available from: <https://jnnp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jnnp-2022-330619>
119. Ashton NJ, Puig-Pi Joan A, Milà-Alomà M, Fernández-Lebrero A, García-Escobar G, González-Ortiz F, et al. Plasma and CSF biomarkers in a memory clinic: Head-to-head comparison of phosphorylated tau immunoassays. *Alzheimer's Dement.* 2023;19(5):1913–24.
120. Ashton NJ, Brum WS, Di Molfetta G, Benedet AL, Arslan B, Jonaitis E, et al. Diagnostic Accuracy of a Plasma Phosphorylated Tau 217 Immunoassay for Alzheimer Disease Pathology. *JAMA Neurol* [Internet]. 2024;1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38252443>
121. Barthélemy NR, Salvadó G, Schindler SE, He Y, Janelidze S, Collij LE, et al. Highly accurate blood test for Alzheimer's disease is similar or superior to clinical cerebrospinal fluid tests. *Nat Med* [Internet]. 2024 Feb 21;1–1. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41591-024-02869-z>
122. Brum WS, Cullen NC, Janelidze S, Ashton NJ, Zimmer ER, Therriault J, et al. A two-step workflow based on plasma p-tau217 to screen for amyloid  $\beta$  positivity with further confirmatory testing only in uncertain cases. *Nat Aging.* 2023;3(9):1079–90.
123. Arranz J, Zhu N, Rubio-Guerra S, Rodríguez-Baz Í, Ferrer R, Carmona-Iragui M, et al. Diagnostic performance of plasma pTau217, pTau181, A $\beta$ 1-42 and A $\beta$ 1-40 in the LUMIPULSE automated platform for the detection of Alzheimer disease. *Alzheimer's Res Ther* [Internet]. 2024;16(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13195-024-01513-9>
124. Hansson O, Edelmayer RM, Boxer AL, Carrillo MC, Mielke MM, Rabinovici GD, et al. The Alzheimer's Association appropriate use recommendations for blood biomarkers in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 2022;(May):1–18.
125. Ashton NJ, Janelidze S, Mattsson-Carlgrén N, Binette AP, Strandberg O, Brum WS, et al. Differential roles of A $\beta$ 42/40, p-tau231 and p-tau217 for Alzheimer's trial selection and disease monitoring. *Nat*

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

Med. 2022;

126. Therriault J, Schindler SE, Salvadó G, Pascoal TA, Benedet AL, Ashton NJ, et al. Biomarker-based staging of Alzheimer disease: rationale and clinical applications [Internet]. Vol. 20, Nature Reviews Neurology. 2024. p. 232–44. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41582-024-00942-2>
127. Feizpour A, Doecke JD, Doré V, Krishnadas N, Huang K, Bourgeat P, et al. Detection and staging of Alzheimer's disease by plasma pTau217 on a high throughput immunoassay platform. eBioMedicine [Internet]. 2024;109:105405. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2024.105405>
128. Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. Nat Neurosci [Internet]. 2021 Mar 15;24(3):312–25. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41593-020-00783-4>
129. Benedet AL, Milà-Alomà M, Vrillon A, Ashton NJ, Pascoal TA, Lussier F, et al. Differences between Plasma and Cerebrospinal Fluid Glial Fibrillary Acidic Protein Levels across the Alzheimer Disease Continuum. JAMA Neurol [Internet]. 2021;78(12):1471–83. Available from: <https://jamanetwork.com/>
130. Cousins KAQ, Shaw LM, Chen-Plotkin A, Wolk DA, Van Deerlin VM, Lee EB, et al. Distinguishing Frontotemporal Lobar Degeneration Tau from TDP-43 Using Plasma Biomarkers. JAMA Neurol [Internet]. 2022 Oct 10; Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/2796817>
131. Bellaver B, Povala G, Ferreira PCL, Ferrari-Souza JP, Leffa DT, Lussier FZ, et al. Astrocyte reactivity influences amyloid- $\beta$  effects on tau pathology in preclinical Alzheimer's disease. Nat Med. 2023;29(7):1775–81.
132. Ashton NJ, Janelidze S, Al Khleifat A, Leuzy A, van der Ende EL, Karikari TK, et al. A multicentre validation study of the diagnostic value of plasma neurofilament light. Nat Commun. 2021 Dec 1;12(1).
133. Khalil M, Teunissen CE, Lehmann S, Otto M, Piehl F, Ziemssen T, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders — towards clinical application. Nat Rev Neurol [Internet]. 2024 Apr 12; Available from: <https://www.nature.com/articles/s41582-024-00955-x>
134. O'Bryant SE, Petersen M, Hall J, Johnson LA. Medical comorbidities and ethnicity impact plasma Alzheimer's disease biomarkers: Important considerations for clinical trials and practice. Alzheimer's Dement. 2022;(December 2021):36–43.
135. Vermunt L, Otte M, Verberk IMW, Killestein J, Lemstra AW, van der Flier WM, et al. Age- and disease-specific reference values for neurofilament light presented in an online interactive support interface. Ann Clin Transl Neurol. 2022;9(11):1832–7.
136. Syrjanen JA, Campbell MR, Algeciras-Schimmich A, Vemuri P, Graff-Radford J, Machulda MM, et al. Associations of amyloid and neurodegeneration plasma biomarkers with comorbidities. Alzheimer's

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

- Dement. 2022;18(6):1128–40.
137. Dittrich A, Ashton NJ, Zetterberg H, Blennow K, Zettergren A, Simrén J, et al. Association of Chronic Kidney Disease with Plasma NfL and Other Biomarkers of Neurodegeneration: The H70 Birth Cohort Study in Gothenburg. *Neurology*. 2023;101(3):E277–88.
138. Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Doré V, et al. High performance plasma amyloid- $\beta$  biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*. 2018;554(7691):249–54.
139. Janelidze S, Teunissen CE, Zetterberg H, Allué JA, Sarasa L, Eichenlaub U, et al. Head-to-Head Comparison of 8 Plasma Amyloid- $\beta$  42/40 Assays in Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*. 2021;78(11):1375–82.
140. Illán-Gala I, Lleó A, Karydas A, Staffaroni AM, Zetterberg H, Sivasankaran R, et al. Plasma Tau and Neurofilament Light in Frontotemporal Lobar Degeneration and Alzheimer Disease. *Neurology*. 2021;96(5):e671–83.
141. Wang KK, Yang Z, Sarkis G, Torres I, Raghavan V. Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1) as a therapeutic and diagnostic target in neurodegeneration, neurotrauma and neuro-injuries. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2017;21(6):627–38. Available from: <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1321635>
142. Papa L, Brophy GM, Welch RD, Lewis LM, Braga CF, Tan CN, et al. Time course and diagnostic accuracy of glial and neuronal blood biomarkers GFAP and UCH-L1 in a large cohort of trauma patients with and without mild traumatic brain injury. *JAMA Neurol*. 2016;73(5):551–60.
143. Lantero-Rodriguez J, Tissot C, Snellman A, Servaes S, Benedet AL, Rahmouni N, et al. Plasma and CSF concentrations of N-terminal tau fragments associate with in vivo neurofibrillary tangle burden. *Alzheimer's Dement*. 2023;19(12):5343–54.
144. Anniina Snellman, Juan Lantero-Rodriguez, Andreja Emeršič, Agathe Vrillon, Thomas K. Karikari, Nicholas J. Ashton, Milica Gregorič Kramberger, Saša Čučnik, Claire Paquet, Uroš Rot, Henrik Zetterberg KB. N-terminal and mid-region tau fragments as fluid biomarkers in neurological diseases. *Brain* [Internet]. 2022; Available from: <https://doi.org/10.1093/brain/awab481>
145. McKenzie N, Piconi G, Culeux A, Hammarin A, Stergiou C, Tzartos S, et al. Concordance of cerebrospinal fluid real-time quaking-induced conversion across the European Creutzfeldt–Jakob Disease Surveillance Network. *Eur J Neurol*. 2022;(April):2431–8.
146. Mok TH, Nihat A, Majbour N, Sequeira D, Holm-Mercer L, Coysh T, et al. Seed amplification and neurodegeneration marker trajectories in individuals at risk of prion disease. *Brain* [Internet]. 2023 Jun 1;146(6):2570–83. Available from: <https://doi.org/10.1101/2022.10.30.22281644>
147. Yan S, Jiang C, Janzen A, Barber TR, Seger A, Sommerauer M, et al. Neuronally Derived Extracellular

*Utilidad de los biomarcadores plasmáticos para el diagnóstico etiológico del deterioro cognitivo en un centro especializado de trastornos cognitivos*

- Vesicle  $\alpha$ -Synuclein as a Serum Biomarker for Individuals at Risk of Developing Parkinson Disease. *JAMA Neurol.* 2024;81(1):59–68.
148. Teunissen CE, Verberk IMW, Thijssen EH, Vermunt L, Hansson O, Zetterberg H, et al. Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease: towards clinical implementation [Internet]. Vol. 21, *The Lancet Neurology*. Elsevier Ltd; 2022. p. 66–77. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00361-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00361-6)
149. Ramanan VK, Graff-Radford J, Syrjanen J, Shir D, Algeciras-Schimnich A, Lucas J, et al. Association of Plasma Biomarkers of Alzheimer Disease With Cognition and Medical Comorbidities in a Biracial Cohort. *Neurology* [Internet]. 2023 Oct 3;101(14):10.1212/WNL.0000000000207675. Available from: <http://n.neurology.org/content/early/2023/08/14/WNL.0000000000207675.abstract>
150. Tsiknia AA, Edland SD, Sundermann EE, Reas ET, Brewer JB, Galasko D, et al. Sex differences in plasma p-tau181 associations with Alzheimer's disease biomarkers, cognitive decline, and clinical progression. *Mol Psychiatry*. 2022;(March).
151. Ossenkoppele R, Schonhaut DR, Schöll M, Lockhart SN, Ayakta N, Baker SL, et al. Tau PET patterns mirror clinical and neuroanatomical variability in Alzheimer's disease. *Brain*. 2016;139(5):1551–67.
152. Groot C, Smith R, Stomrud E, Binette AP, Leuzy A, Wuestefeld A, et al. Phospho-tau with subthreshold tau-PET predicts increased tau accumulation rates in amyloid-positive individuals. *Brain* [Internet]. 2022;146(4):1580–91. Available from: <https://doi.org/10.1093/brain/awac329>
153. Palmqvist S, Tideman P, Mattsson-Carlsson N, Schindler SE, Smith R, Ossenkoppele R, et al. Blood Biomarkers to Detect Alzheimer Disease in Primary Care and Secondary Care. *Jama* [Internet]. 2024;20502:1–13. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2821669>