



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“Uso de la espectroscopia Raman como herramienta no invasiva para el diagnóstico temprano de la enfermedad de Alzheimer en pacientes mexicanos.”

TESIS

QUE PRESENTA

M. en C. Castillo Mendieta Nadia Tzayaka

Matricula: 2171801248

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Directores de Tesis:

DRA. DEBORA YOALY ARANA LECHUGA

DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA

ASESOR:

DR. RODOLFO PINTO ALMAZÁN

Iztapalapa, Ciudad de México, 27 de Agosto de 2021



El presente trabajo fue realizado en los Laboratorios de Neurociencias, Clínica del Sueño y la Unidad de Investigación Médica en Farmacología, bajo la dirección de la Dra. Débora Yoaly Arana Lechuga del laboratorio de neurociencias y Clínica del sueño, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa y del Dr. Christian Guerra Araiza de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología del Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Siglo XXI. El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo del Dr. Rodolfo Pinto Almazán, del Hospital Regional de Alta Especialidad, unidad Ixtapaluca.

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 308398 que comprendió del periodo de 01/01/2017 al 01/12/2020. Así como a la beca otorgada por parte Programa para la Formación de Investigadores de la División de Desarrollo de la Investigación Coordinación de Investigación en Salud del IMSS, con el número de matrícula 99096803. Y al apoyo financiero para el proyecto otorgado por el IMSS, con número de registro FIS/IMSS/PROT/G17-2/1718. El doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de excelencia del CONACyT y además, cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

Agradecimientos

A la **Universidad Autónoma Metropolitana**

A la Unidad de estudios campus Iztapalapa

Al Instituto Mexicano del Seguro Social.

A la Unidad de Investigación Médica en Farmacología

Agradezco a cada uno de los miembros de mi comité tutorial:

Dra. Débora Yoaly Arana Lechuga

Dr. Christian Guerra Araiza.

Dr. Rodolfo Pinto Almazán.

Así como también a los miembros del jurado del examen pre-doctoral y Doctoral

Dra. Isabel Arrieta Cruz.

Dra. Sandra Adela Orozco Suarez.

Dr. Rafael Bojalil Parra

Dra. Kioko Rubí Guzmán Ramos

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

Por el tiempo brindado a la revisión de la tesis, así como por sus comentarios y sugerencias.

Agradecimientos

Al Dr. Christian, por todo su apoyo, el tiempo dedicado, sus enseñanzas, paciencia y dedicación, al presente trabajo y también gracias por su infinita paciencia en todo este tiempo que lleva enseñándome y por el entusiasmo puesto en este trabajo.

A la Dra. Yoaly, por su apoyo, paciencia y dedicación en el presente trabajo, por sus aportes y enseñanzas.

Al Dr. Rodolfo, por todo el tiempo y paciencia, que dedico para trabajar conmigo, en el desarrollo del presente trabajo y sobre todo por su apoyo y entusiasmo hacia mi trabajo.

Gracias, al Dr. Marvin Soriano Ursúa, por habernos prestado sus instalaciones y equipo para la realización del proyecto, así como al Dr. Juan Manuel Gallardo Montoya, por su enseñanza en técnicas bioquímicas.

A la Dra. Julia Segura-Uribe, a la Dra. Victoria Campos Peña y a la Dra. Ana Luisa Sosa, por sus valiosos aportes para la realización de este proyecto de investigación.

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud,
de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

Nadia Tzayaka Castillo Mendieta

27 de Agosto de 2021

JURADO:

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

Presidente

Dr. Christian Guerra Araiza

Secretario

Dr. Rodolfo Pinto Almazan

Vocal 1

Dra. Sandra Adela Orozco Suarez

Vocal 2

Dra. Isabel Arrieta Cruz

Vocal 3

Abreviaturas

Enfermedad de Alzheimer.....	EA
Espectroscopia Raman.....	ER
Infrarrojo.....	IR
Ratón triple transgénico para la Enfermedad de Alzheimer.....	3xTG-AD
Ratón wild type (control).....	WT
Beta- Amiloide.....	β A
Sistema Nervioso Central.....	SNC
Enfermedad de Parkinson.....	EP
Potencialización a largo plazo.....	LPT
Proteína Precursora de Amiloide.....	APP
Presenilina 1.....	PSEN1
Presenilina 2.....	PSEN2
Apolipoproteína E.....	APOE
Apolipoproteína E4.....	APOE4
Beta-Site APP-Cleaving Enzyme 1.....	BACE-1
Filamento Helicoidales Pareados.....	FHP
Proteínas asociadas a microtúbulos.....	MAPs
Mini-examen del Estado Mental.....	MMSE
ELISA.....	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

MCI.....	Deterioro cognitivo leve
SCI.....	Deterioro Cognitivo Severo
Tau-T.....	Tau Total
Tau- P.....	Tau fosforilada
Líquido Cefalorraquídeo.....	LCR

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Marco teórico	5
Antecedentes	18
Hipótesis	21
Objetivo General	22
OBJETIVOS ESPECIFICOS	23
MATERIALES Y METODOS	24
RESULTADOS	29
DISCUSION	43
CONCLUSIONES	52
PERSPECTIVAS	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO 1. (ARTICULO)	66
ANEXO 2. (Espectros Raman de pacientes diagnosticados con Enfermedad de Alzheimer y sujetos Control)	77
ANEXO 3. (Análisis del área bajo la curva de Espectros Raman de pacientes diagnosticados con Enfermedad de Alzheimer y sujetos Control)	82
ANEXO 4. (Cuantificación plasmática de biomarcadores en pacientes diagnosticados con Enfermedad de Alzheimer y sujetos Control)	83

Índice de Tablas y Figuras

Tabla 1 Asignación de bandas Raman asociadas a β A 1-40 y 1-42 _____	15
Tabla 2 Asignación de bandas Raman asociadas a patrones de EA _____	16
Tabla 3 Datos demográficos de la muestra poblacional estudiada _____	30
Tabla 4 Correlación entre biomarcadores y grado de demencia. _____	42
Tabla 5 Concentraciones plasmáticas de biomarcadores medidos en pacientes con EA y sujetos Control _____	83
Gráfica 1, Análisis bajo la curva de promedios de espectros Raman de sujetos control, MCI y SCI _____	36
Gráfica 2, Concentraciones plasmáticas de β A de sujetos control y pacientes con MCI y SCI _____	37,38
Gráfica 3, Concentraciones plasmáticas de la proteína Tau en sujetos control y pacientes con MCI y SCI _____	39,40
Gráfica 4, Concentraciones plasmáticas de lípidos de sujetos control y pacientes con MCI y SCI _____	41

Gráfica 5, Análisis bajo la curva de promedios de espectros Raman de sujetos control y Pacientes diagnosticados con demencia tipo Alzheimer	82
Espectro Raman 1, dilución de péptido β A	31
Espectro Raman 2, Superposición de promedios de SCI y MCI	32
Espectro Raman 3, Promedio de sujetos control, MCI y SCI	34
Espectro Raman 4, Análisis bajo la curva de promedios de sujetos control, MCI y SCI	35
Espectro Raman 5, Promedio de muestra de sujetos control	77
Espectro Raman 6, Promedio de muestra de pacientes diagnosticados con demencia tipo Alzheimer	78
Espectro Raman 7, Superposición de promedios de sujetos control y Pacientes diagnosticados con demencia tipo Alzheimer	79
Espectro Raman 8, Sustracción de promedios de muestras de sujetos control y Pacientes diagnosticados con demencia tipo Alzheimer	81
Espectro Raman 9, Análisis bajo la curva de promedios de sujetos control y Pacientes diagnosticados con demencia tipo Alzheimer	82

Figura 1, Mecanismo de la ruta no amilodoigénica y de la ruta amilodoigénica. _____ **7**

Figura 2, Estructura y función de Tau. _____ **10**

Figura 3, Proceso involucrado en la recolección de los espectros Raman. _____ **12**

Figura 4, Diagrama energético de estados vibracionales. _____ **13**

Resumen

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a personas mayores de 60 años, afecta principalmente a la memoria y provoca otros deterioros cognitivos. El diagnóstico de esta enfermedad se realiza mediante un examen neuropatológico del cerebro post mortem y las primeras etapas de esta enfermedad pueden confundirse con otros tipos de demencia. En México hay una población de 10 millones de adultos mayores de 60 años, cerca de 860.000 mexicanos se encuentran actualmente afectados por algún tipo de demencia, la mayoría de ellos con acceso insuficiente a servicios de salud integral adecuados. La búsqueda de biomarcadores plasmáticos mediante la espectroscopia de Raman, podría ser una opción rápida para obtener un diagnóstico temprano de la enfermedad. En este estudio se analizó el plasma de pacientes con enfermedad de Alzheimer y se adquirió el plasma de sujetos sin enfermedades neurodegenerativas asociadas, como control, utilizando la espectroscopia de Raman y kits de ELISA para analizar el comportamiento de amiloide β , tau y lípidos como Colesterol y triglicéridos. Se observaron cambios en los patrones espectroscópicos de las señales de beta amiloide, CH_2 correspondiente a la cadena de lípidos, entre pacientes con Alzheimer y sujetos control; así mismo, los niveles plasmáticos de beta amiloide, una disminución de beta-40 y un aumento de beta-42 entre pacientes con Alzheimer y sujetos de control, así como un aumento en la concentración plasmática de triglicéridos de Tau-P en pacientes con EA. Estos cambios en las concentraciones plasmáticas de estos biomarcadores podrían aproximarse a un diagnóstico temprano, menos invasivo y costoso en una población con un alto índice de marginación social.

Palabras clave: β -amiloide, enfermedad de Alzheimer, diagnóstico, Espectroscopia de Raman, ELISA.

Abstract

Alzheimer's is a neurodegenerative disease that affects people over 60 years of age, mainly affects memory and causes other cognitive impairments. The diagnosis of this disease is made by a neuropathological examination of the brain postmortem and the early stages of this disease can be confused with other types of dementia. In Mexico, there is a population of 10 million adults over 60 years old, about 860,000 Mexicans are currently affected with some type of dementia, most of them with insufficient access to adequate comprehensive health services. The search for plasma biomarkers by Raman spectroscopy analysis could be a quick option to obtain an early diagnosis of the disease. In this study, the plasma of patients with Alzheimer's disease was analyzed and they were compared with purchased plasma of subjects without associated neurodegenerative diseases, as a control, using the spectroscopy Raman and ELISA kits to analyze the behavior of B amyloid, tau and lipids such as Cholesterol and triglycerides. Changes in the spectroscopic patterns of beta amyloid signals, CH₂ corresponding to the lipid chain, were observed between Alzheimer patients and control subjects; likewise changes in plasma amyloid beta levels, a decrease in beta-40 and an increase in beta-42 were observed between patients with Alzheimer's and control subjects, as well as an increase in plasma Tau-P concentration of triglycerides in patients with Alzheimer's. These changes in the plasma concentrations of these biomarkers could approach an early, less invasive and costly diagnosis in a population with a high index of social marginalization.

Keywords: Amyloid β , Alzheimer's disease, diagnosis, Raman Spectroscopy, ELISA Assays.

Introducción

La demencia es un síndrome clínico caracterizado por un deterioro global de las funciones cognitivas respecto a un grado de funcionamiento previo, generalmente de evolución crónica y ligado a una causa orgánica [Fernández y Castro, 2008]. Se ha estimado que, a nivel global, hay 47 millones de personas con demencia, y se prevé que esta cifra se duplicará cada 20 años, alcanzando 75 millones en 2030 y para el 2050 a 132 millones de personas con demencia. Anualmente, el número total de nuevos casos de demencia en el mundo es de 10 millones, lo que significa un nuevo caso cada cuatro segundos [OMS, 2017].

Actualmente, en México el INEGI calcula que por cada 100 niños y jóvenes hay 38 adultos mayores (>60 años); este proceso de envejecimiento demográfico que experimenta el país es irreversible [INEGI, 2015]. De acuerdo con los datos disponibles, existen alrededor de 860 000 personas afectadas por demencia y se calcula que para 2050 se alcanzará la alarmante cifra de más de 3.5 millones [INGER, 2014].

Las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes son la enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad de Alzheimer (EA). Una pequeña proporción de casos son atribuibles a mutaciones genéticas conocidas, cuyo descubrimiento está contribuyendo a conocer mejor su fisiopatología. Sin embargo, la gran mayoría se consideran debidas a la acción e interacción de diversos factores genéticos y ambientales, que actúan como factores de susceptibilidad o precipitantes [Campdelacreu J, 2012]. Después de los 65 años, la incidencia de la demencia y de la EA se duplica cada 5 años, e incrementándose la EA más de tres veces en aquellos sujetos que tienen al menos un familiar de primer grado con demencia [INGER, 2014].

La EA es un trastorno neurodegenerativo, progresivo e irreversible cuya principal manifestación clínica es la afectación de la memoria, y que se acompaña de alteraciones de la conducta, problemas de comunicación y razonamiento que impiden la realización de actividades de la vida diaria. Esta enfermedad puede ser mal diagnosticada ya que, la confirmación del diagnóstico sólo es posible por medio de un examen histopatológico del cerebro *pos mortem*. Debido a esto, se han buscado nuevas herramientas para poder hacer un diagnóstico temprano y eficaz.

La Espectroscopia Raman (ER), es una técnica que se basa en las vibraciones moleculares de las muestras y que tiene varias ventajas frente a otras técnicas de caracterización de compuestos. La ER puede analizar la composición química y estructural de material orgánico e inorgánico directamente sobre el material y sin destruir las muestras, no requiere alguna preparación especial, así como se pueden analizar materiales en cualquier estado: sólido, líquido o gaseoso. Pocos han sido los estudios enfocados en el potencial diagnóstico de la ER en enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, en 2015, Ryzhikova y colaboradores mostraron que la aplicación de esta técnica espectroscópica y modelos matemáticos de clasificación, permiten distinguir y clasificar las muestras de suero de pacientes con EA y otros tipos de demencia [Ryzhikova y Col., 2015].

Existen otras técnicas de análisis que son más restrictivas como: la difracción de rayos X, la cual sólo permite determinar la composición a nivel atómico de cristales y aleaciones inorgánicas muy bien ordenadas. La espectroscopia de fotoelectrones permite la identificación de compuestos sólidos superficiales y necesita de un alto vacío; la espectroscopia de infrarrojo, permite analizar la composición química de sólidos orgánicos e inorgánicos pero requiere la preparación de muestras muy delgadas para que sean transparentes al infrarrojo (IR). La fluorescencia de rayos X permite solo el análisis de elementos sólidos, requiere de vacío y protección para el operario. Es por ello por lo que la ER es una de las técnicas más potentes en la actualidad y tiene una amplia aplicación en todos los ámbitos de investigación.

En este proyecto se propuso el análisis por ER de muestras de sangre de pacientes con EA en diferentes etapas de la enfermedad, con el fin de establecer la utilidad de la ER como técnica espectroscópica simple que permitiera diferenciar muestras de progresión de la EA y estudiar si existe correlación con algunas otras manifestaciones (morfofuncionales, bioquímicas y/o conductuales) de las muestras estudiadas. Identificar diferencias asociadas con la progresión de la EA nos permitiría apoyar el uso de este procedimiento para el diagnóstico de la enfermedad (tal como han sugerido varios autores [Hobro y Col., 2013; Park y Col., 2013; Carmona y Col., 2013; Chen y Col., 2009, 2011; Ryzhikova y Col., 2015], así como hacer factible la evaluación en el futuro del efecto sobre estos cambios de procedimientos o sustancias con potencial terapéutico en la EA.

MARCO TEÓRICO

1. La Enfermedad Alzheimer

La demencia es un síndrome, por lo general de naturaleza crónica o progresiva, caracterizado por el deterioro adquirido de las funciones cognoscitivas, que incluye la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y/o el juicio. Este deterioro es lo suficientemente grave como para causar interferencia con las actividades de la vida diaria. La EA es la causa más común de las demencias en el mundo [INGER, 2014].

La EA es una enfermedad neurodegenerativa, que se caracteriza por el declive cognitivo y conductual progresivo, los síntomas más comunes de esta enfermedad incluyen pérdida de memoria, confusión, alteraciones del juicio, cambios de personalidad, desorientación, y la pérdida de las habilidades lingüísticas [Hampel y Col., 2011].

La incidencia anual estimada y la prevalencia de la EA aumentan drásticamente con la edad. Las tasas de incidencia son de aproximadamente 0.4%, en personas de 65-69 años; y hasta casi el 10% en personas de más de 90 años con una prevalencia entre aproximadamente el 2% en personas de 65-69 años y hasta más de 25% en el grupo de personas mayores de 90 años [Qiu C. y col., 2009].

De acuerdo con los datos presentados sobre prevalencia de la demencia en México, se estima que en 2014 existían 860 000 personas afectadas por algún tipo de demencia [INGER., 2014] de los cuales, más de 350,000 personas estaban afectadas por la EA y con una muerte anual de 2,030 pacientes. Se estima que uno de cada tres de nosotros enfrentará esta enfermedad en algún ser querido o en un familiar [IMSS, 2007].

La EA se puede presentar a partir de los 65 años esta se considera de inicio tardío, sin embargo esta enfermedad no solo se presenta en adultos mayores, también puede desarrollarse entre los 40 y 50 años esta es de inicio temprano. La EA de aparición temprana, también llamada EA familiar, representa aproximadamente el 3.0% de todos los casos son estos los que han sido hasta la fecha, relacionados con mutaciones en los genes de la proteína precursora de amiloide (APP; nombre del

gen APP) en el cromosoma 21, la presenilina 1 (PS1; gen del nombre PSEN1) en el cromosoma 14, y presenilina 2 (PS2; nombre de genes PSEN2) en el cromosoma 1. Entre estos genes, más de 160 diferentes mutaciones se han identificado hasta el momento, lo que representa aproximadamente 40.0% de todos los casos de EA familiar. La mayoría de las mutaciones son encontradas en el gen PSEN1, mientras que los restantes son casi igualmente divididos entre APP y PSEN2. La EA familiar se caracteriza por la aparición temprana (entre los 30 a los 50 años de edad), de síntomas cognitivos, pero es clínicamente indistinguible de EA de aparición tardía [Hazarrrd y col., 2009].

La EA de aparición tardía, también llamada EA esporádica, representa cerca de 97.0% de todos los casos de EA y el principal factor de riesgo para contraer EA tardía es el envejecimiento [Hazarrrd y col., 2009]. Se ha asociado con muchos factores de riesgo ambientales y genéticos, la mayor asociación es con las enfermedades cardiovasculares (como hipertensión arterial, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, tabaquismo y obesidad, entre otros) [Whitmer y col., 2005] y otros factores de riesgo vascular, traumatismo cráneo-encefálico, y bajo nivel educativo. Entre los factores de riesgo genéticos, está el alelo $\epsilon 4$, que es el alelo del gen de la apolipoproteína E (APOE), en el cromosoma 19, es el único polimorfismo que se encuentra consistentemente asociado con EA tardía. Aún no se sabe si el alelo APOE4 influye en la tasa de producción, o agregación del péptido β -amiloide (β -A), o si influencia al metabolismo del colesterol y la inflamación que según los informes desempeñan un papel importante en la patología de la EA [Hazarrrd y col., 2009].

2.- Neuropatología de EA

Las características neuropatológicas de la EA incluyen la formación de placas amiloides, marañas neurofibrilares y angiopatía amiloide acompañados por pérdida de neuronas y de sinapsis en la neocorteza, el hipocampo, y otras regiones subcorticales del cerebro.

Se han identificado diversas alteraciones moleculares, como la acumulación de proteínas mal conformadas (en forma de placas amiloides y marañas neurofibrilares) que en conjunto ocasionan daño oxidativo y una reacción inflamatoria, con la consecuente disfunción sináptica y alteración en el metabolismo neuronal. Estas alteraciones ocasionan el desenlace de neurodegeneración y muerte neuronal [Hazarrrd y col., 2009]

El péptido β A es un producto natural del metabolismo que consiste en 36 a 43 aminoácidos. Los monómeros de β A-40 son mucho más frecuentes que la agregación propensa y dañina de especies

β A-42. Los péptidos de β -Amiloide proceden de la proteólisis de la APP por la acción de la BACE-1 (Beta-Site APP-Cleaving Enzyme 1), una β -secretasa, y γ -secretasa, un complejo proteico con la PSEN 1 en su núcleo catalizador 4 (Fig. 1). Un desequilibrio entre la producción, la remoción y la agregación de péptidos, provoca la acumulación de β A, este exceso puede ser el factor de iniciación en la EA. Esta idea, llamada la "hipótesis amiloide", se basa en estudios de formas genéticas de la EA, que incluye el síndrome de Down [Busciglio y col., 2002], y prueba que el β A-42 es tóxico para las células [Selkoe., 2001; Tanzi y col., 2005]. El péptido β A es espontáneamente auto-agregado en varias formas físicas coexistentes, una de ellas es la formación de oligómeros (de 2 a 6 péptidos), que se unen formando conjuntos intermedios [Kayed y Col., 2003; Klein y Col., 2001] (Fig. 1). El β A

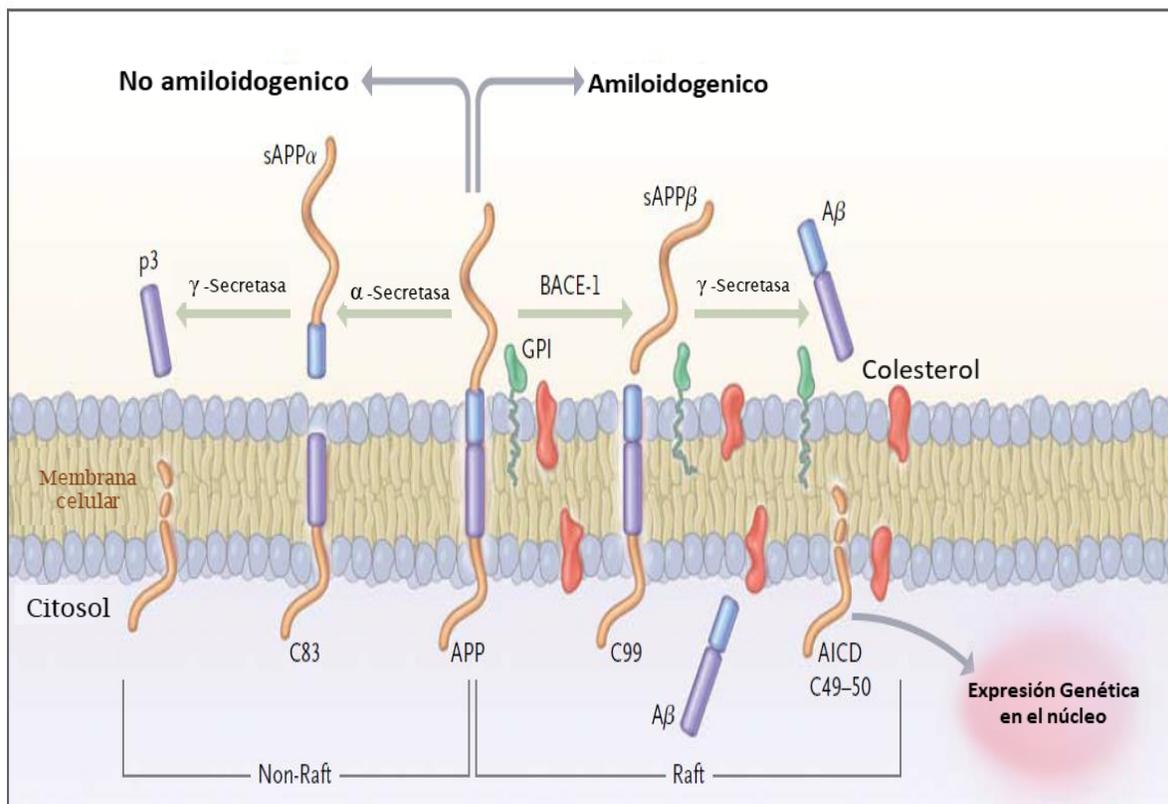


Figura 1. Mecanismo de la ruta no amiloidogénica y de la ruta amiloidogénica [Querfurth y La Ferla, 2010]

2.1.- Hipótesis Amiloide

La hipótesis amiloide fue propuesta formalmente por primera vez por Hardy y Allsop en 1991, y sigue siendo una de las hipótesis etiológicas más científicamente apoyadas hoy en día. Esta hipótesis establece que la producción y acumulación excesiva de β A, tanto intracelular como extracelular, bajo diferentes estados físicos y de agregación, son algunos de los eventos iniciales que impulsan el daño neuronal progresivo que caracteriza completamente la enfermedad [Hardy J., Allsop O. 1991; Hardy J. y Higgins G. 1992; Ekman C. y Eckman E. 2007]. Es importante destacar que todas las mutaciones asociadas con el tipo familiar de EA (APP, PS1 y PS2), de una forma u otra, aumentan la producción de β A o modifican su tasa de producción [Nathalie P. y Jean-Noel. 2008].

De acuerdo con la hipótesis amiloide, este péptido juega un papel muy importante en el origen y la progresión del daño en el tejido nervioso observado en pacientes con EA [Hardy J., Allsop O. 1991]. Las evidencias que apoyan esta hipótesis, es la existencia del péptido β A como el componente principal de las placas neuríticas y la angiopatía amiloide observada en los pacientes con EA [Allsop D y Col. 1983]; las observaciones en las formas familiares de EA que conducen a un aumento de la producción de β A [Vetrivel, K. y Thinakaran G. 2006]; y los diversos efectos tóxicos que β A ha demostrado tanto *in vitro* como en experimentos *in vivo*, que reproducen algunas de las alteraciones observadas en EA [Atwood C. Y Col., 2003]. Estas evidencias sugieren una producción excesiva de β A o un deterioro, estos acontecimientos pueden ser la clave en el origen y la progresión del daño neuronal. La hipótesis amiloide comenzó con el aislamiento y la identificación de un material similar a la proteína que se depositó en los vasos meníngeos de los pacientes con EA [Glennner G. y Wong C. 1988]. Estudios posteriores demostraron que este material era idéntico al obtenido de los vasos sanguíneos de los pacientes con síndrome de Down, un trastorno que no sólo se caracteriza por deterioro cognitivo, sino que también se asocia con una trisomía del cromosoma 21 [Glennner C. y Wong C. 1984]. Posteriormente, otros estudios confirmaron que este era el mismo péptido encontrado en las placas seniles de los pacientes con EA [Masters C. y Col. 1985; Gerevic P. Y Col. 1986]. Por último, la identificación tanto de la APP de la que se origina β A [Tanzi R. y Col. 1987; Godgaber D. y Col. 1987] y la primera mutación que se asoció con el desarrollo de EA (localizado en el gen APP), inevitablemente llevó a sugerir que este péptido tiene un papel central en el origen de la enfermedad [Goate A. y Chartier-Harlin 1991].

2.2.- Proteína Tau

La proteína Tau forma parte de una familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), son proteínas que se encuentran acopladas en el citoplasma, poseen de tres o cuatro dominios de enlace con los microtúbulos y se pueden unir con la tubulina, con lo que contribuyen a la formación de puentes entre los microtúbulos adyacentes [Hazzard y Col., 2009]. En condiciones normales, la proteína Tau promueve el ensamblaje, la estabilidad de los microtúbulos y favorece el transporte axonal [INGER, 2014]. La formación de las marañas neurofibrilares es debida a una hiperfosforilación de la proteína Tau, las cuales son inclusiones filamentosas en las neuronas piramidales; que se producen en la EA y otros trastornos neurodegenerativos denominados tauopatías [Lee y Col., 2001]. De manera normal, una proteína soluble en los axones promueve el ensamblaje de Tau, la estabilidad de los microtúbulos y el transporte de vesículas. La forma de Tau hiperfosforilada es insoluble, carece de afinidad por los microtúbulos y se autoasocia en estructuras de filamentos helicoidales pareados (FHP) (Fig. 2). Así como los oligómeros β A, los agregados intermedios de moléculas de Tau anormales son citotóxicos y afectan la cognición [Khlistunova y Col., 2006]. Se ha encontrado que el aumento de los niveles de Tau fosforilada y total en el líquido cefalorraquídeo se correlacionan con reducciones en las puntuaciones de exámenes cognitivos, ya que se ha observado que la cantidad de marañas neurofibrilares presentes, es un indicador patológico de la severidad de la EA [Wallin y Col., 2006].

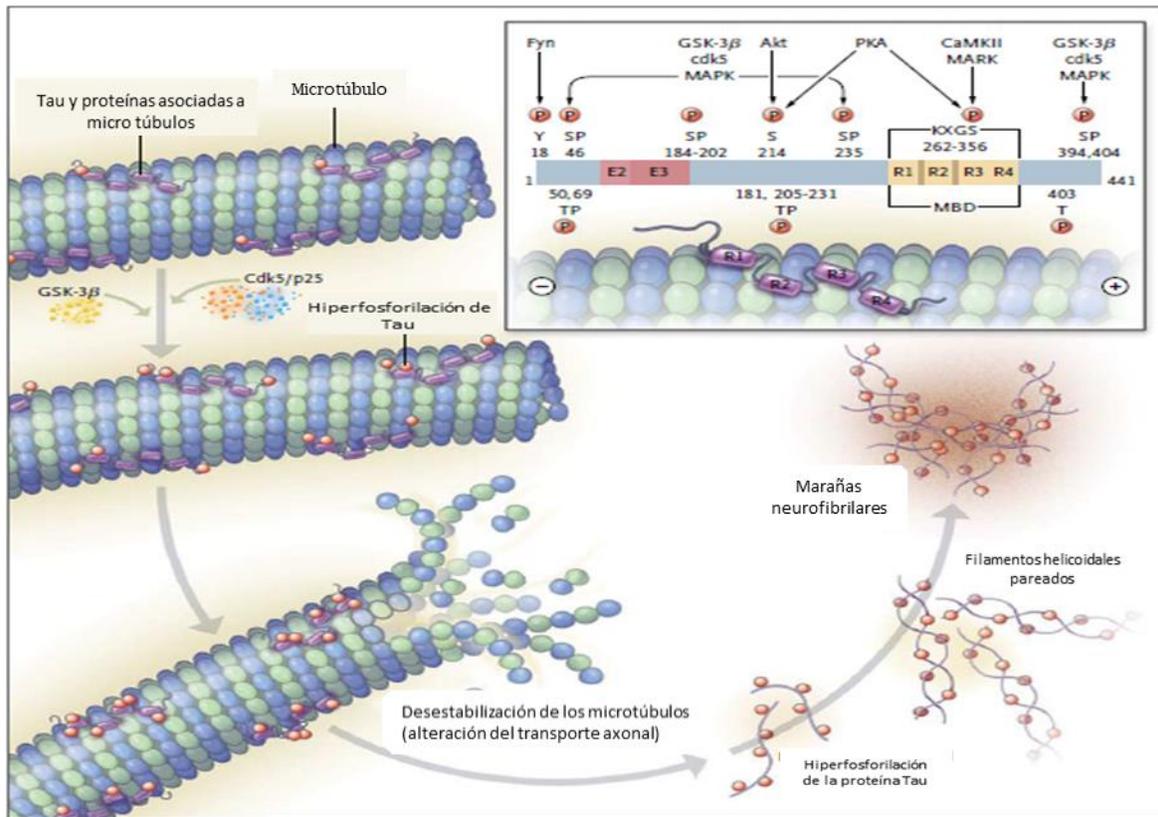


Figura 2. Estructura y función de Tau [Querfurt y LaFerla, 2010].

La mayor parte de los datos que se han encontrado, han demostrado que los mecanismos moleculares implicados en el procesamiento de Tau en la EA, y que conducen a la formación FHP, son impulsados por dos eventos físicos: agregación y polimerización [Mena R. y Luna J., 2006]. Estos dos acontecimientos parecen estar relacionada con el tiempo y el seguimiento de los mecanismos moleculares específicos, que incluyen pasos en los que fosforilaciones anormales y procesos de truncamiento desempeñan un papel importante [Mondragón-Rodríguez S. y Col., 2008], dichos eventos favorecerían la generación de una serie de mal plegamiento conformacional, a partir de pequeños cambios en las regiones, a lo largo de la molécula Tau, hacia cambios estructurales, que incluyen el plegado de la totalidad de N-terminal a lo largo del dominio repetido situado a lo largo del lado C-terminal de la proteína tau [Mena R y Luna J., 2006].

3. Espectroscopia Raman

El fenómeno conocido como efecto Raman fue descrito por el físico Indio Chandrasekhara Venkata Raman, en el año de 1928, se le dio el nombre de Raman al fenómeno inelástico de dispersión de luz que permite el estudio de las rotaciones y vibraciones moleculares.

La espectroscopia Raman (ER), es una técnica fotónica de alta resolución, que proporciona la información química y estructural de materiales o compuestos orgánicos e inorgánicos. Este tipo de espectroscopia Raman, surge a partir de la interacción de la luz incidente con los electrones de una molécula iluminada. La energía de la luz incidente no es suficiente para excitar la molécula a un nivel electrónico de mayor energía, el resultado de la dispersión Raman es cambiar el estado vibracional de la molécula [Hirschfeld T. y Col. 1986]. Para que una molécula exhiba el efecto Raman, la luz incidente debe inducir un cambio en el momento dipolar o un cambio en la polarizabilidad molecular. La luz que mantiene la misma frecuencia ν_0 que la luz incidente se conoce como dispersión Rayleigh y no aporta ninguna información sobre la composición de la muestra analizada. La dispersión Raman va a contener líneas Stokes y anti-Stokes, estas frecuencias corresponden a la suma y diferencia de las frecuencias de la luz incidente y las frecuencias vibracionales permitidas [Perez J. y Col. 2011]. Estas frecuencias distintas a la de la radiación incidente, es la que proporciona información sobre la composición molecular de la muestra y es la que se conoce como dispersión Raman. Las nuevas frecuencias $+\nu_r$ y $-\nu_r$ son frecuencias Raman, características de la naturaleza química y el estado físico de la muestra e independientes de la radiación incidente [sistemas.fciencias.unam.mx].

Espectroscopia Raman

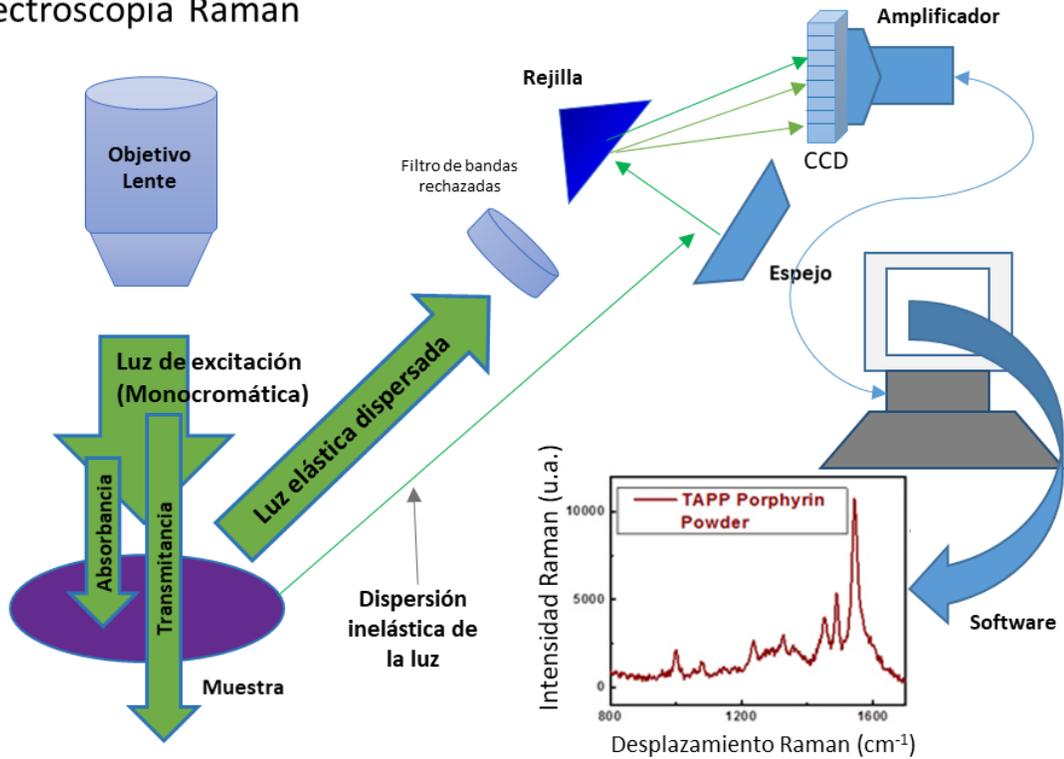


Figura 3. Proceso involucrado en la recolección de los espectros Raman [Murphy S. y col. 2011].

Las vibraciones de frecuencia observadas en el fenómeno de dispersión Raman, son equivalentes a variaciones de energía. Los iones y átomos enlazados químicamente para formar moléculas y redes cristalinas están sometidas a constantes movimientos vibraciones y rotacionales; estas oscilaciones se realizan a frecuencias bien determinadas en función de la masa de las partículas que intervienen y del comportamiento dinámico de los enlaces existentes. A cada uno de los movimientos vibracionales y rotacionales de la molécula le corresponderá un valor determinado de la energía molecular, [www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6887/03Rpp03de11.pdf].

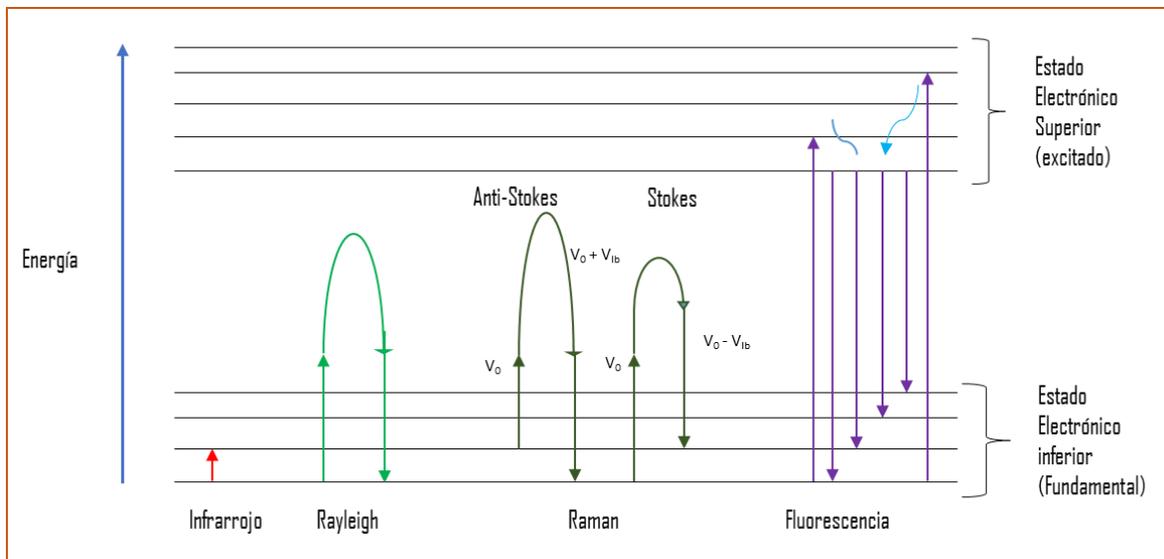


Figura 4. Diagrama energético en donde las líneas horizontales representan distintos estados vibracionales y en el que se muestran las transiciones entre estados energéticos para las diferentes interacciones luz-materia [Tomada y modificada de www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6887/03Rpp03de11.pdf].

Esto permite el análisis de rotaciones y vibraciones moleculares [De Gelder J. y Col. 2007]. Se hace sobre el material a analizar sin que este requiera de preparación especial y no conlleva alteración de la superficie sobre la que se realiza; por tanto, se considera una técnica ‘no-destruccionista’. Esta característica la hace muy útil en aplicaciones biológicas, y pese a los problemas de especificidad de señales, efectos de fluorescencia de biomoléculas y baja sensibilidad, algunas estrategias se han diseñado para la aplicación de esta técnica en la identificación y cuantificación de biomoléculas en sistemas biológicos complejos.

3.1. Uso de la espectroscopia Raman

La aplicación de este tipo de espectroscopia en el área biológica ha generado creciente interés en los últimos 20 años, gracias a la delimitación de las áreas que se pueden analizar, las cuales pueden ser tan pequeñas como un micrómetro cuadrado (la mayoría de las células humanas tienen de 25 a 150 micrómetros cuadrados de área en un corte transversal).

Hasta la fecha la mayor parte de los trabajos sobre EA se han dirigido hacia la búsqueda y validación de biomarcadores durante las fases iniciales de la enfermedad. Tales biomarcadores deben facilitar

una predicción temprana, diagnóstico y tratamiento, así como el seguimiento de la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. Con este fin, los biomarcadores deben principalmente combinar la alta sensibilidad (y especificidad) con alto valor predictivo, e idealmente debe validarse contra algún estándar de oro de neuropatología confirmado antes de la integración clínica. La detección de enfermedades en una etapa sin síntomas, deben ser cuantificable y no probabilístico, lo cual elevaría los requisitos para la generalización y estandarización, así como la detección de una alta precisión, reproducibilidad, y validez. Intuitivamente, cualquier nuevo biomarcador para ser útil debe correlacionar con estadio de la enfermedad y / o progresión de la enfermedad [Hampel H. y Col., 2011].

La ER se ha aplicado en la investigación biomédica, este tipo espectroscopia se ha aplicado en el diagnóstico de cáncer [Frank C. y Col., 1995; Ling X. y Col., 2002], la caracterización de tejido humano y la detección de células dañadas [Kneipp K. y Col.; 2002, Mourant J. y Col., 2005]. Algunos otros estudios por ER se han enfocado en diferenciar tejido cerebral (sustancia blanca de sustancia gris), con el objetivo de analizar los cambios en las interacciones estructurales y moleculares entre personas sin demencia de pacientes con EA [Chen P. y Col., 2009].

Diversos estudios han demostrado el papel potencial de la espectroscopia de Raman, como un método diagnóstico. Se ha realizado este análisis en muestras de cerebro post mortem de sujetos sanos y de sujetos con EA. Los espectros procedentes de estos tejidos fueron altamente reproducibles y los resultados iniciales indicaron una diferencia fundamental en el contenido de proteína y la conformación, en relación con los niveles anormalmente altos de agregados de proteínas en los tejidos enfermos [Sudworth C. y Col., 2006]. También se ha analizado el hipocampo de ratas sanas y de ratas a las que se les administró BA25-35 para provocar las características de la EA, en donde se observaron cambios conformacionales en la proteína BA, así como un aumento en las bandas de Raman, relacionadas con el colesterol y la proteína Tau [Chen P. y Col., 2009].

3.2. Asignación de Bandas Raman

Puesto que el Espectro Raman es único para cada compuesto y el material analizado queda identificado de manera inequívoca, ofreciendo, así, información referente a la caracterización de este, en las siguientes tablas se muestran las bandas Raman que describen al péptido β A 1-40 y 1-42 y las bandas asociadas a EA.

Tabla 1. Bandas para la interpretación de espectros en la región Raman asignadas al péptido β A-1-40,1-42 por ER [Chou I. y Col., 2008].

Posición de la banda cm^{-1}	Proteína asignada
675	Tyr
823	Doblete Try
963	n (C-C)
1000	Phe (n12)
1036	Phe (n18 _a)
1077	n (C _a -N)
1144	n(CCN)
1187	Phe y Tyr
1244	Amida III (hoja- β)
1266	Amida III (α -helice)
1350	n(=C-N)
1455	d(CH ₂)
1490	His
1547	Phe, Amida II
1580	Try, n(COO-) / Phe

n= Estiramiento.

d=Flexión

Tabla 2. Bandas para la interpretación de espectros en la región Raman asignadas a patrones de EA [Carmona P. y Col., 2013; Chen P. y Col., 2009, 2011; Sudworth C. y Col. 2006; Huang N. y Col., 2011]

Posición de la banda cm^{-1}	Proteína asignada
665	$\nu(\text{C}-\text{S})$, cys
743	Cytochrome C
757	Cytochrome C
853	$\nu(\text{C}-\text{C})$, proteína $\delta(\text{CCH})$, Tyr
1004	$\text{C}-\text{C}$, Phe, Phy
1126	$\nu(\text{C}-\text{N})$, proteínas, Amida III
1175	$\delta(\text{C}-\text{N})$, tyr
1248	$\nu(\text{CN})$, $\delta(\text{CN})$, Amida III, α -hélice, colágeno, Trp
1343	CH_2 , CH_3 , movimiento colágeno
1395	Hemoglobina
1448	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$, colágeno
1606	Trp
1658	$(\text{C}-\text{O})$ Amida I, α -hélice, colágeno
1006	$\text{C}-\text{C}$ estiramiento en lípidos (colesterol)
1088	$\text{C}-\text{C}$ y $\text{C}-\text{N}$ Estiramiento simétrico
1130	$\text{C}-\text{C}$ y $\text{C}-\text{N}$ estiramiento de proteínas
1300	CH_2 de formación en lípidos (colesterol y ácidos grasos)
1440	CH_2 de formación en proteínas y lípidos (colesterol y ácidos grasos)
1466	CH_2 unión en proteínas
1660	Amida I (proteínas, α -helice conformación)
1670	Amida I (cambio conformacional de α -hélice a β -plegada)
1490	Enlace disulfuro
1000-1200	Fosfatos

550-750	Amidas
1000, 1266	β A
1040	Albumina

Antecedentes

La búsqueda de biomarcadores en fluidos corporales, como el líquido cefalorraquídeo podría ser utilizado para aumentar la precisión en el diagnóstico de enfermedades de déficit cognitivo. Sin embargo, este procedimiento llega a ser muy invasivo en pacientes de avanzada edad, por lo cual se han hecho estudios en otros tipos de fluidos como el plasma. El plasma es un fluido corporal complejo que contiene proteínas, péptidos, lípidos y metabolitos que reflejan la actividad fisiológica y la patología de varios órganos del cuerpo, que incluye el sistema nervioso central [Song F. y Col., 2009]. Además, la extracción del plasma sanguíneo es un procedimiento menos invasivo y más sencillo de realizarse que una punción lumbar.

Diversos estudios han demostrado el papel potencial de la espectroscopia Raman, como un método diagnóstico. En un primer acercamiento al análisis con la ER, se ha utilizado para el análisis en muestras de cerebro post mortem de sujetos sanos y de sujetos con la EA. Los espectros procedentes de estos tejidos fueron altamente reproducibles, y los resultados iniciales indicaron una diferencia fundamental en el contenido de la proteína β A y su conformación.

En relación con los niveles anormalmente altos de agregados de proteínas en los tejidos enfermos; no obstante, no se analizó a qué grupos funcionales pertenecían estos cambios observados [Chen P. y Col. 2009]. En otro estudio en donde se analizó el hipocampo de ratas sanas y de ratas a las que se les administró BA25-35 para provocar las características de la EA, se observó que los cambios bioquímicos del hipocampo, incluyendo el depósito de proteína β A, el aumento de colesterol y Tau hiperfosforilada se observaron a través del análisis de espectroscopia Raman, en los animales tratados con la proteína β A [Song F. y Col. 2009]. A pesar de que en este modelo solo se observan algunas características de la EA, es importante señalar que se relacionaron los cambios en la proteína β A, la proteína Tau y en los ácidos grasos, ya que trabajos previos han reportado que un aumento en los niveles de ácidos grasos como el colesterol y los triglicéridos, juegan un papel fundamental en el metabolismo y la formación de depósitos de la proteína β A y tienen un papel patológico en el desarrollo de la EA [Reed B. y Col. 2014].

En estudios realizados en pacientes diagnosticados con EA, se han analizado muestras de plasma por medio de la ER, en el cual se hallaron diferencias en bandas asociadas con la proteína β A, en etapas tardías EA [Carmona P. y Col., 2013; Park y Col., 2013].

En un estudio previo donde se analizó el plasma a tres edades diferentes del ratón triple transgénico para Alzheimer (3xTG-AD) por la ER con la finalidad de encontrar las diferencias espectroscópicas en el plasma a diferentes estados de progresión de la enfermedad. En este estudio se empleó como control el plasma de ratones no modificados genéticamente (WT), a las mismas edades de estudio que los ratones triple transgénicos. Los espectros de Raman que se obtuvieron en el estudio tras el análisis de las muestras de plasma de la cepa de ratones WT, revelaron espectros muy parecidos entre los ratones de 7, 9 y 13 meses de edad; sin embargo, las diferencias significativas entre estos grupos que radicarón en las intensidades de algunas de las bandas. Los resultados obtenidos con el análisis del plasma de ratón 3xTG-AD mostraron que había diferencias entre los espectros de Raman a los 7, 9 y 13 meses de edad en bandas asociadas a β A, en donde en el plasma de ratones 3xTG-AD de 13 meses de edad se encontró un mayor número de bandas asociadas a esta proteína, así como una mayor intensidad de las mismas bandas, lo que se podría deberse a una mayor concentración de este péptido, en comparación de las muestras de plasma de los ratones 3xTG-AD de 7 y 9 meses de edad. Aunque, la búsqueda de los biomarcadores para esta enfermedad se enfocan en los cambios que presenta el péptido β A y Tau. En este estudio por medio de la ER, se encontraron cambios en las bandas asociadas a lípidos y colesterol, las cuales van aumentando sucesivamente en el plasma del ratón 3xTG-AD de 7, 9 y 13 meses en comparación con las bandas en el plasma de los animales control las cuales fueron menores en el número de bandas así como en la intensidad de las mismas [Castillo-M NT. 2016]. Si bien no se conocen los mecanismos por el cual el colesterol este participando en la acumulación del péptido β A, por medio de la ER, es posible la detección de los cambios de estas bandas, lo cual nos hace pensar que el colesterol puede usarse como una fuente en la búsqueda de nuevos biomarcadores para esta enfermedad, por medio de los cambios estructurales encontrados por la ER.

Por medio de la ER, a los 7, 9 y 13 meses de edad en los animales 3xTG-AD, las bandas asociadas al péptido β A, sus intensidades y otras bandas registradas varían entre una edad y otra; los resultados que se obtuvieron muestran que la actividad de algunas isomorfias del péptido β A, puede ser detectable por medio de la espectroscopia Raman. Ampliando el rango de estudio del espectro Raman, nos daría más herramientas para poder estudiar los cambios que hay en la progresión de la EA.

A pesar de que estos estudios proporcionan información acerca de los cambios bioquímicos y moleculares que ocurren entre un estado fisiológico y patológico, no se ha determinado la

correlación entre las modificaciones que se dan en áreas del SNC afectadas por esta enfermedad como el hipocampo y los cambios a nivel sistémico que se pueden detectar en el plasma, tampoco en qué grupos funcionales y estructurales se dan estos cambios. El análisis de estos cambios y el establecimiento de los grupos funcionales y estructurales que se modifican durante el progreso de la enfermedad, permitirán considerar a la ER como una posible herramienta no invasiva y no destructiva para el diagnóstico temprano de la EA.

En estudios realizados en pacientes diagnosticados con EA, se han analizado muestras de plasma por medio de la ER, en el cual se hallaron diferencias en las bandas relacionadas con β A, y con las cuales se han podido diferenciar etapas tardías de personas con la patología y en comparación con sujetos sanos [Carmona P. y Col., 2013; Park y Col., 2013].

La bioactividad de β A, se ha estudiado por medio de la ER, permitiendo observar cómo esta proteína tiene cambios conformacionales, a diferentes concentraciones. Por lo tanto, podemos investigar proteínas en solución sin modificarla. Además, la sensibilidad de esta técnica es capaz de distinguir entre α -hélices y β -hojas, así como otros cambios conformacionales de la proteína, lo que ha podido facilitar la discriminación entre las formas inofensivas monoméricas de β A y las formas más tóxicas oligomérica β -hoja o protofibrilla [Chou I. y Col., 2008; Huang N. y Col., 2011; Hobro A. y Col., 2013].

Hipótesis

Si la progresión de la EA genera cambios vibracionales en la proteína β -Amiloide, en la fosforilación de la proteína Tau y en la concentración del colesterol y triglicéridos, entonces estos, podrán ser detectados por cambios en las señales e intensidades de estas proteínas por espectroscopia Raman en el plasma de pacientes diagnosticados con EA y será diferente al presentado en sujetos cognitivamente sanos.

Objetivo General

Determinar la correlación entre los cambios en la conformación y en la intensidad de las señales de los espectros Raman para el péptido β -amiloide y la proteína Tau, así como para el colesterol y los triglicéridos, con las diferentes etapas de la enfermedad de Alzheimer, así como con el contenido de estos marcadores moleculares, en el plasma de sujetos sanos y en pacientes diagnosticados con EA, y proponer el análisis por espectroscopia Raman como una herramienta diagnóstica de la enfermedad de Alzheimer en pacientes mexicanos.

Objetivos particulares

- Determinar y vincular los cambios en la conformación y en la intensidad de la señal de la proteína β -amiloide, en la fosforilación de la proteína Tau y en los ácidos grasos como el colesterol y los triglicéridos, a través de la espectroscopia Raman en el plasma de pacientes diagnosticados con EA a diferentes etapas del desarrollo de la enfermedad, en comparación con sujetos sanos.
- Analizar el contenido de las proteínas β A y Tau fosforilada en el plasma de los pacientes diagnosticados con EA en diferentes etapas del desarrollo de la enfermedad en comparación con sujetos sanos.
- Determinar si la concentración de colesterol y triglicéridos encontrados en plasma pueden ser usados como un biomarcador en el diagnóstico de la EA.

METODOLOGÍA

Definición de la muestra de estudio

Este trabajo fue realizado en pacientes de nacionalidad mexicana, mayores de 60 años, que clínicamente fueron diagnosticados con demencia tipo Alzheimer fase 1 o fase 3, los cuales no presentaron otra enfermedad neurodegenerativa agregada. El grupo de estudio fue comparado con sujetos mayores de 60 años los cuales no presentaron síntomas de demencia o de otro tipo de enfermedad neurodegenerativa. Se formaron tres grupos de estudio. Los pacientes fueron reclutados en El Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), Manuel Velasco Suárez y en el Hospital de Especialidades Bernardo Sepúlveda, del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

El tamaño de la muestra fue de 50 sujetos por grupo de estudio. Se trata de un estudio casos y controles.

Criterios de inclusión para pacientes:

- Pacientes con diagnóstico confirmado de síndrome de demencia, mayores de 60 años, de sexo masculino o femenino, que sepan leer y escribir.
- Puntaje del Mini-Examen del Estado Mental (MMSE) ≤ 20 .
- Que aceptaron su participación mediante una carta de consentimiento informado, firmada por el paciente o por lo menos, por dos parientes en línea directa.

Criterios de exclusión para pacientes:

- Pacientes con enfermedad crónica aguda o exacerbada presente dentro de los 30 días antes de la entrevista que podría afectar la calidad de respuesta a los cuestionarios (según al personal médico). Pacientes con alguna neoplasia
- Pacientes con disminución del estado de alerta, afasia severa; discapacidad visual y auditiva.
- Personas que presentaban otras enfermedades neurológicas que podrían haber influido en el diagnóstico de demencia.
- Aquellos que viven en un asilo.

- Que no acepten participar en el estudio.

Los criterios de inclusión del grupo control:

- Edad ≥ 60 años, sin ningún síntoma o quejas de deficiencia de memoria reportados ni por el informante ni por el participante
- Puntuación del Mini Examen del Estado Mental (MMSE) ≥ 24 ; y capaz de leer y escribir.

Criterios de exclusión del grupo control

- Personas que presentaban cualquier enfermedad crónica aguda o grave.
- Aquellos que presentaban cualquier condición (disminución del estado de alerta, afasia severa, problemas de visión o audición) que complicaría el llenado de los cuestionarios.
- Que no acepten participar en el estudio.

Diagnóstico

Inicialmente, los pacientes fueron entrevistados para ser derivados a la subespecialidad requerida para cada caso. Los pacientes con diagnóstico de demencia se sometieron a una resonancia magnética (RM) cerebral y a estudios de laboratorio de rutina (hemograma completo, panel metabólico completo y perfil tiroideo). Por protocolo, se realizó una evaluación general estandarizada, que incluyó antecedentes médicos, físicos, neurológicos, cognitivos y conductuales. Para la evaluación sistemática de la cognición, se realizaron las siguientes pruebas: Mini Examen del Estado Mental (MMSE), Cuestionario para informantes sobre deterioro cognitivo en el anciano (IQCODE), fluidez verbal semántica y fonológica (VF) y Clock Drawing Test (CDT). Además, la conducta se evaluó con el Inventario Neuropsiquiátrico (NPI). Además, la funcionalidad se evaluó a través del Cuestionario de actividades funcionales (FAQ). Estas evaluaciones permitieron excluir otras patologías primarias y establecer una etiología una vez confirmada la demencia. El diagnóstico clínico de la EA se realizó de acuerdo con los criterios del DSM-5 y NIA-AA [32]. La gravedad de la demencia se clasificó de acuerdo con la puntuación del MMSE de la siguiente manera: 21-26, leve; 12-20, moderado; y <12 , demencia grave.

El protocolo de investigación para estudios en humanos fue revisado y aprobado tanto por la Comisión de Ética en Investigación (IMSS, R-2017-785-073) como por el Comité de Experimentación

Humana (INNN, 100/07). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1975. El formulario de consentimiento informado por escrito se obtuvo de los posibles participantes antes de su inclusión en el estudio. Todas las personas que aceptaron participar en el estudio firmaron un consentimiento informado. Un cuidador, tutor legal u otro apoderado dio su consentimiento en nombre de las personas con deterioro cognitivo sustancial.

Muestra

Se recolectó la sangre de los grupos (10 ml / sujeto) por punción venosa en tubos heparinizados (BD Vacutainer) y se centrifugó a 12000 RPM durante 10 min a 4 ° C. La capa superior de todo el plasma se separó y se almacenó a -80 ° C hasta su posterior análisis.

Espectroscopia Raman

Los estudios de espectroscopia Raman se llevaron a cabo sobre plasma de pacientes diagnosticados con EA y sujetos sanos para analizar las diferencias del patrón adquirido desde este material biológico. Las muestras de sangre y se recolectaron en tubos heparinizados, posteriormente se centrifugaron para la obtención del plasma. Se colocaron 5µl de plasma de pacientes diagnosticados con demencia tipo EA, o sujetos control en un portaobjetos de vidrio de cuarzo, para su análisis. Mediante el uso de un microscopio Raman Bruker-Senterra®, se determinaron los espectros con una fuente de 785 nm láser a una potencia de 50 mV, un tiempo de integración de 5 seg., un número automático de adquisiciones, 2 co-adiciones, con el uso de una resolución de 3 a 5 cm⁻¹ y un rango espectral de 1800-400 a través de una abertura de malla de 50 micras x100 en un objetivo 50X. La corrección de la forma espectral y los filtros automáticos de rechazo de fluorescencia incluido en el Senterra system® se activaron durante la grabación de espectros con el fin de evitar señales adicionales.

Determinación de los niveles de proteínas y ácidos grasos

Los niveles del péptido β-amiloide (1-40), β-amiloide (1-42), Tau total, Tau fosforilada, colesterol total y triglicéridos se determinaron para cada paciente por duplicado a través de kits comerciales de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Determinación de β -amiloide y proteína Tau por ELISA

Para la determinación de la proteína β -amiloide y proteína Tau en el plasma de pacientes se utilizaron kits comerciales Cloud-Clone Corp (Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit, for Amyloid Beta Peptide 1-40, in human), Cloud-Clone Corp (Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit, for Amyloid Beta Peptide 1-42, in human), Cloud-Clone Corp (Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit, for microtubule Associated Protein Tau-Total, in human) respectivamente. Para la curva de calibración de β A se prepararon 5 pozos para la solución estándar y 7 pozos para la proteína Tau, 1 pozo para el blanco, a cada pozo se agregó 50 μ l, la curva de calibración se metió por duplicado. En los pozos restantes se colocaron las muestras de plasma, por pozo se metieron 50 μ l de muestra, una vez preparados los pozos con las muestras y la curva estándar, a cada pozo se le agregaron 50 μ l de agente de detección A para β A y 100 μ l para Tau respectivamente y se agitó cuidadosamente, se cubrió y se puso la placa a incubar a 37°C por 1 hora. Se aspiró cada pozo y lavó con 350 μ l de solución de lavado (1X), se volvió a aspirar cada pozo y secó con papel absorbente (estos lavados se repitieron 3 veces), en el último lavado se removió el remanente por decantación. Posteriormente a cada pozo se le agregaron 100 μ l de agente B, se tapó la placa e incubó por 30 min. A 37°C. Después de la incubación, la aspiración y los lavados se repitieron por 5 veces. Posteriormente se agregó 90 μ l de solución de sustrato, se cubrió la placa e incubó de 10-20 min. A 37°C protegiendo la placa de la luz. Cuando la solución se tornó a un color azul en los pozos, se agregaron 50 μ l de solución stop. Se removió el líquido de cada pozo y se limpió la placa para su inmediata lectura en un espectrofotómetro a 450 nm.

Determinación de Colesterol Total y Triglicéridos por Agentes Colorimétricos

Para la determinación del colesterol total y triglicéridos en el plasma de pacientes EA y controles sanos se utilizó un kit comercial (Teco Diagnostic). Para la curva de calibración de se prepararon 7 pozos para la solución estándar, 1 pozo para el blanco, para colesterol a cada pozo se le agregó 2 μ l y 5 μ l para triglicéridos respectivamente, la curva de calibración se metió por duplicado. En los pozos restantes se colocaron las muestras de plasma, por pozo se colocó 2 μ l (colesterol) y 5 μ l (triglicéridos) de muestra, una vez preparados los pozos con las muestras y la curva estándar, a cada pozo se le agregó 200 μ l de reactivo estándar, se cubrió la placa y se puso a incubar a 37°C por 10 minutos. La lectura de las muestras se realizó en un espectrofotómetro a 520 nm.

Análisis estadístico

Los datos demográficos se compararon utilizando la prueba exacta de Fisher para el sexo y la prueba de Kruskal-Wallis seguida de múltiples comparaciones post-hoc de Dunn para las otras variables. Se utilizaron como covariables datos demográficos con diferencias significativas (nivel socioeconómico y educativo). La transformación logarítmica se utilizó para aproximar las distribuciones normales y realizar un análisis de covarianza (ANCOVA) y una prueba post-hoc de Bonferroni. La concentración de biomarcadores de cada grupo (control y grupos de EA) se comparó mediante un análisis ANOVA de una vía y una prueba de Tukey post-hoc. Los datos se expresaron como media \pm error estándar (EE). Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (r) para determinar la asociación entre la gravedad de la demencia y los niveles de los biomarcadores con un intervalo de confianza del 95%. Los análisis se realizaron utilizando el paquete de software IBM SPSS Statistics 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

Para los espectros Raman, se realizó la lectura de, al menos, tres puntos al azar de cada muestra. Se hizo la comparación de los espectros por grupo, para identificar diferencias en los patrones de intensidad y tipo de señales. Posteriormente, los espectros se promediaron. Los valores del espectro representaron el promedio de los casos registrados con EA y controles (sujetos sanos). Al valor promedio de los espectros de los pacientes con EA se restará el espectro de la muestra de los sujetos control, mediante el uso del software Opus® 7.0.

Resultados

En la tabla 3, se muestran las características poblacionales de la muestra recolectada. La muestra poblacional de pacientes con EA, se dividió en dos grupos, aquellos con un deterioro cognitivo leve (MCI), y aquellos con un deterioro cognitivo severo (SCI), de acuerdo al puntaje del mini-examen del estado mental (MMSE). La edad promedio de la muestra poblacional de los sujetos control fue alrededor de los 80 años, tanto para hombres como para mujeres y la edad promedio de la población reclutada de pacientes con demencia tipo Alzheimer fue entre 78 (SCI) y 82 (MCI) años de edad. Como se observa en la tabla 1, los pacientes con MCI y SCI tuvieron un puntaje de MMSE que se encontraba en un promedio de 14.62 ± 5.88 y 6.54 ± 2.6 , respectivamente, lo cual los clasificó con un deterioro cognitivo leve y un deterioro cognitivo severo, comparándolos con nuestra muestra control el promedio del puntaje de esta muestra se encontró en 27.86 ± 2.21 puntos en el MMSE, lo cual refiere a que esta muestra no padece de algún deterioro cognitivo. La mayor parte de nuestra muestra recolectada se encontraba en un nivel socioeconómico entre bajo y medio, solo un bajo porcentaje se situó en un estado socioeconómico alto, estos pertenecientes a pacientes con un deterioro cognitivo leve y alto respectivamente. La mayor parte de la muestra recolectada se situaba en un nivel educativo básico (primaria), tanto pacientes como sujetos control.

Tabla 3. Datos demográficos de la muestra poblacional estudiada

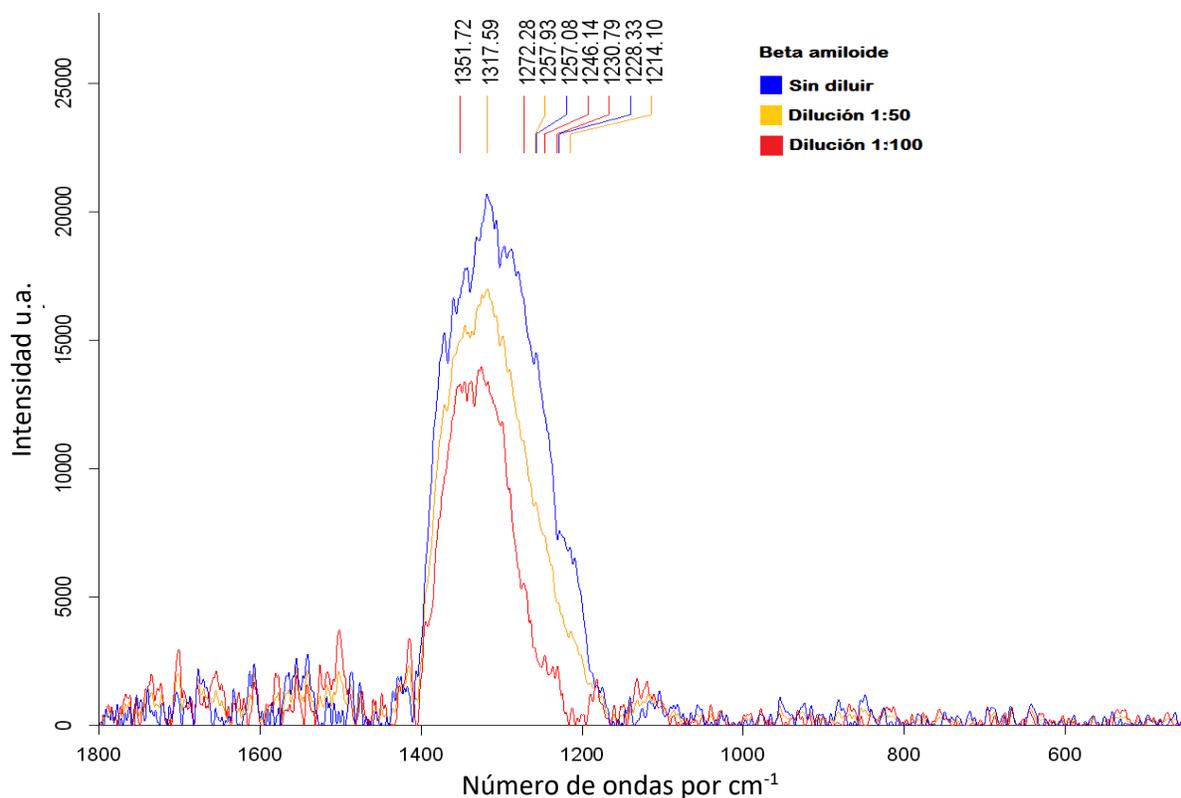
	Control	Pacientes EA		<i>P</i>
		MCI	SCI	
Muestra Total n (%)	50 (100)	27 (53)	24 (47)	
Mujeres n (%)	45 (90.2%)	14 (54%)	23 (96%)	0.06 ^a
Edad (Años) ^a	80.5±8.018	82.08±8.62	78.0±9.07	0.49 ^b
Puntuación MMSE ^b	27.86±2.21	14.62±5.88	6.54±2.6	0.000 ^b
Nivel socioeconómico				
Bajo	29 (56.9)	15 (57.7)	0	
Medio	22 (43.1)	7 (26.9)	17 (70.8)	
Alto	0	4 (15.4)	7 (29.2)	
Nivel educativo (Años)	4.75± 1.79	5.96± 4.7	6.78± 2.36	0.016 ^b

Los datos se presentan como media ± SD o frecuencias y porcentajes; n, número de participantes.

^aTest exacto de Fisher; ^bTest de Kruskal-Wallis. EA: enfermedad de Alzheimer; MMSE: Mini-Mental State Examination; MCI: deterioro cognitivo moderado; SCI, deterioro cognitivo severo; SD, desviación estándar. Nivel socioeconómico: 1-2, bajo; 3-4, medio; 5-6, alto. Nivel educativo (años): 0, analfabeto; 1-6, primaria; 7-9, secundaria; 10-14, bachillerato.

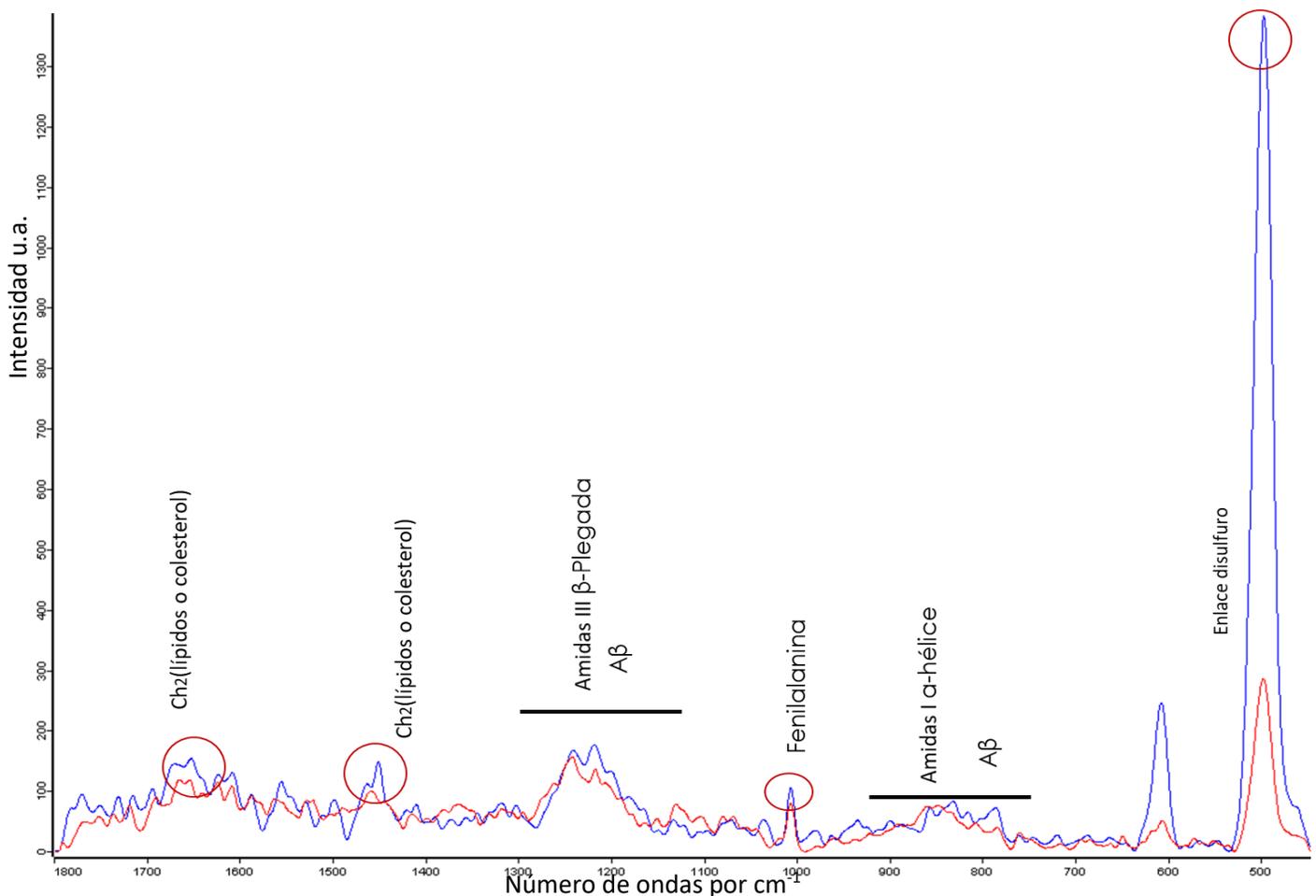
Análisis por espectroscopia de Raman

Con el objetivo de tener un espectro de referencia de β A (1-40), para la identificación de estas bandas de Raman en las muestras problema, se realizó un espectro Raman de β A a diferentes concentraciones de la proteína; 1:100 (banda roja), 1:50 (banda amarilla) y sin diluir (banda azul), como se puede observar en el espectro 1 el rango en el que las bandas asociadas a esta proteína se concentró de los 1200 a los 1400 cm^{-1} , que de acuerdo a la literatura esta región está asociada a las Amidas III [Chou y Col., 2008; Huang y Col., 2011; Hobro y Col., 2013], en donde se registra el paso conformacional de α -hélice a β -plegada. Como se puede observar en el espectro a una mayor concentración de la proteína hay una mayor intensidad, es decir la banda azul que pertenece al β A sin diluir tuvo una mayor intensidad (mayor a 20000) en comparación con las diluciones de 1:50 y 1:100, esto sin que ninguna modifique el rango en el que se presentan las bandas.



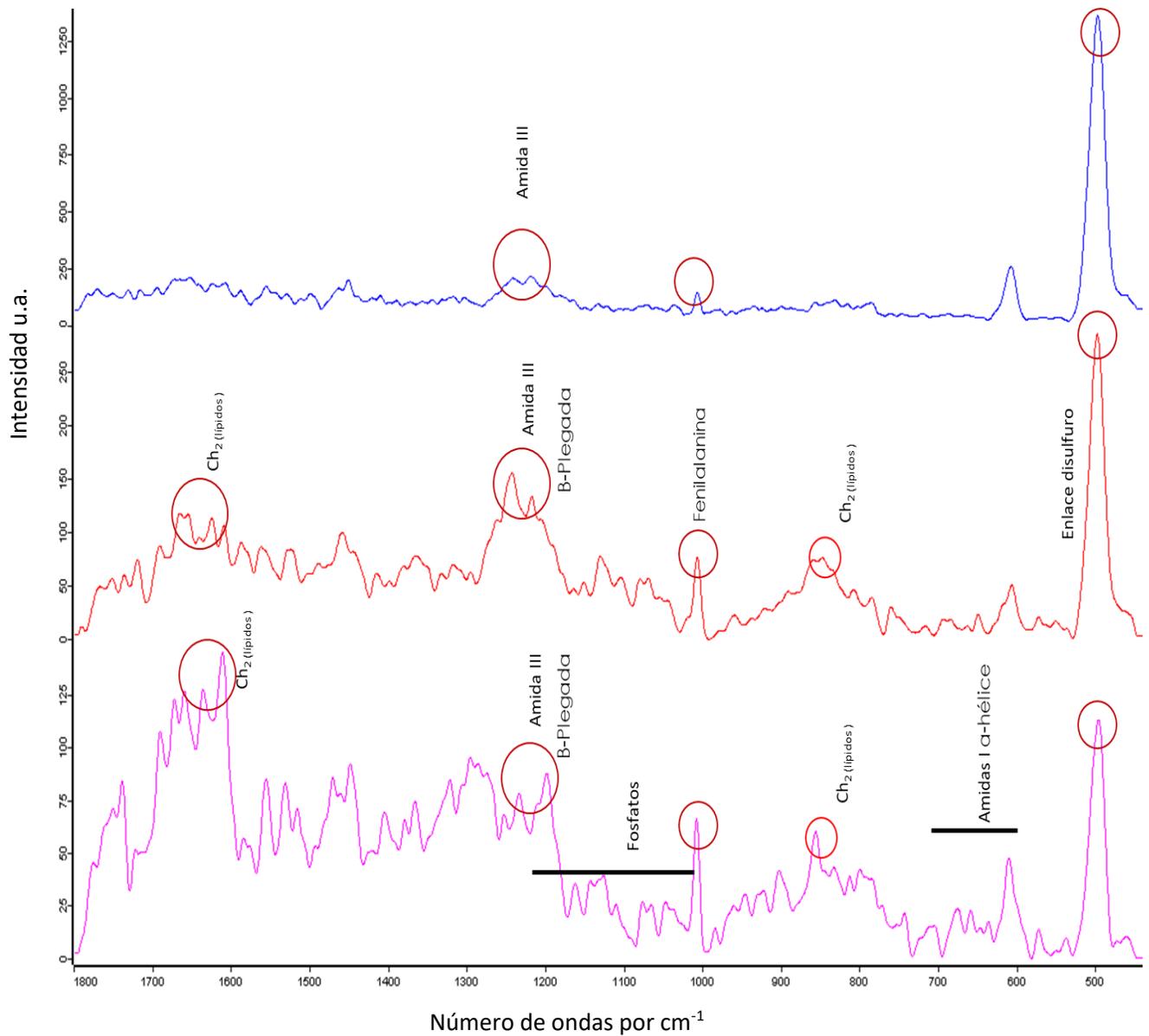
Espectro 1. Espectro Raman de β A a diferentes concentraciones (sin diluir (azul), 1:50 (amarillo), 1:100 (Rojo), los espectros fueron obtenidos mediante el programa OPUS Ver7.0.).

En el espectro 2, el grupo de pacientes con EA se clasificaron en 2 subgrupos, aquellos que de acuerdo con los estudios clínicos clasificaban MCI y aquellos que se situaban de acuerdo a los estudios clínicos con un SCI, una vez obtenidos esta subclasificación, se realizó un promedio general de los espectros Raman de cada uno de estos grupos. Como se observa en este espectro, interacciones moleculares correspondientes a enlace disulfuro ($500-550\text{ cm}^{-1}$) tienen una mayor intensidad en el grupo de SCI que en pacientes con EA MCI, bandas correspondientes a amidas I ($600-700\text{ cm}^{-1}$), III ($1200-1300\text{ cm}^{-1}$) también sobresalen en pacientes con SCI, al igual que las bandas relacionadas con lípidos y colesterol ($1550-1600\text{ cm}^{-1}$; $1600-1700\text{ cm}^{-1}$).



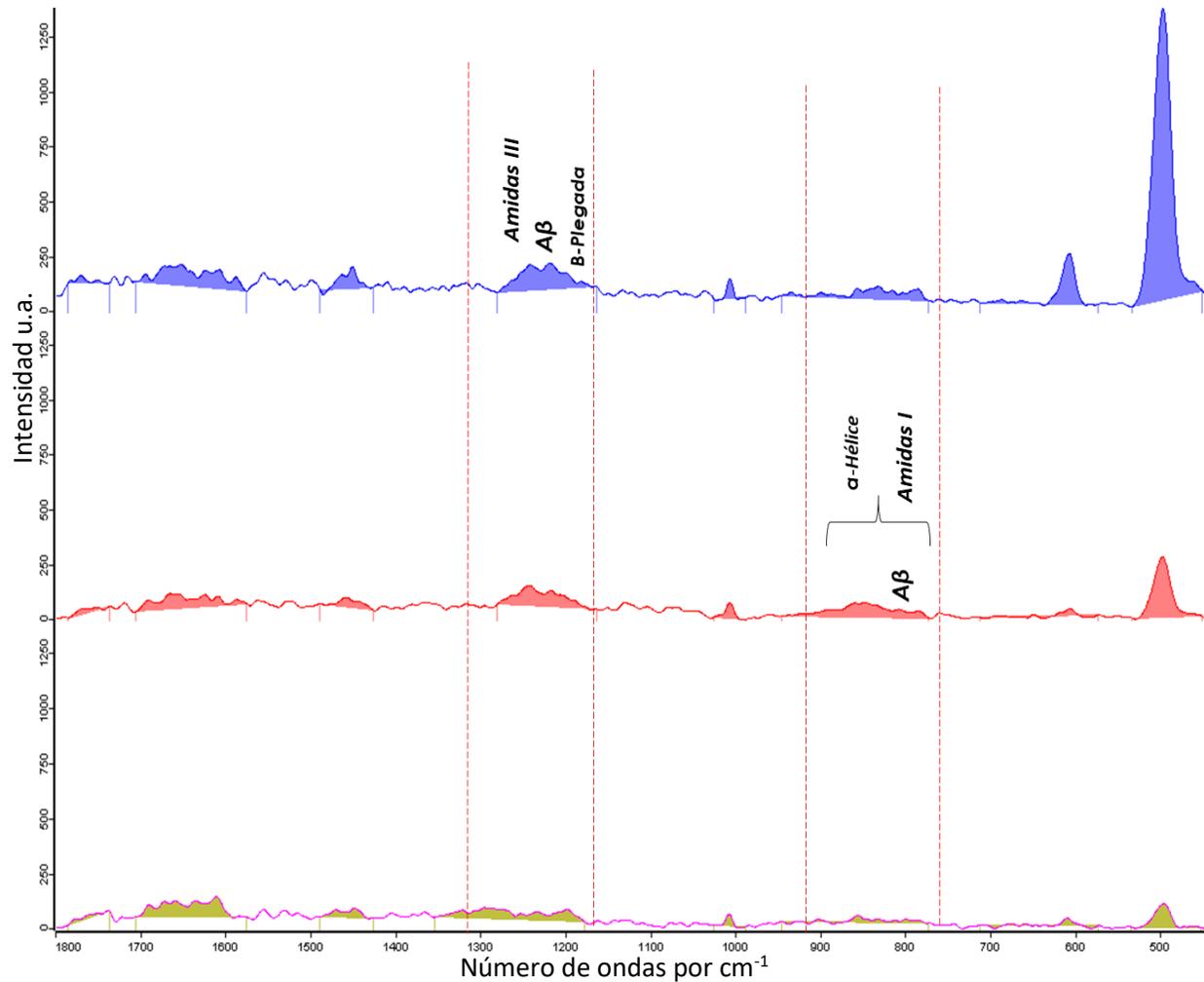
Espectro 2. Promedio de espectros Raman de muestras de plasma de pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI) espectro rojo, Pacientes con Deterioro cognitivo severo (SCI) espectro azul, los cuales fueron obtenidos mediante el programa OPUS Ver7.0.

En el espectro 3, se presentan los promedios Raman de los 3 grupos, con la finalidad de observar las diferencias entre estos mismos. El promedio de los espectros Raman de pacientes con SCI (barra azul), muestran una mayor intensidad en las banda asociadas a las amidas III ($1200-1300\text{ cm}^{-1}$) a diferencia del promedio de espectro Raman de pacientes con MCI (barra Roja) y de sujetos control (barra rosa). De igual manera la banda asociada al grupo de enlaces disulfuro (500 cm^{-1}), hay una mayor intensidad en el grupo de SCI, llegando a una intensidad aproximada de 1200 u.a., a diferencia del grupo de MCI y Control que se ubican alrededor de los 250 y 125 u.a. respectivamente. Como se puede observar las bandas asociadas a la proteína βA en las muestras de plasma analizadas de pacientes con SCI tienen una mayor intensidad en comparación con la banda perteneciente a las muestras de plasma de pacientes con MCI y sujetos control, lo que podría relacionarse con una mayor concentración de esta proteína en pacientes con SCI, lo que concuerda a una mayor presencia de placas βA , en esta muestra a diferencia de los pacientes con MCI, en los cuales la formación y acumulación de estas placas aún está en formación,



Espectro 3. Espectros Raman de sujetos control (espectro rosa), pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI, espectro rojo) y pacientes con deterioro cognitivo severo (SCI, espectro Azul). Los promedios fueron obtenidos mediante el programa OPUS Ver7.0.).

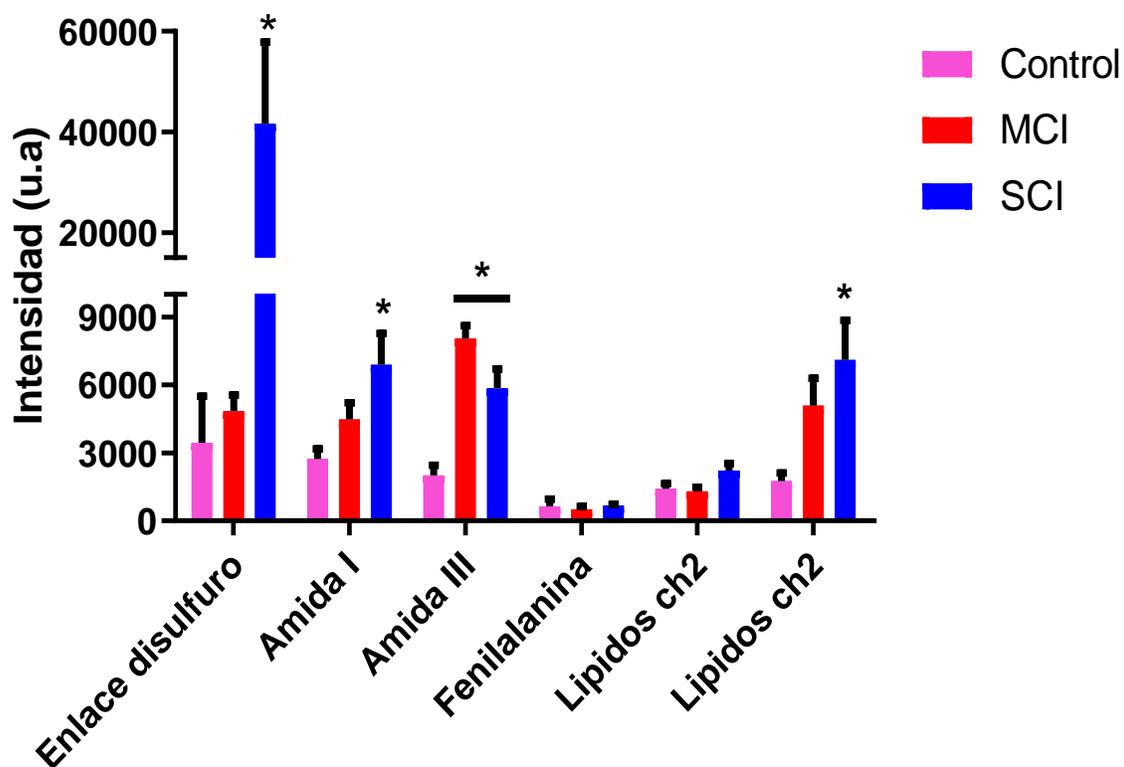
Se realizó un análisis del área bajo la curva de ciertas regiones del espectro Raman para determinar las diferencias entre los promedios de las muestras de pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI), y deterioro cognitivo severo (SCI), así como mismo el promedio de los sujetos control. Las áreas analizadas fueron las bandas pertenecientes a los enlaces disulfuro ($490\text{-}500\text{ cm}^{-1}$), las bandas asociadas a amida I ($800\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$), fenilalanina (1000 cm^{-1}), amidas III ($1200\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$), lípidos ($1540\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ y $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$).



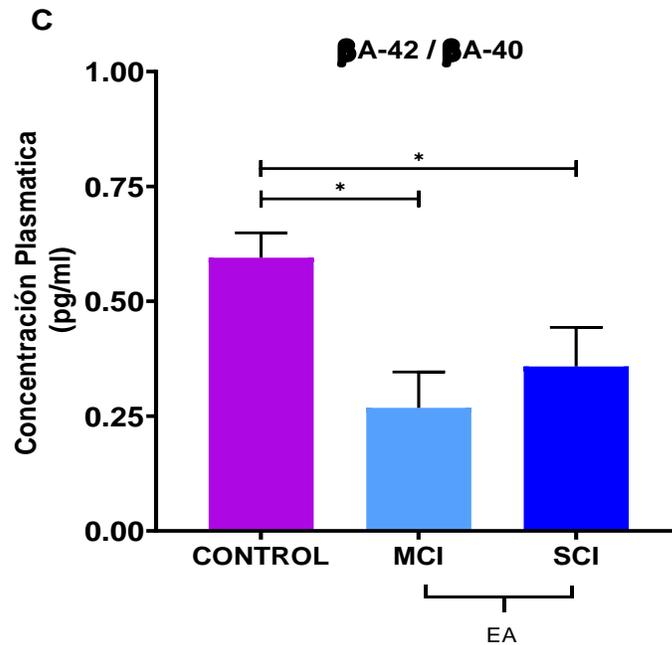
Espectro 4.- Análisis de área bajo la curva del promedio de espectros Raman de Pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI) (espectro Azul), pacientes con deterioro cognitivo severo (SCI) (barra roja) y promedio de espectros Raman de sujetos Control (espectro rosa), ANOVA post-hoc Bonferroni * $p < 0.001$ EA vs control ANOVA post-hoc Bonferroni # $p < 0.01$ EA vs control.

La gráfica 1, representa los valores del análisis de área bajo la curva de los espectros promedio de pacientes con MCI (barra roja), SCI (barra azul) y de los sujetos control (barra rosa), expresados en valores de intensidad del espectro Raman. Como se puede observar, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de enlaces disulfuro, así como en los grupos de amida I y amida III, con un valor de $p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente comparados con los sujetos control. Estas diferencias nos muestran que hay un cambio estructural en la conformación de la proteína BA en donde se da el paso conformacional de α a β plegada, es decir en donde las placas beta-amiloide ya se encuentran formadas. Sin embargo no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos de MCI y SCI.

Area bajo la Curva Espectro Raman



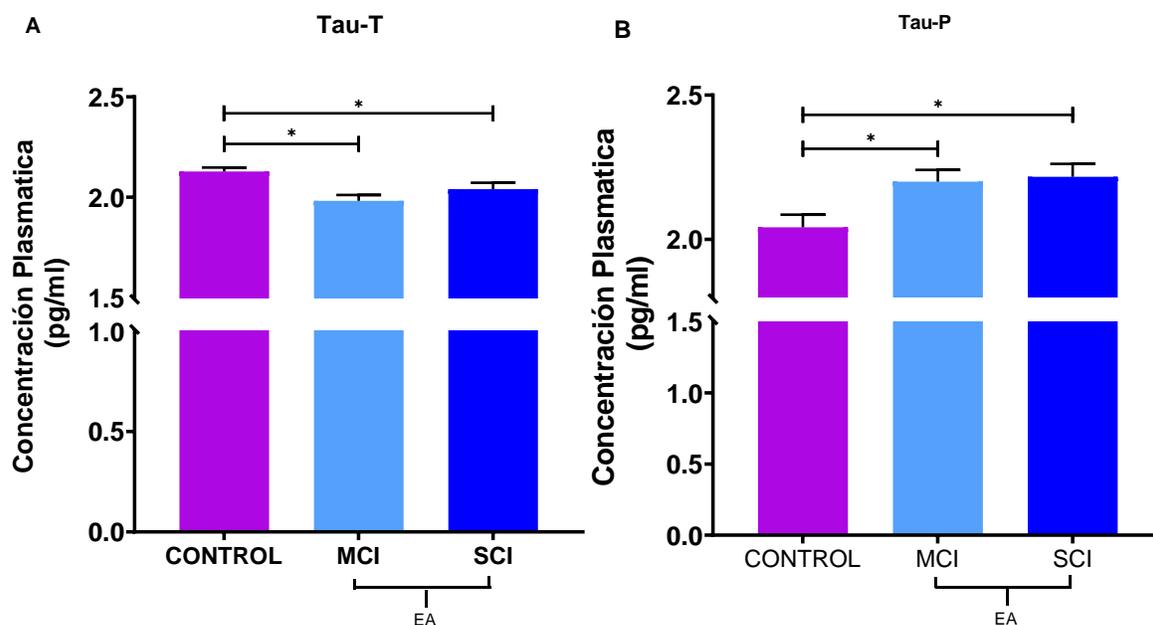
Gráfica 1. – Análisis de área bajo la curva del promedio del espectro Raman de pacientes deterioro cognitivo leve MCI (barra roja), Deterioro cognitivo severo SCI (barra Azul), y promedio de sujetos control (barras rosa). ANOVA post-hoc Bonferroni * $p < 0.001$ EA vs control ANOVA post-hoc Bonferroni # $p < 0.01$ EA vs control.

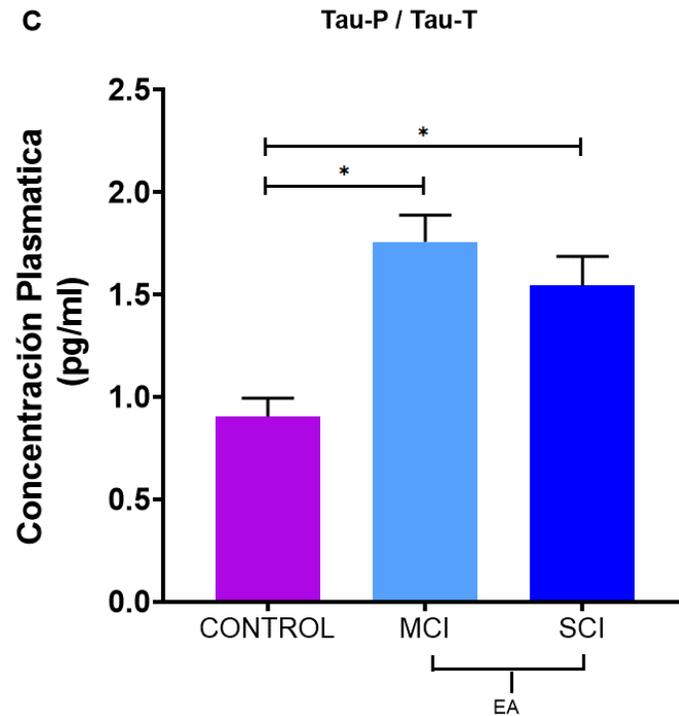


Gráfica 2. Concentración plasmática de Beta amiloide. Concentración plasmática de β A 40 (gráfica 4A), β A 42 (gráfica 4B) y la relación β A42 / β A40 (gráfica 4C) en sujetos control (n = 50) pacientes con MCI (n = 23) y SCI (n = 27) y, ANOVA una vía, post hoc tukey. Control, (sujetos sin deterioro cognitivo), pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI) y pacientes con deterioro cognitivo severo (SCI). Los datos se presentan como \pm SE, * p < 0.05 versus grupo control.

Análisis de concentración de la proteína Tau en plasma por grado de deterioro cognitivo

En la gráfica 3 se analizó el contenido plasmático de la proteína Tau-T (gráfica 3A) y la proteína Tau-P (gráfica 3B) respectivamente. Se observa en la gráfica 3A, una disminución en la concentración plasmática de la proteína Tau-T en los grupos con MCI y SCI respectivamente. Por el contrario, se observó un aumento en la concentración plasmática de la proteína Tau-P (gráfica 3C) en los grupos con MCI y SCI respecto al control. Al realizar el análisis de la relación de la proteína Tau-P/Tau-T, se observó en los grupos con MCI y SCI un aumento en la concentración de esta proteína, es decir, en pacientes con un deterioro cognitivo leve y severo, se encontró un aumento de la concentración de la proteína Tau en su estado fosforado.

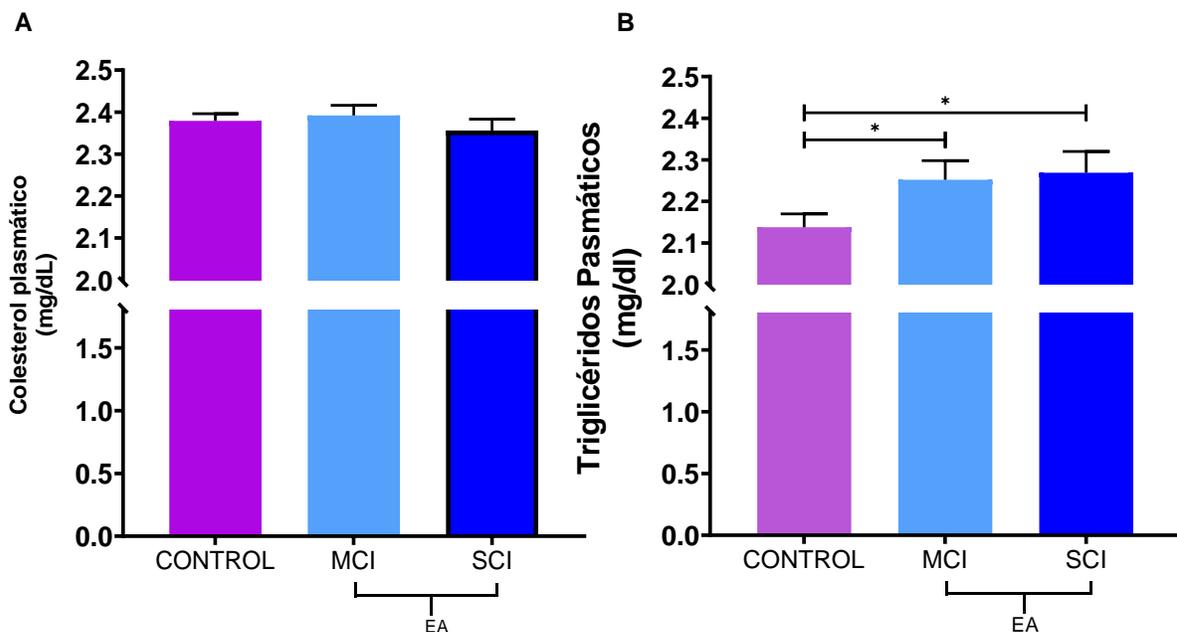




Gráfica 3. Concentración plasmática de la proteína Tau. Concentración plasmática de Tau-T (gráfica 3A), Tau-P (gráfica 3B) y la relación Tau-P / Tau-T (gráfica 3C) en sujetos control (n = 50), pacientes con MCI (n = 23) y pacientes con SCI (n = 27) y, ANOVA una vía, post hoc tukey. Control, (sujetos sin deterioro cognitivo), Pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI) y Pacientes con deterioro cognitivo severo (SCI). Los datos se presentan como \pm SE, *p < 0.05 versus grupo control.

Análisis de concentración lípidos plasmáticos por grado de deterioro cognitivo

En la gráfica 4 se realizó el análisis de la concentración plasmática de lípidos. Colesterol (gráfica 4A) y Triglicéridos (gráfica 4B) respectivamente. En la gráfica 4A, no se observan diferencias en la concentración plasmática del colesterol en los diferentes grupos de estudio, sin embargo, al analizar la concentración plasmática de triglicéridos (4B), se pudo observar que hay un aumento de estos en los grupos de pacientes con MCI y SCI respecto al control ($*p < 0.05$).



Gráfica 4. Correlación entre la concentración plasmática de lípidos. Concentración plasmática de colesterol (gráfica 4A), Triglicéridos (gráfica 4B) en sujetos control (n = 50), pacientes con MCI (n = 23) y pacientes con SCI (n = 27).) ANOVA una vía, post hoc tukey. Control, (sujetos sin deterioro cognitivo), pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI) y pacientes con deterioro cognitivo severo (SCI). Los datos se presentan como \pm SE, $*p < 0.05$ versus grupo control.

En siguiente tabla, se muestran los valores de las correlaciones entre los marcadores medidos y las muestras de pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI), pacientes con deterioro cognitivo severo (SCI). Se observó una correlación positiva ($p < 0.05$) entre la relación de $\beta A -42/\beta A -40$, Tau-t y Tau. De igual forma se observó una correlación en los grupos de MCI y SCI y los triglicéridos

Tabla 4. Correlación entre biomarcadores y severidad de demencia.

Marcador	MCI		SCI	
	Pearson's r	P	Pearson's r	P
BA-40	0.1108	0.7456	0.2795	0.4664
BA-42	0.2930	0.3819	0.5434	0.1639
BA-42 / BA40	-0.8993	0.0002*	-0.7477	0.0206*
TAU-P	-0.7781	0.0080*	-0.9078	0.0124*
TAU TOTAL	-0.6723	0.0678*	-0.5871	0.1658*
TAU-P / TAU TOTAL	-0.8136	0.0489*	-0.8135	0.0140*
COLESTEROL	-0.2883	0.3395	0.4556	0.2566
TRIGLICÉRIDOS	-0.6552	0.0151*	-0.8192	0.0461*

La concentración plasmática de βA y Tau se midieron por kit de ELISA, la concentración plasmática de lípidos fue medida por un kit de agente biológico. La asociación entre el biomarcador plasmático y el grado de deterioro cognitivo se evaluó mediante la correlación de Pearson. Los datos se presentan como r, p del análisis de correlación de Pearson y las estimaciones de pendiente (IC 95%) de RMA; Se muestran resultados significativos en asterisco.

Discusión

La espectroscopia Raman se ha vuelto una herramienta muy utilizada en los últimos años, para la investigación de muchas enfermedades, entre las cuales se encuentran las enfermedades neurodegenerativas, este tipo de espectroscopia ha mostrado buenos resultados en la diferenciación entre pacientes con algún tipo de deterioro cognitivo y sujetos cognitivamente sanos. La búsqueda de biomarcadores para detectar alguna enfermedad neurodegenerativa ha producido el estudio de muchos tipos de tejidos o fluidos, en este estudio, se propuso el uso de este tipo de espectroscopia, como una herramienta diagnóstica en la EA, utilizando el plasma para el análisis de esta enfermedad. El plasma es una buena fuente de investigación, ya que es el menos invasivo de obtener a diferencia del líquido cefalorraquídeo es un procedimiento invasivo para este tipo de pacientes.

Se realizó el estudio de dos poblaciones una con una enfermedad neurodegenerativa y como control se utilizó a una población pareada por edad, pero sin ninguna enfermedad neurodegenerativa agregada, esto con la finalidad de mostrar las características espectroscópicas, que existen entre una población con una demencia y otra sana, los cambios en las intensidades, así como en las regiones donde se presentan las bandas de β A, enlaces desulfuro y lípidos son diferentes entre una población y otra (véase los resultados en Anexos). Estos cambios por ER, nos proporcionan información estructural y molecular de una población con EA, lo cual es útil para el diagnóstico de la enfermedad.

El objetivos de este proyecto fue diferenciar la etapa inicial de la etapa tardía de pacientes diagnosticados con demencia tipo Alzheimer por medio de la espectroscopia Raman, por lo cual el grupo de pacientes diagnosticados con EA se dividió en 2 subgrupos, aquellos que de acuerdo a sus análisis clínicos fueron clasificados con deterioro cognitivo leve (MCI) y aquellos clasificados con deterioro cognitivo severo (SCI); una vez clasificados estos subgrupos se realizó el análisis por ER. Se realizó el análisis del área bajo la curva del promedio de las muestras de plasma de pacientes con MCI, SCI y sujetos control (espectro 4 y grafica 1), en 6 regiones del espectro Raman ($450-500\text{ cm}^{-1}$, $800-900\text{ cm}^{-1}$, $1200-1300\text{ cm}^{-1}$, 1000 cm^{-1} , $1400-1500\text{ cm}^{-1}$, $1600-1700\text{ cm}^{-1}$), asociadas a; enlace disulfuro, amida I, amida III, fenilalanina, CH_2 lípidos, respectivamente. En el espectro 2, se

analizaron las diferencias existentes entre pacientes con MCI y SCI, se observó que existen pequeñas diferencias significativas entre estos grupos, que radican en las intensidades de algunas de las bandas y que pueden ser relacionadas a las concentraciones de ciertas moléculas que se consideran marcadores de la enfermedad. Si bien se esperaba la identificación de una mayor cantidad de bandas relacionadas con el péptido β A, en el espectro promedio de los pacientes con SCI, ya que se sabe que en esta etapa hay una mayor cantidad de placas β A, solo se observaron más interacciones moleculares de este péptido en los espectros de este grupo. No obstante, una de las bandas que marca diferencia entre estos grupos es la banda encontrada a una frecuencia de 1343 cm^{-1} asociada al cambio conformacional de α -Hélice a β -plegada, este cambio conformacional se asocia con el estado de agregación del péptido β [Lippert J. y Col., 1976]. Al comparar estos grupos de pacientes con EA contra sujetos control (espectro 3), se observó que en las regiones asociadas a amidas I y III, hay una mayor intensidad, de estas bandas en los grupos de MCI y SCI con respecto al grupo control. Al hacer el análisis de áreas bajo la curva de estos espectros (espectro 4, gráfica 1), se observó que la banda asociada a enlaces disulfuro en muestras de plasma de pacientes con SCI, mostraron una mayor intensidad en comparación con las muestras de plasma de pacientes MCI y sujetos control, este aumento en la intensidad podría ser debido a una mayor presencia de proteínas, lípidos y de enlaces que estén presentes, o por los cambios debido a la vibración en la cadena lateral de la estructura proteínica de la composición de la proteína en las plaquetas. Diversos estudios han demostrado que la tasa de la APP se altera en las plaquetas de pacientes con EA [Laniare-Mate y Col., 2014], dichos cambios pueden alterar la intensidad de las conexiones vecinas a la APP, estos cambios se han observado un modelo murino de Alzheimer en donde se observa que a partir de los 4 meses y se atenúan a una mayor edad [Chen P. y Col., 2011].

La generación y deposición anormal del péptido β A es una característica patológica típica de EA; nuestros resultados muestran un aumento en la intensidad de la señal en rangos entre $1200\text{-}1328\text{ cm}^{-1}$. Esto puede atribuirse a la proteína β -plegada que aparece en la región de la amida III, lo cual podría indicar que la proteína progresa a un cambio conformacional de α -hélice a β -plegada, y este cambio es observable en el plasma de pacientes con SCI. Estudios anteriores han demostrado que este mismo cambio se observa en el hipocampo de ratones a los cuales se les indujo EA, estos rangos en los espectros de Raman son marco de referencia para el análisis de estudios para la EA. Si es verdad que la acumulación del β A se pliega en el espacio extracelular, por medio de la espectroscopia Raman es posible llegar a detectar este péptido en algunas bandas, estos resultados

concuerdan con los obtenidos por el grupo de Carmona y Col., 2013, en donde ellos al realizar el análisis de plasma de pacientes diagnosticados con EA, encontraron diferencias en este péptido en comparación con pacientes sanos. Se observó un aumento en la intensidad de la región de las amidas I ($800-900\text{ cm}^{-1}$), en el grupo de SCI y fue estadísticamente significativo (2723 ± 455.2 versus 6888 ± 1397) en comparación del grupo Control, este aumento no se observó en la región de amida III ($1200-1300\text{ cm}^{-1}$) para el grupo de SCI (grafica 1). En estudios realizados en el plasma de ratones transgénico para EA, por ER, se ha encontrado que, a los 4 y 12 meses de edad, la mayoría de las bandas que presentan los espectros son pertenecientes a cambios en la conformación de la amida I, así como a cambios relacionados a cadenas laterales de proteínas generadas por fenilalanina, triptófano [Chen P. y Col., 2011]. Sin embargo, sí aumentó la intensidad de la señal en la región de la amida III en el grupo de pacientes con MCI contra sujetos control (gráfica 1) y esta diferencia fue estadísticamente significativa (2002 ± 458.7 versus 8043 ± 574.1 $p < 0.05$), este aumento en la señal podría deberse a una mayor cantidad de estructuras β -plegadas del péptido βA .

Si bien los resultados obtenidos en el presente estudio, por medio de la espectroscopia Raman contrastan con los obtenido por ELISA (gráfica 2A, 2B y 2C), ya que encontramos concentraciones significativamente bajas de βA 1-42 en plasma en el grupo de MCI y SCI, mientras que sólo niveles significativamente altos de βA 1-40 en el grupo de MCI. Esto puede ser debido a que si bien la isoforma βA 1-42 está disminuyendo (gráfica 2B), también se ha reportado que la isoforma del βA 1-40 puede aumentar [Schneider P. y Col., 2009; Ritchie C. y Col., 2014] y la diferencia de estas formas de amiloide por espectroscopia es limitada en nuestro proyecto. Estudios han informado de niveles plasmáticos bajos de βA 1-42 puede estar asociado a un mayor riesgo de desarrollar demencia [Van Oijen y Col. 2006], lo que coincide con nuestros hallazgos. De forma similar a nuestras observaciones (gráfica 2C), otros estudios han informado de que los individuos con una relación βA 1-42/ βA 1-40 plasmático baja tienen un riesgo algo más significativo de desarrollar EA, ya que βA 1-42/ βA 1-40 se ha relacionado con el deterioro cognitivo a lo largo del tiempo [Graff-Radford N. y Col., 2007; Seppälä T. y Col., 2010]. Un factor que contribuye a la variabilidad entre los estudios puede ser el origen étnico, ya que la mayoría de los estudios se han realizado en países europeos o en Estados Unidos, donde la mayoría de la población es caucásica [Hansson O. y Col., 2012; Graff-Radford N. y Col., 2007]. Cosentino y Col. (2010), Incluyeron a pacientes Hispano-Caribeños, Afroamericanos y Caucásicos no hispanos e informaron niveles de $A\beta$ 1-42 estables o en descenso y el cociente βA 1-42/ βA 1-40 durante el seguimiento se asociaban con el deterioro cognitivo global [Cosentino A. y Col., 2010]. Estos hallazgos apoyan nuestros resultados respecto a

los niveles de A β 1-42 en plasma en pacientes mexicanos con EA, aunque no se realizó un seguimiento de los pacientes. El sexo es otro factor que puede explicar las diferencias entre los estudios [Subramaniapillai S. y Col., 2021; Dennison J. y Col. 2021]. Se ha informado de un riesgo relativamente mayor de EA en mujeres, lo que sugiere interacciones entre la disminución hormonal asociada a la menopausia y la apolipoproteína E (APOE) 4 [Emarani S. y Col., 2020]. En los resultados que obtuvimos por medio de la espectroscopia Raman nos enfocamos en buscar patrones del amiloide, con pleno conocimiento de que las isomorfias más tóxicas como la 1-40 y 1-42 pueden ser principal componente; pero a la vez con la posibilidad de que las bandas encontradas asociadas al péptido β A pertenezcan a cualquiera de las isoformas que se encuentra en mayor concentración [Chou I-Hsien y Col., 2008; Growdon J. 1999; Schneider P. y Col., 2009; Van Oijen y Col., 2006]. La importancia de concentración plasmática de β A en relación con la acumulación de β A en el cerebro no está clara. Si el β A plasmático se origina en distintos tejidos del cerebro, puede que no haya una asociación entre los niveles plasmáticos de β A y el β A depositado en el cerebro. Sin embargo, se ha demostrado que los complejos A β -APO E y A β -APO J cruzan la barrera hematoencefálica [Zlokovic B. y Col., 1996], por lo tanto, el β A presente en el plasma puede contribuir al desarrollo de depósitos de β A en el cerebro.

En pacientes con EA, la proteína Tau normal contiene 2-3 radicales de fosfato en cada molécula, mientras que la proteína Tau hiperfosforilada puede contener de 5-9 radicales de fosfato en consecuencia [Zhang Y. y Col., 2006]. Algunos estudios han encontrado que la proteína Tau aumenta en sangre, en pacientes con EA en comparación con pacientes sanos o con pacientes con enfermedades neurológicas no del tipo Alzheimer; [Growdon J. 1999; Schneider P. y Col., 2009; Giedraitis V. y Col., 2007; Hansson O. y Col., 2010]. Si bien la presencia de grupos fosfatos no fue detectable por medio de la ER, en muestras de plasma de pacientes con MCI y SCI (espectro 2 y 3), se encontró una banda, alrededor de una frecuencia de 1080 cm⁻¹, que es asignada a la vibración de PO_{2s}. Esto podría estar implicado en la presencia de la proteína Tau hiperfosforilada y su acumulación, la cual puede llegar a ser detectada en el plasma de pacientes con EA, esta banda es similar y se aproxima a la encontrada en muestras de hipocampo de pacientes diagnosticados con EA a un rango aproximado de 1088 cm⁻¹ [Chen P. y Col., 2009].

Las bandas asociadas a grupos fosfatos (100-1200 cm⁻¹), aunque no se presentan con gran intensidad en los grupos de pacientes diagnosticados con MCI y SCI, esta pequeña señal podría indicar que hay una mayor concentración de estos grupos, como una evidencia de la alteración e

hiperfosforilación de la proteína Tau [Oddo S. y col., 2003a, 2003b]. Sin embargo, al realizar el análisis por ELISA por grupo para la proteína Tau observamos que la concentración plasmática de la proteína Tau-T (gráfica 3A) disminuye en pacientes con MCI y SCI, contrariamente al analizar la proteína Tau-P (gráfica 3B) observamos que la concentración plasmática de la proteína Tau-P aumentan en pacientes diagnosticados MCI y SCI en comparación con el control. Por lo tanto, los niveles de Tau en plasma podrían reflejar el daño neuronal y el subsiguiente drenaje de tau desde el parénquima cerebral hacia el LCR y la sangre [Pase M. y Col., 2019; Deters K. y Col., 2017]. En el gráfico 3c, se puede observar la relación de la proteína Tau-P / Tau-T en plasma, en la que encontramos que hay una mayor concentración de la proteína Tau-P en pacientes diagnosticados con MCI y SCI, en comparación con sujetos control. Esta relación podría indicar que desde las primeras etapas de la enfermedad podemos encontrar una mayor concentración de la proteína Tau-P en plasma y sugiere una asociación entre los niveles de Tau y el deterioro cognitivo [Dage J. y Col., 2016; Schraen-Maschke S. y Col., 2008] y aunque esperamos que la concentración de esta proteína aumente en las últimas etapas, no se observa un aumento estadísticamente significativo, la concentración de esta proteína no aumenta en las últimas etapas en comparación con la primera etapa de la enfermedad.

La falta de correlación de las concentraciones de Tau en plasma y LCR sugiere que las concentraciones de Tau en estado estacionario en estos dos fluidos corporales están reguladas de manera diferencial [Zetterberg H. y Col., 2013]. La proteína Tau se expresa principalmente en las neuronas del sistema nervioso central [Schraen-Maschke S. y Col., 2008] y se cree que los niveles plasmáticos reflejan el daño neuronal y posterior drenaje de Tau desde el parénquima cerebral hasta el LCR y la sangre [Mattsson N. y Col., 2016; Whitmer R. y Col., 2005]. Por lo tanto, el nivel elevado de Tau-T en el plasma puede reflejar el daño neuronal de numerosas fuentes. Del mismo modo, en la cohorte de la Iniciativa de Neuroimagen de la Enfermedad de Alzheimer, se ha demostrado que el incremento en la concentración plasmática de Tau-T se correlaciona con densidades más bajas de materia gris en múltiples regiones del cerebro, lo que sugiere una falta de especificidad [Deters K. y Col., 2017].

Hay muchos informes sobre la relación entre los lípidos y EA [Kivipelto M. y Col., 2002; Whitmer R. y Col., 2005]. El cerebro es rico en colesterol, lo que representa casi el 25% de todo el colesterol en el cuerpo [Reiss A. y Col., 2004]. Hay algunas investigaciones donde se informa el papel del colesterol en la formación de las placas beta amiloide [Reitz C. 2012; Di Paolo G. y Col., 2011]. Los estudios in

vitro [Ehehalt R. y Col., 2003] informan que los niveles más bajos de colesterol desplazan el proceso de APP a regiones no agrupadas de la membrana donde se favorece la vía de escisión de la α -secretasa benigna. Adicionalmente en trabajos in vitro se ha demostrado que la modulación de los niveles locales de colesterol modifica la producción de β A. Al mismo tiempo, la evidencia en animales demuestra un papel potencial para el colesterol en la deposición de β A en suero. Por ejemplo, en ratones APP transgénicos, una dieta alta en colesterol se asoció reversiblemente con una mayor formación de placas β A [Refolo L. y Col., 2000; Shie F. Col., 2002]. Por ER, se buscaron bandas en las regiones de $1400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ y $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ que es el rango en donde se expresa el movimiento vibracional de CH_2 de la cadena lateral perteneciente a lípidos, y observamos que las intensidades de estas bandas entre los grupos de estudio eran semejantes (espectro 2 y 3). Sin embargo, se distinguen varias bandas que corresponden a los modos vibracionales de biomoléculas tales como proteínas, lípidos, o ácidos nucleicos, esto puede ser por la alteración que empieza a detectarse propio de la EA en estos grupos [Chen P. y Col., 2011; Huang N. y Col.; 2011, Michael y Col., 2014]. Aún si estos cambios no llegan a ser comparables con las encontradas en estudios realizados en hipocampo de pacientes diagnosticados con EA, en donde la cantidad de bandas encontradas corresponde al grado de lesión del hipocampo a frecuencias Raman de 1065, 1088, 1130, 1300, 1440, y 1670 cm^{-1} , que son normalmente asignadas a los modos de vibración de C-H y C-C, pertenecientes a proteínas, lípidos o colesterol, en donde mostraron una tendencia al alza [Chen P. y Col., 2009, 2011], los cambios que se encontraron en el presente estudio en las regiones $1400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ y $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ (espectro 3) asociados a un modo vibracional de la cadena de lípidos, llegaron a ser significativos en el grupo de MCI y SCI en comparación con sujetos control (gráfica 1). Este aumento de la intensidad podría asociarse al aumento en la concentración de los triglicéridos presente en el grupo de pacientes con MCI y SCI (gráfica 4B). Los espectros muestran un reflejo de la composición del plasma, como lo son, agua, proteínas, lípidos, glucosa, vitaminas, hormonas, así como productos de desecho del metabolismo, si bien las diferencias que encontramos en los espectros entre las diferentes fases muestran cambios en algunos de las bandas relacionados con los cambios vibracionales de C-H, C-C de las proteínas y/o lípidos, esto podría ser debido a algún otro componente del plasma.

Si bien por ELISA no se detectaron cambios en las concentraciones plasmáticas de colesterol en nuestros grupos de estudio (gráfica 4A), sí encontramos un aumento en la concentración de triglicéridos, se ha encontrado que los niveles altos de triglicéridos pueden causar aterosclerosis, que a su vez aumenta el riesgo de eventos cardiovasculares. Estos altos niveles de triglicéridos

podrían ser el resultado de otras comorbilidades relacionadas con la EA, como la diabetes mellitus tipo 2 y el síndrome metabólico [Gutiérrez-Solis A. y Col. 2018]. Además, un estudio de cohorte longitudinal en individuos cognitivamente sanos concluyó que el aumento de los niveles de triglicéridos en la mediana edad podría predecir la patología cerebral de la EA, lo que apoya la implicación de los lípidos en etapas muy tempranas del desarrollo de la EA [Nägga K. y Col., 2018]. En cambio, otros estudios no apoyan la hipótesis de que el riesgo de EA esté asociado a las concentraciones de lípidos en plasma [Reitz C. y Col., 2004]. Por lo tanto, es necesario realizar más investigaciones y seguimiento en una muestra más amplia de pacientes mexicanos con EA para aclarar esto.

Al analizar la relación entre β A-42/ β A-40 y el grado de deterioro cognitivo (Tabla 4), se encontró una correlación negativa, que fue estadísticamente significativa lo que indicó que el grado de deterioro cognitivo estaba relacionado con la concentración plasmática de este marcador. Según varios autores, la relación de la proteína β A en plasma es controvertida, aunque se esperaba un aumento de esta proteína en pacientes con Alzheimer, también es cierto que una gran cantidad se acumulará en el cerebro para la formación de placas, sin embargo, según el grado de deterioro progresa en pacientes con EA, también se espera que la concentración de la proteína aumente en el plasma, esto porque se ha informado que en las últimas etapas de la enfermedad ya hay una ruptura de la barrera hematoencefálica [Zlokovik B. y Col., 2008; Bell R. y Col. 2009; Metha P. y Col., 2002], lo que permitiría la salida de las proteínas más grandes, como la proteína β A.

Se realizó una correlación de Pearson para observar la asociación entre la proteína Tau plasmática y el deterioro cognitivo de las muestras analizadas por Elisa, encontramos una diferencia significativa en la relación de la proteína Tau-P y la relación Tau-P/Tau-T y el grado de deterioro cognitivo (tabla 2), existe una correlación negativa entre el grado de demencia y la concentración plasmática de esta proteína en MCI y SCI. Esta relación podría indicar que desde las primeras etapas de la enfermedad esta proteína está implicada en el grado de deterioro cognitivo de los pacientes. Se observa la correlación entre los triglicéridos y el grado de deterioro cognitivo (tabla 4), en pacientes en MCI y SCI, se encontró una correlación entre la concentración de este lípido y el grado de demencia. No hubo asociación entre el colesterol y algún grado de demencia en pacientes con EA, esto podría deberse al hecho de que los niveles de colesterol en plasma en nuestros sujetos sanos estaban por arriba de las concentraciones normales (por arriba de 200 mg / dl), podría deberse a esta razón que no se encontró relación entre el colesterol y el grado de demencia. Estos

niveles elevados de colesterol en adultos mexicanos (> 60 años de edad) indican un riesgo de desarrollar otras enfermedades, como hipertensión arterial, diabetes tipo 2 y síndrome metabólico [Kivipelto M. y Col., 2002; Gutiérrez-Solis A. y Col., 2018]. Hay muchos autores que relacionan las altas concentraciones de este lípido en la sangre con el deterioro cognitivo, se sugiere que las altas concentraciones de lípidos podrían conducir a una hiperlipidemia sistémica que podría causar daños en la barrera hematoencefálica [Ehehalt R. y Col., 2003] a través de mecanismos inflamatorios y de otro tipo, con la consiguiente fuga de colesterol sérico, citocinas inflamatorias y otros factores amiloidogénicos [Altman R. y Col., 2010], lo que podría facilitar el paso de proteínas como BA y Tau al torrente sanguíneo. Además, algunos autores han informado de que los portadores de APOE4 presentan tanto hipertrigliceridemia como hipercolesterolemia [Yassine H. y Finch C. 2020]. Además, APOE4 se asocia con el hipometabolismo de la glucosa en el cerebro de los adultos mayores [Wolf A. y Col. 2013]. En los astrocitos, la expresión de APOE4 reduce la capacidad de degradar los péptidos β A y proporciona un mecanismo para la mayor formación de placas amiloides [Prasad H. y Rao R. 2018].

Durante las últimas décadas, la búsqueda de biomarcadores para la detección temprana de la enfermedad de Alzheimer ha ido en aumento, ya que considerando el crecimiento exponencial de la población mundial, en un futuro próximo el número de adultos mayores de 60 años será considerable, teniendo en cuenta que desde el 50% al 60% diagnosticado con algún tipo de demencia desarrolla demencia de tipo Alzheimer, la búsqueda de biomarcadores se vuelve esencial, lo que puede ayudar a detectar la enfermedad en etapas tempranas y así mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados por esta enfermedad. Aunque los resultados encontrados en este trabajo nos muestran que es posible detectar proteínas plasmáticas íntimamente involucradas en la enfermedad de Alzheimer. Es importante expandir el grupo de estudio, así como analizar las diferentes etapas de la enfermedad para conocer las concentraciones de las proteínas involucradas en las diferentes etapas de la enfermedad. El estudio de la enfermedad de Alzheimer en una población mexicana es poco conocido, ya que los factores socioeconómicos impiden que ciertos sectores de la población realicen estudios en profundidad para conocer la gravedad de su enfermedad, por lo que la búsqueda de biomarcadores tempranos en este tipo de poblaciones podría mejorar la calidad de vida, retrasando la aparición de algunos síntomas si la enfermedad se detecta a tiempo. Aunque las altas concentraciones de lípidos pueden facilitar el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, debemos tener en cuenta que las poblaciones con una dieta alta en carbohidratos y grasas tienen un mayor riesgo de desarrollarla. Es importante hacer un estudio en

profundidad para saber qué otros factores en este tipo de poblaciones ayudan al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la actividad de algunas isoformas del péptido β A, puede ser detectables por medio de la espectroscopia Raman. Este tipo de espectroscopia es una técnica que podría ser utilizada como herramienta diagnóstica, se podrían encontrar más diferencias entre estados neurodegenerativos y fases de la enfermedad, si se ampliara el rango de estudio, esto nos daría más herramientas para poder estudiar los cambios que hay en la progresión de la enfermedad de Alzheimer.

Si bien la proteína Tau está íntimamente relacionada la patología de Alzheimer, es necesario hacer una búsqueda más profunda en las interacciones y movimientos moleculares de esta proteína, para poder identificarla por medio de la espectroscopia Raman, ya que el rango del grupo fosfato no nos da una mayor respuesta del comportamiento de esta proteína en las diferentes fases de la enfermedad.

La alta sensibilidad y especificidad de la detección de biomarcadores por ELISA, nos acerca a una herramienta muy útil para el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas tal como la EA, sin embargo, hay muchas controversias en el contenido de proteínas como Tau o de péptidos como β A en sangre, estas diferencias pueden deberse, a diversos factores, como el tipo de población, el grado de deterioro cognitivo que presenten, en el momento en el que la muestra sea tomada etc. Sin embargo, los resultados encontrados en este estudio por medio de esta técnica, muestran diferencias significativas en los niveles plasmáticos de péptido β A42 y proteína Tau y concentraciones de triglicéridos entre pacientes mexicanos con EA y controles. Uno de los principales resultados que encontramos fueron los observados en las concentraciones plasmáticas de proteína Tau-T y la proteína Tau-P, ya que estos cambios no pudieron ser detectables por medio de la ER, estos cambios son importantes ya que esta proteína es uno de los principales marcadores para diagnosticar la EA.

Lípidos como el colesterol y triglicéridos, podrían estar más involucrados en la patología de Alzheimer, sin embargo, es necesario hacer el estudio en una población donde las concentraciones de estos marcadores estuvieran controladas, para poder hacer una correcta asociación entre el grado de demencia y la concentración plasmática de lípidos.

Este tipo de estudio es fundamental en la población mexicana, por lo que esta es una fortaleza de nuestra investigación. Algunas de las limitaciones de este estudio a considerar fueron en primer lugar la recolección de muestras de sangre sin ayuno y no evaluamos si los pacientes estaban tomando algún medicamento contra el colesterol, lo que puede haber revelado diferencias en los niveles de colesterol entre los grupos. En segundo lugar, no se determinó el genotipo APOE. En tercer lugar, el estudio no incluyó sujetos con otros tipos de demencia o enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, nuestros hallazgos no pudieron usarse para diferenciar entre la EA y otras demencias en la población mexicana. Cuarto, consideramos que el tamaño de la muestra fue relativamente pequeño. Se necesitan investigaciones futuras para determinar si estos compuestos plasmáticos podrían ser un marcador diagnóstico más útil para los pacientes mexicanos con EA en combinación con medidas de neuroimagen neurodegenerativas. Además, el seguimiento de estos participantes sería fundamental para analizar si estos marcadores cambian con el tiempo.

Perspectivas

- Realizar el análisis por espectroscopia de Raman de pacientes con demencia Vascular u otra enfermedad neurodegenerativa, para buscar las diferencias espectroscópicas diferentes tipos de demencia.
- Ampliar el rango de búsqueda en Espectroscopia de Raman para la identificación de más cambios e interacciones moleculares.
- Realizar un análisis de componentes principales de los espectros Raman, para identificación de fenómenos ocultos en el espectro.

Referencias Bibliográficas

1. Allsop, D., Landon, M., y Kidd, M. (1983). The isolation and amino acid composition of senile plaque core protein. *Brain research*, 259(2), 348-352.
2. Altman, R., Rutledge, J. C. (2010). The vascular contribution to Alzheimer's disease. *Clinical science*, 119(10), 407-421.
3. Atwood, C. S., Obrenovich, M. E., Liu, T., Chan, H., Perry, G., Smith, M. A., y Martins, R. N. (2003). Amyloid- β : a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid- β . *Brain Research Reviews*, 43(1), 1-16.
4. Bell, R. D., Zlokovic, B. V. (2009). Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, 118(1), 103-113.
5. Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., Zetterberg, H. (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 6(3), 131.
6. Busciglio J, Pelsman A, Wong C. (2002). Altered metabolism of the amyloid beta precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome. *Neuron*; 33:677-88.
7. Campdelacreu J. (2012). Parkinson disease and Alzheimer disease: environmental risk factors. *Neurologia*. PubMed PMID: 22703631.
8. Carmona P, Molinab M, Caleroc M, Bermejo F, Martínez P, Toledano A (2013). Discrimination Analysis of Blood Plasma Associated with Alzheimer's Disease Using Vibrational Spectroscopy, *Journal of Alzheimer's disease* 34, 911-920.

9. Castillo-M NT. (2016). Análisis de la progresión de la enfermedad de Alzheimer por Espectroscopia de Raman en plasma de ratón 3xTG-AD (Tesis de Maestría). Instituto Politecnico Nacional, CDMX, México.
10. Chen P, Shen A, Zhao W, Baek SJ, Yuan H, Hu J. (2009). Raman signature from brain hippocampus could aid Alzheimer's disease diagnosis. *Appl Opt.*; 48:4743-8.
11. Chou I-Hsien, Benford M., Beier H., Coté G. (2008). Nanofluidic Biosensing for β -amyloid Detection Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS). *Nano Lett.*, 8 (6), pp 1729–1735.
12. Cosentino, S. A., Stern, Y., Sokolov, E., Scarmeas, N., Manly, J. J., Tang, M. X., Mayeux, R. P. (2010). Plasma β -amyloid and cognitive decline. *Archives of neurology*, 67(12), 1485-1490.
13. Dage JL, Wennberg A, Airey DC, Hagen CE, Knopman DS, Machulda MM, Roberts RO, Jack CR Jr, Petersen RC, Mielke MM (2016) Levels of tau protein in plasma are associated with neurodegeneration and cognitive function in a population-based elderly cohort. *Alzheimers Dement* 12, 1226-1234.
14. De Gelder, J., De Gussem, K., Vandenabeele, P., & Moens, L. (2007). Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38(9), 1133-1147.
15. Dennison JL., Ricciardi NR. , Lohse I., Volmar CH., Wahlestedt C. (2021). Sexual dimorphism in the 3xTg-AD mouse model and its impact on pre-clinical research. *J Alzheimers Dis* 80, 41-52.
16. Deters, K. D., Risacher, S. L., Kim, S., Nho, K., West, J. D., Blennow, K., Saykin, A. J. (2017). Plasma tau association with brain atrophy in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 58(4), 1245-1254.

17. Di Paolo, G., Kim, T. W. (2011). Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(5), 284-296.
18. Frank C. J., McCreery R., Redd D. (1995). Raman spectroscopy of normal and diseased human breast tissues. *Anal. Chem.* 67, 777–783.
19. Eckman, C. B., y Eckman, E. A. (2007). An update on the amyloid hypothesis. *Neurologic clinics*, 25(3), 669-682.
20. Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160, 113-123.
21. Emrani S, Arain HA, DeMarshall C, Nuriel T (2020). APOE4 is associated with cognitive and pathological heterogeneity in patients with Alzheimer's disease: A systematic review. *Alzheimers Res Ther* 12, 141.
22. Giedraitis, V., Sundelöf, J., Irizarry, M. C., Gårevik, N., Hyman, B. T., Wahlund, L., Lannfelt, L. (2007). The normal equilibrium between CSF and plasma amyloid beta levels is disrupted in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*, 427(3), 127-131.
23. Glenner, G. G., y Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 122(3), 1131-1135.
24. Glenner, G. G., y Wong, C. W. (1988). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Alzheimer Disease y Associated Disorders*, 2(2), 134.
25. Goate, A., y Chartier-Harlin, M. C. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349(6311), 704.
26. Gorevic, P. D., Goñi, F., Pons-Estel, B., Alvarez, F., Peress, N. S., y Frangione, B. (1986). Isolation and partial characterization of neurofibrillary tangles and amyloid plaque core in

- Alzheimer's disease: immunohistological studies. *Journal of Neuropathology y Experimental Neurology*, 45(6), 647-664.
27. Graff-Radford, N. R., Crook, J. E., Lucas, J., Boeve, B. F., Knopman, D. S., Ivnik, R. J., Younkin, S. G. (2007). Association of low plasma BA42/BA40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Archives of neurology*, 64(3), 354-362.
28. Growdon, J. H. (1999). Biomarkers of Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 56(3), 281-283.
29. Gutiérrez-Solis AL, Datta Banik S, Méndez-González RM (2018). Prevalence of metabolic syndrome in Mexico: A systematic review and meta-analysis. *Metab Syndr Relat Disord* 16, 395-405.
30. Hampel H., Prvulovic D., Teipel S., Jessen F., Luckhaus C., Frolich L., Riepe M., Dodel R., Leyhe T., Bertram L., Hoffmann W., Faltraco F. (2011). The future of Alzheimer's disease: The next 10 years. *Progress in Neurobiology* 95 718–728.
31. Hardy, J., y Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in pharmacological sciences*, 12, 383-388.
32. Hardy, J. A., y Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184.
33. Hansson, O., Zetterberg, H., Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Andreasson, U., Londos, E., Blennow, K. (2010). Evaluation of plasma A β 40 and A β 42 as predictors of conversion to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiology of aging*, 31(3), 357-367.
34. Hansson, O., Stomrud, E., Vanmechelen, E., Östling, S., Gustafson, D., Zetterberg, H., Blennow, K., Skoog, I. (2012). Evaluation of Plasma BA as Predictor of Alzheimer's disease in Older Individuals without Dementia: a Population-based Study. *JAD*, 2011, 111418.

35. Hazzard, Halter J., Ouslander J., Tinetti M., Studenski S., High K., Asthana S. (2009). Dementia Including Alzheimer's disease, en Hazarrd's Geriatric Medicine and Gerontology. 6ta edicion, edit. McGraw-Hill Companies, Inc.
36. Hirschfeld, T. and Chase, B., 1986. FT-Raman spectroscopy: development and justification. *Applied spectroscopy*, 40(2), pp.133-137.
37. Hobro A., Konishi A., Coban C., Smith N. (2013). Raman spectroscopic analysis of malaria disease progression via blood and plasma samples. *Analyst*, 138, 3927.
38. Huang N., Short M., Zhao J., Wang H., Lui H., Korbelik M., Zeng H. (2011). Full range characterization of the Raman spectra of organs in a murine model. *Optical Society of America*, Vol. 19, No. 23.
39. Instituto Mexicano del Seguro Social. (2007). Comunicado de la Coordinación de Comunicación Social.
40. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2015) Encuesta Nacional sobre Salud y envejecimiento en México (ENASEM).
41. Instituto Nacional de Geriátría. (2014). Plan de acción Alzheimer y otras demencias. México, Primera edición.
42. Kaye R, Head E, Thompson JL. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*; 300:486-9.
43. Khlistunova I, Biernat J, Wang Y. (2006). Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J BiolChem*; 281:1205-14.
44. Kivipelto, M., Helkala, E. L., Laakso, M. P., Hänninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Soininen, H. (2002). Apolipoprotein E $\epsilon 4$ allele, elevated midlife total cholesterol level, and

- high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. *Annals of internal medicine*, 137(3), 149-155.
45. Klein WL, Krafft GA, Finch CE. (2001). Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum *Trends Neurosci*; 24:219-24 (2001).
46. Kneipp K., Haka A., Kneipp H, Badizadegan K., Yoshizawa N., Boone C., Shafer-Peltier K., Motz J., Dasari R., Feld M. (2002). Surfaces-enhance Raman spectroscopy in single living cell using gold nanoparticles. *Appl. Spectrosc.* 56, 150–154.
47. Laniare-Mate, Cruces J., Vida C., Saunfeliu C., Manssra R., Gimenez-Llort L., De la Fuente M. (2014). Inmunosenescencia prematura en los ratones triple-transgénico para la enfermedad de Alzheimer. 49(1):15-19.
48. Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. (2001). Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci*; 24:1121-59.
49. Ling X., Xu Y., Weng S., Li W., Zhi X., Hammaker R., Fateley W., Wang F., Zhou X., Soloway R., Ferraro J., Wu J.(2002). Investigation of normal and malignant tissue samples from the human stomach using Fourier transform Raman spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 56, 570–573.
50. Lippert J., Tyminski D., Desmeules P. (1976). Determination of the secondary structure of proteins by laser Raman spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 98, 7075–7080.
51. Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., y Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(12), 4245-4249.
52. Mattsson, N., Zetterberg, H., Janelidze, S., Insel, P. S., Andreasson, U., Stomrud, E., Hanlon, D. (2016). Plasma tau in Alzheimer disease. *Neurology*, 87(17), 1827-1835.

53. Mena, R., & Luna-Muñoz, J. (2009). Stages of pathological tau-protein processing in Alzheimer's disease: from soluble aggregations to polymerization into insoluble tau-PHF. In *Current Hypotheses and Research Milestones in Alzheimer's disease* (pp. 79-91). Springer US.
54. Mehta, P. D., Pirttilä, T. (2002). Biological markers of Alzheimer's disease. *Drug development research*, 56(2), 74-84.
55. Mondragón-Rodríguez S, Basurto-Islas G, Santa-Maria I. (2008). Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease. *Int J Exp Pathol* 89: 81 – 90.
56. Mourant J., Short K., Carpenter S., Kunapareddy N., Coburn L., Powers T., Freyer J. (2005). Biochemical differences in tumorigenic and nontumorigenic cells measured by Raman and infrared spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 10, 031106.
57. Murphy, S., Huang, L., & Kamat, P. V. (2011). Charge-transfer complexation and excited-state interactions in porphyrin-silver nanoparticle hybrid structures. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(46), 22761-22769.
58. Nägga K, Gustavsson AM, Stomrud E, Lindqvist D, van Westen D, Blennow K, Zetterberg H, Melander O, Hansson O (2018). Increased midlife triglycerides predict brain β -amyloid and tau pathology 20 years later. *Neurology* 90, e73-e81.
59. Nathalie, P., y Jean-Noel, O. (2008). Processing of amyloid precursor protein and amyloid peptide neurotoxicity. *Current Alzheimer Research*, 5(2), 92-99.
60. Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M. (2003a). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*; 24:1063-1070.
61. 43. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. (2003b). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*; 39:409-421. Park A., Baek S., Shen A., Hu J. (2013). Detection of Alzheimer's disease by Raman spectra of rat's

- platelet with a simple feature selection. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 121 52–56.
62. Pase MP, Beiser AS, Himali JJ, Satizabal CL, Aparicio HJ, DeCarli C, Chêne G, Dufouil C, Seshadri S (2019). Assessment of plasma total tau level as a predictive biomarker for dementia and related endophenotypes. *JAMA Neurol* 76, 598-606.
63. Pérez, J.L., Murillo, R. and Gómez, R., 2011. Espectroscopías infrarroja y Raman. *línea*. <http://sistemas.fciencias.unam.mx/~fam/EsRaman.pdf>. Consultado el, 4.
64. Prasad H, Rao R (2018). Amyloid clearance defect in ApoE4 astrocytes is reversed by epigenetic correction of endosomal pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E6640-E6649.
65. Querfurth HW y LaFerla FM. (2010). Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 28; 362 (4):329-44.
66. Qiu, C., Kivipelto, M., von Strauss, E. (2009). Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention". *Dialogues Clin. Neurosci* 11, 111–112.
67. Reed, B., Villeneuve, S., Mack, W., DeCarli, C., Chui, H. C., & Jagust, W. (2014). Associations between serum cholesterol levels and cerebral amyloidosis. *JAMA neurology*, 71(2), 195-200.
68. Refolo, L. M., Pappolla, M. A., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Duff, K. (2000). Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiology of disease*, 7(4), 321-331.
69. Reiss, A. B., Siller, K. A., Rahman, M. M., Chan, E. S., Ghiso, J., de Leon, M. J. (2004). Cholesterol in neurologic disorders of the elderly: stroke and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 25(8), 977-989.
70. Reitz C, Tang MX, Luchsinger J, Mayeux R (2004). Relation of plasma lipids to Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Neurol* 61, 705-714.

71. Reitz, C. (2012). Dyslipidemia and dementia: current epidemiology, genetic evidence, and mechanisms behind the associations. *Journal of Alzheimer's disease*, 30(s2), S127-S145.
72. Ritchie, C., Smailagic, N., Noel-Storr, A. H., Takwoingi, Y., Flicker, L., Mason, S. E., & McShane, R. (2014). Plasma and cerebrospinal fluid amyloid beta for the diagnosis of Alzheimer's disease dementia and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI). *The Cochrane Library*.
73. Roher, A. E., Esh, C. L., Kokjohn, T. A., Castaño, E. M., Van Vickle, G. D., Kalback, W. M. Emmerling, M. R. (2009). Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dementia*, 5(1), 18-29.
74. Ryzhikova E., Kazakov O., Halámková L., Celmins D, Malone P., Molho E., Zimmerman E., Lednev I. (2015). Raman spectroscopy of blood serum for Alzheimer's disease diagnostic: specificity relative to other types of dementia. *J. Biophotonics* 8, No. 7, 584–596.
75. Schneider, P., Hampel, H., & Buerger, K. (2009). Biological marker candidates of Alzheimer's disease in blood, plasma, and serum. *CNS neuroscience & therapeutics*, 15(4), 358-374.
76. Schraen-Maschke S, Sergeant N, Dhaenens CM, Bombois S, Deramecourt V, Caillet-Boudin ML, Pasquier F, Maurice CA, Sablonnière B, Vanmechelen E, Buée L (2008). Tau as a biomarker of neurodegenerative diseases. *Biomark Med* 2, 363-384.
77. Selkoe DJ. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*; 81:741-66.
78. Seppälä TT, Herukka SK, Hänninen T, Tervo S, Hallikainen M, Soininen H, Pirttilä T (2010) Plasma Abeta42 and Abeta40 as markers of cognitive change in follow-up: A prospective, longitudinal, population-based cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81, 1123-1127.

79. Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Larson, E. (1996). Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature medicine*, 2(8), 864-870.
80. Shie, F. S., Jin, L. W., Cook, D. G., Leverenz, J. B., LeBoeuf, R. C. (2002). Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain BA accumulation in transgenic mice. *Neuroreport*, 13(4), 455-459.
81. Song F., Poljak A., Smythe GA., Sachdev P. (2009). Plasma biomarkers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 61, 69-80.
82. Sudworth C; Archer J; Black R; Mann D. (2006). Advances in Raman spectroscopy for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Proc. SPIE 6093, Biomedical Vibrational Spectroscopy III: Advances in Research and Industry*, 60930K; doi:10.1117/12.642823.
83. Subramaniapillai S, Almey A, Natasha Rajah M, Einstein G. (2021). Sex and gender differences in cognitive and brain reserve: Implications for Alzheimer's disease in women. *Front Neuroendocrinol* 60, 100879.
84. Tanzi RE, Bertram L. (2005). Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*; 120:545-55.
85. Toledo, J. B., Vanderstichele, H., Figurski, M., Aisen, P. S., Petersen, R. C., Weiner, M. W., Toledo, E. (2011). Factors affecting BA plasma levels and their utility as biomarkers in ADNI. *Acta neuropathologica*, 122(4), 401.
86. Van Oijen, M., Hofman, A., Soares, H. D., Koudstaal, P. J., Breteler, M. M. (2006). Plasma BA1-40 and BA1-42 and the risk of dementia: a prospective case-cohort study. *The Lancet Neurology*, 5(8), 655-660.

87. Vetrivel, K. S., y Thinakaran, G. (2006). Amyloidogenic processing of β -amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology*, 66(1 suppl 1), S69-S73.
88. Wallin A., Blennow K, and Andreasen N, Minthon L. (2006). CSF biomarkers for Alzheimer's disease: levels of beta-amyloid, tau, and phosphorylated tau relate to clinical symptoms and survival. *Dement GeriatrCognDisord*; 21:131-8.
89. Whitmer RA, Sidney S, Selby J. (2005). Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology*. 64:277–281.
90. Wolf AB, Caselli RJ, Reiman EM, Valla J (2013) APOE and neuroenergetics: An emerging paradigm in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 34, 1007-1017.
91. Yassine HN, Finch CE (2020). APOE alleles and diet in brain aging and Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 12, 150.
92. Zhang Y., Li H., Wang D., Liu S., Wang J. (2006). A transitory activation of protein kinase-A induces a sustained tau hyperphosphorylation at multiple sites in N2a cells and implies a new mechanism in Alzheimer pathology. *J. Neural Transm.* 113, 1487–1497.
93. Zetterberg, H., Wilson, D., Andreasson, U., Minthon, L., Blennow, K., Randall, J., & Hansson, O. (2013). Plasma tau levels in Alzheimer's disease. *Alzheimer's research & therapy*, 5(2), 9.
94. Zlokovic, B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2), 178-201.
95. <http://sistemas.fciencias.unam.mx/~fam/EsRaman.pdf>.
96. <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6887/03Rpp03de11.pdf?sequence=3>.
97. www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6887/03Rpp03de11.pdf

Anexo 1.

Journal of Alzheimer's Disease 82 (2021) S271–S281
 DOI 10.3233/JAD-200912
 IOS Press

S271

Plasma Levels of Amyloid- β Peptides and Tau Protein in Mexican Patients with Alzheimer's Disease

Tzayaka Castillo-Mendieta^{a,b}, Yoaly Arana-Lechuga^c, Victoria Campos-Peña^d, Ana Luisa Sosa^e, Sandra Orozco-Suarez^f, Rodolfo Pinto-Almazán^g, Julia Segura-Uribe^h, Aldo Javier Rodríguez-Sánchez de Tagle^{a,i}, Elizabeth Ruiz-Sánchez^j and Christian Guerra-Araiza^{a,*}

^aUnidad de Investigación Médica en Farmacología, Hospital de Especialidades Bernardo Sepúlveda, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico

^bDoctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

^cSleep Disorders Clinic, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico

^dLaboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Mexico City, Mexico

^eClínica de Demencia, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Mexico City, Mexico

^fUnidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades Bernardo Sepúlveda, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico

^gLaboratorio de Biología Molecular en Enfermedades Metabólicas y Neurodegenerativas, Unidad de Investigación, Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca, Ixtapaluca, State of Mexico, Mexico

^hSubdirección de Gestión de la Investigación, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Secretaría de Salud, Mexico City, Mexico

ⁱCoordinación de QFBT, Universidad del Valle de México-Chapultepec, México City, México

^jLaboratorio de Neurotoxicología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Mexico City, Mexico

Accepted 7 June 2021
 Pre-press 11 June 2021

Abstract

Background: Alzheimer's disease (AD) causes memory deficit and alterations in other cognitive functions, mainly in adults over 60 years of age. As the diagnosis confirmation is performed by a postmortem neuropathological examination of the brain, this disease can be confused with other types of dementia at early stages. About 860,000 Mexicans are affected by dementia, most of them with insufficient access to adequate comprehensive health care services. Plasma biomarkers could be a rapid option for early diagnosis of the disease.

Objective: This study aimed to analyze some plasma biomarkers (amyloid- β , tau, and lipids) in Mexican AD patients and control subjects with no associated neurodegenerative diseases.

*Correspondence to: Christian Guerra-Araiza, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto

Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, Doctores, Cuauhtémoc, 06720, Mexico City, Mexico. Tel.: +52 1 55 56 27 69 00; E-mail: christianguerrea2001@gmail.com.

Methods: Plasma amyloid- β peptides (A β_{40} and A β_{42}), total and phosphorylated tau protein (T-tau and P-tau), and cholesterol and triglyceride levels were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay in AD patients and control subjects.

Results: In Mexican AD patients, we found significantly lower levels of A β_{42} ($p < 0.05$) compared to the control group. In contrast, significantly higher levels of P-tau ($p < 0.05$) and triglycerides ($p < 0.05$) were observed in AD patients compared to controls. Furthermore, a significant correlation was found between the severity of dementia and plasma P-tau levels, A β_{42} /A β_{40} and P-tau/T-tau ratios, and triglycerides concentrations. This correlation increased gradually with cognitive decline.

Conclusion: The detection of these plasma biomarkers is an initial step in searching for a timely, less invasive, and cost-efficient diagnosis in Mexicans.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid- β , early diagnosis, Mexican patients, tau protein

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD), a neurodegenerative disorder that causes memory disruption [1] and cognitive impairment [2], is the most common form of dementia (50–60% of all cases) [3]. This disease primarily affects adults > 60 years old [4], representing 10.4% of the population in Mexico in 2015; this percentage is estimated to double by 2029 [5].

The neuropathology of AD is characterized by neuronal loss [6], the presence of intracellular neurofibrillary tangles formed by hyperphosphorylated tau proteins, and extracellular senile plaques composed of amyloid- β (A β) peptides [7]. The pathological accumulation of A β in the brain is caused by the enzymatic cleavage of the amyloid- β protein precursor (A β PP), which renders two main amyloid peptides, A β_{40} and A β_{42} [8].

Age is the most important risk factor for AD, although heart disease, dyslipidemia, hypertension, type 2 diabetes mellitus, obesity, hypercholesterolemia, and genetic predisposition are also considered risk factors [9]. Epidemiological and biological evidence suggests an association between serum cholesterol levels and the development of AD [11, 12]. In the central nervous system (CNS), cholesterol is mainly found in myelin sheaths and plasma membranes of astrocytes and neurons [10] and has an essential role in the synthesis, deposition, and clearance of A β . Cholesterol is known to interact with A β reciprocally: cell cholesterol levels modulate A β generation, whereas A β alters neural cholesterol dynamics, leading to tauopathies [13].

The *APOE* $\epsilon 4$ allele, a strong genetic risk factor for AD, is associated with earlier and higher deposition of A β [14]. Apolipoprotein E (*APOE*) is the primary transporter of cholesterol in the brain, and its isoforms differentially modulate brain cholesterol levels. A significant association between *APOE* and A β signaling and clearance has been described [14]. Therefore, it is essential to understand the poten-

tial role of peripheral cholesterol in cerebral A β deposition.

The relationship between tau and A β plasma levels and their accumulation in the brain has been described previously. In one study, imaging findings using florbetaben-positron emission tomography (^{18}F -FBB PET) showed that lower plasma A β_{42} /A β_{40} ratio correlates with higher brain A β plaque burden [15]. Similar studies reported associations between plasma A β_{42} /A β_{40} ratio and cortical fibrillar A β burden [16–18]. Additionally, it has been reported that plasma P-tau181 and total tau are differentially associated with neuroimaging in AD pathology. Across the diagnostic groups, plasma P-tau181 was consistently associated with both A β and Tau-PET, whereas total plasma tau was associated with cortical thickness. Plasma P-tau181 showed not only a stronger association with brain A β -PET but also high sensitivity and specificity for predicting elevated brain A β throughout AD clinical severity [19].

Conversely, some studies have shown no association between A β accumulation in the brain and plasma [20] and cerebrospinal fluid (CSF) A β levels in AD patients [21]. Furthermore, no changes in plasma A β concentrations in patients with sporadic AD have been observed in other reports [22–26]. In contrast, other studies have shown higher plasma concentrations of this peptide [27, 28].

Regarding the concentrations of tau protein in plasma, the results are contradictory. Some studies have reported no variations in plasma levels of this protein between dementia patients and healthy controls [29]. Conversely, other authors have reported that this protein increases in the plasma of AD patients [30, 31].

Given the different results reported for other populations, we considered it necessary to quantify these biomarkers in Mexican patients with AD. We aimed to determine the potential of plasma A β and tau protein levels and cholesterol and triglyceride con-

centrations to serve as biomarkers of AD in Mexican patients.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

All participants were of Mexican origin. Participants were recruited from two national reference centers in Mexico City: The Dementia Clinic, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNN), and the Neurology Service, Hospital de Especialidades Bernardo Sepúlveda, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Initially, patients were interviewed to be referred to the sub-specialty required for each case. Patients with dementia diagnosis underwent brain magnetic resonance imaging (MRI) and routine laboratory studies (complete blood count, comprehensive metabolic panel, and thyroid profile). An overall standardized evaluation was conducted by protocol, including medical, physical, neurological, cognitive, and behavioral history. For systematic cognition assessment, the following tests were performed: Mini-Mental State Examination (MMSE), Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly (IQCODE), semantic and phonological verbal fluency (VF), and the Clock Drawing Test (CDT). Moreover, the behavior was evaluated with the Neuropsychiatric Inventory (NPI). Also, functionality was assessed through the Functional Activities Questionnaire (FAQ). These evaluations allowed excluding other primary pathologies and establishing an etiology once dementia was confirmed. Clinical diagnosis of AD was performed according to DSM-5 and NIA-AA criteria [32]. According to the MMSE score, the severity of cognitive impairment was classified as follows: 21–26, mild; 12–20, moderate; and < 12, severe.

The inclusion criteria for patients were the following: 1) patients with confirmed dementia syndrome diagnosis were required to be able to read and write; 2) age \geq 60 years old; and 3) MMSE score \leq 20. We excluded individuals with the following characteristics: 1) acute or exacerbated chronic disease present within 30 days before the interview that could affect the quality of response to questionnaires (according to the medical staff); 2) decreased alertness; 3) severe aphasia; 4) visual and hearing impairment; 5) other neurological diseases that could have influenced the diagnosis of dementia; and 6) living in a nursing home.

The inclusion criteria for controls were the following: 1) age \geq 60 years; 2) no symptoms or complaints of memory deficiency reported either by the informant or the participant; 3) MMSE score \geq 24; and 4) able to read and write. We excluded individuals with the following criteria: 1) any acute or severe chronic illness; and 2) any condition (diminished alertness, severe aphasia, impaired vision or hearing) that would complicate the completion of the questionnaires.

The control group included individuals with no associated neurodegenerative disease ($n=51$). According to the MMSE score, AD patients were divided into moderate (MCI) ($n=26$) and severe (SCI) ($n=24$) cognitive impairment. The following demographic data were collected from the participants' medical records: sex, age, MMSE score, educational level in years of study (0, illiterate; 1-6 elementary school; 7-9, junior high; 10-14, high school), and socioeconomic level (1-2, low; 3-4, median; 5-6, high).

The research protocol for human studies was reviewed and approved by The Research Ethics Commission (IMSS, R-2017-785-073) and the Committee On Human Experimentation (INNN, 100/07) from both institutions. All the experiments were performed according to the Declaration of Helsinki, 1975. The written informed consent form was obtained from the potential participants before their inclusion in the study. All the individuals who agreed to participate in the study signed an informed consent form. A caregiver, legal guardian, or other proxy gave consent on behalf of those with substantial cognitive impairment.

Sample collection

Non-fasting blood (4 ml/subject) was collected by venipuncture in heparinized tubes (BD Vacutainer) and centrifuged at 12000 RPM for 10 min at 4°C. The upper layer of the whole plasma containing platelets was separated and stored at -80°C until further analysis.

Biochemical assays

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits for amyloid- β 1-40 peptide ($\text{A}\beta_{40}$), amyloid- β 1-42 peptide ($\text{A}\beta_{42}$), and total tau protein were purchased from Cloud-Clone-Corp (CCC, USA).

For the standard curves, synthetic $\text{A}\beta_{1-40}$ and $\text{A}\beta_{1-42}$ peptides were dissolved in 0.5 ml of standard diluent and kept for 10 min at room temperature. The concentration of the stock solution was 1,000

pg/ml. Before the addition of samples, A β peptides were diluted in a buffer and added to the ELISA plate wells in duplicate. The standard curve was developed by plotting six points at the following concentrations: 1,000 pg/ml, 333.33 pg/ml, 111.11 pg/ml, 37.04 pg/ml, 12.35 pg/ml, and 0 pg/ml.

Standards and samples were added to the appropriate microtiter plate wells with a biotin-conjugated polyclonal antibody preparation specific for each A β peptide. Avidin conjugated to horseradish peroxidase (HRP) was added to each microplate well and incubated, and a tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution was added to each well. A sulfuric acid solution was added to terminate the enzyme-substrate reaction. Subsequently, the plate was analyzed at a wavelength of 450 nm. The A β peptides concentration was determined by comparing the optical density of the samples with the standard curve. The detection limit was 3.12–200 pg/ml.

Tau protein levels in plasma were quantified using a High Sensitive ELISA kit for human Microtubule Associated Protein tau (MAPt) (Cloud-Clone Corp) and an ELISA kit for human phosphorylated tau (Phospho) [pS396] (Thermo Fisher Scientific). Samples, standards, and blanks were added to the appropriate wells. Then, detection reagents were added, and the plate was incubated for 60 min at 37°C. After washing the plate five times, the substrate solution was added to each well and incubated for 20 min at 37°C. Finally, a stop solution was added. The analysis was conducted at 450 nm using a spectrophotometer (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek Instruments, Vermont, US).

Total cholesterol and triglycerides in blood plasma were determined for each participant in duplicate and quantified by commercial colorimetric kits (Teco Diagnostic, CA, USA).

Statistical analysis

Demographic data were compared using the exact Fisher's test for sex and the Kruskal-Wallis test followed by *post-hoc* Dunn's multiple comparisons for the other variables. Demographic data with significant differences were used as covariates (socioeconomic and educational levels). Log transformation was used to approximate normal distributions and perform a covariance analysis (ANCOVA) and a Bonferroni *post-hoc* test. Data were expressed as mean \pm standard error (SE). Pearson's correlation coefficient (*r*) was used to determine the association between the severity of dementia and the levels of the biomarkers with a 95% confidence interval. Analyses were performed using the IBM SPSS Statistics 20.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). *p*-values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

The demographic characteristics of the participants are shown in Table 1. Although no significant differences were found regarding sex, a higher percentage of females was found in both the overall number of patients with AD (74%) and the SCI group (96%). Significant differences were observed regarding the educational and socioeconomic levels (*p* < 0.05) compared with the control group.

We analyzed the biochemical markers concentrations considering the educational and socioeconomic levels as covariates. In Table 2, data from the ANCOVA including both the unadjusted and adjusted means can be observed. No statistical differences were observed in cholesterol concentrations between groups. In contrast, the other studied mark-

Table 1
Demographic data on the studied population

	Controls <i>n</i> = 51	AD patients		<i>p</i>
		MCI <i>n</i> = 26	SCI <i>n</i> = 24	
Female	46 (90.2%)	14 (54%)	23 (96%)	0.06 ^a
Age, y	80.5 \pm 8.18	82.08 \pm 8.62	78.0 \pm 9.07	0.49 ^b
MMSE score	27.86 \pm 2.21	14.62 \pm 5.88	6.54 \pm 2.6	0.000 ^b
Socioeconomic level				0.000 ^b
Low	29 (56.9)	15 (57.7)	0	
Median	22 (43.1)	7 (26.9)	17 (70.8)	
High	0	4 (15.4)	7 (29.2)	
Educational level	4.75 \pm 1.79	5.96 \pm 4.7	6.79 \pm 2.36	0.016 ^b

Data are presented as mean \pm SD or frequencies and percentages; *n*, number of participants. ^aFisher's-exact test; ^bKruskal-Wallis test. AD, Alzheimer's disease; MMSE, Mini-Mental State Examination; MCI, moderate cognitive impairment; SCI, severe cognitive impairment; SD, standard deviation. Socioeconomic level: 1-2, low; 3-4, median; 5-6, high. Educational level (years): 0, illiterate; 1-6 elementary school; 7-9, junior high; 10-14, high school.

Table 2
Analysis of covariance (ANCOVA) and comparisons between groups

Biomarkers	Control		MCI		SCI		F	p	Bonferroni's post-hoc
	UM (SD)	AM (SE) [95%CI]	UM (SD)	AM (SE) [95%CI]	UM (SD)	AM (SE) [95%CI]			
A β ₄₀	1.92 (0.272)	1.90 (0.048) [1.80-1.99]	2.09 (0.21)	2.11 (0.07) [1.97-2.24]	1.98 (0.48)	1.96 (0.08) [1.81-2.11]	3.000	0.055	0.016 ^a
A β ₄₂	1.16 (0.64)	1.13 (0.07) [0.99-1.27]	0.54 (0.05)	0.56 (0.10) [0.37-0.76]	0.50 (0.07)	0.52 (0.53) [0.309-0.74]	15.998	0.000	0.000 ^{a,b}
A β ₄₂ /A β ₄₀	0.63 (0.49)	0.59 (0.05) [0.49-0.70]	0.26 (0.03)	0.27 (0.08) [0.11-0.53]	0.30 (0.2)	0.36 (0.08) [0.19-0.53]	6.648	0.002	0.001 ^a 0.027 ^b
T-tau	2.13 (0.11)	2.13 (0.02) [2.09-2.17]	1.98 (0.16)	1.98 (0.08) [1.92-2.04]	2.04 (0.14)	2.04 (0.03) [1.98-2.10]	8.63	0.000	0.000 ^a 0.031 ^b
P-tau	2.00 (0.2)	2.00 (0.02) [1.96-2.05]	2.19 (0.09)	2.19 (0.08) [2.12-2.25]	2.21 (0.07)	2.21 (0.04) [2.14-2.29]	15.771	0.000	0.000 ^{a,b}
P-tau/T-tau	0.95 (0.10)	0.94 (0.01) [0.91-0.97]	1.11 (0.10)	1.11 (0.02) [1.07-1.15]	1.09 (0.09)	1.09 (0.02) [1.04-1.14]	23.811	0.000	0.000 ^{a,b}
Cholesterol	2.37 (0.11)	2.38 (0.02) [2.34-2.41]	2.39 (0.14)	2.39 (0.02) [2.34-2.44]	2.37 (0.08)	2.36 (0.03) [2.30-2.41]	0.444	0.643	>0.05
Triglycerides	2.12 (0.16)	2.14 (0.03) [2.07-2.20]	2.27 (0.25)	2.25 (0.06) [2.16-2.34]	2.29 (0.25)	2.27 (0.05) [2.17-2.37]	3.299	0.041	0.04 ^{a,b}

UM, unadjusted means; AM, adjusted means; SD, standard deviation; SE, standard error; 95%CI, 95% confidence intervals. ^aComparison between controls and the MCI group. ^bComparison between controls and the SCI group. Education and socioeconomic levels were included as covariates.

ers showed statistical differences when compared between groups.

Regarding A β peptides, we observed significantly higher plasma A β ₄₀ levels in the MCI group compared with the control group (Fig. 1A), whereas plasma A β ₄₂ levels were significantly lower in both MCI and SCI groups when compared with the control group (Fig. 1B). Furthermore, the A β ₄₂/A β ₄₀ ratio was significantly lower in the MCI and SCI groups when compared with the control group (Fig. 1C).

The analysis of tau protein showed significant differences between AD groups and controls. Plasma T-tau levels were lower in the MCI and SCI groups with respect to the control group (Fig. 2A). In contrast, plasma P-tau protein levels in both AD groups were higher than in the control group (Fig. 2B). Consequently, we observed a significant increase in the P-tau/T-tau ratio in both MCI and SCI groups compared to the control group (Fig. 2C).

In relation to plasma lipids, no changes were observed in plasma cholesterol concentrations in either of the analyzed groups (Fig. 3A). However, it is essential to note that cholesterol levels in the studied groups were higher than healthy cholesterol levels for seniors (< 200 mg/dl). A significantly higher concentration of plasma triglycerides was observed in both AD groups with respect to the control group (Fig. 3B).

The correlation analyses between plasma biomarkers and the severity of dementia are shown in Table 3. We observed a significant correlation ($p < 0.05$) between the A β ₄₂/A β ₄₀ ratio, P-tau and P-tau/T-tau ratio, as well as triglycerides levels and both MCI and SCI groups.

DISCUSSION

In this study, we evaluated plasma A β peptides, tau protein, and cholesterol and triglyceride levels in Mexican AD patients. We found significant differences in plasma A β peptides and tau protein levels and triglyceride concentrations between Mexican AD patients and controls. Additionally, we observed a significant correlation between the severity of dementia and plasma A β ₄₂/A β ₄₀ ratio, P-tau levels, plasma P-tau/T-tau ratio, and triglyceride concentrations.

Regarding A β peptides, we found significantly low plasma A β ₄₂ levels in the MCI and SCI group, whereas only significant high A β ₄₀ levels in the MCI group. In the search for biomarkers to identify early and pre-symptomatic stages of some neurodegenerative diseases, particularly AD, plasma is a promising

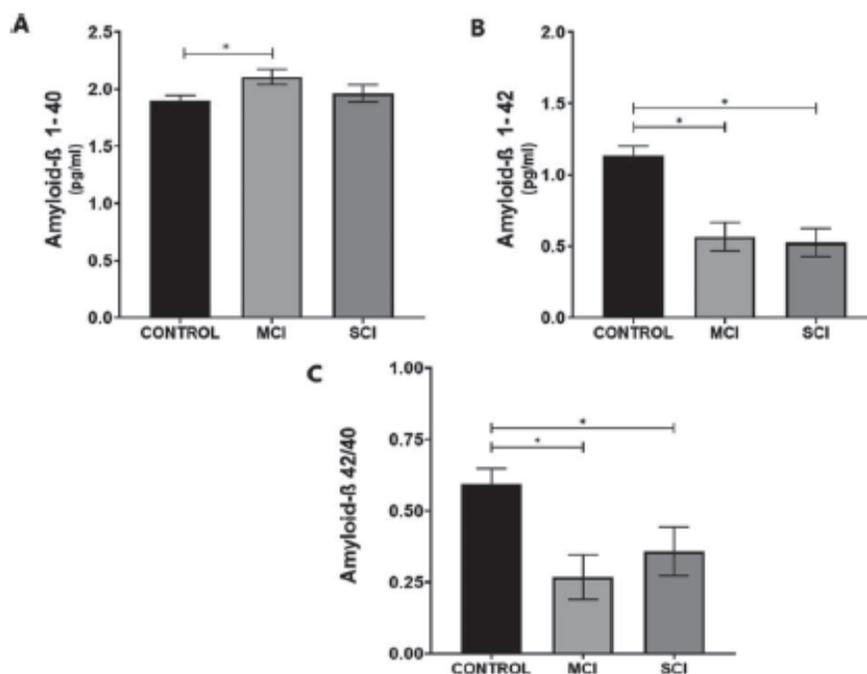


Fig. 1. Plasma A β peptides in Mexican AD patients in different stages of the disease. Plasma A) A β ₄₀, B) A β ₄₂ levels, and C) A β ₄₂/A β ₄₀ ratio in controls ($n=51$), and mild cognitive impairment (MCI; $n=26$) and severe cognitive impairment (SCI; $n=24$) groups. Data are presented as mean \pm SE. * $p < 0.05$ versus control group.

source for research since it is the least invasive and easy to collect at a low-cost sample [33]. A β levels in plasma have been quantified [27, 28], but evidence has shown discrepancies among these results. Some studies have reported low A β ₄₀ levels and high A β ₄₂ plasma levels in AD patients [34, 35]. Conversely, other studies have reported low A β ₄₂ plasma levels associated with increased risk of dementia [36], which are consistent with our findings.

Furthermore, other studies report no changes in plasma A β levels between AD patients and controls [37–39]. However, most authors agree that the A β ₄₂/A β ₄₀ ratio provides more information than A β levels individually. Similar to our observations, other studies have reported that individuals with low plasma A β ₄₂/A β ₄₀ ratio are at somewhat more significant risk of developing AD as the A β ₄₂/A β ₄₀ ratio has been linked to cognitive decline over time [40–42].

One factor contributing to variability among studies may be ethnicity since most of the studies have been conducted in either European countries or the United States, where most of the population is Caucasian [39, 40]. Cosentino et al. included

Caribbean Hispanic, African American, and non-Hispanic White patients and reported that stable or decreasing A β ₄₂ levels and the A β ₄₂/A β ₄₀ ratio at follow-up were associated with global cognitive decline [35]. These findings support our results regarding plasma A β ₄₂ levels in Mexican AD patients, although patient follow-up was not performed.

Sex is another factor that may account for differences among studies [43, 44]. A relatively higher risk of AD in females has been reported, suggesting interactions between the hormonal decline associated with menopause and Apolipoprotein E (*APOE*) ϵ 4 [45]. Namely, among *APOE* ϵ 4 carriers, women are at greater risk for developing AD than men [46, 47]. However, the *APOE* genotype was not addressed in the patients studied here.

Another explanation for plasma A β ₄₂ levels decrease could be its accumulation and subsequent formation of amyloidogenic plaques in the brain [17]. Therefore, as cognitive decline progresses in AD patients, brain A β burden and plasma A β concentrations would increase and decrease, respectively.

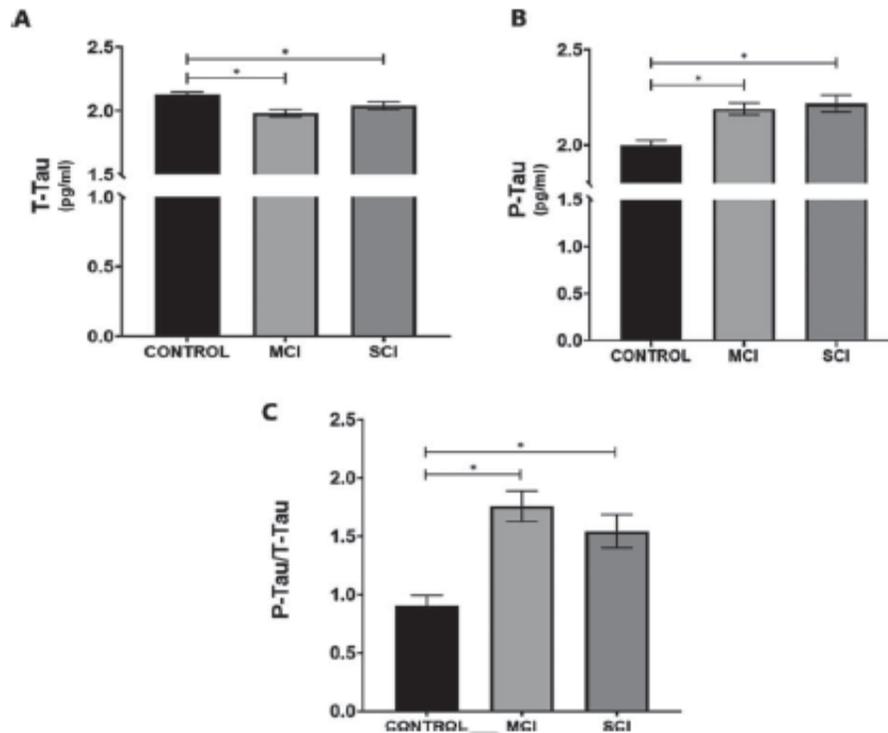


Fig. 2. Total (T-tau) and phosphorylated (P-tau) tau protein in Mexican AD patients in different stages of the disease. Plasma levels of A) T-tau, b) P-tau, and C) P-tau/T-tau ratio in controls ($n=51$), and mild cognitive impairment (MCI; $n=26$) and severe cognitive impairment (SCI; $n=24$) groups. Data are presented as mean \pm SE. * $p < 0.05$ versus control group.

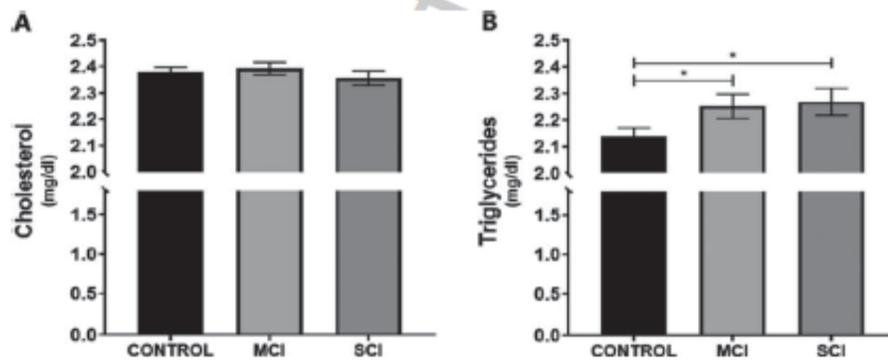


Fig. 3. Plasma lipids in Mexican AD patients in different stages of the disease. A) Cholesterol and b) triglycerides levels in controls ($n=51$), and mild cognitive impairment (MCI; $n=26$) and severe cognitive impairment (SCI; $n=24$) groups. Data are presented as mean \pm SE. * $p < 0.05$ versus control group.

Regarding the differences reported in plasma A β and tau concentrations in patients with AD, another consideration to be made is the origin of the sample. Several authors used blood samples, while others have access to CSF to search for biomarkers in patients with AD. Due to the miscellaneous nature

and the large size range of blood components, plasma samples are much more variable than CSF [48].

We observed that plasma total tau protein levels were lower in the AD groups, whereas a higher concentration of the phosphorylated form (P-tau) was identified in these groups compared to the control

Table 3
Correlation between plasma biomarkers and the severity of dementia in patients with Alzheimer's disease

Biomarker	MCI		SCI	
	Pearson's r	p	Pearson's r	p
A β ₄₀	0.1108	0.7456	0.2795	0.4664
A β ₄₂	0.2930	0.3819	0.5434	0.1639
A β ₄₂ /A β ₄₀	-0.8983	0.0002*	-0.7477	0.0206*
P-tau	-0.7781	0.0080*	-0.9078	0.0124*
T-tau	-0.6723	0.0678	-0.5871	0.1658
P-tau/T-tau	-0.8136	0.0489*	-0.8135	0.0140*
Cholesterol	-0.2883	0.3395	0.4556	0.2566
Triglycerides	-0.6552	0.0151*	-0.8192	0.0461*

Plasma A β peptides and tau protein levels were analyzed by ELISA. A β , amyloid- β ; P-tau, phosphorylated tau; T-tau, total tau; MCI, moderate cognitive impairment; SCI, severe cognitive impairment. The association between the biomarkers and the severity of dementia was evaluated using Pearson's correlation. * $p < 0.05$.

group. Similarly, we observed a significant correlation between the increased P-tau/T-tau ratio and cognitive impairment. This correlation indicates that higher concentrations of P-tau could be found in plasma since the early stages of the disease and suggests an association between tau levels and cognitive decline [49, 50]. A possible explanation for this observation could be that neurofibrillary tangles deteriorate the blood-brain barrier, which allows the leakage of the A β peptides and tau protein in AD patients [51]. Therefore, plasma tau levels might reflect neuronal damage and the subsequent drainage of tau from the brain parenchyma to the CSF and blood [52, 53]. Based on other studies, an increase of tau levels in the late stages of AD was expected [54]. However, no significant difference was observed between the MCI and SCI groups. Our results are similar to other studies in which cognitive status was not related to tau deposition in patients with Parkinson's disease [55].

Regarding lipid concentrations, our findings showed that cholesterol levels were higher than healthy ranges for elderly adults (<200 mg/dl) in both groups of Mexican AD patients and the control group. However, we found no significant differences in plasma cholesterol levels between the AD and control groups. These high cholesterol levels in Mexican adults (>60 years of age) indicate a risk of developing other diseases, such as high blood pressure, type 2 diabetes, and metabolic syndrome [56–59]. These comorbidities are related to neurodegeneration [60, 61] and suggest that high lipid concentrations could lead to systemic hyperlipidemia that might cause damage to the blood-brain barrier

[62] and facilitate the migration of proteins such as A β and tau to the bloodstream. In addition, some authors have reported that *APOE4* carriers display both hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia [63]. Furthermore, *APOE4* is associated with glucose hypometabolism in the brain of older adults [64]. In astrocytes, *APOE4* expression reduces the ability to degrade A β peptides and provides one mechanism for the increased formation of amyloid plaques [65].

Moreover, we observed higher levels of triglycerides in AD patients than controls. Although cardiovascular diseases are not a direct cause of neurodegenerative diseases, several studies have implicated heart disease as a risk factor for dementia [66–68]. High levels of triglycerides can cause atherosclerosis, which in turn increases the risk of cardiovascular events. These high levels of triglycerides could be the result of other AD-related comorbidities, such as type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome [59]. Furthermore, a longitudinal cohort study in cognitively healthy individuals concluded that midlife increased levels of triglycerides could predict brain A β pathology, supporting the involvement of lipids in very early stages of AD development [68]. In contrast, other studies do not support the hypothesis that the risk of AD is associated with plasma lipid concentrations [69]. Therefore, further research and follow-up in a larger sample of Mexican AD patients is necessary to clarify this.

Several authors have studied the influence of socioeconomic factors such as educational and socioeconomic status (SES) in healthcare, particularly for AD. However, the results of this association are ambiguous. In some studies, no association between the risk of AD and SES was found [70], while other studies report an association between low SES and high risk for AD [71]. Another study indicated that SES is associated with a higher risk for AD in Black people than White people in the US [72]. No ethnic differences were registered in our study population. However, our results indicated a higher SES in the SCI group compared to the other two groups. An explanation for this finding may be because SES can influence the educational level and better health culture, as reported in other developing countries [73]. Therefore, people with higher SES and educational levels have greater access to medical check-ups in health institutions where chronic diseases such as AD can be detected and treated. In contrast, it is more difficult to receive medical care for low-income and low-educated people, even more so from public health institutions, due to their high demand in the

country. However, the influence of these factors on AD should be studied further.

This type of study is essential in the Mexican population, for which this is a strength of our research. However, some limitations of the study warrant consideration. First, non-fasting blood samples were collected, and we did not assess whether patients were under any anti-cholesterol medications, which may have revealed differences in cholesterol levels among groups. Second, the *APOE* genotype was not determined. Third, the study did not include subjects with other types of dementia or neurodegenerative diseases. Therefore, our findings could not be used to differentiate between AD and other dementias in the Mexican population. Fourth, we consider that the sample size was relatively small. Future research is needed to determine whether these plasma compounds could be a more useful diagnostic marker for Mexican AD patients in combination with neurodegenerative neuroimaging measures. In addition, follow-up of these participants would be essential to analyze whether these markers change over time.

The number of adults >60 years of age who may develop AD will be a public health issue and economic concern worldwide. Overall, the present results are an early step in determining whether peripheral blood analysis could aid in an early AD diagnosis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree of Tzayaka Castillo Mendieta at Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud (UAM-I). Tzayaka Castillo Mendieta received financial support from CONACyT (308389) and CIS/IMSS/ (99096803). Christian Guerra-Araiza received financial support for this project from FIS/IMSS (Project No. FIS/IMSS/PROT/G17-2/1718). The funders had no participation in the design of the study, collection, and analysis of data, decision to publish, or preparation of the manuscript. The publication of this paper was supported by a grant from the Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México CM-SECTEI/200/2020 Red Colaborativa de Investigación Traslacional para el Envejecimiento Saludable (RECITES) de la Ciudad de México.

Authors' disclosures available online (<https://www.j-alz.com/manuscript-disclosures/20-0912r4>).

REFERENCES

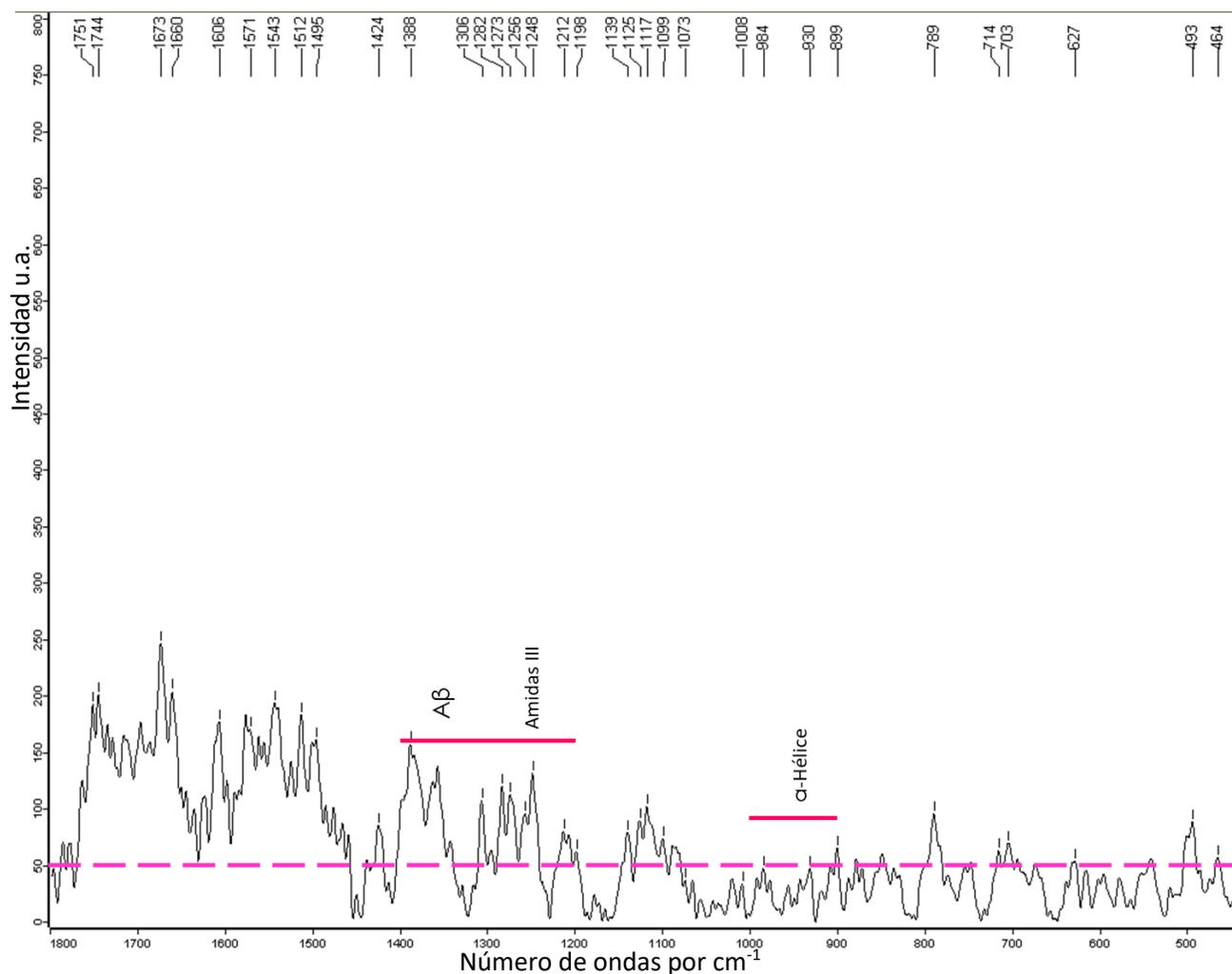
- [1] Khairallah MI, Kassem LA (2011) Alzheimer's disease: Current status of etiopathogenesis and therapeutic strategies. *Pakistan J Biol Sci* **14**, 257-272.
- [2] Hampel H, Prvulovic D, Teipel S, Jessen F, Luckhaus C, Frölich L, Riepe MW, Dodel R, Leyhe T, Bertram L, Hoffmann W, Faltraco F, German Task Force on Alzheimer's Disease (GTF-AD) (2011) The future of Alzheimer's disease: The next 10 years. *Prog Neurobiol* **95**, 718-728.
- [3] Selkoe DJ (1999) Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* **399**(6738 Suppl), A23-A31.
- [4] Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E (2009) Epidemiology of Alzheimer's disease: Occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci* **11**, 111-128.
- [5] Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2011) Principales resultados del Censo de Población y Vivienda 2010. INEGI, México.
- [6] Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K (2006) Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol* **112**, 389-404.
- [7] Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**, 239-259.
- [8] Friedman R (2011) Aggregation of amyloids in a cellular context: Modelling and experiment. *Biochem J* **438**, 415-426.
- [9] Whitmer RA, Sidney S, Selby J, Johnston SC, Yaffe K (2005) Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology* **64**, 277-281.
- [10] Snipes GJ, Suter U (1997) Cholesterol and myelin. In *Cholesterol*. Springer, Boston, pp. 173-204.
- [11] Reitz C (2012) Dyslipidemia and dementia: Current epidemiology, genetic evidence, and mechanisms behind the associations. *J Alzheimers Dis* **30**(Suppl 2), S127-S145.
- [12] Di Paolo G, Kim TW (2011) Linking lipids to Alzheimer's disease: Cholesterol and beyond. *Nat Rev Neurosci* **12**, 284-296.
- [13] Sáiz-Vázquez O, Puente-Martínez A, Ubillos-Landa S, Pacheco-Bonrostro J, Santabárbara J (2020) Cholesterol and Alzheimer's disease risk: A meta-meta-analysis. *Brain Sci* **10**, 386.
- [14] Holtzman DM, Herz J, Bu G (2012) Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: Normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006312.
- [15] De Rojas I, Romero J, Rodríguez-Gómez O, Pesini P, Sanabria A, Pérez-Cordón A, Abdelnour C, Hernández I, Rosende-Roca M, Mauleon A, Vargas L (2018) Correlations between plasma and PET beta-amyloid levels in individuals with subjective cognitive decline: The Fundació ACE Healthy Brain Initiative (FACEHBI). *Alzheimers Res Ther* **10**, 119.
- [16] Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Doré V, Fowler C, Li QX, Martins R, Rowe C, Tomita T (2018) High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature* **554**, 249-254.
- [17] Risacher SL, Fandos N, Romero J, Sherriff I, Pesini P, Saykin AJ, Apostolova LG (2019) Plasma amyloid-beta levels are associated with cerebral amyloid and tau deposition. *Alzheimers Dement (Amst)* **11**, 510-519.
- [18] Toledo JB, Vanderstichele H, Figurski M, Aisen PS, Petersen RC, Weiner MW, Jack CR Jr, Jagust W, Decarli

- C, Toga AW, Toledo E, Xie SX, Lee VM, Trojanowski JQ, Shaw LM, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2011) Factors affecting A β plasma levels and their utility as biomarkers in ADNI. *Acta Neuropathol* **122**, 401-413.
- [19] Mielke MM, Hagen CE, Xu J, Chai X, Vemuri P, Lowe VJ, Airey DC, Knopman DS, Roberts RO, Machulda MM, Jack Jr CR (2018) Plasma phospho-tau181 increases with Alzheimer's disease clinical severity and is associated with tau-and amyloid-positron emission tomography. *Alzheimers Dement* **14**, 989-997.
- [20] Freeman SH, Raju S, Hyman BT, Frosch MP, Irizarry MC (2007) Plasma Abeta levels do not reflect brain Abeta levels. *J Neuropathol Exp Neurol* **66**, 264-271.
- [21] Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, Lee SY, Dence CS, Shah AR, LaRossa GN, Spinner ML, Klunk WE, Mathis CA, DeKosky ST, Morris JC, Holtzman DM (2006) Inverse relation between *in vivo* amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Ann Neurol* **59**, 512-519.
- [22] Fukumoto H, Tennis M, Locascio JJ, Hyman BT, Growdon JH, Irizarry MC (2003) Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid beta-protein levels. *Arch Neurol* **60**, 958-964.
- [23] Startin CM, Ashton NJ, Hamburg S, Hithersay R, Wiseman FK, Mok KY, Hardy J, Lleó A, Lovestone S, Parnetti L, Zetterberg H, Hye A, LonDownS Consortium, Strydom A (2019) Plasma biomarkers for amyloid, tau, and cytokines in Down syndrome and sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* **11**, 26.
- [24] Sobów T, Flirski M, Kloszewska I, Liberski PP (2005) Plasma levels of alpha-beta peptides are altered in amnesic mild cognitive impairment but not in sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neurol Exp (Wars)* **65**, 117-124.
- [25] Tamaoka A, Fukushima T, Sawamura N, Ishikawa K, Oguni E, Komatsuzaki Y, Shoji S (1996) Amyloid-beta protein in plasma from patients with sporadic Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* **141**, 65-68.
- [26] Vanderstichele H, Van Kerschaver E, Hesse C, Davidsson P, Buyse MA, Andreasen N, Minthon L, Wallin A, Blennow K, Vanmechelen E (2000) Standardization of measurement of beta-amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid and plasma. *Amyloid* **7**, 245-258.
- [27] Mayeux R, Honig LS, Tang MX, Manly J, Stern Y, Schupf N, Mehta PD (2003) Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: Relation to age, mortality, and risk. *Neurology* **61**, 1185-1190.
- [28] Mehta PD, Pirttila T, Patrick BA, Barshatzky M, Mehta SP (2001) Amyloid-beta protein 1-40 and 1-42 levels in matched cerebrospinal fluid and plasma from patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **304**, 102-106.
- [29] Wang T, Xiao S, Liu Y, Lin Z, Su N, Li X, Li G, Zhang M, Fang Y (2014) The efficacy of plasma biomarkers in early diagnosis of Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* **29**, 713-719.
- [30] Fossati S, Ramos Cejudo J, Debure L, Pirraglia E, Sone JY, Li Y, Chen J, Butler T, Zetterberg H, Blennow K, de Leon MJ (2019) Plasma tau complements CSF tau and P-tau in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)* **11**, 483-492.
- [31] Mattsson N, Zetterberg H, Janelidze S, Insel PS, Andreasson U, Stomrud E, Palmqvist S, Baker D, Tan Hehir CA, Jeromin A, Hanlon D, Song L, Shaw LM, Trojanowski JQ, Weiner MW, Hansson O, Blennow K, ADNI Investigators (2016) Plasma tau in Alzheimer's disease. *Neurology* **87**, 1827-1835.
- [32] Jack CR Jr, Albert MS, Knopman DS, McKhann GM, Sperling RA, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH (2011) Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (NY)* **7**, 257-262.
- [33] Hampel H, Bürger K, Teipel SJ, Bokde ALW, Zetterberg H, Blennow K (2008) Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (NY)* **4**, 38-48.
- [34] Xia W, Yang T, Shankar G, Smith IM, Shen Y, Walsh DM, Selkoe DJ (2009) A specific enzyme-linked immunosorbent assay for measuring beta-amyloid protein oligomers in human plasma and brain tissue of patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol* **66**, 190-199.
- [35] Cosentino SA, Stern Y, Sokolov E, Scarmeas N, Manly JJ, Tang MX, Schupf N, Mayeux RP (2010) Plasma β -amyloid and cognitive decline. *Arch Neurol* **67**, 1485-1490.
- [36] van Oijen M, Hofman A, Soares HD, Koudstaal PJ, Breteler MM (2006) Plasma Abeta(1-40) and Abeta(1-42) and the risk of dementia: A prospective case-cohort study. *Lancet Neurol* **5**, 655-660.
- [37] Roher AE, Esh CL, Kokjohn TA, Castaño EM, Van Vickle GD, Kalback WM, Patton RL, Luehrs DC, Dausgs ID, Kuo YM, Emmerling MR, Soares H, Quinn JF, Kaye J, Connor DJ, Silverberg NB, Adler CH, Seward JD, Beach TG, Sabaugh MN (2009) Amyloid-beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **5**, 18-29.
- [38] Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H (2010) Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurol* **6**, 131-144.
- [39] Hansson O, Stomrud E, Vanmechelen E, Östling S, Gustafson DR, Zetterberg H, Blennow K, Skoog I (2012) Evaluation of plasma A β as predictor of Alzheimer's disease in older individuals without dementia: A population-based study. *J Alzheimers Dis* **28**, 231-238.
- [40] Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J, Boeve BF, Knopman DS, Ivnik RJ, Smith GE, Younkin LH, Petersen RC, Younkin SG (2007) Association of low plasma Abeta42/Abeta40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Arch Neurol* **64**, 354-362.
- [41] Yaffe K, Weston A, Graff-Radford NR, Satterfield S, Simonick EM, Younkin SG, Younkin LH, Kuller L, Ayonayon HN, Ding J, Harris TB (2011) Association of plasma beta-amyloid level and cognitive reserve with subsequent cognitive decline. *JAMA* **305**, 261-266.
- [42] Seppälä TT, Herukka SK, Hänninen T, Tervo S, Hallikainen M, Soininen H, Pirttilä T (2010) Plasma Abeta42 and Abeta40 as markers of cognitive change in follow-up: A prospective, longitudinal, population-based cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **81**, 1123-1127.
- [43] Subramaniapillai S, Almey A, Natasha Rajah M, Einstein G (2021) Sex and gender differences in cognitive and brain reserve: Implications for Alzheimer's disease in women. *Front Neuroendocrinol* **60**, 100879.
- [44] Dennison JL, Ricciardi NR, Lohse I, Volmar CH, Wahlestedt C (2021) Sexual dimorphism in the 3xTg-AD mouse model and its impact on pre-clinical research. *J Alzheimers Dis* **80**, 41-52.
- [45] Emrani S, Arain HA, DeMarshall C, Nuriel T (2020) APOE4 is associated with cognitive and pathological heterogeneity in patients with Alzheimer's disease: A systematic review. *Alzheimers Res Ther* **12**, 141.

- [46] Sundermann EE, Tran M, Maki PM, Bondi MW (2018) Sex differences in the association between apolipoprotein E ϵ 4 allele and Alzheimer's disease markers. *Alzheimers Dement (Amst)* **10**, 438-447.
- [47] Neu SC, Pa J, Kukull W, Beekly D, Kuzma A, Gangadharan P, Wang LS, Romero K, Arneric SP, Redolfi A, Orlandi D, Frisoni GB, Au R, Devine S, Auerbach S, Espinosa A, Boada M, Ruiz A, Johnson SC, Kosciak R, Wang JJ, Hsu WC, Chen YL, Toga AW (2017) Apolipoprotein E genotype and sex risk factors for Alzheimer disease: A meta-analysis. *JAMA Neurol* **74**, 1178-1189.
- [48] Hladky SB, Barrand MA (2014) Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: Evaluation of the evidence. *Fluids Barriers CNS* **11**, 26.
- [49] Dage JL, Wennberg A, Airey DC, Hagen CE, Knopman DS, Machulda MM, Roberts RO, Jack CR Jr, Petersen RC, Mielke MM (2016) Levels of tau protein in plasma are associated with neurodegeneration and cognitive function in a population-based elderly cohort. *Alzheimers Dement* **12**, 1226-1234.
- [50] Schraen-Maschke S, Sergeant N, Dhaenens CM, Bombois S, Deramecourt V, Cailliet-Boudin ML, Pasquier F, Mauraige CA, Sablonnière B, Vanmechelen E, Buée L (2008) Tau as a biomarker of neurodegenerative diseases. *Biomark Med* **2**, 363-384.
- [51] Canepa E, Fossati S (2021) Impact of tau on neurovascular pathology in Alzheimer's disease. *Front Neurol* **11**, 573324.
- [52] Pase MP, Beiser AS, Himali JJ, Satizabal CL, Aparicio HJ, DeCarli C, Chêne G, Dufouil C, Seshadri S (2019) Assessment of plasma total tau level as a predictive biomarker for dementia and related endophenotypes. *JAMA Neurol* **76**, 598-606.
- [53] Deters KD, Risacher SL, Kim S, Nho K, West JD, Blennow K, Zetterberg H, Shaw LM, Trojanowski JQ, Weiner MW, Saykin AJ, Alzheimer Disease Neuroimaging Initiative (2017) Plasma tau association with brain atrophy in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **58**, 1245-1254.
- [54] Regalado-Reyes M, Furcila D, Hernández F, Ávila J, DeFelipe J, León-Espinoza G (2019) Phospho-tau changes in the human CA1 during Alzheimer's disease progression. *J Alzheimers Dis* **69**, 277-288.
- [55] Winer JR, Maass A, Pressman P, Stiver J, Schonhaut DR, Baker SL, Kramer J, Rabinovici GD, Jagust WJ (2018) Associations between Tau, β -amyloid, and cognition in Parkinson's disease. *JAMA Neurol* **75**, 227-235.
- [56] Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Iivonen S, Mannermaa A, Tuomilehto J, Nissinen A, Soininen H (2002) Apolipoprotein E epsilon-4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. *Ann Intern Med* **137**, 149-155.
- [57] Reiss AB, Siller KA, Rahman MM, Chan ES, Ghiso J, de Leon MJ (2004) Cholesterol in neurologic disorders of the elderly: Stroke and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **25**, 977-989.
- [58] Yamamoto-Kimura L, Zamora-González J, Huerta-Alvarado S, Fajardo-Gutiérrez A, Cardoso-Saldaña G, Posadas-Romero C (1996) High blood pressure and cardiovascular risk factors in an adult population of Mexico City. Characteristics of the studied population. *Arch Med Res* **27**, 213-222.
- [59] Gutiérrez-Solis AL, Datta Banik S, Méndez-González RM (2018) Prevalence of metabolic syndrome in Mexico: A systematic review and meta-analysis. *Metab Syndr Relat Disord* **16**, 395-405.
- [60] Santos CY, Snyder PJ, Wu WC, Zhang M, Echeverria A, Alber J (2017) Pathophysiologic relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: A review and synthesis. *Alzheimers Dement (Amst)* **7**, 69-87.
- [61] Allinquant B, Clamagirand C, Potier MC (2014) Role of cholesterol metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **17**, 319-323.
- [62] Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* **160**, 113-123.
- [63] Yassine HN, Finch CE (2020) APOE alleles and diet in brain aging and Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* **12**, 150.
- [64] Wolf AB, Caselli RJ, Reiman EM, Valla J (2013) APOE and neuroenergetics: An emerging paradigm in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **34**, 1007-1017.
- [65] Prasad H, Rao R (2018) Amyloid clearance defect in ApoE4 astrocytes is reversed by epigenetic correction of endosomal pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E6640-E6649.
- [66] Altman R, Rutledge JC (2010) The vascular contribution to Alzheimer's disease. *Clin Sci (Lond)* **119**, 407-421.
- [67] Justin BN, Turek M, Hakim AM (2013) Heart disease as a risk factor for dementia. *Clin Epidemiol* **5**, 135-145.
- [68] Nägga K, Gustavsson AM, Stomrud E, Lindqvist D, van Westen D, Blennow K, Zetterberg H, Melander O, Hansson O (2018) Increased midlife triglycerides predict brain β -amyloid and tau pathology 20 years later. *Neurology* **90**, e73-e81.
- [69] Reitz C, Tang MX, Luchsinger J, Mayeux R (2004) Relation of plasma lipids to Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Neurol* **61**, 705-714.
- [70] Karp A, Kåreholt I, Qiu C, Bellander T, Winblad B, Fratiglioni L (2004) Relation of education and occupation-based socioeconomic status to incident Alzheimer's disease. *Am J Epidemiol* **159**, 175-183.
- [71] Hasselgren C, Dellve L, Ekbrand H, Zettergren A, Zetterberg H, Blennow K, Skoog I, Halleröd B (2018) Socioeconomic status, gender and dementia: The influence of work environment exposures and their interactions with APOE ϵ 4. *SSM Popul Health* **5**, 171-179.
- [72] Yaffe K, Falvey C, Harris TB, Newman A, Satterfield S, Koster A, Ayonayon H, Simonsick E; Health ABC Study (2013) Effect of socioeconomic disparities on incidence of dementia among biracial older adults: Prospective study. *BMJ* **347**, f7051.
- [73] Aranda M, Calabria A (2019) [Social and economic impact of Alzheimer's disease]. *Neurol Argentina* **11**, 19-26.

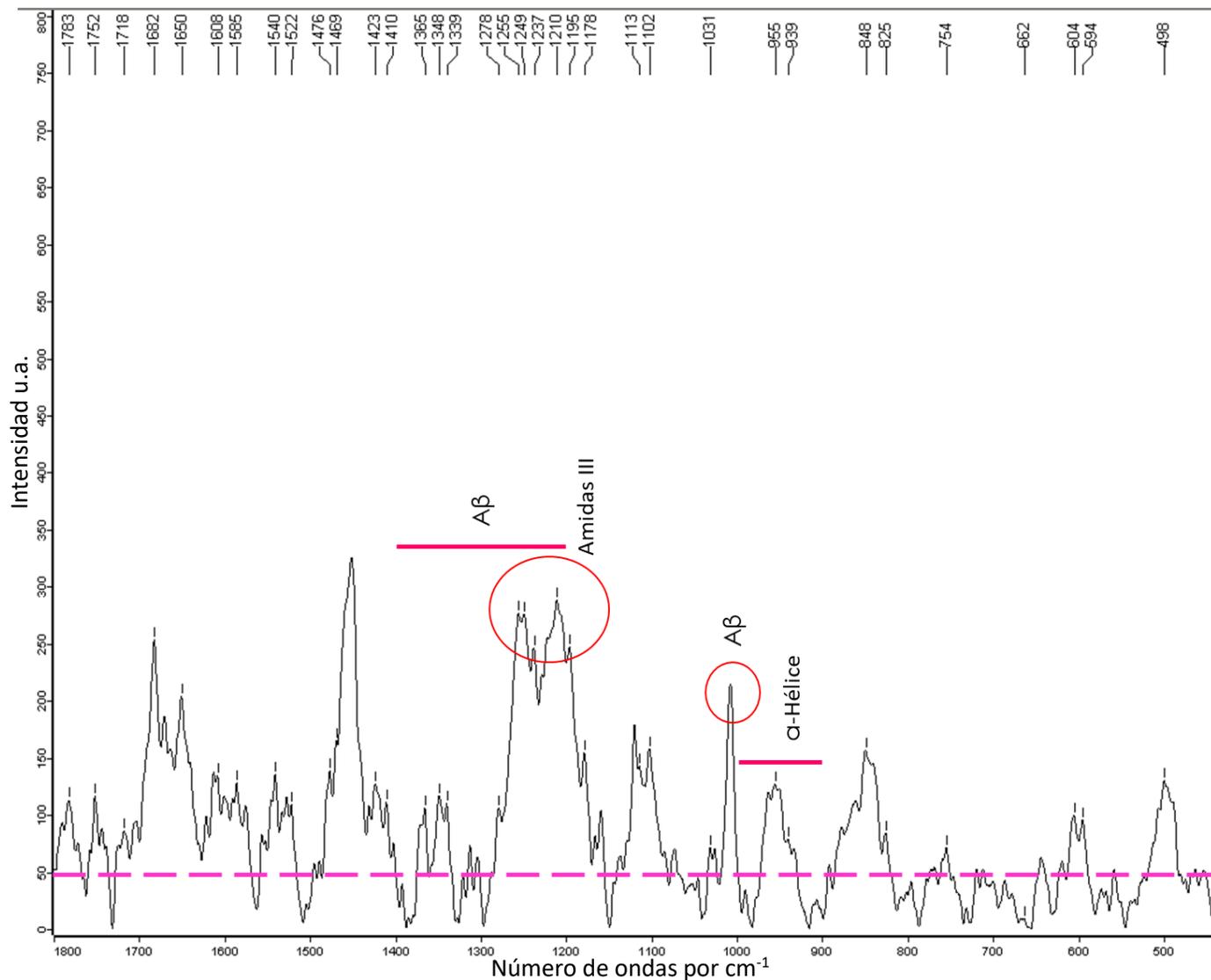
Anexo 2. Espectros Raman de pacientes diagnosticados con Enfermedad de Alzheimer y sujetos Control.

En el espectro número 5, se presenta el promedio de los espectros Raman de las muestras de plasma tomadas de los sujetos sanos ($n=50$), las bandas que se encuentran por debajo de la línea rosa no se consideraron para el análisis, ya que se tomaron como fluorescencia, es decir ruido natural del espectro. En este espectro Raman se puede observar que la región de 1200 a 1400, se presentan algunas bandas a una baja intensidad, lo cual indica la presencia de una pequeña concentración de β A.



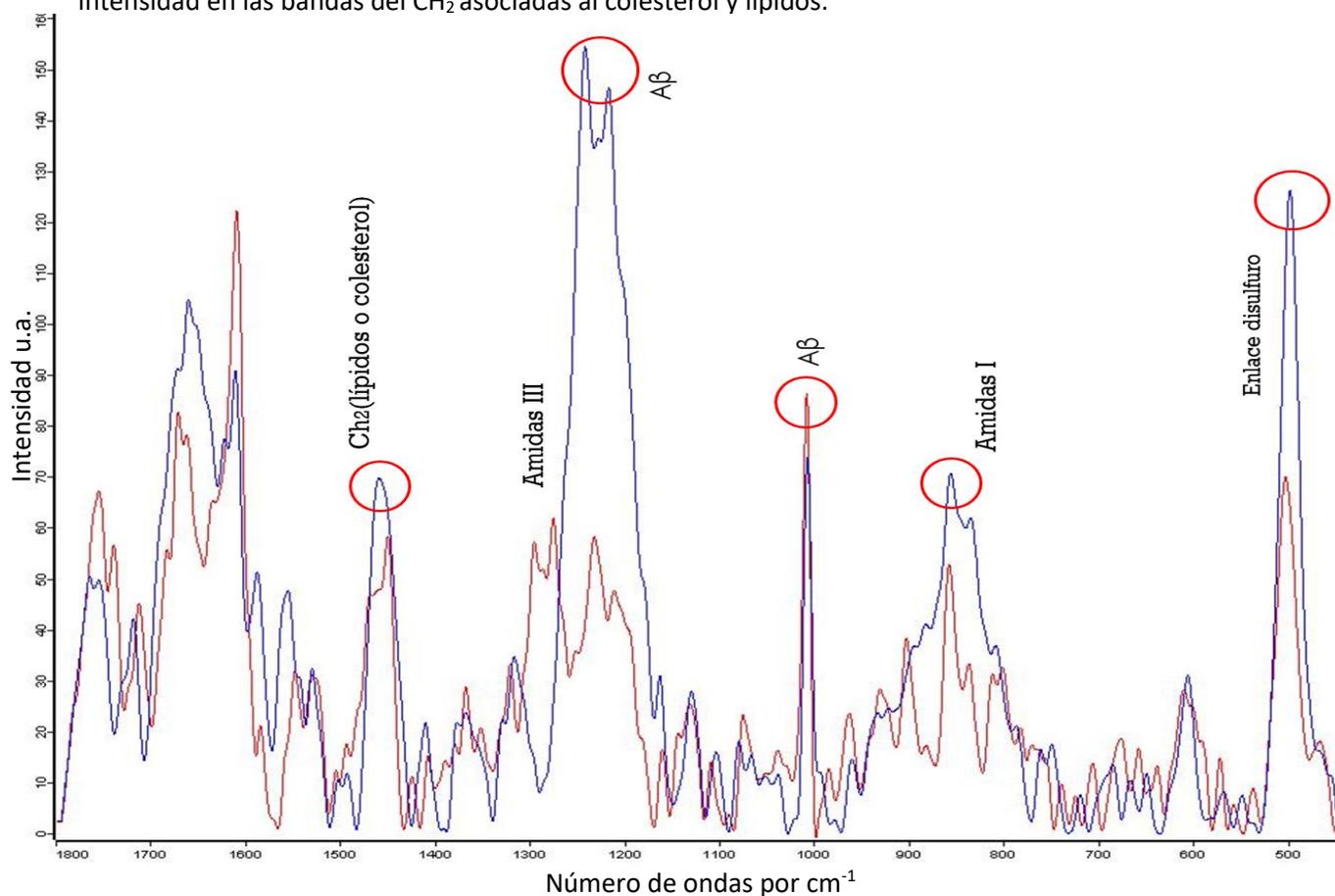
Espectro 5. Promedio de los espectros de Raman sujetos sanos ($n=50$, el promedio fue obtenido mediante el programa OPUS Ver7.0.).

En el espectro 6, se muestra el promedio de los espectros Raman de las muestras de plasma tomadas de pacientes con demencia tipo Alzheimer (n=50), de igual manera que en el espectro anterior, las bandas que se encuentran por debajo de la línea rosa no se consideraron para el análisis. En este espectro promedio, observamos que las bandas asociadas a la proteína βA (1200-1400), tuvieron una mayor intensidad a diferencia del espectro promedio de sujetos sanos (espectro 4), es decir hubo una mayor concentración de esta proteína, es en esta región en donde se observa que hay un paso conformacional de α -hélice a β -plegada.



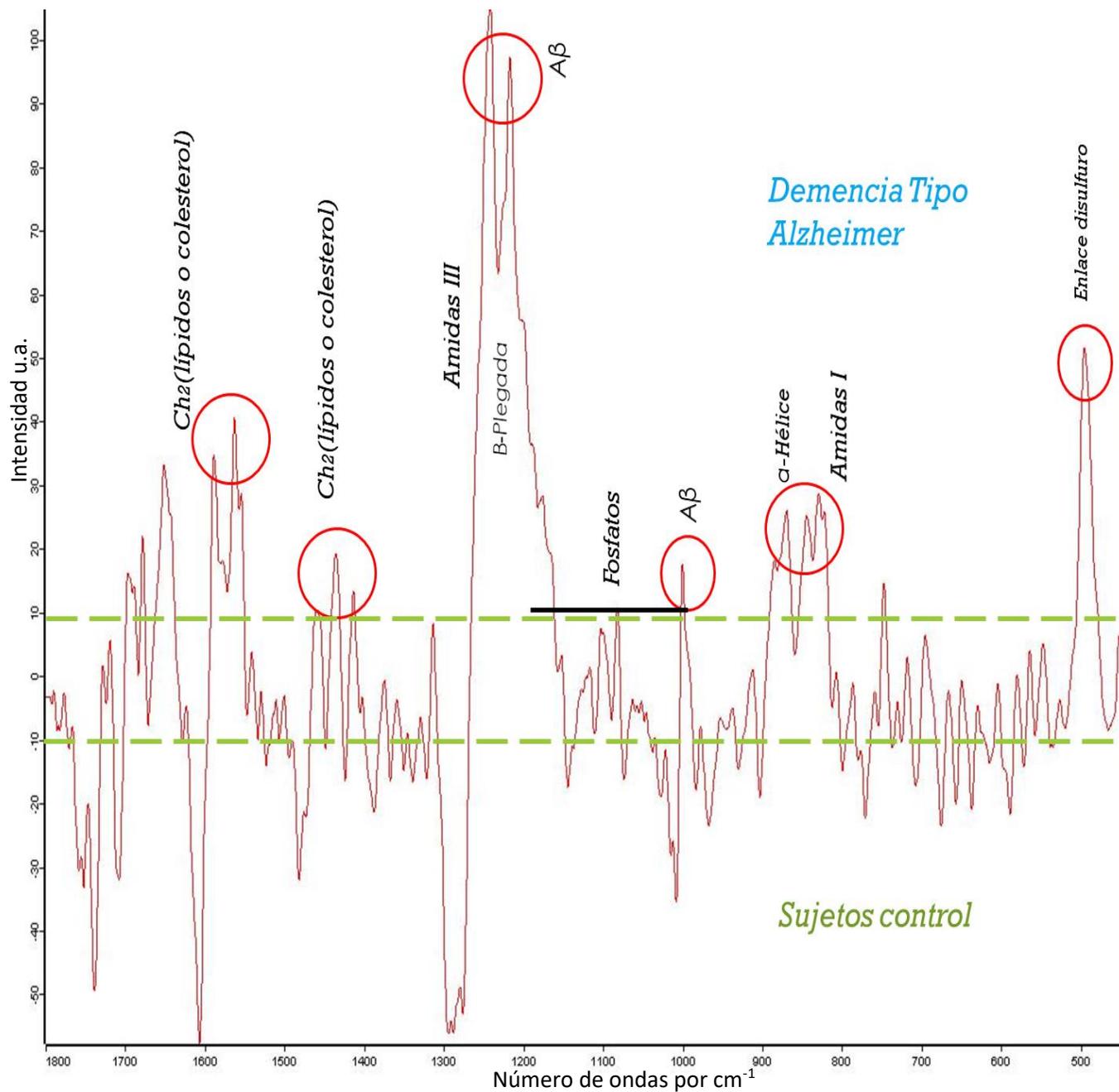
Espectro 6. Promedio de los espectros de Raman de pacientes con demencia tipo Alzheimer (n=50, los promedios fueron obtenidos mediante el programa OPUS Ver7.0.).

En el espectro 7, se muestra el promedio de los espectros Raman de las muestras de plasma tomadas de pacientes con demencia tipo Alzheimer (n=50), en línea azul, versus el promedio de los espectros Raman de las muestras de plasma de sujetos control (50), en línea Roja, en esta gráfica los espectros Raman fueron sobrepuestos, para mostrar las diferencias que hay entre las muestras analizadas. Como se observa, en las bandas asociadas a βA en las muestras de suero analizadas de pacientes con demencia tipo Alzheimer hubo una mayor intensidad en comparación con la banda perteneciente a las muestras de suero de sujetos control en la región de los 1200-1300 que se asocia a las amidas III en donde se da el paso conformacional de α hélice a β -plegada. De igual forma hubo una mayor intensidad en las bandas asociadas a las amidas I (región 800-900 cm^{-1}) y una mayor intensidad en las bandas del CH_2 asociadas al colesterol y lípidos.



Espectro 7. Promedio de los espectros de Raman de pacientes con demencia tipo Alzheimer (n=50) espectro en color azul, versus promedio de los espectros de Raman de sujetos control (n=50), espectro en color rojo, los promedios fueron obtenidos mediante el programa OPUS Ver7.0.).

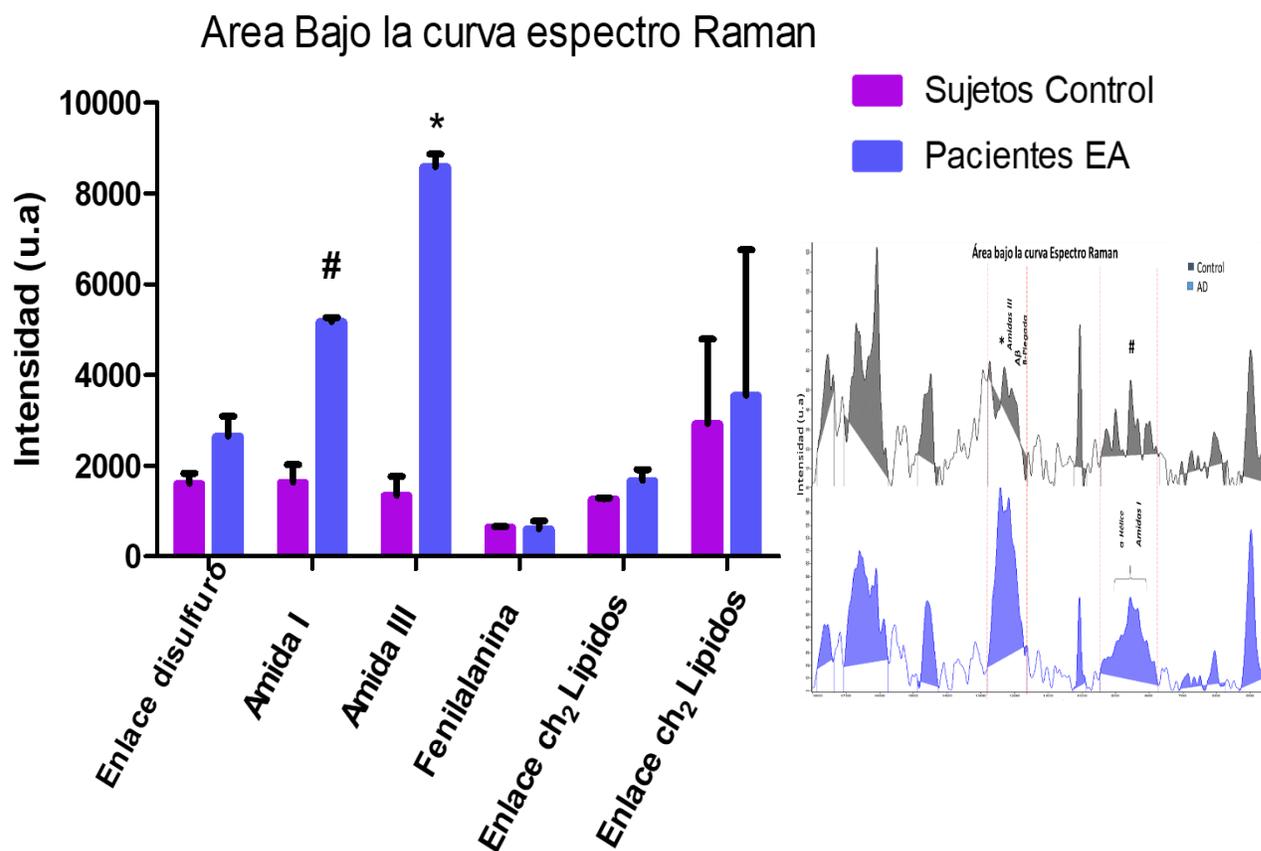
En el espectro 8, se realizó la sustracción del promedio de las muestras de suero de pacientes con demencia tipo Alzheimer (n=50) a los promedios de las muestras de suero de sujetos control (n=50), esto con el fin de mostrar las diferencias que existen entre las muestras de suero de pacientes diagnosticados con demencia tipo Alzheimer y una población pareada por edad, sin ninguna enfermedad neurodegenerativa. Las bandas que se encuentran entre las líneas punteadas no fueron consideradas para el análisis, ya que se consideraron como ruido natural del espectro. Se observó la presencia de la banda asociada al enlace disulfuro alrededor de los 500 cm^{-1} , pertenecientes a las muestras de pacientes con EA. Los cambios esperados en los rangos en donde se encuentra el péptido βA ($1000, 1100\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$), están presentes en espectro y pertenecen a las muestra de suero de pacientes con EA. Alrededor de los 1400 a 1500 cm^{-1} , se observaron bandas asociadas a colesterol y lípidos pertenecientes a las muestras de suero de pacientes con EA. En contraste con los sujetos control, al realizar la sustracción de espectro, se pudo observar que no hay presencia de bandas asociadas a βA , Amidas I, Amidas III o a lípidos y colesterol, los cuales pueden ser utilizados como biomarcadores para la búsqueda de Alzheimer. Aunque las bandas asociadas a los fosfatos ($1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) no sobresalen del rango que fue considerado como ruido natural del espectro, se observó que hay una mayor presencia de estas bandas asociadas a las muestras de pacientes con EA que en sujetos control, este grupo se asocia a la hiperfosforilación que se presente en la proteína Tau en pacientes con EA.



Espectro 8. Sustracción de promedios de los espectros Raman de muestras de suero de pacientes con Demencia tipo Alzheimer ($n=50$) a muestras de suero de sujetos control ($n=50$), los promedios fueron obtenidos mediante el programa OPUS Ver7.0.).

Anexo 3. Análisis del área bajo la curva de Espectros Raman de pacientes diagnosticados con Enfermedad de Alzheimer y sujetos Control.

La gráfica 5, representa los valores del análisis de área bajo la curva de los espectros promedio de pacientes con EA (barra azul) y de los sujetos control (barra morada), expresados en valores de intensidad del espectro Raman. Como se puede observar, solo en los grupos de amida I y amida III, se encontraron diferencias estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente comparados con los sujetos control. Estas diferencias nos muestran que hay un cambio estructural en la conformación de βA en donde se da el paso conformacional de α a β plegada, es decir en donde las placas beta-amiloide ya se encuentran formadas. Como se puede observar en la gráfica 5 hay una mayor intensidad en la conformación de amida I y amida III, lo que se traduce en una mayor concentración de la proteína βA .



Gráfica 5. – Análisis de área bajo la curva del promedio del espectro Raman de plcientes con EA (barra Azul), y promedio de sujetos control (barras moradas). ANOVA post-hoc Bonferroni * $p < 0.001$ EA vs control ANOVA post-hoc Bonferroni # $p < 0.01$ EA vs control.

Anexo 4. Cuantificación plasmática de biomarcadores en pacientes diagnosticados con Enfermedad de Alzheimer y sujetos Control.

Las muestras recolectadas de plasma de 50 sujetos control (sanos) y 50 pacientes con demencia tipo Alzheimer, fueron procesadas por la técnica de ELISA para la detección de β A 1-40, β A 1-42, Tau-T, Tau-P, colesterol total y triglicéridos (Tabla 5). Como se observa en la tabla, las concentraciones plasmáticas de β A 1-42 y la relación de β A42/ β A40 aumento en pacientes diagnosticados con EA en comparación con el grupo control, mientras que la concentración plasmática de β A 1-40 tuvo una disminución en comparación con el grupo de sujetos control. Al medir la concentración plasmática de la proteína Tau, observamos, que hubo un aumento en la concentración plasmática de Tau-P y en la relación de Tau-p/Tau-T en pacientes diagnosticados con EA versus sujetos control, sin embargo, la concentración plasmática de Tau-T disminuyó en pacientes con EA en comparación con el grupo de sujetos control. Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración plasmática de colesterol, si observó un aumento en la concentración plasmática de triglicéridos en pacientes con EA versus su control.

Tabla 5. Concentraciones plasmáticas de biomarcadores medidos en pacientes con EA y sujetos control

Biomarcador	Sujetos Control (n=50)	Pacientes EA (n=50)	P
β A 1-40	0.7014 \pm 0.0006	0.6317 \pm 0.0175	<0.0001*
β A 1-42	0.7370 \pm 0.08896	0.9597 \pm 0.08877	<0.05*
β A 1-40/ β A 1-42	1.072 \pm 0.1392	1.927 \pm 0.2315	<0.005*
Tau-T	147.8 \pm 3.135	122.0 \pm 5.519	<0.0001*
Tau-P	133.7 \pm 8.482	166.4 \pm 5.748	<0.05*
Tau-p/Tau-T	0.8865 \pm 0.08814	1.542 \pm 0.1349	<0.05*
Colesterol	237.4 \pm 7.766	216.3 \pm 10.09	<0.04
Triglicéridos	134.6 \pm 7.397	239.6 \pm 18.13	<0.0001*

La concentración plasmática de β A y Tau se midieron por kit de ELISA, la concentración plasmática de lípidos fue medida por un kit de agente biológico. Los datos se presentan como la media \pm error estándar. Se muestran resultados significativos en asterisco.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00114

Matrícula: 2171801248

Uso de la espectroscopia Raman como herramienta no invasiva para el diagnóstico temprano de la enfermedad de Alzheimer en pacientes mexicanos.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 27 del mes de agosto del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. JORGE ISMAEL CASTAÑEDA SANCHEZ
DR. RODOLFO PINTO ALMAZAN
DRA. ISABEL ARRIETA CRUZ
DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ
DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario del último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: NADIA TZAYAKA CASTILLO MENDIETA

NADIA TZAYAKA CASTILLO MENDIETA

ALUMNA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JORGE ISMAEL CASTAÑEDA SANCHEZ

VOCAL

DR. RODOLFO PINTO ALMAZAN

VOCAL

DRA. ISABEL ARRIETA CRUZ

VOCAL

DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ

SECRETARIO

DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA