



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**MODIFICACIÓN DE GLICOSILACIÓN PROTEICA SÉRICA Y
NEUROINFLAMACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LUIS MANUEL CASTILLO CHÁVEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MIGUEL ANGEL JORGE GUEVARA FONSECA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. LAURA COLIN BARENQUE
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.
DRA. FRANCISCA PÉREZ SEVERIANO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

MÉXICO, D.F. ENERO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**MODIFICACIÓN DE GLICOSILACIÓN PROTEICA SÉRICA Y
NEUROINFLAMACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LUIS MANUEL CASTILLO CHÁVEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MIGUEL ANGEL JORGE GUEVARA FONSECA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. LAURA COLIN BARENQUE
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.
DRA. FRANCISCA PÉREZ SEVERIANO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

MÉXICO, D.F. ENERO, 2015

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 03 de noviembre de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **CASTILLO CHÁVEZ LUIS MANUEL** con número de cuenta **513023716**, con la tesis titulada **"MODIFICACIÓN DE GLICOSILACIÓN PROTEICA SÉRICA Y NEUROINFLAMACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER"**, realizada bajo la dirección del **DR. MIGUEL ÁNGEL JORGE GUEVARA FONSECA**:

Presidente: DRA. ANAHÍ CHAVARRÍA KRAUSER
Vocal: DRA. MARÍA ROSA DE LOURDES AVILA COSTA
Secretario: DRA. FRANCISCA PÉREZ SEVERIANO
Suplente: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA
Suplente: DRA. LAURA COLÍN BARENQUE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de noviembre de 2014

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradezco al Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco el apoyo otorgado por el CONACyT para llevar a cabo mis estudios de posgrado de Maestría (Beca No. 28876).

Y agradecimiento especial a mi comité tutorial por el apoyo y orientación dada:
Dr. Miguel Angel Jorge Guevara Fonseca
Dra. Laura Colin Barenque
Dra. Francisca Pérez Severiano

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia

Agradezco a mis padres ante todo, ya que sin ellos ese viaje no podría ser realidad.

A mi tía, gracias por el apoyo, por estar siempre ahí.

En el trabajo

A la Dra. Blanca Espinosa, gracias por el apoyo, paciencia y orientación para poder lograr este trabajo.

A Enrique Moreno, siempre te lo dije, sin ti esta empresa hubiera sido imposible; gracias por ser un amigo antes que un compañero de trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por recibirme, brindarme un espacio y por crear un ambiente agradable que hoy puedo considerar mi segunda casa. "Por mi raza hablará el espíritu"

A esas personas en el camino

Al Ing. Ángel Chávez Rodríguez, por formar mi carácter; en su momento no lo entendí, hoy le agradezco, ya que los embates fueron más llevaderos.

Al Dr. Ignacio Miranda Medrano, gracias por la confianza y el apoyo.

Al Dr. José Nestor Procuna, cada persona tiene un motivo en el camino; sin usted no estaría escribiendo estas líneas, gracias por recordarme él porque estaba en este camino.

Al Dr. Luis Felipe Montaña, gracias por los regaños y las pláticas interminables; siempre es necesario aceptar, aprender y crecer.

Y a todas esas personas que de una u otra forma contribuyen a formar el camino de las baldosas amarillas.

INDICE

TEMA	No de Página
i. Índice de abreviaturas	I
ii. Índice de tablas y figuras	IV
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
1.1 Deterioro Cognitivo Leve	7
1.2 El Amiloide β en la Enfermedad de Alzheimer	9
1.2.1 Amiloide β en la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer	9
1.2.2 Amiloide β y el óxido nítrico	11
1.2.3 amiloide β como activador de la respuesta inmunológica	13
1.3 Amiloide β a nivel sistémico	14
1.3.1 Drenaje antigénico del Amiloide β	14
1.3.2 Amiloide β sérico	16
1.3.3 Acción del Amiloide β en las células endoteliales	17
1.4 Glicosilación en la Enfermedad de Alzheimer	19
2 Justificación	21
3 Objetivo	22
3.1 Objetivos particulares	22

4 Material y métodos	23
4.1 Sujetos de estudios	23
4.2 Criterios de inclusión	23
4.3 Consideraciones éticas	24
4.4 Estadística descriptiva	25
4.5 Prueba MMSE (Mini Examen del Estado Mental)	25
4.6 Muestras sanguíneas	25
4.7 Proteínas séricas totales	26
4.8 Nitritos séricos	26
4.9 Interleucinas séricas	27
4.10 Depuración de albúmina sérica	28
4.11 Electroforesis de las muestras séricas	29
4.12 Tinción de plata	29
4.13 Transferencia	30
4.14 Western Blot para la detección de la Óxido Nítrico Sintasa Inducible	31
4.15 Western Blot para la detección de glicanos de proteínas séricas con lectinas	32
4.16 Análisis estadístico	33
5. Resultados	34
5.1 Características generales de la población	34
5.2 iNOS y ON	36
5.3 Interleucinas	39
5.4 Perfil electroforético	41

5.5 Glicosilación proteica sérica	41
6. Discusión	46
7. Conclusiones	55
8. Literatura citada	57
9. Anexo I	62
10. Anexo II	65
11. Anexo III	68

i. INDICE DE ABREVIATURAS

AD: Alzheimer's disease

ALL: *Amaranthus leucocarpus*

ANOVA: Analysis of Variance "Análisis de Varianza"

APOE: Apolipoproteína

APP: Proteína Precursora del Amiloide

A β : Amiloide beta

BACE-1: Beta-secretasa 1

BSA: Bovine Serum Albumine "Albúmina Sérica Bovina"

DCL: Deterioro Cognitivo Leve

dpp: dots per point "puntos por punto"

DSMV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

EA: Enfermedad de Alzheimer

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 'Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas'

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno

HRP: Horseradish peroxidase "peroxidasa de rabano"

Ig: Inmunoglobulina

IL-10: Interleucina 10

IL-12(p70): Interleucina 12

IL-1 β : Interleucina 1-beta

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

ISF: Solutos y Fluidos Intersticiales

kDa: kilo Daltones

LCR: Líquido cefalorraquídeo

MAA: *Maackia amurensis*

MCI: Mild Cognitive Impairment

MMSE: Prueba Minimental

NED: N-1-naptilenediamina- dihidroclorhidrico

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: Nitric oxide “Óxido Nítrico”

NOS: Nitric Oxide Synthase “Óxido Nítrico Sintasa”

eNOS: endotelial Nitric Oxide Synthase “Óxido Nítrico Sintasa
endotelial”

iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase inducible “Óxido Nítrico Sintasa
inducible”

nNOS: neuronal Nitric Oxide Synthase “Óxido Nítrico Sintasa neuronal”

ON: Óxido nítrico

PBS: Phosphate buffered saline

PM: Peso Molecular

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

ROS: Reactive Oxygen Species “Especies Reactivas de Oxígeno”

SDS: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis “Duodecil Sulfato de Sodio – Electroforesis de Gel de Poliacrilamida”

SNA: *Sambucus nigra*

SNC: Sistema Nervioso Central

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

ii. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura o tabla	Pagina
Figura 1 Evolución clínica de la Enfermedad de Alzheimer	11
Tabla 1 Criterios de diagnóstico para el Deterioro Cognitivo Leve	13
Figura 2 Mecanismo de toxicidad del amiloide β en la neurona	16
Figura 3 Drenaje antigénico propuesto para el amiloide β	20
Figura 4 Mecanismos de aclaramiento propuestos para el amiloide β en el cerebro	21
Tabla 2 Descripción general de los grupos de estudio	40
Figura 5 Concentraciones séricas de nitritos en los grupos de estudio	41
Figura 6 Correlación entre la concentración sérica de nitritos y el puntaje de la prueba de MMSE	42

Figura o Tabla	Pagina
Figura 7 Densidad de marcaje de la óxido nítrico sintasa inducible sérica	43
Figura 8 Determinación de las concentraciones séricas de las citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12(p70)	45
Figura 9 Perfil electroforético de muestras séricas de sujetos control, paciente con deterioro cognitivo leve y enfermedad de Alzheimer	47
Figura 10 Marcaje con lectina ALL y SNA en muestras séricas mediante la técnica de Western Blot	48
Tabla 3 Análisis estadístico del reconocimiento de la lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i> por Western Blot	49
Tabla 4 Análisis estadístico del reconocimiento de la lectina de <i>Sambucus nigra</i> por Western Blot	50
Esquema 1 Propuesta de las vías por las cuales se pudo estudiar ON, iNOS, interleucinas y cambios en la glicosilación sérica en el DCL y la EA	61

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia, con una fase temprana denominada deterioro cognitivo leve (DCL). La EA ha sido caracterizada por una respuesta inflamatoria crónica a nivel local y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), en especial óxido nítrico (ON) sintetizado por las óxido nítrico sintasas (NOS) a través de diferentes vías. Sin embargo, en los últimos años, se ha encontrado una correlación entre la producción de citocinas y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS); estas alteraciones se han relacionado con la toxicidad del amiloide- β ($A\beta$), el cual también genera alteraciones en la glicosilación proteica. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la relación entre el desarrollo del DCL y la EA, a través de la cuantificación de los niveles séricos de la iNOS y el ON séricos, así como la respuesta inmune sistémica a través de las citocinas descritas a nivel local en la EA (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12) y cambios en la glicosilación proteica sérica. En el presente trabajo se estudió la relación entre el deterioro cognitivo y la respuesta inmune, mediante la prueba de MMSE y la determinación de los niveles séricos de la iNOS, ON y las citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 y marcaje de residuos de glicanos en proteínas séricas con las lectinas *Amaranthus leucocarpus* (ALL), *Sambucus nigra* (SNA) y *Maackia amurensis* (MAA). En pacientes con DCL (n=4), pacientes con EA (n=9) e individuos controles de la misma edad (n=46). Los resultados de este

trabajo mostraron un aumento de la iNOS sérica en pacientes con DCL y EA, pero sólo en los pacientes con DCL se observó concentraciones séricas elevadas de ON en forma significativa. Así mismo, se observó un aumento significativo únicamente en TNF- α e IL-1 β en pacientes con DCL y EA; del resto de las citocinas sólo IL-6 e IL-8 se encontraron aumentadas significativamente en pacientes con EA. Respecto a la prueba de MMSE se encontró una relación directamente proporcional con la disminución de la concentración del ON sérico. Por otro lado se encontró aumento en la reactividad de las lectinas *Sambucus nigra* (SNA) la cual reconoce la estructura sacarídica NeuNAc (α , 2-6) y *Amaranthus leucocarpus* (ALL) misma que reconoce la estructura Gal β 1,3 GalNAc α 1, 0 o GalNAc α 1, 0, lo que indica un aumento de estos residuos sacarídicos en proteínas séricas. Estos resultados pueden correlacionar que alteraciones en la prueba de MMSE acompañado de aumento en las concentraciones séricas de iNOs, NO, TNF- α , IL-1 β e aumento de estructuras glicosídicas en proteínas sericas, podrían ser indicativos de la fase temprana de la EA.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the principal cause of dementia, with an early phase called mild cognitive impairment (MCI). AD has been characterized as a chronic inflammatory immune response at local level and production of reactive oxygen species (ROS), specially the nitric oxide (NO), which is synthesized by nitric oxide synthase (NOS).

However, in last years a crosstalk between cytokines production and inducible nitric oxide synthase (iNOS) has been found; these alterations have been associated with the toxicity of amyloid- β ($A\beta$), which also generates alterations in the protein glycosylation. The aim of this work was to evaluate the relation to development of MCI and AD, iNOS, NO and the systemic immune response through local cytokines described at AD (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12) and changes in serum protein glycosylation. In this work the relation to cognitive decline and immune response was studied through the MMSE test and the determination of serum levels of the iNOS, the NO, the cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 and the labeling of glycans residues on serum proteins with the lectins *Amaranthus leucocarpus* (ALL), *Sambucus nigra* (SNA) and *Maackia amurensis* (MAA). In MCI patients (n=4), AD patients (n=9) and healthy age-matched controls (n=46). The results showed increased levels of serum iNOS in MCI and AD patients, but only in MCI patients serum NO concentrations were significantly elevated; and only IL-6 and IL-8 were found significantly increased in

patients with AD. Concerning the MMSE test was found a direct proportional relationship with decrease of serum concentration of NO was found, but not to cytokines. Also an increase of reactivity to SNA lectin that has affinity to sequence of carbohydrates NeuNAc (α , 2-6) and ALL lectin whose affinity to sequence Gal β 1,3 GalNAc α 1, 0 o GalNAc α 1, 0, that was related to an increase of glycans of serum protein.

These results show that an increase of serum iNOS, NO, TNF- α , IL-1 β and an elevation of serum grlycans accompanied by the MMSE altered test could indicate the development of an early stage of EA.

1 INTRODUCCION

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia y la enfermedad neurodegenerativa más frecuente (Hugo y Ganguli 2014) Las lesiones características de la EA son la formación de marañas neurofibrilares originadas por la hiperfosforilación de la proteína tau y las placas neuríticas formadas por depósitos del amiloide- β ($A\beta$) (Harrington 2012). Clínicamente la EA es caracterizada por alteraciones cognitivas y conductuales (McKhann *et al.* 2011).

Se ha propuesto que en el desarrollo de la EA se presentan dos etapas, una etapa que puede ser considerada como preclínica (Lazarczyk *et al.* 2012), seguida de una etapa prodrómica llamada deterioro cognitivo leve (DCL), previa al establecimiento de la etapa o estadio demencial, la cual es denominada como EA propiamente dicho (Petersen *et al.* 2009) (Figura 1). El DCL presenta características clínicas similares a la EA, sin embargo, dichas alteraciones cognitivas y conductuales no llegan a provocar alteraciones en el desarrollo de las actividades diarias (Kelley y Petersen 2007).

El diagnóstico de la EA actualmente es de tipo presuntivo, ya que el diagnóstico confirmativo de la EA de acuerdo a las guías diagnósticas del National Institute on Aging-Alzheimer's Association Workgroups es únicamente *post-mortem* (McKhann *et al.* 2011) y el diagnóstico del

DCL es por exclusión (Albert *et al.* 2011), debido a que se carecen de biomarcadores certeros para ambas fases de la enfermedad.

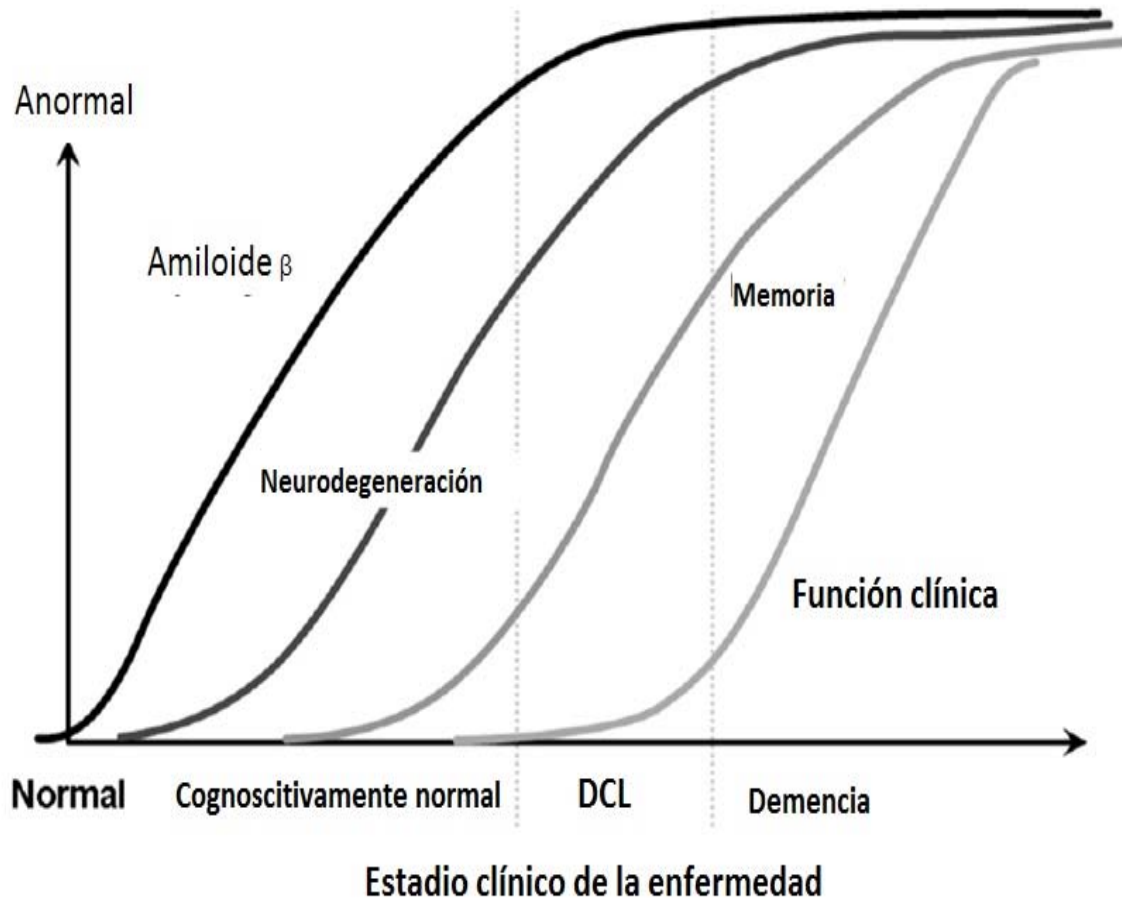


Figura 1. Proceso neuropatológico en la EA. Se esquematizan las principales alteraciones presentes en la EA y el posible estado que guardan con los estadios clínicos de la enfermedad que son la fase de deterioro cognitivo leve (MCI) y la fase demencial. Tomado de Petersen *et al.* 2009.

Los biomarcadores moleculares actualmente aceptados en las guías diagnósticas son concentraciones bajas de $A\beta$ y aumento de la concentración de la proteína tau hiperfosforilada en el líquido cefalorraquídeo (Bohm *et al.* , Albert *et al.* 2011).

Sin embargo la presencia de diversas alteraciones fisiopatológicas en la EA que están relacionadas con el estrés oxidativo, la respuesta inflamatoria y la glicosilación; así como, la posibilidad de detectar dichas alteraciones en LCR y en suero (Song *et al.* 2009), han permitido el planteamiento de nuevos biomarcadores para el diagnóstico del DCL y su progresión a EA.

Por lo que en años recientes la investigación sobre biomarcadores moleculares diagnósticos se ha centrado en moléculas detectables en espacios extra cerebrales que guarden relación con las características descritas en la EA a nivel local.

1.1 Deterioro Cognitivo Leve

El término deterioro cognitivo leve (DCL) fue introducido por (Reisberg 1988); sin embargo, el concepto de DCL se ha modificado a lo largo del tiempo, actualmente hace referencia a la fase sintomática pre-demencia de la EA; la cual es diagnosticada en base al juicio clínico, ya que se carecen de marcadores moleculares que puedan ser identificados por pruebas de laboratorio o de gabinete (Albert *et al.*). Tanto los criterios como la definición actual de DCL está basada en los primeros criterios diagnósticos para DCL publicados en 1999 (Tabla1) (Petersen *et al.* 2009).

Criterios de Deterioro Cognitivo Leve originales de 1999

Criterios

Queja de memoria, preferentemente corroborado por un informante.

Alteración de la memoria documentada acorde a valores de referencia apropiados.

Rendimiento normal en dominios cognitivos que no sean de memoria.

Actividades de la vida diaria preservadas

No demenciado.

Tabla 1. Criterios originales para el diagnóstico del deterioro cognitivo leve en 1999. Dichos criterios se centran en el juicio clínico. Tabla modificada de Petersen *et al.* 2009.

Actualmente el DCL recibe el nombre de Desorden Neurocognitivo Leve de acuerdo a los criterios diagnósticos del *DSM V* (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders). El nombre habitual de deterioro cognitivo leve debido a EA está basado en los criterios del *National Institute on Aging-Alzheimer's Association Workgroups*, con una subclasificación llamada deterioro cognitivo leve con grado de certeza si se ha realizado la determinación del A β en LCR (Petersen *et al.* 2014) y la concentración cuantificada del A β son inferiores a las concentraciones que presentan personas sanas; estos criterios son los más aceptados actualmente.

1.2 El Amiloide β en la Enfermedad de Alzheimer

De acuerdo a los criterios diagnósticos, el biomarcador molecular aceptado es la cuantificación del A β en LCR, esto debido a la importancia del A β en el desarrollo de la EA.

1.2.1 Amiloide β en la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer

Actualmente la hipótesis que más ha tomado auge en la fisiopatología de la EA, es la denominada cascada del A β , la cual propone que esta proteína inicia una cascada de eventos como estrés oxidativo, respuesta inflamatoria y alteraciones en la formación de proteínas como lo son alteraciones en la glicosilación, conducen a la neurodegeneración y desarrollo de la enfermedad (Pratico *et al.* 2001).

El A β es el producto de la proteólisis del dominio extra citoplasmático de la proteína precursora del amiloide (APP), por acción de β y γ secretasas (Pike *et al.* 1995, Citron *et al.* 1996, Selkoe y Schenk 2003). En la EA se ha descrito una sobre activación de la β y γ secretasas, generando un aumento en la producción del A β (Polvikoski *et al.* 1995).

El A β es un péptido hidrófobo formado de 39 a 43 aminoácidos, que suele presentarse en dos formas A β (1-40) y A β (1-42) de 4.2 kDa (Selkoe y Schenk 2003). Estos fragmentos constituyen el elemento

más importante en las placas neuríticas (Harrington 2012), ya que dichas placas son agregados formados principalmente de A β (1-42) (Harrington 2012) en las zonas temporal superior, parietal inferior y frontal del cerebro (Tiraboschi *et al.* 2004). A medida que progresa la EA aparecen agregados fibrilares en el hipocampo (Tiraboschi *et al.* 2004).

El mecanismo de toxicidad que más se ha descrito para A β está dado por sobre activación del receptor NMDA (excitotoxicidad) por acción del A β , resultando en niveles excesivos de óxido nítrico (ON). Estas alteraciones provocan mal plegamiento protéico y fragmentación mitocondrial; liberando citocromo C y activando la vía de las caspasas (Gotz *et al.* 2011) (Figura 2). Todos estos procesos desencadenan la muerte neuronal, contribuyendo al proceso neurodegenerativo (Lopez de Munain 1998) y por consiguiente al deterioro de los procesos de aprendizaje y memoria (Selkoe 1996).

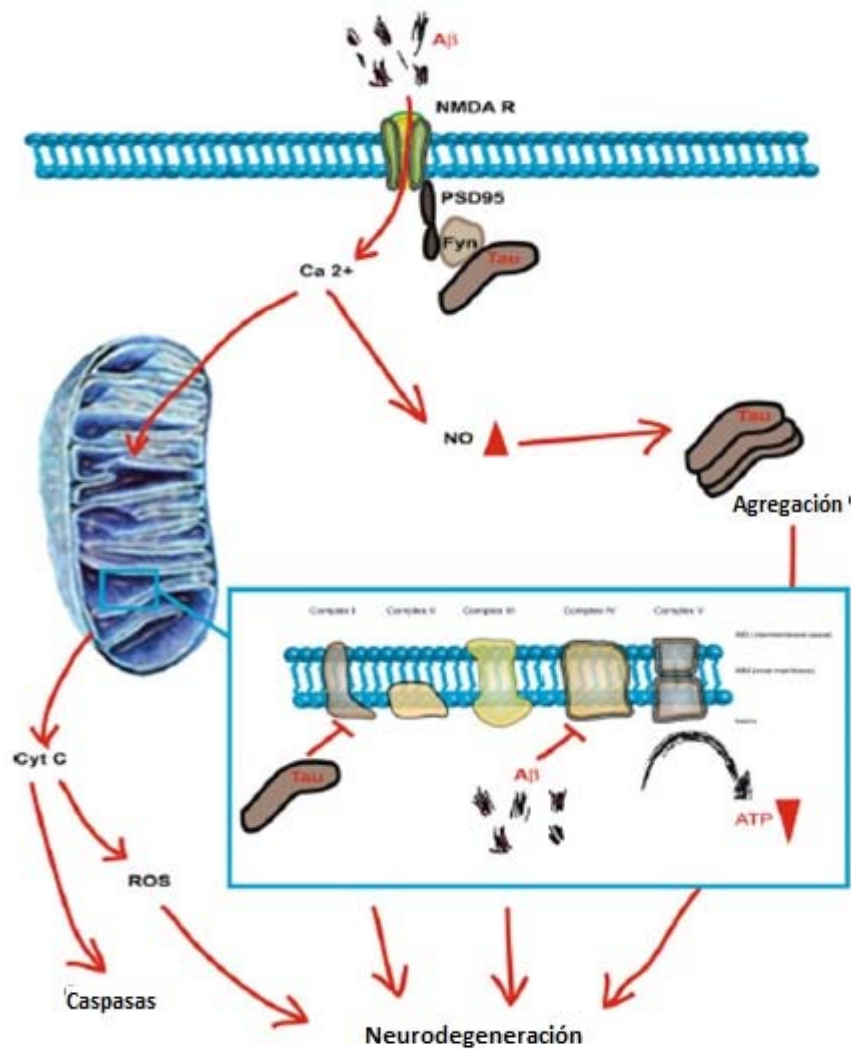


Figura 2. Mecanismo general de la toxicidad del Aβ en las neuronas. Se muestra la activación de receptores NMDA, que conlleva a necrosis por excitotoxicidad y daño a la mitocondria, la cual expresa especies reactivas de oxígeno y se activan las caspasas. Tomado de Gotz, 2011.

1.2.2 Amiloide β y el óxido nítrico

El ON es una molécula diatómica, hidrofóbica, altamente reactiva, que difunde a través de las membranas celulares de acuerdo a su gradiente de concentración (Baranano y Snyder 2001). Para su síntesis es requerido el aminoácido L-arginina y la óxido nítrico sintasa (NOS), de la que se han descrito tres isoformas (Liu *et al.* 2014): 1) la óxido

nítrico sintasa neuronal (nNOS) que se ha relacionado con la formación de los circuitos cognitivos y del lenguaje (Funk y Kwan 2014), 2) la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) sintetiza el ON que participa en la estabilización y regulación del microambiente vascular (de la Torre y Stefano 2000), además de regular la producción del A β (Austin *et al.* 2010); y 3) a óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) cuyo ON sintetizado está asociado a la neurodegeneración y neurotoxicidad, además de estimular macrófagos, astrocitos y microglía (Simonian y Coyle 1996) (Law *et al.* 2001).

Además se ha descrito que las neuronas muestran un aumento en la síntesis de ON en presencia del A β por activación de los receptores NMDA, fisión mitocondrial, pérdida sináptica y daño neuronal (Cho *et al.* 2009, Gotz *et al.* 2011). El aumento de ON se debe a una mayor expresión del eNOS y iNOS (Luth *et al.* 2001, Venturini *et al.* 2002); sin embargo se ha sugerido que la isoforma con mayor actividad es la iNOS, debido a que el A β inhibe fuertemente la actividad de la eNOS (Venturini *et al.* 2002).

También se ha descrito que en la EA las células de la microglía presentan un aumento en la síntesis de ON mediante dos vías: la primera por la exposición al A β (Zielasek *et al.* 1992); y la segunda por

la inducción generada por el ON sintetizado en la neurona debido a la iNOS (Simonian y Coyle 1996).

1.2.3 Amiloide β como activador de la respuesta inmunológica

La neuroinflamación contribuye sustancialmente al desarrollo de la EA (Griffin 2013). A partir de la década de 1980 se describió la relación entre la microglía activada y los depósitos del A β (Itagaki *et al.* 1989), además, también se ha descrito activación de los astrocitos en presencia del A β (Okabe *et al.* 2012). La activación directa de los astrocitos y microglía genera una cascada de liberación de diversas citocinas e interleucinas, primordialmente: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 (Szczepanik *et al.* 2001, Morales *et al.* 2014).

Dentro de la reacción inmunológica se ha descrito la participación de componentes endocrinos, del sistema del complemento y participación de células endoteliales, las cuales son activadas por las citocinas liberadas por células del sistema nervioso central (SNC) y por depósitos del A β en la vasculatura (Broussard *et al.* 2012).

1.3 Amiloide β a nivel sistémico

Como se ha comentado previamente, la búsqueda de biomarcadores moleculares para mejorar y facilitar el diagnóstico de la EA ha tomado un papel preponderante en la investigación básica aplicada; la base de esta investigación se ha sustentado en el hecho de encontrar A β en el suero de pacientes con EA asociado al drenaje antigénico (Laman y Weller, 2013).

1.3.1 Drenaje antigénico del Amiloide β

El drenaje antigénico es el proceso mediante el cual antígenos solubles pasan del SNC a ganglios linfáticos para su presentación ante células especializadas como linfocitos T. Este proceso se da a través de dos vías. La primera de estas es el drenaje del LCR presente en el espacio subaracnoideo a través de las placas cribiformes, para seguir el trayecto de los nervios olfatorios que drenan en los ganglios linfáticos nasales; la segunda vía es el drenaje del LCR hacia el líquido intersticial para posteriormente llegar al sistema linfático, para lo cual el A β circula en el espacio perivascular cerebral hasta llegar a los pares craneales o a la carótida interna; ambas rutas terminan en los ganglios linfáticos cervicales o al torrente sanguíneo donde el A β es llevado al bazo y a otros órganos donde residen células especializadas en la respuesta inmune (Figura 3) (Laman y Weller 2013).

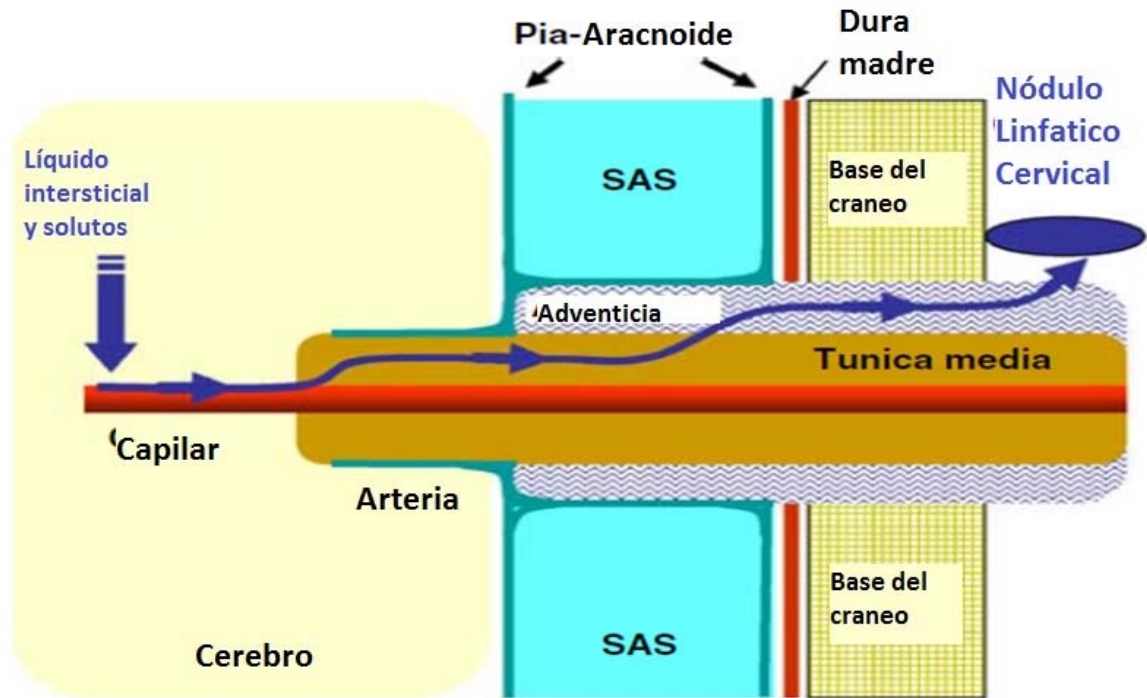


Figura 3. Ruta propuesta para el drenaje antigénico vía drenaje linfático. Los solutos y fluidos intersticiales (ISF) fluyen hacia el capilar; posteriormente los ISF se extravasan hacia la adventicia al llegar al espacio subaracnoideo (SAS), posteriormente seguirá a través la red vascular de las meninges hasta la base del cráneo donde drenará hacia los vasos vertebrales, grandes vasos o directamente a los nódulos linfáticos cervicales. Tomado de Weller *et al.* 2009b.

Sin embargo, en la EA no existe un proceso de aclaramiento exitoso, ya que se ha demostrado que el A β puede formar acúmulos en el espacio perivascular por donde circula, generando una angiopatía (Figura 4) (Weller *et al.* 2000). Esto puede contribuir al desarrollo de la EA al favorecer la acumulación del A β en el cerebro y afectar la integridad vascular del tejido expuesto al A β , ya sea en cerebro o a nivel periférico (Weller *et al.* 2008, Weller *et al.* 2009a, Weller *et al.* 2009b).

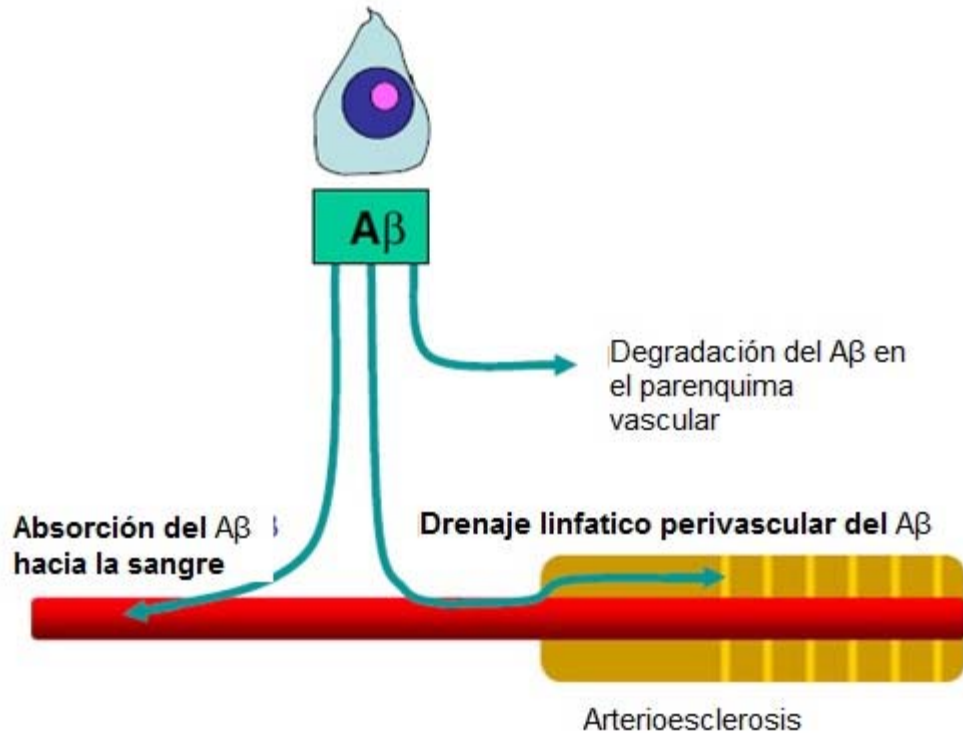


Figura. 4 Vías de aclaramiento del Aβ en el cerebro. La falta de aclaramiento del Aβ provoca un aumento en el drenaje del Aβ a espacios extra cerebrales, el cual se da por drenaje linfático a través de la circulación en la adventicia de los vasos y drenaje directo a sangre. Tomado por Weller *et al.* 2009b.

1.3.2 Amiloide β sérico

Debido a que EA afecta al SNC, es necesaria la búsqueda de marcadores extra cerebrales, ya que actualmente sólo se acepta como biomarcadores la detección del Aβ y proteína tau en LCR (Hawkins *et al.* 1994, McKhann *et al.* 2011). Actualmente la búsqueda de marcadores se extendió hacia otros tejidos, después del hallazgo de Aβ a nivel sérico. Esta detección fue realizada por primera vez de forma indirecta, con la detección de anticuerpo anti-Aβ sérico (Cole *et al.* 1989), los cuales se encuentran en niveles significativamente menores

en pacientes con EA que en personas sanas (Weksler *et al.* 2002, Qu *et al.* 2014).

Posteriormente se demostró la existencia de A β (1-40) y A β (1-42) circulante en suero de pacientes con EA, cuyos niveles séricos no presentan diferencia significativa entre los pacientes con EA y los sujetos control (Irizarry 2004); existiendo una correlación entre las concentraciones séricas del A β con las concentraciones del A β en LCR (Kasai *et al.* 2013). Por otro lado, en pacientes con DCL, los niveles séricos del A β (1-42) se encuentran elevados significativamente (Luis *et al.* 2009); por lo que sería probable encontrar cambios serológicos en los pacientes con DCL y con EA en comparación con los sujetos sanos; estos cambios pueden ser debido a las diferentes concentraciones del A β sérico presentes en cada etapa del desarrollo de la EA.

1.3.3 Acción del Amiloide β en las células endoteliales

Ante la presencia del A β en suero, el tejido endotelial y el músculo están en exposición continua a este péptido, pero se ha demostrado que la respuesta inducida por el péptido es mayor en células endoteliales que en músculo (Suo *et al.* 1998).

La actividad tóxica del A β en el endotelio es diversa, ya que puede inhibir la proliferación celular endotelial (Grammas *et al.* 1995),

aumentar la producción de EROs (Thomas *et al.* 1996), cambios en la producción y actividad de las NOS (Zhu *et al.* 2007), además de generar depósitos en el tejido endotelial en vasos de diferente localización anatómica. (Thomas *et al.* 1997).

Los depósitos generados por el A β en el tejido endotelial son extra e intracelulares, estos últimos son preferentemente en retículo endoplásmico y mitocondria (Soriano *et al.* 2003), dichos depósitos mitocondriales generan aumento en la producción y liberación de ON (Xu *et al.* 2001). El aumento del ON producido por células endoteliales expuestas al A β se ha relacionado con un aumento en la eNOS (Rajadas *et al.* 2013). Sin embargo se desconoce la presencia o producción de la iNOS producida por las células endoteliales ante la presencia del A β .

Además de la respuesta asociada a EROs, el A β induce la expresión de CD40 y de IL-1 β en las células endoteliales (Suo *et al.* 1998), por lo tanto, cualquier célula endotelial sin importar su localización podría sintetizar otras interleucinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6 ante el estímulo del A β sérico.

1.4 Glicosilación en la Enfermedad de Alzheimer

En la EA, además de cambios relacionados al estrés oxidativo y la inflamación, también se han descrito alteraciones en la O- glicosilación (la unión glicano-proteína se da en un aminoácido serina/treonina) y N- glicosilación (la unión glicano-proteína se da en un aminoácido asparagina) (Schedin-Weiss *et al.* 2014). Se ha observado disminución de la actividad de sialiltransferasas en cerebros de pacientes con la enfermedad (Maguire y Breen 1995). Posteriormente se mostró mediante el uso de las lectinas *Amaranthus leucocarpus* y *Macrobrachium rosenbergii* que existe aumento significativo en la presencia de proteínas O-glicosiladas que presentan estructuras de glicanos tales como Gal β 1,3, GalNAc α 1,0 Ser/Thr o GalNAc α 1,0 Ser/Thr (Zenteno *et al.* 1992) en proteínas de cerebro de pacientes con EA (Guevara *et al.* 1998).

Actualmente las alteraciones en la glicosilación han sido detectadas en las principales proteínas involucradas en la EA, como son: APP (Proteína Precursora del Amiloide), BACE-1 (Beta secretasa-1), presenilina, nicastrina, tau, acetilcolinesterasa y la transferrina (Schedin-Weiss *et al.* 2014).

Los cambios en la glicosilación de la EA no están confinados al cerebro, ya que desde 1994 se conocen cambios en la actividad de sialiltransferasas en el suero de pacientes con la enfermedad (Maguire

et al. 1994), esto abrió la posibilidad de detectar cambios en la glicosilación de proteínas encontradas en suero.

Los cambios en la glicosilación de proteínas séricas hasta ahora descritas muestran tanto un aumento como disminución de estructuras de glicanos presentes (Marklová E 2012). Algunas de las proteínas séricas a las que se les ha descrito cambios en la glicosilación son ApoE y transferrina (Marklová E 2012); esta última, puede ser localizada en LCR de paciente con EA con cambios en la glicosilación similares a las presentes en la transferrina sérica (Schedin-Weiss *et al.* 2014), lo que podría significar que existe una relación entre los cambios de glicosilación en SNC y en espacios extra cerebrales.

La mayoría de los cambios descritos en la glicosilación de proteínas en la EA están explorados a través de cambios de peso molecular y uso de anticuerpos (Marklová E 2012), sin embargo, también ha sido posible detectar dichos cambios en base a la presencia y secuencia de carbohidratos mediante el uso de lectinas (Guevara *et al.* 1998, Espinosa *et al.* 2003). En suero aún no se han descrito los cambios de glicosilación en las glicoproteínas séricas durante las etapas del desarrollo de la EA

2. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia en el mundo (Alzheimer's Association, 2014); la cual actualmente sólo tiene un diagnóstico de tipo presuntivo (McKhann *et al.*, 2011), ya que el diagnóstico confirmativo se da en etapa post-mortem.

La dificultad que presenta la EA para ser diagnosticada, está dada por la localización anatómica de las principales lesiones, ya que afectan al sistema nervioso central (Li *et al.* 2014); lo que dificulta la obtención de muestras biológicas para el diagnóstico de la enfermedad. Esta condición ha orientado las investigaciones en pro de la búsqueda de la marcadores que faciliten el diagnóstico y la evaluación de la progresión de la enfermedad. Como resultado de dichas investigaciones está la detección del A β y proteína tau en LCR (McKhann *et al.* 2011) sin poder brindar la posibilidad de un diagnóstico precoz de la EA o del DCL.

Por lo que, en este estudio se pretende identificar candidatos moleculares séricos como marcadores para el diagnóstico precoz y seguimiento de la EA y del DCL en base a las características fisiopatológicas descritas en la EA, tales como: estrés oxidativo (Bennett *et al.* 2009), respuesta inflamatoria (Rubio-Perez y Morillas-Ruiz 2012) y glicosilación proteica (Guevara *et al.* 1998).

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil de glicoproteínas séricas y concentraciones séricas de óxido nítrico e interleucinas pro- y anti-inflamatorias, que correlacionen con la presencia del DCL y presencia de EA, que puedan ser biomarcadores para el diagnóstico precoz de la EA.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

a) Cuantificar las concentraciones séricas del ON en personas control, pacientes con deterioro cognitivo leve y pacientes con EA.

b) Cuantificar las concentraciones séricas de las interleucinas: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 (p70) en personas control, pacientes con deterioro cognitivo leve y pacientes con EA.

c) Determinar las diferencias de glicosilación entre las glicoproteínas séricas en base a la presencia de carbohidratos como ácido siálico y GalNAC, mediante el uso de las lectinas: *Sambucus nigra* (SNA), *Amaranthus leucocarpus* (ALL) y *Maackia amaurensis* (MAA), esto en personas control, pacientes con deterioro cognitivo leve y pacientes con EA.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Sujetos de estudio

En este estudio participaron 46 individuos clínicamente sanos (hombres= 23, mujeres= 23) de edades similares a los pacientes (mayores de 55 años), canalizados para este estudio a través de la asociación “Vida digna A.C.” y el Departamento de Neuropsicología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez.” Se reclutaron cuatro pacientes con deterioro cognitivo leve (Mild Cognitive Impairment) (hombres=2, mujeres=2) diagnosticados acorde a los criterios de Petersen (Albert *et al.* 2011); 9 pacientes con probable demencia por enfermedad de Alzheimer (hombres=3, mujeres=6) diagnosticados acorde a los criterios establecidos por el National Institute on Aging-Alzheimer’s Association Workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease del 2011 (McKhann *et al.* 2011, Segal-Gidan *et al.* 2011).

4.2 Criterios de inclusión

Las personas participantes en nuestro estudio tienen al menos 55 años de edad; los cuales al momento de tomar la muestra no debían cursar con ninguna enfermedad infecciosa, lesión bucal o tratamiento odontológico para cualquiera de los tres grupos. Las personas del grupo control no debían tener diagnóstico de enfermedades

neurológicas, inflamatorias crónicas o autoinmunes; los pacientes con diagnóstico de deterioro cognitivo leve y con diagnóstico de probable enfermedad de Alzheimer debían cumplir con los criterios respectivos (Albert *et al.* 2011) (McKhann *et al.* 2011, Segal-Gidan *et al.* 2011).

Todos los sujetos participantes en este estudio o el familiar responsable debieron firmar los consentimientos informados acerca del estudio y de la extracción de muestra sanguínea (ANEXO 1), dichos consentimientos fueron elaborados en base a las consideraciones éticas con las que se desarrolló este estudio (Punto 4.3)

4.3 Consideraciones éticas

De acuerdo con los principios éticos de Helsinki para la investigación médica que involucra sujetos humanos, adoptados por la 18ª Asamblea General de la WMA, Helsinki, Finlandia, Junio de 1964 y corregido por la 59ª Asamblea General de la WMA, Seúl, Octubre de 2008, el proyecto cuenta con dos Consentimientos Informados, en los cuales se acepta la participación voluntaria en el proyecto por parte de los pacientes, en la evaluación neuropsicológica y en la donación de las muestras. Los consentimientos informados fueron firmados por el paciente y/o del familiar responsable, así como el especialista responsable de la toma de muestras y de la aplicación de la evaluación neuropsicológica y un testigo.

4.4 Estadística descriptiva

Se realizó análisis estadístico acerca del género, lateralidad y escolaridad del grupo control o testigo, DCL y EA.

4.5 Prueba MMSE (Mini Examen del Estado Mental)

A cada participante se le aplicó la prueba de Mini Mental State Examination (MMSE) (ANEXO 2), adaptado del descrito por Folstein en 1975 (Folstein *et al.* 1975); usando un corte de 23 puntos para designar daño cognitivo acorde a lo establecido por la Secretaria de Salud de México en la guía correspondiente para dicha prueba.

4.6 Muestras sanguíneas

Se obtuvieron 5 mL de muestra sanguínea de cada individuo, mediante venopunción en brazo usando un tubo de colección Vacutainer sin anticoagulante. La muestra se mantuvo a temperatura ambiente por 15 minutos, posteriormente la muestra se centrifugo por 10 minutos a 2000 rpm. El suero fue colectado, alicuotado y almacenado a -70° C hasta su uso.

4.7 Proteínas séricas totales

Se realizó la cuantificación de proteínas séricas mediante la técnica de Lowry, utilizando el kit BioLegend Protein Assay Dc (BioLegend, USA), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La determinación se realizó en micro placa de 96 pozos y se preparó una curva estándar con albúmina sérica bovina (concentración máxima 8 g/dL, concentración mínima 5 g/dL). La técnica consiste en colocar 5 μ L de muestra o del estándar de albúmina sérica bovina, posteriormente se agregaron 25 μ L del reactivo A y 200 μ L del reactivo B. La reacción generada tendrá un viraje de color amarillo a color azul, esta reacción se deja estabilizar por 15 minutos a temperatura ambiente. Por último se cuantificó la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm, mediante el uso de un lector de ELISA para micro-placas Multiskan EX Thermo ELISA (Thermo Sci, USA).

4.8 Nitritos séricos

Los nitritos séricos se cuantificaron utilizando el método de Griess modificado para micro placa de 96 pozos. Se utilizó el *kit* Griess Reagent System (Promega Corporation) que incluye su propia curva estándar. Dicho método consiste en colocar 50 μ l de suero o del estándar (máximo 100 μ M), posteriormente se agregaron 50 μ l de sulfanilamida (1%) y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente,

seguido a esto se agregó 50 μ l de la solución NED (N-1-naphtiletilenediamina- dihidroclorhidrico) (0.1% en ácido fosfórico al 5%) y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, hasta el desarrollo de una coloración rosa. Todas las reacciones son sensibles a la luz, por lo que se protegieron. La absorbancia fue medida a 520 nm de longitud de onda en un lector de ELISA Multiskan EX Thermo ELISA (Thermo Sci, USA).

4.9 Interleucinas Séricas

Los niveles séricos de las interleucinas 1 β , 6, 8, 10,12 y TNF- α se cuantificaron por el método de Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) usando los kits comerciales ELISA MAX Deluxe (Biolegend, San Diego CA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La micro placa se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo de captura específico para cada interleucina, a la mañana siguiente se realizaron 4 lavados con buffer de lavado (PBS pH 7.4 / 0.05% Tween 20), seguido de la incubación a temperatura ambiente por una hora con el diluyente de ensayo, y luego nuevamente 4 lavados con buffer de lavado. Se colocaron 100 μ l de muestra por pozo (el volumen de muestra varía de acuerdo a cada interleucina) o estándar (proporcionado por el fabricante) e incubado por dos horas. Tras la incubación de la muestra se realizaron 4 lavados y se agregó el

anticuerpo de detección por una hora y se prosiguió con 4 lavados más; se agregó un conjugado Avidina-HRP y se incubó por 30 minutos seguido de 5 lavados, por último se agregó el revelador TMB (3,3',5,5' tetrametil-bencidina) incubándola en obscuridad y parando la reacción a los 30 minutos con ácido sulfúrico 2N. Finalmente se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un lector Multiskan EX Thermo ELISA (Thermo Sci, USA).

4.10 Depuración de albúmina sérica

A 9 muestras de grupo control, 4 de pacientes con DCL y de 9 pacientes con EA se les depuró la albúmina sérica, con el fin de favorecer la visualización de proteínas minoritarias. El proceso se realizó con el *kit* PureProteome™ Albumin Magnetic Beads (Millipore, Merck; Alemania, 2014). El proceso se realizó colocando 150µl de las perlas del kit en un tubo de micro centrifuga de 2 ml, posteriormente los tubos se colocaron en la base magnética del kit y se retiró el buffer en el que vienen las perlas. Después se lavaron las perlas dos veces con PBS pH 7.4, retirando el buffer posterior a cada lavado; se colocó 5 µL de muestra y 20 µl de PBS pH 7.4 en el tubo de micro centrifuga que contienen las perlas lavadas, incubando en movimiento continuo a temperatura ambiente por 60 minutos fuera de la base magnética. Posterior a la incubación se colocó el tubo de micro centrifuga en la

base magnética y se recuperó una muestra depurada para albúmina. Posterior al tratamiento para depurar o eliminar la albúmina sérica se realizó una nueva medición de proteínas totales séricas con la técnica descrita en el punto 4.5. El *kit* PureProteome™ Albumin Magnetic Beads depura un 90-98% de la albúmina sérica; lo que equivale a reducir en 54% las proteínas de la muestra.

4.11 Electroforesis de las muestras séricas

Las muestras libres de albúmina sérica fueron sometidas a electroforesis. Dichas muestras se mezclaron en proporción 1:1 con buffer de muestra marca BioRad (62.5 mM Tris-HCL, pH 6.8 / glicerol 25%/ SDS 2%/ azul de bromofenol) (BioRad, USA) y colocadas durante un minuto en agua en ebullición; posteriormente se realizó la electroforesis en geles SDS-PAGE al 10% y de 1.5 mm de grosor. Se colocaron en cada carril 80 µg de proteína y el corrimiento se realizó a 120 V y 4° C durante 2 horas.

4.12 Tinción de plata amoniaca

Una vez finalizada la electroforesis de las muestras del grupo control, de pacientes con DCL y de pacientes con EA, los geles fueron teñidos

con la técnica plata amoniacal, con el objetivo de identificar el perfil electroforético de las proteínas séricas entre los tres grupos.

Tras realizar la electroforesis, el gel fue colocado durante 20 minutos en isopropanol 10%/ ácido acético 10% en agitación suave; posteriormente se retiró dicha solución y se colocó isopropanol 10% durante 20 minutos en agitación suave. Finalizado el tiempo se eliminó la solución de isopropanol y se incubó el gel durante 1 hora en una solución de glutaraldehído al 3.5%, posteriormente se realizaron 5 lavados de 15 minutos cada uno con agua desionizada, después se colocó el gel en la solución de tinción (5 ml de AgNO_3 al 10% / 1.5 mL NH_4OH / 27 mL de NaOH al 0.36%) durante 30 minutos; posterior a la tinción se llevó a cabo 3-5 lavados con agua desionizada de 10 minutos.

Por último se aplicó al gel la solución de revelado (50 mg de ácido cítrico / 50 μL de formaldehído al 37%/ 100mL de agua desionizada), y se detuvo la reacción con una solución de ácido acético al 10%.

4.13 Transferencia

Terminada la electroforesis, los geles fueron transferidos a una membrana de PVDF mediante el uso de una cámara de transferencia semi-seca (BioRad, USA) a un voltaje de 20V durante 1 hora 20 minutos. Se verificó la transferencia mediante la tinción de la

membrana transferida con rojo de Ponceau, seguido de lavados con agua desionizada para retirar el colorante.

4.14 Western Blot para la detección de la Óxido Nítrico Sintasa Inducible.

Seguido a la transferencia, la membrana se incubó en una solución de PBS pH 7.4 / 3% BSA a 4°C durante toda la noche, posteriormente se lavó por triplicado en PBS pH 7.4/ 0.01% Tween 20; se incubó con el anticuerpo para iNOS humana (Anti-NOS2, Santa Cruz Biotech. USA) en PBS pH 7.4/ 3% BSA/ 0.01% Tween 20 por 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de lavados por triplicado e incubado con anticuerpo secundario Ig Anti-Rabbit HRP (Jackson Immuno, USA) en una dilución 1:1000 en PBS pH7.4 / 0.01% Tween 20 por 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente lavado tres veces con PBS pH 7.4/0.001% Tween 20.

La detección se realizó por quimio-luminiscencia con SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific) y se analizó la emisión de la señal utilizando el equipo DNI Bioimaging y el programa Gelquant versión 2.7.0 (Gelquant. DNI Bioimaging system, Jerusalem, Israel). El programa convirtió la imagen en una imagen de 8 bit y calculó la densidad del área en escala de pixeles/pulgada cuadrada,

convirtiendo la lectura en un valor numérico expresado en dots per point (dpp).

4.15 Western Blot para la detección de glicanos en proteínas séricas con lectinas

Tras la realización de los pasos descritos en los apartados 4.10 y 4.12, la membranas transferidas fueron bloqueadas en PBS/ 3% BSA a 4°C toda la noche, posteriormente se lavó por triplicado en PBS/ 0.01% Tween 20 e incubada toda la noche a 4°C en presencia de lectina-PBS/ 0.01% Tween 20/ 3% BSA. Se utilizaron las lectinas: *Sambucus nigra* (SNA) (NeuNAc α , 2-6), *Amaranthus leucocarpus* (ALL) (Gal β 1,3 GalNAc α 1,0 o GalNAc α 1,0) y *Maackia amaurensis* (MAA) (ácido sálico α -2,6). A la mañana siguiente la membrana fue lavada por triplicado en PBS/ 0.01% Tween 20 e incubada en ExtrAvidin-Peroxidasa (Sigma-Aldrich, USA) en una dilución 1:5000 en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Al terminar el periodo de incubación, la membrana se reveló por quimioluminiscencia con el kit SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific), dejando 15 minutos de exposición la película (Kodak, USA), utilizando revelador y fijador Kodak. Éstas películas fueron fotografiadas y analizadas digitalmente con el software Gel Capture 4.5 y analizadas con el software Gelquant versión 2.7.0 (Bio Imaging Systems). El programa convirtió la imagen

en una imagen de 8 bit y calcula la densidad del área en escala de pixeles/pulgada cuadrada, convirtiendo la lectura en un valor numérico expresado en dots per point (dpp).

4.16 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos acerca de la estadística descriptiva, concentraciones de proteínas séricas totales, nitritos, interleucinas y densidad (dpp) fueron analizados por la prueba de ANOVA, seguido por una prueba post hoc Turkey. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software GraphPad Prism 6.0 (San Diego. CA). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Características generales de la población

El grupo de deterioro cognitivo leve (DCL) representa 6.67% de nuestra muestra y los sujetos con demencia por probable enfermedad de Alzheimer (EA) representan el 15% de la muestra.

Dentro del grupo de pacientes con EA se encontró una prevalencia significativa del género femenino ($p = <0.0001$); en los sujetos control se encontró un 84.8% de lateralidad diestra y 10.9% para lateralidad zurda, se encontró un 100% de lateralidad diestra para DCL y para demencia por probable EA (Tabla 2). Respecto a la escolaridad tenemos una media de 14.76 años de estudio para el grupo control, 11 años para DCL y 8 años para el grupo de pacientes con demencia por probable EA, existiendo una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo demencia de $p = 0.0011$ (Tabla 2). Respecto a los niveles protéicos séricos no hay diferencia significativa entre los tres grupos (Tabla 2).

Características generales de la población

	Control	DCL	EA	ANOVA (valor de p)
<i>Muestra</i> <i>(n=)</i>	46	4	9	
<i>Edad (Años)</i>	65.73	65.25	75.77	
<i>Genero</i> <i>(Masculino/Femenino)</i>	23/23	2/2	3/6	<0.0001 (para EA)
<i>Lateralidad</i> <i>(Diestro/Zurdo)</i>	39/7	4/0	9/0	
<i>Escolaridad (Años)</i>	14.76	11	8	0.0006
<i>Proteínas</i> <i>totales</i> <i>séricas (g/dL)</i>	6.880	6.780	6.61	0.6348

Tabla 2. Descripción general de los grupos control, DCL y EA; con análisis de ANOVA para predominio de género, escolaridad y proteínas séricas totales

5.2 iNOS y óxido nítrico sérico

Se encontró aumento significativo en los niveles séricos de nitritos en pacientes con DCL 8.21 $\mu\text{Mol/l}$ en comparación con el grupo control 4.28 $\mu\text{Mol/l}$ y 5.37 $\mu\text{Mol/l}$ para pacientes con EA ($p \leq 0.0001$) (Figura 5).

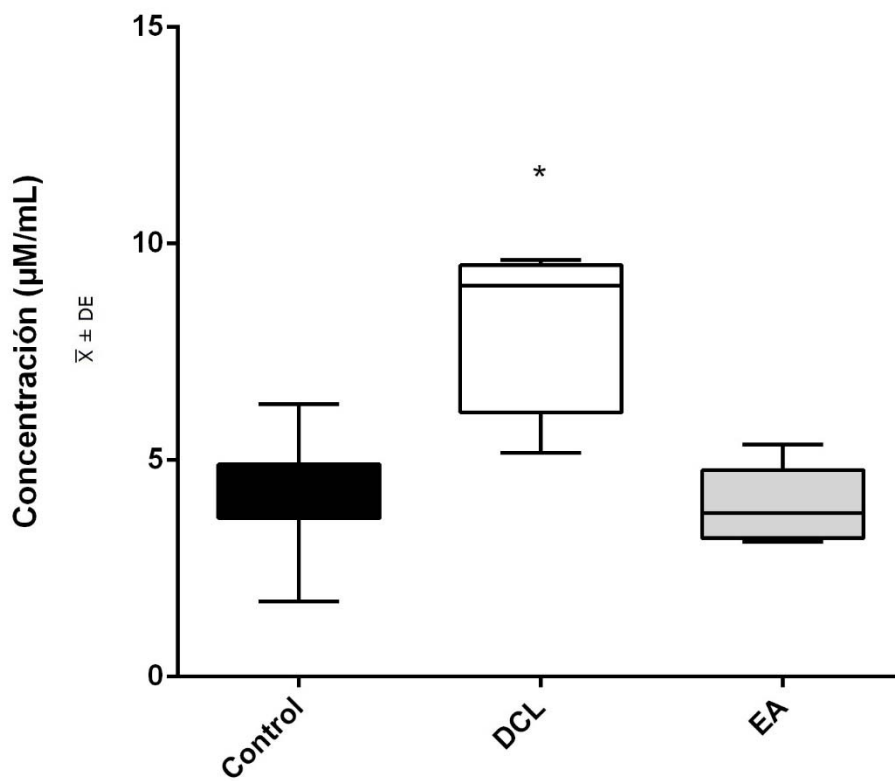


Figura 5. Concentraciones séricas de nitritos en los grupos control, DCL y EA. Mostrando un aumento significativo en el grupo DCL, sin diferencias entre el grupo control y el grupo de pacientes con probable enfermedad de Alzheimer. Prueba de ANOVA * $p = < 0.0001$ \bar{x} = Media DE = Desviación Estandar

La relevancia de estos resultados es establecida cuando se compara el resultado de la prueba MMSE con los valores de nitritos séricos. Encontrando una relación entre ambos $r=0.58$, la cual establece un punto de tendencia de aumento de los nitritos séricos en la etapa temprana (DCL) de la EA, seguida de una disminución de los nitritos asociado al daño cognitivo (Figura 6).

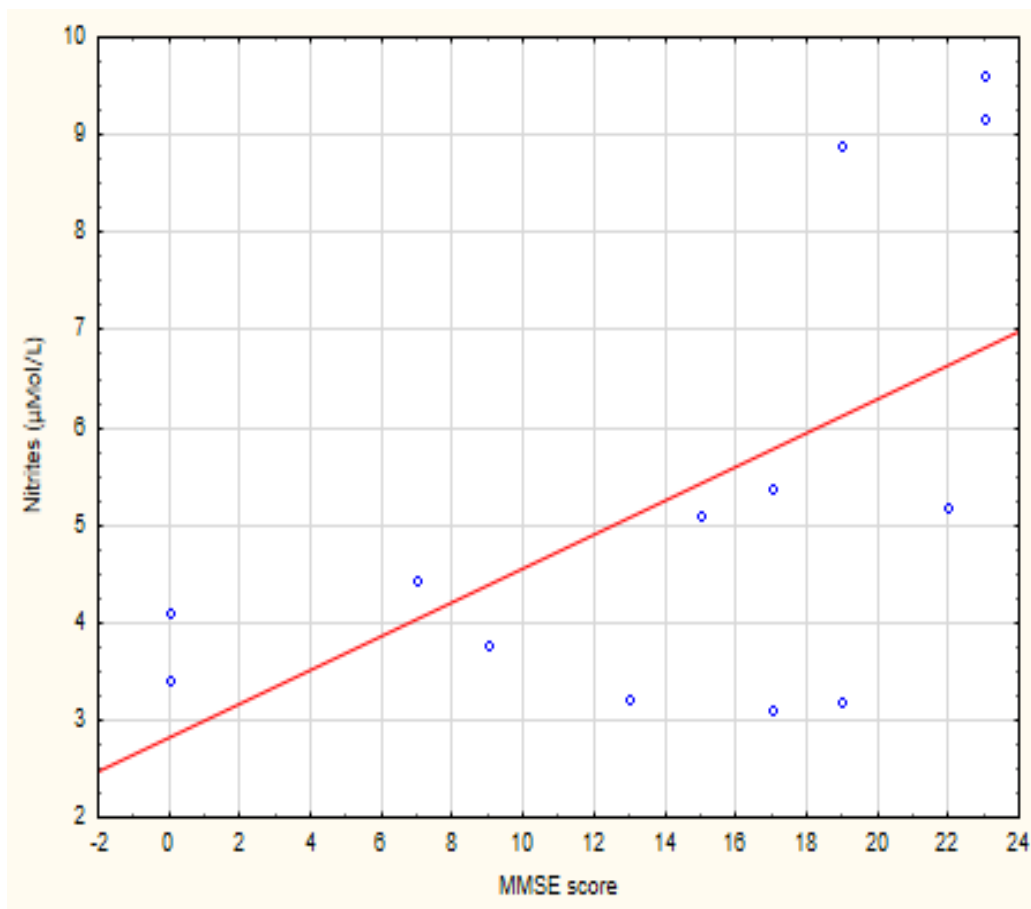


Figura 6. Correlación entre el puntaje de la prueba MMSE y la concentración de nitritos séricos entre los grupos DCL y EA, ($r=0.58$, $p=0.0187$). Se observa una relación proporcional entre los valores de la prueba y las concentraciones séricas de los nitritos.

Respecto a la detección de iNOS mediante Western Blot (Figura 7), se encontró un aumento significativo de la enzima en pacientes con EA respecto al sujeto control y DCL ($p=0.0218$); en relación a los niveles detectados de iNOS en pacientes con DCL se encuentra una tendencia significativa ($p= 0.0650$, prueba t de Student) de aumento en la densidad del marcaje obtenida respecto a el marcaje en pacientes control.

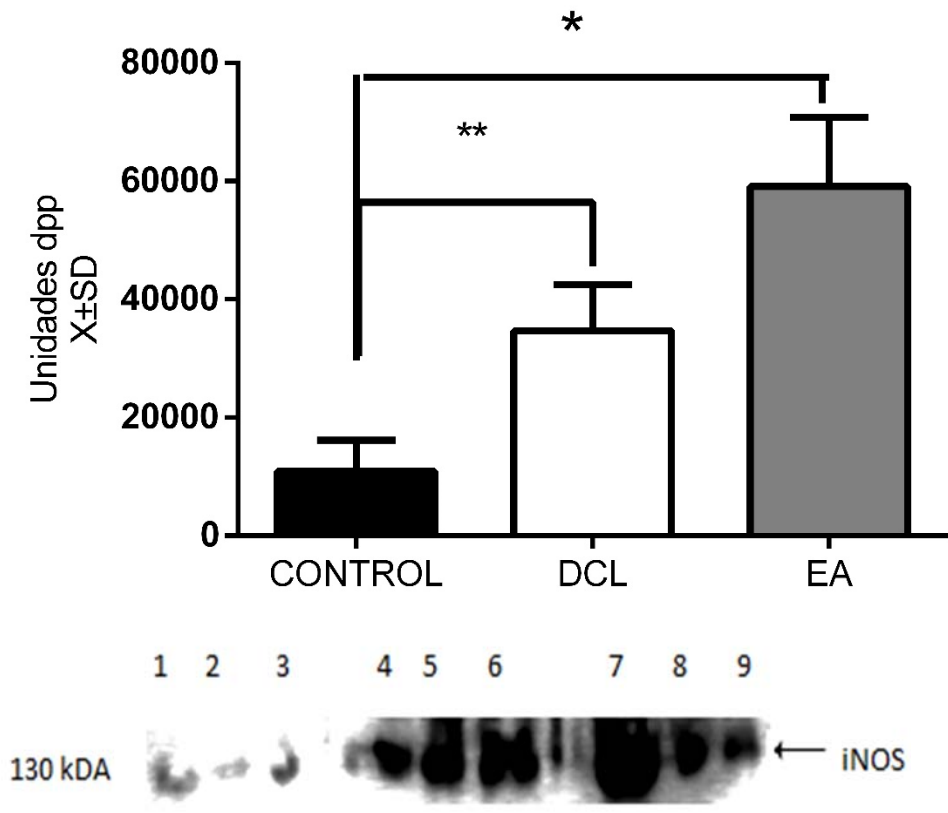


Figura 7. Identificación de iNOS mediante Western Blot (carril 1,2 y 3: control; carril 4,5 y 6: DCL; carril 7,8 y 9: Enfermedad de Alzheimer). Mostrando un aumento en la densidad de marcaje significativa en pacientes con Enfermedad de Alzheimer. Prueba de ANOVA $p=0.0218$ Prueba t de Student= * Control vs EA $p=0.0198$ ** Control vs DCL $p=0.065$

5.3 Interleucinas

Se cuantificó la concentración sérica de las citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 (p70), las gráficas de los resultados se muestran en la figura 8.

Las concentraciones de TNF- α del grupo de Demencia por probable EA y DCL mostraron diferencias significativas respecto con el grupo control ($p=0.0017$) (Figura 8); respecto a IL-1 β la diferencia significativa se encontró en el grupo DCL y en el grupo demencia por probable EA ($p<0.0001$) (Figura 8); respecto a IL-6 e IL-8 se encontró diferencias significativas ($p <0.003$ and 0.078 , respectivamente) entre el grupo demencia por probable EA en comparación con el grupo DCL y el grupo control (Figura 8); por último en cuanto a IL-10 e IL-12 (p70) no se encontraron diferencias significativas ($p=0.8712$ and 0.6292 , respectivamente) (Figura 8).

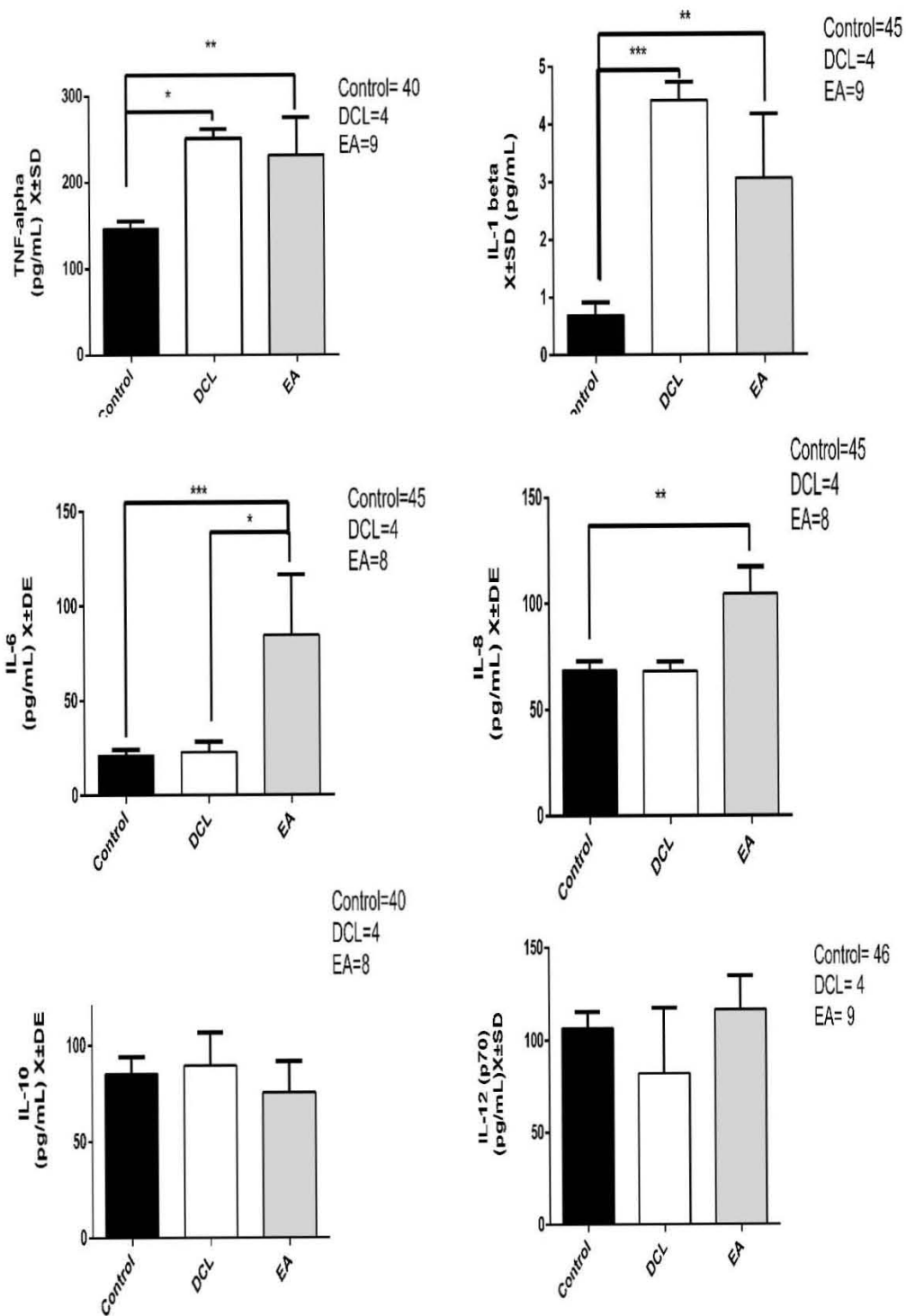


Figura 8. Representación de las concentraciones séricas de las interleucinas estudiadas en los 3 grupos: control, pacientes con DCL y pacientes con EA. En cada gráfica se muestra: \bar{X} = media DE=Desviación Estandar Prueba Turkey: * ≤ 0.05 ** ≤ 0.01 *** ≤ 0.001

5.4 Perfil electroforético

El perfil electroforético de las muestras de pacientes control, DCL y EA se determinó por tinción de plata amoniacal (Figura 9). Encontramos 17 bandas identificables en el corrimiento de las muestras de sujetos control; sin embargo en el corrimiento de muestras de pacientes con DCL se observó un aumento en la densidad de las bandas proteicas impidiendo el conteo de las mismas. Por último, en el corrimiento de las muestras de pacientes con EA se observa una gran cantidad de bandas de alto peso molecular (mayores a 125 kDa), así como un aumento en el número de bandas con pesos muy cercanos entre 100 y 37 kDa, siendo imposible su cuantificación precisa.

5.5 Glicosilación proteica sérica

Tras determinar el perfil electroforético de sueros de pacientes control, pacientes con DCL y pacientes con EA y una adecuada transferencia a membrana PVDF, se realizó la identificación de estructuras sacarídicas con la lectina ALL (Gal β 1,3 GalNAc α 1,0 o GalNAc α 1,0) y SNA (NeuNAc α , 2-6) (Figura 10). De la lectina MAA no obtuvimos marcaje alguno.

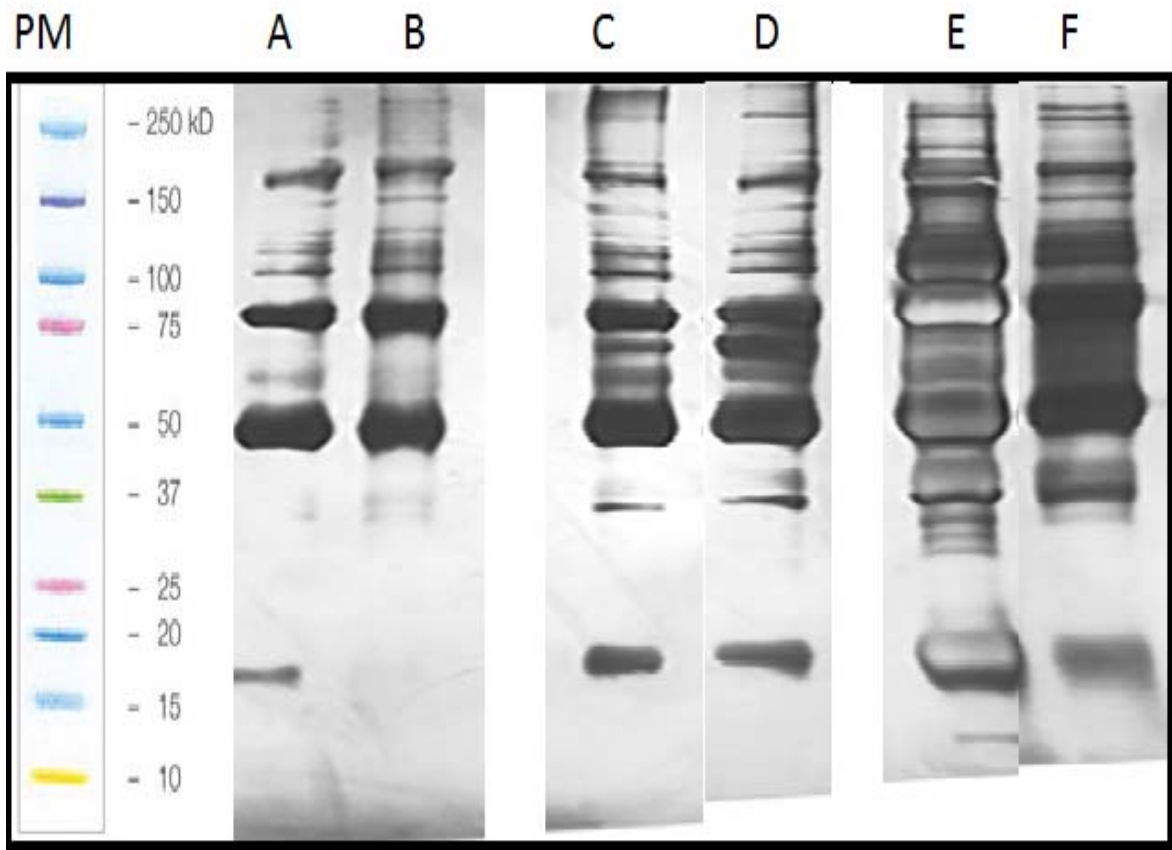


Figura 9. Perfil electroforético de muestras séricas de pacientes, con tinción de plata amoniaca en gel SDS-PAGE al 10%; carril A y B muestra sérica de sujetos controles, C y D muestra sérica de pacientes con DCL, E y F muestra sérica de pacientes con demencia por probable EA.

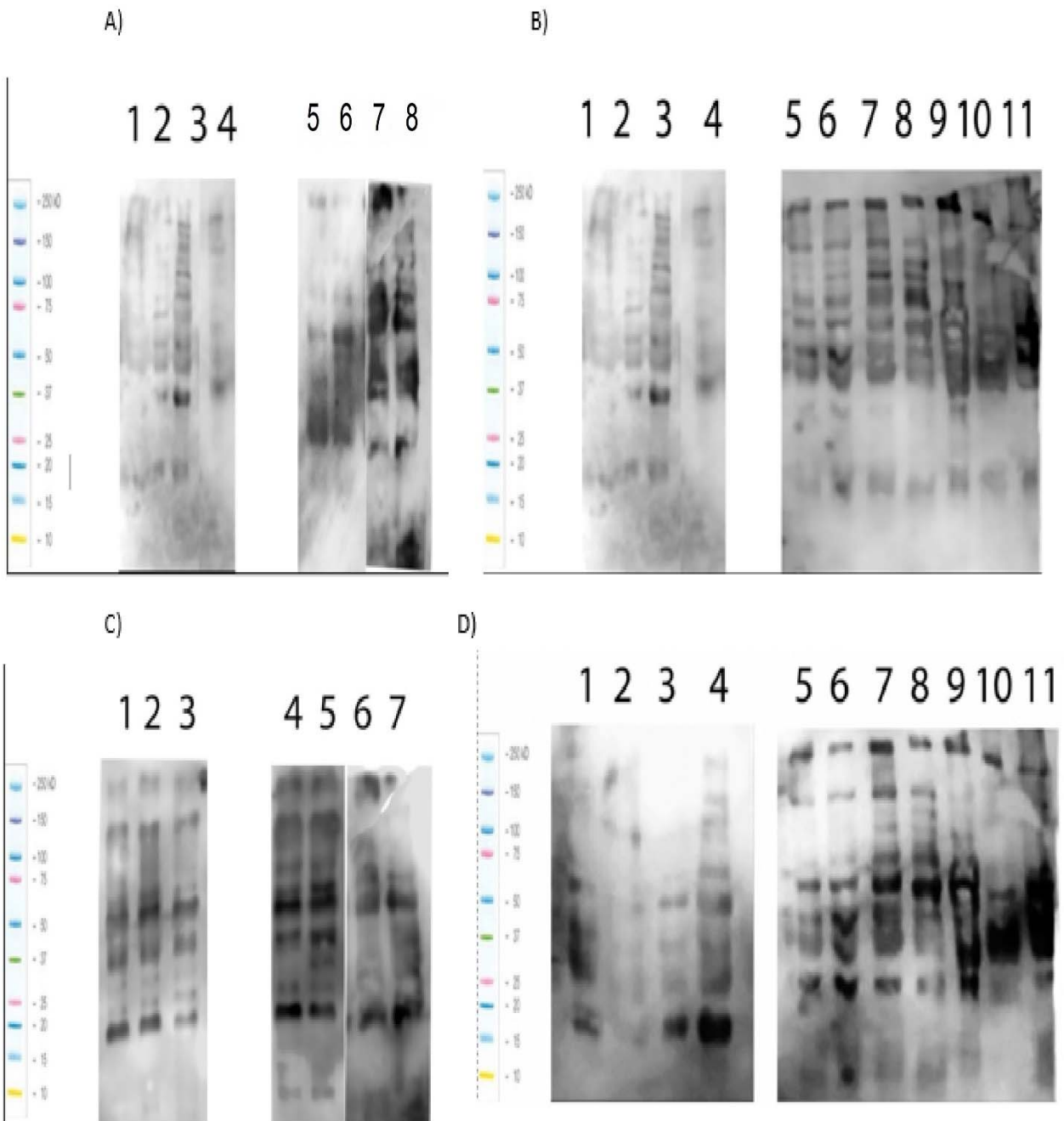


Figura 10. Reconocimiento de residuos sacarídicos con la lectina de *Amarantus leucocarpus* (Gal y GalNAc) (A y B) y de *Sambucus nigra* (NeuNAc) (C y D) en proteínas séricas. Observando un aumento no sólo en la cantidad de bandas visibles, sino también en la densidad de las mismas, como resultado del aumento en los complejos de carbohidratos presentes en las proteínas. A y C: Carriles 1-4 muestras control y carriles 5-8 muestras de DCL. B y D: Carriles 1-4 muestras control y carriles 5-11 muestras de AD.

En el reconocimiento de carbohidratos obtenido con la lectina de *Amaranthus leucocarpus* observamos un aumento en la presencia de residuos sacarídicos Gal β 1,3 GalNAc α 1,0 o GalNAc α 1,0 en las proteínas séricas de pacientes con DCL y EA (Tabla 3).

PM	P de ANOVA	Prueba de Turkey		
		Control vs DCL	Control vs EA	DCL vs EA
240-250	0.0434	ns	ns	ns
90-118	0.041	ns	ns	ns
80-85	0.3875	ns	ns	ns
67-71	0.118	ns	ns	ns
53-62	0.0234	ns	$p \leq 0.05$	ns
41-44	0.0187	ns	ns	$p \leq 0.05$
32-36	0.8756	ns	ns	Ns
27-28	> 0.001	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$
15	0.0320	ns	ns	$p \leq 0.05$

Tabla 3 Resultados de las pruebas de ANOVA para los cambios de densidad del marcaje con lectina de *Amaranthus leucocarpus*, también se incluye el resultado de las pruebas de Turkey.

ns= no significativo

Respecto a la identificación de residuos sacarídicos como ácido siálico α 2-6 con la lectina de SNA, se observó un aumento en la cantidad de bandas reconocidas por la lectina en muestras séricas de pacientes con EA, también se encontró un aumento en la densidad (Tabla 4) de bandas de alto peso molecular en pacientes con EA respecto a sujetos del grupo control.

PM	P de ANOVA	Prueba de Turkey		
		Control vs DCL	Control vs EA	DCL vs EA
250-260	0.0272	ns	ns	$p \leq 0.05$
100-120	0.0295	ns	$p \leq 0.05$	ns
85-91	0.016	ns	ns	$p \leq 0.05$
75-80	0.645	ns	ns	ns
70-73	0.006	ns	ns	$p \leq 0.01$
55-65	0.6197	ns	ns	ns
49-54	0.03	ns	ns	$p \leq 0.05$
27-31	< 0.0001	$p \leq 0.01$	$p \leq 0.001$	$p \leq 0.01$
16-21	< 0.0002	ns	$p \leq 0.001$	$p \leq 0.01$

Tabla 4 Resultados de las pruebas de ANOVA para los cambios de densidad del marcaje con lectina de *Sambucus nigra*, también se incluye el resultado de las pruebas de Turkey.
ns= no significativo

6. Discusión

En nuestro estudio se encontró una predominio del género femenino en el grupo de enfermedad de Alzheimer (EA), lo cual es concordante con lo descrito para la EA en diferentes poblaciones (Sharp y Gatz 2011, Chene *et al.* 2014). Esto se ha relacionado con el papel que ejercen los estrógenos y progestágenos en la formación de la memoria (Janicki y Schupf 2010, Sliwinski *et al.* 2014), la reactividad de los linfocitos (Peeva y Zouali 2005), y en el aclaramiento del A β y la regulación en la fosforilación de la proteína tau (Carroll *et al.* 2007, Hwang *et al.* 2014); razón por la cual tras el periodo post-menopausia el riesgo de desarrollar EA en la mujeres incrementa.

Asimismo se encontró un 100% de lateralidad diestra para el grupo EA, lo cual concuerda con otros estudios estadísticos de la enfermedad (de Leon *et al.* 1986, Doody *et al.* 1999); esto podría estar asociado a la respuesta inmunológica pro inflamatoria que presentan los pacientes con EA (Griffin 2013), ya que las personas zurdas presentan una menor producción de células CD4 y CD8, y una mayor producción de linfocitos B; en cuanto la dominancia diestra se ha relacionado con una mayor producción de células CD8 (Lengen *et al.* 2009).

Dentro de los resultados descriptivos de los grupos participantes también se encontró una menor escolaridad en el grupo de pacientes con EA con respecto al grupo control, similar a lo descrito en estudios referentes a la relación entre el estilo de vida con el desarrollo de la EA (Sharp y Gatz 2011, Vemuri *et al.* 2012); ya que se ha demostrado que el nivel educativo y en especial el estudio de diversas lenguas puede disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad hasta 5 años (Craik *et al.* 2010, Chertkow *et al.* 2010).

Nuestros datos muestran un aumento de la iNOS en los grupos de pacientes con DCL y EA, lo cual sólo ha sido descrito cuando los astrocitos están en presencia del A β , los cuales incrementan la síntesis de la eNOS, la nNOS y la iNOS (Luth *et al.* 2001) (Simic *et al.* 2000). Se ha observado en estudios *in vitro* con células endoteliales, procedentes de grandes vasos, que en presencia del A β aumentan la expresión de la eNOS, sin observar cambios respecto a la nNOS (Rajadas *et al.* 2013); sin embargo, no se conoce el efecto del A β sobre la expresión de la iNOS. Aunque el estudio del efecto del A β sobre las células endoteliales se ha realizado a través de experimentos *in vitro*, se considera como modelo de lo que sucede *in vivo*, debido a que las células endoteliales están expuestas al A β que se encuentra en el suero humano (Freeman *et al.* 2007).

El A β se encuentra en concentraciones elevadas en suero de pacientes con DCL (Luis *et al.* 2009), lo que podría explicar el aumento de iNOS en suero a expensas de la producción de la enzima por parte de las células endoteliales expuestas al A β circulante en sangre. Un efecto similar se ha observado en células C6 (células de glioblastoma) expuestas al A β (25-35) que presentan un aumento en la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la iNOS (Venturini *et al.* 2002). Sin embargo se ha descrito que en los pacientes con EA se encuentran concentraciones séricas del A β superiores o similares a las que presentan los grupos control de edades similares, pero en concentraciones séricas menores a las concentraciones que presentan pacientes con DCL (Freeman *et al.* 2007) (Irizarry 2004, Abdullah *et al.* 2007, Luis *et al.* 2009); dicha disminución en las concentraciones séricas del A β parecen no afectar la expresión de la iNOS, ya que en los resultados de nuestro estudio se encuentra un aumento de la concentración sérica de la iNOS en pacientes con EA respecto a los grupos de sujetos control y de pacientes con DCL.

El comportamiento de las concentraciones séricas de la iNOS que se describen en este estudio, podrían ser explicadas mediante la actividad del A β en las células endoteliales independientemente de la concentración sérica de este péptido; ya que se ha demostrado que el péptido genera depósitos en el tejido endotelial (Soriano *et al.* 2003), propiciando en las células endoteliales una exposición continua al A β

pese a la disminución paulatina de las concentraciones séricas del A β (Mayeux *et al.* 2003).

Conjuntamente a los depósitos del A β en el tejido endotelial, la célula endotelial experimenta los efectos tóxicos del A β debido a que el A β genera depósitos intracelulares en los lisosomas (Soriano *et al.* 2003), retículo endoplásmico (en especial el retículo endoplásmico rugoso) y mitocondria, estimulando la expresión de las caspasas (Dobrogowska *et al.* 2001, Xu *et al.* 2001); lo que podría generar diversas alteraciones celulares, entre ellas el aumento en la producción de la iNOS de forma constante.

El aumento significativo de ON que se describe en el grupo de pacientes con DCL en este estudio podría ser explicado por el aumento en la expresión de la eNOS (Rajadas *et al.* 2013) y el aumento de la iNOS sérica que se encontró en este estudio.

Sin embargo, no se encontró diferencia en los niveles séricos de ON entre el grupo control y el grupo de pacientes con EA, aun cuando en el grupo de pacientes con EA se encontraron niveles de iNOS elevados significativamente. Este comportamiento pudiera ser explicado mediante dos mecanismos; el primero de ellos asociado a los niveles séricos de arginina en pacientes con diagnóstico de EA, los cuales no tienen diferencia significativa respecto a las concentraciones séricas

del aminoácido en sujetos control (Ravaglia *et al.* 2004); implicando la presencia de la enzima, pero la falta de sustrato para ON. Además de la posible falta de sustrato para la síntesis del óxido nítrico, las células endoteliales podrían presentar pérdida de la actividad de la iNOS pese al aumento en la síntesis de la enzima debido a la formación de complejos NADPH-A β , lo que inhibe la reacción de formación de ON, como sucede en las células C6 expuestas al A β (Venturini *et al.* 2002).

El aumento de la concentración sérica del ON en pacientes con diagnóstico de DCL seguida de la disminución sérica en los pacientes con EA que se describe en este estudio mantiene una correlación de mediana intensidad con el puntaje obtenido en la prueba de MMSE, la cual es utilizada como parte de las pruebas diagnósticas y de progresión clínica de la EA (Segal-Gidan *et al.* 2011).

Una correlación similar ha sido descrita entre la concentración de nitritos en el LCR y la prueba de MMSE (Tohgi *et al.* 1998). Aunque la correlación entre la concentración del ON y el puntaje de la prueba no es alta, indican una correlación directamente proporcional, lo que podría indicar que es posible que exista una disminución en la concentración del ON en el LCR y en suero, proporcional al deterioro clínico. Similar a lo descrito en la concentración sérica del A β , que presenta una velocidad de disminución anual durante la evolución de

la EA (Freeman *et al.* 2007) (Irizarry 2004, Abdullah *et al.* 2007, Luis *et al.* 2009).

En los resultados obtenidos respecto a la respuesta inmunológica evaluada, se encontró concentraciones séricas elevadas significativamente para TNF- α e IL-1 β en pacientes con DCL. La producción de estas interleucinas podría tener su origen en los macrófagos y microglía, células que se activan ante la presencia del A β (Klegeris *et al.* 1994, Fiala *et al.* 1998), conjunto a esto las células endoteliales expuestas al péptido generan expresión de CD40 y producción de IL-1 β (Suo *et al.* 1998).

El aumento significativo de la IL-1 β y TNF- α que se presenta en pacientes con DCL, se mantiene en pacientes con EA; es probable que las células implicadas en la producción de estas interleucinas, como lo son células endoteliales, macrófagos y microglía, mantienen una alta producción de las mismas durante el DCL y la EA, pese a que los niveles séricos del A β en pacientes con EA son similares a los controles (Freeman *et al.* 2007, Irizarry 2004, Abdullah *et al.* 2007, Luis *et al.* 2009). Lo que podría significar un proceso donde los niveles de síntesis de interleucinas permanecen elevados debido a los depósitos A β en cerebro y en la vasculatura, depósitos intracelulares en células endoteliales del péptido y el daño crónico generado por la exposición al A β .

En pacientes con EA se encontró también un aumento significativo de la IL-6 e IL-8, esto concuerda con lo descrito en otros estudios (Swardfager *et al.* 2010), mientras que no se tiene conocimiento claro del comportamiento de las concentraciones séricas de IL-8 en la EA (Swardfager *et al.* 2010).

Para el desarrollo de la respuesta inmunológica de la EA es importante la IL-8, ésta es una citocina primordial en el proceso de la quimiotaxis; la producción de esta quimocina se encuentra en relación con el ON, ya que concentraciones altas del ON inhiben la síntesis de esta citocina (Remick 2005), por lo que los niveles séricos de ON que se describen en este estudio en el grupo de pacientes con DCL podrían inhibir la síntesis de esta citocina e incrementar su síntesis en el grupo de personas con EA que presentan concentraciones de ON similares a los del grupo control.

Respecto a la IL10 e IL-12 (p70) no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones séricas de los grupos de pacientes con DCL y con EA en relación al grupo control. Los resultados obtenidos con respecto a estas interleucinas son similares a otros estudios donde se determinaron concentraciones tanto séricas como en LCR (Swardfager *et al.* 2010, Singh y Guthikonda 1997, Rota *et al.* 2006). La característica principal de la IL-10 es su papel anti-inflamatorio (King *et al.* 2014, Sabat *et al.* 2010) y de la IL-12 en su

heterodímero activo (p70) es la participación en la diferenciación celular y activación de macrófagos (Trinchieri 2003); esto pudiera ser interpretado de dos maneras, la primera como la ausencia de una respuesta anti-inflamatoria sistémica en la EA o la segunda como la incapacidad del organismo para generar una respuesta adecuada ante los eventos presentados en la EA, ya que se ha demostrado una asociación entre la edad avanzada y la disminución en la producción de factores anti-inflamatorios (Milgrom y Huang 2014).

Las bandas de alto peso molecular (> 125 kDa) detectadas en el perfil electroforético en los pacientes con EA podrían ser factores de transcripción u otros señalizadores, los cuales son moléculas de alto peso molecular que se han asociado con la enfermedad (Karkkainen *et al.* 2014). Respecto al aumento del número de bandas cuyo peso está entre 27-50 kDa en el grupo con EA, estas pudieran deberse a la presencia de proteínas como son las interleucinas, las serpinas y posiblemente las proteínas de fase aguda, ya que como se ha descrito en la EA se encuentran activos en los procesos inflamatorios y proteínas moduladoras de coagulación e inflamación como son las serpinas (Nielsen *et al.* 2007, Meraz-Rios *et al.* 2013).

Con respecto a los cambios de glicosilación encontrados en las proteínas séricas de los pacientes con EA tenemos un aumento significativo en la presencia de carbohidratos de tipo NeuNAc (α , 2-6)

(Peumans *et al.* 1998), este tipo de glicosilación está dada por la sialiltransferasa ST6Gal II (Krzewinski-Recchi *et al.* 2003) la cual está reportada que se expresa en cerebro (Lehoux *et al.* 2010) y en suero humano (Genecards, 2014).

En cuanto al reconocimiento realizado con la lectina de ALL se encontró aumentado significativamente, lo que a su vez sugiere un aumento de glicosilación de tipo Gal β 1,3 GalNAc α 1,0 o GalNAc α 1,0 (Zenteno *et al.* 1992) tanto en la EA como en el DCL. Esto representaría una disminución en la presencia de residuos de ácido siálico, muy probablemente por disminución de la actividad de sialiltransferasas en el suero de pacientes con EA (Maguire *et al.* 1994).

Los cambios descritos en muestras de cerebro de pacientes con EA (Guevara *et al.* 1998, Espinosa *et al.* 2003), son similares a los cambios serios descritos en este estudio.

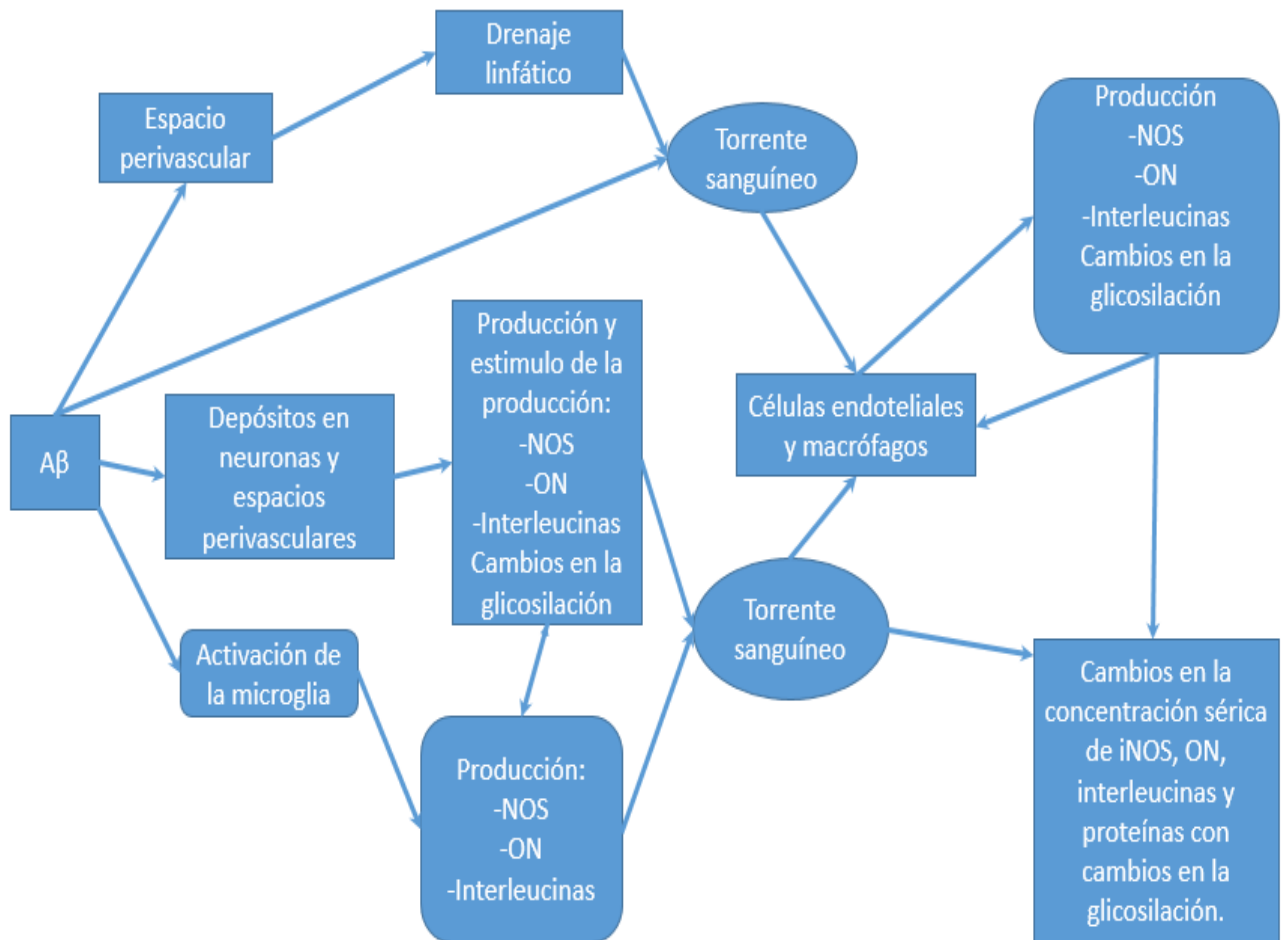
CONCLUSIONES

La enfermedad de Alzheimer a nivel sistémico se caracteriza por un cuadro proinflamatorio a nivel sérico acompañado de cambios de glicosilación proteica; lo cual es semejante a los cambios en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

Existe una relación entre el deterioro cognitivo en el desarrollo de la enfermedad con los cambios en la presencia de moléculas pro-inflamatorias, estrés oxidativo y cambios de glicosilación proteica (Esquema 1).

Por lo que, en base a los resultados de este estudio es posible plantear que el DCL y la EA pueden ser detectados a nivel periférico; facilitando diagnosticar y darle seguimiento a dicha enfermedad con métodos no invasivos. Esto mediante el establecimiento de un panel integrado por diversos marcadores que incluyan los diversos aspectos fisiopatológicos de la enfermedad.

Se ha elaborado un escrito para su publicación, tomando los resultados obtenidos en este estudio (Anexo 3)



Esquema 1. Posibles vías mediante las cuales el Aβ induce el ON, interleucinas y los cambios en la glicosilación, que fueron encontrados en este estudio.

8. LITERATURA CITADA

- Abdullah, L., D. Paris, C. Luis, A. Quadros, J. Parrish, L. Valdes, A. P. Keegan, V. Mathura, F. Crawford and M. Mullan (2007). "The influence of diagnosis, intra- and inter-person variability on serum and plasma Aβ levels." *Neurosci Lett* **428**(2-3): 53-58.
- Albert, M. S., S. T. DeKosky, D. Dickson, B. Dubois, H. H. Feldman, N. C. Fox, A. Gamst, D. M. Holtzman, W. J. Jagust, R. C. Petersen, P. J. Snyder, M. C. Carrillo, B. Thies and C. H. Phelps (2011). "The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." *Alzheimers Dement* **7**(3): 270-279.
- Austin, S. A., A. V. Santhanam and Z. S. Katusic (2010). "Endothelial nitric oxide modulates expression and processing of amyloid precursor protein." *Circ Res* **107**(12): 1498-1502.
- Baranano, D. E. and S. H. Snyder (2001). "Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 10996-11002.
- Bennett, S., M. M. Grant and S. Aldred (2009). "Oxidative stress in vascular dementia and Alzheimer's disease: a common pathology." *J Alzheimers Dis* **17**(2): 245-257.
- Bohm, M., P. C. White, M. J. Daniels, D. J. Allcroft, R. Munro and M. R. Hutchings (2006). "The health of wild red and sika deer in Scotland: an analysis of key endoparasites and recommendations for monitoring disease." *Vet J* **171**(2): 287-294.
- Broussard, G. J., J. Mytar, R. C. Li and G. J. Klapstein (2012). "The role of inflammatory processes in Alzheimer's disease." *Inflammopharmacology* **20**(3): 109-126.
- Carroll, J. C., E. R. Rosario, L. Chang, F. Z. Stanczyk, S. Oddo, F. M. LaFerla and C. J. Pike (2007). "Progesterone and estrogen regulate Alzheimer-like neuropathology in female 3xTg-AD mice." *J Neurosci* **27**(48): 13357-13365.
- Citron, M., T. S. Diehl, G. Gordon, A. L. Biere, P. Seubert and D. J. Selkoe (1996). "Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(23): 13170-13175.
- Cole, G., E. Masliah, T. V. Huynh, R. DeTeresa, R. D. Terry, C. Okuda and T. Saitoh (1989). "An antiserum against amyloid beta-protein precursor detects a unique peptide in Alzheimer brain." *Neurosci Lett* **100**(1-3): 340-346.
- Craik, F. I., E. Bialystok and M. Freedman (2010). "Delaying the onset of Alzheimer disease: bilingualism as a form of cognitive reserve." *Neurology* **75**(19): 1726-1729.
- Chene, G., A. Beiser, R. Au, S. R. Preis, P. A. Wolf, C. Dufouil and S. Seshadri (2014). "Gender and incidence of dementia in the Framingham Heart Study from mid-adult life." *Alzheimers Dement*.
- Chertkow, H., V. Whitehead, N. Phillips, C. Wolfson, J. Atherton and H. Bergman (2010). "Multilingualism (but not always bilingualism) delays the onset of Alzheimer disease: evidence from a bilingual community." *Alzheimer Dis Assoc Disord* **24**(2): 118-125.
- Cho, D. H., T. Nakamura, J. Fang, P. Cieplak, A. Godzik, Z. Gu and S. A. Lipton (2009). "S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury." *Science* **324**(5923): 102-105.
- de la Torre, J. C. and G. B. Stefano (2000). "Evidence that Alzheimer's disease is a microvascular disorder: the role of constitutive nitric oxide." *Brain Res Brain Res Rev* **34**(3): 119-136.
- de Leon, M. J., M. E. la Regina, S. H. Ferris, C. I. Gentes and J. D. Miller (1986). "Reduced incidence of left-handedness in clinically diagnosed dementia of the Alzheimer type." *Neurobiol Aging* **7**(3): 161-164.
- Dobrogowska, D. H., A. W. Vorbodt, J. Wegiel, K. C. Wang, M. Shoji, C. Mondadori, G. Polatis, A. Giovanni and H. M. Wisniewski (2001). "Cytochemical study of the involvement of cell organelles in formation and accumulation of fibrillar amyloid in the pancreas of NORbeta transgenic mice." *Histol Histopathol* **16**(4): 1047-1056.
- Doody, R. S., J. L. Vacca, P. J. Massman and T. Y. Liao (1999). "The influence of handedness on the clinical presentation and neuropsychology of Alzheimer disease." *Arch Neurol* **56**(9): 1133-1137.
- Espinosa, B., J. Guevara, P. Hernandez, M. C. Slomianny, A. Guzman, S. Martinez-Cairo and E. Zenteno (2003). "Characterization of an O-glycosylated plaque-associated protein from Alzheimer disease brain." *J Neuropathol Exp Neurol* **62**(1): 34-41.
- Fiala, M., L. Zhang, X. Gan, B. Sherry, D. Taub, M. C. Graves, S. Hama, D. Way, M. Weinand, M. Witte, D. Lorton, Y. M. Kuo and A. E. Roher (1998). "Amyloid-beta induces chemokine secretion and monocyte migration across a human blood-brain barrier model." *Mol Med* **4**(7): 480-489.

Folstein, M. F., S. E. Folstein and P. R. McHugh (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician." *J Psychiatr Res* **12**(3): 189-198.

Freeman, S. H., S. Raju, B. T. Hyman, M. P. Frosch and M. C. Irizarry (2007). "Plasma Abeta levels do not reflect brain Abeta levels." *J Neuropathol Exp Neurol* **66**(4): 264-271.

Funk, O. H. and K. Y. Kwan (2014). "Nitric oxide signaling in the development and evolution of language and cognitive circuits." *Neurosci Res*.

Gotz, J., A. Eckert, M. Matamales, L. M. Ittner and X. Liu (2011). "Modes of Abeta toxicity in Alzheimer's disease." *Cell Mol Life Sci* **68**(20): 3359-3375.

Grammas, P., T. Botchlet, R. Fugate, M. J. Ball and A. E. Roher (1995). "Alzheimer disease amyloid proteins inhibit brain endothelial cell proliferation in vitro." *Dementia* **6**(3): 126-130.

Griffin, W. S. (2013). "Neuroinflammatory cytokine signaling and Alzheimer's disease." *N Engl J Med* **368**(8): 770-771.

Guevara, J., B. Espinosa, E. Zenteno, L. Vazquez, J. Luna, G. Perry and R. Mena (1998). "Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer disease." *J Neuropathol Exp Neurol* **57**(10): 905-914.

Harrington, C. R. (2012). "The molecular pathology of Alzheimer's disease." *Neuroimaging Clin N Am* **22**(1): 11-22, vii.

Hawkins, P. N., M. N. Rossor, J. R. Gallimore, B. Miller, E. G. Moore and M. B. Pepys (1994). "Concentration of serum amyloid P component in the CSF as a possible marker of cerebral amyloid deposits in Alzheimer's disease." *Biochem Biophys Res Commun* **201**(2): 722-726.

Hugo, J. and M. Ganguli (2014). "Dementia and Cognitive Impairment: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment." *Clin Geriatr Med* **30**(3): 421-442.

Hwang, C. J., H. M. Yun, K. R. Park, J. K. Song, H. O. Seo, B. K. Hyun, D. Y. Choi, H. S. Yoo, K. W. Oh, D. Y. Hwang, S. B. Han and J. T. Hong (2014). "Memory Impairment in Estrogen Receptor alpha Knockout Mice Through Accumulation of Amyloid-beta Peptides." *Mol Neurobiol*.

Irizarry, M. C. (2004). "Biomarkers of Alzheimer disease in plasma." *NeuroRx* **1**(2): 226-234.

Itagaki, S., P. L. McGeer, H. Akiyama, S. Zhu and D. Selkoe (1989). "Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease." *J Neuroimmunol* **24**(3): 173-182.

Janicki, S. C. and N. Schupf (2010). "Hormonal influences on cognition and risk for Alzheimer's disease." *Curr Neurol Neurosci Rep* **10**(5): 359-366.

Karkkainen, V., Y. Pomeschik, E. Savchenko, H. Dhungana, A. Kurronen, S. Lehtonen, N. Naumenko, P. Tavi, A. L. Levonen, M. Yamamoto, T. Malm, J. Magga, K. M. Kanninen and J. Koistinaho (2014). "Nrf2 regulates neurogenesis and protects neural progenitor cells against abeta toxicity." *Stem Cells* **32**(7): 1904-1916.

Kasai, T., T. Tokuda, M. Taylor, M. Kondo, D. M. Mann, P. G. Foulds, M. Nakagawa and D. Allsop (2013). "Correlation of Abeta oligomer levels in matched cerebrospinal fluid and serum samples." *Neurosci Lett* **551**: 17-22.

Kelley, B. J. and R. C. Petersen (2007). "Alzheimer's disease and mild cognitive impairment." *Neurol Clin* **25**(3): 577-609, v.

King, A., S. Balaji, L. D. Le, T. M. Crombleholme and S. G. Keswani (2014). "Regenerative Wound Healing: The Role of Interleukin-10." *Adv Wound Care (New Rochelle)* **3**(4): 315-323.

Klegeris, A., D. G. Walker and P. L. McGeer (1994). "Activation of macrophages by Alzheimer beta amyloid peptide." *Biochem Biophys Res Commun* **199**(2): 984-991.

Krzewinski-Recchi, M. A., S. Julien, S. Juliant, M. Teinturier-Lelievre, B. Samyn-Petit, M. D. Montiel, A. M. Mir, M. Cerutti, A. Harduin-Lepers and P. Delannoy (2003). "Identification and functional expression of a second human beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase, ST6Gal II." *Eur J Biochem* **270**(5): 950-961.

Laman, J. D. and R. O. Weller (2013). "Drainage of cells and soluble antigen from the CNS to regional lymph nodes." *J Neuroimmune Pharmacol* **8**(4): 840-856.

Law, A., S. Gauthier and R. Quirion (2001). "Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type." *Brain Res Brain Res Rev* **35**(1): 73-96.

Lazarczyk, M. J., P. R. Hof, C. Bouras and P. Giannakopoulos (2012). "Preclinical Alzheimer disease: identification of cases at risk among cognitively intact older individuals." *BMC Med* **10**: 127.

Lehoux, S., S. Groux-Degroote, A. Cazet, C. M. Dhaenens, C. A. Maurice, M. L. Caillet-Boudin, P. Delannoy and M. A. Krzewinski-Recchi (2010). "Transcriptional regulation of the human ST6GAL2 gene in cerebral cortex and neuronal cells." *Glycoconj J* **27**(1): 99-114.

Lengen, C., M. Regard, H. Joller, T. Landis and P. Lalive (2009). "Anomalous brain dominance and the immune system: do left-handers have specific immunological patterns?" *Brain Cogn* **69**(1): 188-193.

Li, X. L., N. Hu, M. S. Tan, J. T. Yu and L. Tan (2014). "Behavioral and Psychological Symptoms in Alzheimer's Disease." Biomed Res Int **2014**: 927804.

Liu, P., M. S. Fleete, Y. Jing, N. D. Collie, M. A. Curtis, H. J. Waldvogel, R. L. Faull, W. C. Abraham and H. Zhang (2014). "Altered arginine metabolism in Alzheimer's disease brains." Neurobiol Aging **35**(9): 1992-2003.

Lopez de Munain, A. (1998). "[Classification of mitochondrial diseases]." Rev Neurol **26 Suppl 1**: S9-14.

Luis, C. A., L. Abdullah, D. Paris, A. Quadros, M. Mullan, B. Mouzon, G. Ait-Ghezala, F. Crawford and M. Mullan (2009). "Serum beta-amyloid correlates with neuropsychological impairment." Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn **16**(2): 203-218.

Luth, H. J., M. Holzer, U. Gartner, M. Staufenbiel and T. Arendt (2001). "Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology." Brain Res **913**(1): 57-67.

Maguire, T. M. and K. C. Breen (1995). "A decrease in neural sialyltransferase activity in Alzheimer's disease." Dementia **6**(4): 185-190.

Maguire, T. M., A. M. Gillian, D. O'Mahony, C. M. Coughlan, A. Dennihan and K. C. Breen (1994). "A decrease in serum sialyltransferase levels in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **15**(1): 99-102.

Marklová E, A. Z., Vališ M. (2012). "Microheterogeneity of some serum glycoproteins in neurodegenerative diseases." J Neurol Sci **15**(314): 5.

Mayeux, R., L. S. Honig, M. X. Tang, J. Manly, Y. Stern, N. Schupf and P. D. Mehta (2003). "Plasma A[β 40] and A[β 42] and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk." Neurology **61**(9): 1185-1190.

McKhann, G. M., D. S. Knopman, H. Chertkow, B. T. Hyman, C. R. Jack, Jr., C. H. Kawas, W. E. Klunk, W. J. Koroshetz, J. J. Manly, R. Mayeux, R. C. Mohs, J. C. Morris, M. N. Rossor, P. Scheltens, M. C. Carrillo, B. Thies, S. Weintraub and C. H. Phelps (2011). "The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **7**(3): 263-269.

Meraz-Rios, M. A., D. Toral-Rios, D. Franco-Bocanegra, J. Villeda-Hernandez and V. Campos-Pena (2013). "Inflammatory process in Alzheimer's Disease." Front Integr Neurosci **7**: 59.

Milgrom, H. and H. Huang (2014). "Allergic disorders at a venerable age: a mini-review." Gerontology **60**(2): 99-107.

Morales, I., L. Guzman-Martinez, C. Cerda-Troncoso, G. A. Farias and R. B. Maccioni (2014). "Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches." Front Cell Neurosci **8**: 112.

Nielsen, H. M., L. Minthon, E. Londos, K. Blennow, E. Miranda, J. Perez, D. C. Crowther, D. A. Lomas and S. M. Janciauskiene (2007). "Plasma and CSF serpins in Alzheimer disease and dementia with Lewy bodies." Neurology **69**(16): 1569-1579.

Okabe, Y., T. Takahashi, C. Mitsumasu, K. Kosai, E. Tanaka and T. Matsuishi (2012). "Alterations of gene expression and glutamate clearance in astrocytes derived from an MeCP2-null mouse model of Rett syndrome." PLoS One **7**(4): e35354.

Peeva, E. and M. Zouali (2005). "Spotlight on the role of hormonal factors in the emergence of autoreactive B-lymphocytes." Immunol Lett **101**(2): 123-143.

Petersen, R. C., B. Caracciolo, C. Brayne, S. Gauthier, V. Jelic and L. Fratiglioni (2014). "Mild cognitive impairment: a concept in evolution." J Intern Med **275**(3): 214-228.

Petersen, R. C., R. O. Roberts, D. S. Knopman, B. F. Boeve, Y. E. Geda, R. J. Ivnik, G. E. Smith and C. R. Jack, Jr. (2009). "Mild cognitive impairment: ten years later." Arch Neurol **66**(12): 1447-1455.

Peumans, W. J., S. Roy, A. Barre, P. Rouge, F. van Leuven and E. J. van Damme (1998). "Elderberry (*Sambucus nigra*) contains truncated Neu5Ac(α -2,6)Gal/GalNAc-binding type 2 ribosome-inactivating proteins." FEBS Lett **425**(1): 35-39.

Pike, C. J., M. J. Overman and C. W. Cotman (1995). "Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro." J Biol Chem **270**(41): 23895-23898.

Polvikoski, T., R. Sulkava, M. Haltia, K. Kainulainen, A. Vuorio, A. Verkkoniemi, L. Niinisto, P. Halonen and K. Kontula (1995). "Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid protein." N Engl J Med **333**(19): 1242-1247.

Pratico, D., K. Uryu, S. Leight, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2001). "Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis." J Neurosci **21**(12): 4183-4187.

Qu, B. X., Y. Gong, C. Moore, M. Fu, D. C. German, L. Y. Chang, R. Rosenberg and R. Diaz-Arrastia (2014). "Beta-amyloid auto-antibodies are reduced in Alzheimer's disease." J Neuroimmunol.

Rajadas, J., W. Sun, H. Li, M. Inayathullah, D. Cereghetti, A. Tan, V. de Mello Coelho, F. J. Chrest, J. W. Kusiak, W. W. Smith, D. Taub, J. C. Wu and J. M. Rifkind (2013). "Enhanced A β (1-40) production in endothelial cells stimulated with fibrillar A β (1-42)." PLoS One **8**(3): e58194.

Ravaglia, G., P. Forti, F. Maioli, G. Bianchi, M. Martelli, T. Talerico, L. Servadei, M. Zoli and E. Mariani (2004). "Plasma amino acid concentrations in patients with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease." Am J Clin Nutr **80**(2): 483-488.

Reisberg, B. (1988). "Stage-specific behavioral, cognitive, and in vivo changes in community residing subjects with age-associated memory impairment and primary degenerative dementia of the Alzheimer type." Drug Development Research **15**(2-3): 14.

Remick, D. G. (2005). "Interleukin-8." Crit Care Med **33**(12 Suppl): S466-467.

Rota, E., G. Bellone, P. Rocca, B. Bergamasco, G. Emanuelli and P. Ferrero (2006). "Increased intrathecal TGF- β 1, but not IL-12, IFN- γ and IL-10 levels in Alzheimer's disease patients." Neurol Sci **27**(1): 33-39.

Rubio-Perez, J. M. and J. M. Morillas-Ruiz (2012). "A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines." ScientificWorldJournal **2012**: 756357.

Sabat, R., G. Grutz, K. Warszawska, S. Kirsch, E. Witte, K. Wolk and J. Geginat (2010). "Biology of interleukin-10." Cytokine Growth Factor Rev **21**(5): 331-344.

Schedin-Weiss, S., B. Winblad and L. O. Tjernberg (2014). "The role of protein glycosylation in Alzheimer disease." FEBS J **281**(1): 46-62.

Segal-Gidan, F., D. Cherry, R. Jones, B. Williams, L. Hewett, J. Chodosh and M. California Workgroup on Guidelines for Alzheimer's Disease (2011). "Alzheimer's disease management guideline: update 2008." Alzheimers Dement **7**(3): e51-59.

Selkoe, D. J. (1996). "Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease." J Biol Chem **271**(31): 18295-18298.

Selkoe, D. J. and D. Schenk (2003). "Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics." Annu Rev Pharmacol Toxicol **43**: 545-584.

Sharp, E. S. and M. Gatz (2011). "Relationship between education and dementia: an updated systematic review." Alzheimer Dis Assoc Disord **25**(4): 289-304.

Simic, G., P. J. Lucassen, Z. Krstic, B. Kruslin, I. Kostovic, B. Winblad and Bogdanovi (2000). "nNOS expression in reactive astrocytes correlates with increased cell death related DNA damage in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease." Exp Neurol **165**(1): 12-26.

Simonian, N. A. and J. T. Coyle (1996). "Oxidative stress in neurodegenerative diseases." Annu Rev Pharmacol Toxicol **36**: 83-106.

Singh, V. K. and P. Guthikonda (1997). "Circulating cytokines in Alzheimer's disease." J Psychiatr Res **31**(6): 657-660.

Sliwinski, J. R., A. K. Johnson and G. R. Elkins (2014). "Memory Decline in Peri- and Post-menopausal Women: The Potential of Mind-Body Medicine to Improve Cognitive Performance." Integr Med Insights **9**: 17-23.

Song, F., A. Poljak, G. A. Smythe and P. Sachdev (2009). "Plasma biomarkers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." Brain Res Rev **61**(2): 69-80.

Soriano, F. X., J. L. Galbete and G. Forloni (2003). "Effect of beta-amyloid on endothelial cells: lack of direct toxicity, enhancement of MTT-induced cell death and intracellular accumulation." Neurochem Int **43**(3): 251-261.

Suo, Z., J. Tan, A. Placzek, F. Crawford, C. Fang and M. Mullan (1998). "Alzheimer's beta-amyloid peptides induce inflammatory cascade in human vascular cells: the roles of cytokines and CD40." Brain Res **807**(1-2): 110-117.

Swardfager, W., K. Lanctot, L. Rothenburg, A. Wong, J. Cappell and N. Herrmann (2010). "A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease." Biol Psychiatry **68**(10): 930-941.

Szczepanik, A. M., S. Funes, W. Petko and G. E. Ringheim (2001). "IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A β (1-42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line." J Neuroimmunol **113**(1): 49-62.

Thomas, T., E. T. Sutton, A. Hellermann and J. M. Price (1997). "Beta-amyloid-induced coronary artery vasoactivity and endothelial damage." J Cardiovasc Pharmacol **30**(4): 517-522.

Thomas, T., G. Thomas, C. McLendon, T. Sutton and M. Mullan (1996). "beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage." Nature **380**(6570): 168-171.

Tiraboschi, P., L. A. Hansen, L. J. Thal and J. Corey-Bloom (2004). "The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD." Neurology **62**(11): 1984-1989.

Tohgi, H., T. Abe, K. Yamazaki, T. Murata, C. Isobe and E. Ishizaki (1998). "The cerebrospinal fluid oxidized NO metabolites, nitrite and nitrate, in Alzheimer's disease and vascular dementia of Binswanger type and multiple small infarct type." J Neural Transm **105**(10-12): 1283-1291.

Trinchieri, G. (2003). "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **3**(2): 133-146.

Vemuri, P., T. G. Lesnick, S. A. Przybelski, D. S. Knopman, R. O. Roberts, V. J. Lowe, K. Kantarci, M. L. Senjem, J. L. Gunter, B. F. Boeve, R. C. Petersen and C. R. Jack, Jr. (2012). "Effect of lifestyle activities on Alzheimer disease biomarkers and cognition." Ann Neurol **72**(5): 730-738.

Venturini, G., M. Colasanti, T. Persichini, E. Fioravanti, P. Ascenzi, L. Palomba, O. Cantoni and G. Musci (2002). "Beta-amyloid inhibits NOS activity by subtracting NADPH availability." FASEB J **16**(14): 1970-1972.

Weksler, M. E., N. Relkin, R. Turkenich, S. LaRusse, L. Zhou and P. Szabo (2002). "Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals." Exp Gerontol **37**(7): 943-948.

Weller, R. O., D. Boche and J. A. Nicoll (2009a). "Microvasculature changes and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease and their potential impact on therapy." Acta Neuropathol **118**(1): 87-102.

Weller, R. O., E. Djuanda, H. Y. Yow and R. O. Carare (2009b). "Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease." Acta Neuropathol **117**(1): 1-14.

Weller, R. O., A. Massey, Y. M. Kuo and A. E. Roher (2000). "Cerebral amyloid angiopathy: accumulation of A beta in interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease." Ann N Y Acad Sci **903**: 110-117.

Weller, R. O., M. Subash, S. D. Preston, I. Mazanti and R. O. Carare (2008). "Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease." Brain Pathol **18**(2): 253-266.

Xu, J., S. Chen, G. Ku, S. H. Ahmed, J. Xu, H. Chen and C. Y. Hsu (2001). "Amyloid beta peptide-induced cerebral endothelial cell death involves mitochondrial dysfunction and caspase activation." J Cereb Blood Flow Metab **21**(6): 702-710.

Zenteno, E., R. Lascurain, L. F. Montano, L. Vazquez, H. Debray and J. Montreuil (1992). "Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin." Glycoconj J **9**(4): 204-208.

Zhu, X., M. A. Smith, K. Honda, G. Aliev, P. I. Moreira, A. Nunomura, G. Casadesus, P. L. Harris, S. L. Siedlak and G. Perry (2007). "Vascular oxidative stress in Alzheimer disease." J Neurol Sci **257**(1-2): 240-246.

Zielasek, J., M. Tausch, K. V. Toyka and H. P. Hartung (1992). "Production of nitrite by neonatal rat microglial cells/brain macrophages." Cell Immunol **141**(1): 111-120.

ANEXO I

ANEXO I:

Consentimiento Informado de participación del proyecto y toma de muestra de saliva

Investigadores Responsables: *Dr. Jorge Guevara Fonseca, *M. en C. Karla Carmina Rojas Saavedra, **Dra. Yaneth Rodríguez Agudelo, **Mtra. Mireya Chávez Oliveros y ***Dra. Ma. Dolores Jiménez Farfán. *Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, INNN 56063822 ext. 2010, **Departamento de Neuropsicología y Grupos de Apoyo, INNN ext. 2016 y ***Posgrado de Odontología, UNAM.

Propósito del estudio: Identificar biomarcadores que permitan un diagnóstico temprano de la Enfermedad de Alzheimer en fases iniciales, por medio de un estudio de las células epiteliales de la mucosa bucal. El protocolo de investigación que tiene como objetivo lo anterior se titula "Análisis de correlación entre el daño cognitivo de pacientes con enfermedad de Alzheimer, expresión de interleucinas proinflamatorias y proteínas glicosiladas anormales como marcadores extra-cerebrales".

Procedimiento: Se realizará la recolección de la mucosa bucal. El paciente recolectará saliva en la cavidad oral por un minuto, la cual será después recolectada, éste procedimiento se repetirá aprox. 10 veces. Es un procedimiento no invasivo y no causa dolor. No existen complicaciones al recolectar la muestra. Además, se realizarán un conjunto de pruebas de evaluación Neuropsicológica. El tiempo aproximado para la evaluación neuropsicológica y la recolección de muestra es de 1 hora con 30 minutos.

Confidencialidad: Los datos que se obtengan de este estudio serán estrictamente confidenciales y su uso sólo será para fines de este protocolo.

Derecho de abandonar: El o la paciente queda en absoluta libertad para abandonar el estudio en cualquier momento en que él, ella o su responsable legal lo deseen, sin que ello repercuta en la atención de su padecimiento.

Después de ser informado(a), y no tener ninguna duda al respecto de éste protocolo de investigación, autorizo la recolección de la mucosa bucal y la realización de las pruebas de evaluación neuropsicológica.

Nombre, fecha y firma del paciente o responsable legal _____

Nombre, fecha y firma del investigador responsable _____

Nombre, fecha y firma de un testigo _____

*Basado en: Normas éticas internacionales para investigaciones biomédicas con sujetos humanos. Organización Panamericana de la Salud OMS, 1996 (OPS publicaciones científicas, 563).

C66

**ANEXO II:
Formato de Consentimiento Para Toma de Muestra Sanguínea.**

1. El Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, el Departamento de Neuropsicología y Grupos de Apoyo Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, y el Posgrado de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México, de la Ciudad de México buscan identificar biomarcadores en muestras periféricas que permitan un diagnóstico temprano de la Enfermedad de Alzheimer. Esta parte del estudio puede llevar a una mejor comprensión de las causas de la demencia y ayudar en el futuro a realizar un mejor diagnóstico.
2. Se estudiara la expresión de citocinas pro-inflamatorias, lectinas y sialiltransferasas en muestra de sangre.
3. Es necesario que done una muestra de 10 ml. de sangre, para que de ahí se estudien la expresión de los biomarcadores antes mencionados. La muestra de sangre será almacenada en el Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas de este Instituto.
4. La única molestia que puede sufrir al donar la muestra de sangre es enrojecimiento o ardor en la zona de punción.
5. Toda la información obtenida será confidencial y estará disponible solo para los investigadores. Mi muestra será codificada con una combinación de letras y números para proteger su identidad.
6. Mi participación en este estudio es **voluntaria** y no tiene costo alguno para mí, ni recibiré remuneración alguna.
7. Los resultados de los estudios que se realicen a mi muestra no me serán entregados, a menos que se encuentre información relevante para mi salud o la de mis familiares. En dicho caso seré contactado por los investigadores para saber si deseo conocer la información y si deseo participar en otros estudios que contribuyan a un diagnóstico y manejo adecuados.
8. Recibiré respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda respecto a los asuntos relacionados con esta investigación.

Firma del Paciente: _____

Nombre con letra de molde: _____

Firma del Familiar: _____

Nombre con letra de molde: _____

Nombre del Investigador Local: Dr. Jorge Guevara Fonseca
Institución del Investigador Local: Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, M.V.S.
Teléfono del Investigador Local: 56063822 Ext. 2010
Dirección del Investigador Local: Insurgentes Sur 3877 Col. La Fama, Tlalpan. México, D.F. INNN. MVS,
México D.F.

ANEXO II



MINI EXAMEN DEL ESTADO MENTAL
"MINIMENTAL"

Nombre: Fecha de Evaluación:
Escolaridad (en años): No. Reg.:

ORIENTACION

1. Tiempo (máx. 5)	CALIF.	2. Lugar (máx. 5)	CALIF.
¿En qué año estamos?	0.1	¿Cómo se llama este hospital?	0.1
¿En qué mes estamos?	0.1	¿En qué piso estamos?	0.1
¿Qué día del mes es hoy?	0.1	¿Ciudad: Pueblo?	0.1
¿Qué día de la semana es hoy?	0.1	¿En qué colonia estamos?	0.1
¿Qué hora es aproximadamente?	0.1	¿En qué país estamos?	0.1

MEMORIA

3. Recordar el nombre de 3 objetos (máx. 3)	CALIF.
A. Papel	*B. flor 0.1
bicicleta	coche 0.1
cuchara	nariz 0.1

ATENCIÓN Y CALCULO

4. Contar hacia atrás (máx. 5)	CALIF.
A. - (Restar) Contar hacia atrás de 7 en 7 a partir de 100	*B.- Reste de 4 en 4 a partir del 40
93	36 0.1
86	32 0.1
79	28 0.1
72	24 0.1
65	20 0.1

MEMORIA DIFERIDA

5. Recordar los objetos del punto 3 (máx.3)	CALIF.
A. Papel	*B. Flor 0.1
bicicleta	coche 0.1
cuchara	nariz 0.1

LENGUAJE

6. DENOMINAR (máx.2)	CALIF.
¿Cómo se llama esto (señalar)?	
A.- Reloj	*B. Reloj 0.1
Lapiz	Moneda 0.1

7. REPETICIÓN DE UNA FRASE (máx.1)	CALIF.
A. Ni no, ni sí, ni peros	*B. No voy si tú no llegas temprano 0.1

8. COMPRENSIÓN (máx.3)	CALIF.
Tome esta hoja con la mano derecha	0.1
doblelo por la mitad	0.1
y póngalo en el suelo	0.1

9. COMPRENSIÓN ESCRITA (máx.1)	CALIF.
Cierre los ojos	0.1

10. ESCRITURA DE UNA FRASE (máx.1)	CALIF.
Escriba una frase completa (algo que ud. quiera decir)	0.1
S: No	

PRAXIAS

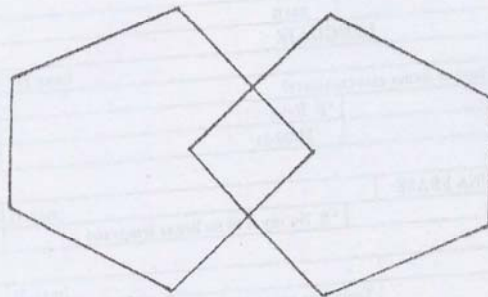
11. COPIA DE UN DIBUJO (máx. 1)	CALIF.
	0.1

Total:

* Aplicar en caso de baja escolaridad

CIERRE SUS OJOS

Doble apl



ANEXO III

Dear Dr. Guevara,

Your submission entitled "Proinflammatory serum profile and abnormal protein glycosylation as predictive markers of mild cognitive impairment and Alzheimer disease progression." has been received by the journal editorial office.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

<http://adad.edmgr.com/>

Your manuscript will be assigned a reference number and you will receive notification of this soon.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind Regards,

Alzheimer Disease & Associated Disorders - An International Journal

ADAD@ucdmc.ucdavis.edu

Proinflammatory serum profile and abnormal protein glycosylation as predictive markers of mild cognitive impairment and Alzheimer disease progression.

Castillo LM¹, Moreno E¹, Rojas K², Rodríguez-Agudelo Y³, Chávez M³, Espinosa B⁴, Trujillo Z⁵, Montaña LF⁶, Guevara J¹.

1Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.

2Laboratorio de Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Dr. Manuel Velasco Suárez.

3Departamento de Neuropsicología y Grupos de Apoyo. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Dr. Manuel Velasco Suárez.

4Laboratorio de Bioquímica. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Dr. Ismael Cossío Villegas.

5Geriatra, Dirección Médica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Dr. Manuel Velasco Suárez.

6Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.

Correspondence author: Jorge Guevara, PhD

Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina, U.N.A.M.

Circuito interior s/n. Ciudad Universitaria. 04510 D.F. México

E-mail: Jorge.guevara@comunidad.unam.mx

Short title: Inflammation and abnormal glycosylation in MCI.

Summary

The amyloid- β (A β) can induce a chronic inflammatory immune response. Chronic inflammatory responses are associated to abnormal glycosylation protein patterns, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and nitric oxide (NO). These alterations and development of MCI at serum level has not been evaluated. An MMSE test and serum levels of iNOs, NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, O- and N-glycosylation of albumin-free serum patterns were determined with well-defined lectins (*Amaranthus leucocarpus* and *Sambucus nigra*) in 4 MCI patients, 9 AD patients and 46 healthy age-matched controls. The results showed an increase of iNOS in MCI and AD but significantly higher NO concentrations were only found in MCI patients. TNF- α and IL-1 β were significantly increased in MCI patients, whereas no differences between control and MCI or AD patients. An abnormal MMSE test correlated with a decrease in serum nitric oxide concentration but not with the increase in TNF- α and IL-1 β in MCI patients. The glycosylation pattern of serum proteins also showed highly significant differences between MCI and AD patient. Our results imply that increased serum TNF- α , IL-1 β , iNOS, NO and alterations of serum proteins glycosylation patterns in adult individuals with an abnormal MMSE test might serve as an early indicator.

Keywords: Alzheimer disease, Mild Cognitive Impairment, Nitric Oxide, Inflammatory cytokines, Glycosylation.

Introduction

The majority of pathology alterations in Alzheimer's disease (AD) have been associated with amyloid- β ($A\beta$) toxicity⁽¹⁾. $A\beta$ can activate the microglia⁽²⁾ and macrophages⁽³⁾, both of which become amyloid presenting cells to T cells of extra cerebral origin⁽⁴⁾; this in turn favors the local liberation of pro inflammatory interleukins and reactive oxygen species (ROS)⁽⁵⁾, as well as modifications of the post-translation process of proteins including glycosylation⁽⁶⁾. This modification are not exclusive of immune cells as *in vitro* activation of endothelial cells exposed to the $A\beta$ peptide has been shown⁽⁷⁾.

Brain sections of AD patients express pro inflammatory interleukins IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α ⁽⁸⁾. However the expression of IL-10 secreted by microglia exposed to $A\beta$ ⁽⁹⁾ and detected in cerebrospinal fluid (CSF) of patients with AD⁽¹⁰⁾ suggest a homeostatic immune activity. An early primary feature of AD is cognitive deficit⁽¹¹⁾ that has been associated to increased expression of IL-12⁽¹²⁾; this observation remains controversial⁽¹³⁾.

Brain sections of AD patients show modifications in sialic acid expression in lesion areas⁽¹⁴⁾. However the glycosylation study of abnormal glycosylation patterns has only been focused on representative proteins of AD such as BACE-1, $A\beta$ PP, Tf, Tau and AChE⁽¹⁵⁾. Nevertheless, none of these studies have analyzed changes in N- and O-glycosylation of other proteins, even though low serum levels of sialyltransferases have been described in AD⁽¹⁶⁾. Endothelial cells exposed to $A\beta$ show alterations of $A\beta$ PP O-glycosilation⁽¹⁷⁾.

The endothelial cell exposed to stress molecules such as $A\beta$, ROS, LDL, TNF- α secrete pro inflammatory cytokines⁽¹⁸⁾ among many other molecules⁽¹⁷⁾. Endothelial cells exposed to $A\beta$ (1-42) increase the secretion of NO⁽¹⁸⁾ due to an increased activity of endothelial nitric oxide synthase⁽¹⁹⁾. The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) has been seen in post mortem brain sections of the temporal cortex of AD patients⁽²⁰⁾, but its presence has not been determined in the serum of patients with mild cognitive impairment (MCI), that is, the stage previous to the full-blown AD dementia⁽²¹⁾. The largest concentration of serum $A\beta$ is found in MCI stage⁽²²⁾.

The aim of this work was to evaluate serum iNOS concentration in patients with MCI and to determine if it is associated with an increase in serum pro-inflammatory cytokines and alterations of N- and O-glycosilation in total serum proteins.

Material and methods

Study group

Our study was made with 46 healthy control individuals (male=23, female=23) over 55 years of age without dementia, neurology's disease or auto immune's disease, directed through the "Vida digna" association and the department of Neuropsychology of the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velazco Suarez"; and four patients with MCI (male=2, female=2) diagnosed according to Petersen's criteria⁽²³⁾; nine patients with probable AD dementia (male=3, female=6) who underwent extensive clinical, cognitive and biochemical according to the revised criteria established by the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease on 2011^(21, 23, 24). An MMSE test⁽²⁴⁾ (Impairment score ≤ 23)⁽²⁵⁾, was performed in each individual prior to the sample collection. All the individuals included in this study were informed of the aims of the study and the possible risks after which they all signed an informed consent form previously approved by the Ethic's and Bioethic Committee of the Instituto Nacional de Neurologia y Neurocirugia "Manuel Velasco Suarez".

Blood Samples

A 5 ml blood sample was obtained via venipuncture using a Vacutainer collection tube without anticoagulant. The blood sample was left to rest at room temperature for 15 min followed by a 10 min centrifugation at 2000 rpm in a Beckman clinical centrifuge. At the end the serum was collected and kept at -70°C before being used.

Electrophoresis and Western blot

Fifty μ l (6.9 g/dL protein) of serum (Control=9, MCI=4, AD=9) were depleted of albumin with PureProteomeTM Albumin Magnetic Beads (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) following the manufacturer's instruction. A 40 μ l (3.36 g/dL protein) volume was recovered after the procedure and SDS-PAGE electrophoresis in 10% gels at 120 V and 4°C for 2 hrs was run using 4 μ l (80 μ g protein) of the albumin-free serum sample.

At the end the proteins in the gel were transferred to PVDF membrane using the Bio-Rad semi-dry transfer chamber. Before use, the membrane stained with Ponceau's red to corroborate that an appropriate protein transfer had been obtained; afterwards the membrane was washed thrice in water and PVDF membrane was blocked with blocking buffer (PBS pH 7.4/ BSA 3%) overnight at 4° C. As soon as the blocking buffer was retired, the membrane was washed thrice in PBS pH 7.4/ Tween 20 0.05% before incubating it with anti-iNOS antibody (Santa Cruz, Biotechn. CA, USA) 1:100 or with SNA (*Sambucus nigra*) (Vector Labs, USA) 1:20 and ALL (*Amaranthus leucocarpus*) (Donated by Dr. Zenteno; Facultad Medicina, UNAM) 1:20 in PBS/3% BSA overnight at 4°C, afterwards the membrane was washed twice with PBS/0.01% Tween-20 and incubated with an IgG anti-rabbit secondary antibody conjugated with HRP (Jackson Immuno Research) 1:1000 or with ExtrAvidin-Perox[™] (Sigma-Aldrich Co, USA) 1:2500, for the lectin assays, in PBS pH 7.4/BSA 3%/ Tween 20 0.05% for 30 minutes at room temperature. The reaction was revealed with the SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific) and density analysis of the signals was evaluated using the Gelquant software (Gelquant. DNI Bioimaging system, Jerusalem, Israel) that transforms the image into an 8-bit image; the program then calculates the intensity of the stained area measuring the amount of pixels/square inch and converts the readings into a white to black numerical value, expressed as dots per point (dpp).

Nitrites

Were quantified by the methods of Griess using the microplate Griess Reagent System (Promega Corporation) that includes its own standard curve. Each sample was read in the Multiskan EX Thermo ELISA reader (Thermo Sci., USA).

Serum interleukins

TNF- α IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12 were determined by ELISA method in each sample using commercially available kits (ELISA MAX Deluxe, BioLegend, San Diego, CA) and following the manufacturer's instruction. Micro plates were read using Multiskan EX Thermo (Thermo Sci., USA).

Statistical analysis

Data was analyzed by an ANOVA test, followed by a post hoc test using the Turkey's test. Pearson's correlation coefficient was also used to convey the impact of the MMSE test and the serum parameters. All the statistical analysis was performed with GraphPad Prism 6.0 software (San Diego, CA). All values are expressed as the mean \pm SD. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

There was a highly significant increase in iNOS expression, as determined by the dpp values obtained in the western blot membranes, in the AD patients (ANOVA $p=0.0218$) and a significant tendency of MCI patients in relation to control group (Student t $p=0.065$) (Fig. 1). Despite this the serum concentration of nitrites was significantly higher in the MCI patients 8.21 ($\mu\text{Mol/l}$) in comparison to the control group 4.28 ($\mu\text{Mol/l}$) and the 5.37 ($\mu\text{Mol/l}$) for the AD patients ($p < 0.0001$) (Fig. 2).

The relevance of the result is established when the results of the MMSE test were compared to the serum nitrite values. We found that the correlation between both was $r=0.58$, which in itself is not very high, it points towards a clear tendency where increased serum nitrates values might represent damage associated with early stages of AD development, that is, mild cognitive impairment (Fig. 3).

When pro-inflammatory cytokines were evaluated it surprised us to detect that the only two cytokines that were increased in patients with mild cognitive impairment and AD were $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$; the difference between them was not significant although in comparison to the control group it was highly significant ($p < 0.0017$ for $\text{IL-1}\beta$ and $p < 0.001$ for $\text{TNF-}\alpha$). Despite the seeming no difference between them, we found a predisposition for serum TNF to be higher in MCI patients than in AD patients. Not surprisingly interleukin-6 and interleukin-8 concentrations were significantly higher in AD patients in comparison to controls and MCI patients ($p < 0.003$ and 0.078 , respectively) (Fig. 4). Interestingly the serum concentration of interleukin-10 and interleukin-12 was similar ($p=0.8712$ and 0.6292 , respectively), almost identical, in the three groups.

O-glycosilation of serum proteins was increased in patients with MCI and AD (Fig.5). The staining intensity of the serum proteins when ALL was used showed a dpp value of ... in AD patients, and a dpp value of .. in MCI in the 40kDa protein band; the values observed in the 250, 50 and 15 kDa were also significantly different between them and the control sera as determined by multivariate analysis (ALL ~ 250 kDa $p= 0.0434$, ~ 50 kDa

p= 0.0434, ~40kDa p=0.01787, ~15kDa p=0.0320). As far as the staining intensity differences with SNA lectin we also observed differences in the 250 Kda proteins, and interestingly in the 100 kDa protein (SNA ~250kDa p=0.0272, ~100kDa p=0.0295) (Fig. 5). In the case of SNA it was interesting to observe that although the 50, 40 and 15 kDa proteins showed no differences between AD, MCI and control sera, the number of bands identified by the lectin in AD and MCI was higher in comparison with those detected with ALL.

Discussion

Inducible NOS, eNOS and NO regulate the inflammatory response⁽¹⁸⁾, but eNOS also regulate the expression of the amyloid precursor protein (A β PP) and b-secretase-1 (BACE-1) an enzyme that cleaves A β PP⁽²⁶⁾. It has been shown that the serum concentration of A β (1-42)⁽²⁴⁾ is increased in MCI⁽²⁷⁾ and that iNOS stimulate endothelial cells to produce TNF- α and IL-1 β in the presence of A β ⁽²⁸⁾. We found an increase in iNOS in MCI patients probably secondary to the high A β concentration, but it is well recognized that in the more advanced phase of the Alzheimer's disease the concentration of A β are almost negligible⁽²⁹⁾. iNOS expression was, as expected, above that determined in MCI patients, the reasons could be that A β remains in the endothelial cells mitochondria or endoplasmic reticulum in the absence of serum A β ⁽³⁰⁾ or that the damage to the endothelial cells during the MCI phase persist, a possibility that needs further investigation. It has been shown that endothelial cells cleave the 1-42 A β inside the cytoplasm to produce 1-40 A β ⁽¹⁹⁾; the latter is less toxic to the endothelial cell and this could be considered as a defense mechanism that is probably altered in AD patients.

We found an increase of serum nitric oxide in the MCI patients and a decrease in AD. This is probably the consequence of the increased iNOS expression that we observed in the MCI patients, interestingly patients with AD showed lower serum concentrations of ON^(31, 32)(31, 32)(31, 32)(31, 32), that were not secondary to a decrease or disappearance of iNOS since it was increased. It is possible that the lack of arginine that has been reported in AD patients⁽³³⁾ is the cause of such a decrease.

The directly proportional correlation between MMSE score and levels of nitric oxide, has only been described in cerebrospinal fluid in AD patients with severe damage⁽³⁴⁾. We found an identical correlation when MMSE

score and serum nitric oxide were evaluated. Nitric oxide is produced and secreted into CSF by neurons via nNOS and iNOS⁽³⁵⁾; it has been shown that nitric oxide synthases respond to different hormones and peptides⁽³⁶⁾ and that a damaged endothelium induces the expression of iNOS⁽³⁷⁾. Whether the continuous damage to the neurons in AD behaves similarly is unknown but a major player in AD is the role of the cerebral vascular endothelium, which is poorly understood.

The study of serum interleukins so far have not included the MCI stage of the disease⁽¹³⁾. In our study we found increased levels of TNF- α and IL-1 β in MCI patients. TNF- α , and IL-1 β are pro inflammatory cytokine⁽³⁸⁾. The increase of pro inflammatory cytokines was related to an increase of iNOS, the latter stimulates the endothelial cell synthesis and secretion of TNF- α and IL-1 β ⁽²⁸⁾. This apparently enhanced selective secretion of only two of the many pro-inflammatory cytokines could be related to “low endothelial damage”. This type of selective damage has been described in endothelium exposed to irradiation⁽³⁹⁾ and small amounts of ROS⁽⁴⁰⁾. Nitric oxide is a reactive oxygen specie and our results showed that in AD the concentration was low. The serum inflammatory response is similar to reports of brain sections of AD⁽⁴¹⁾.

The N- and O-glycosilation pattern in total and albumin-free serum proteins was evaluated with ALL lectin (GalNAc α 1,0 o GalNAc α 1,0)⁽⁴²⁾ and SNA lectin (α -2,6)⁽⁴³⁾. Both patterns were increased in AD and MCI samples, but the differences between them was significantly higher in AD samples. This difference could be related to the presence of A β ; Brain endothelial cells exposed to A β show changes in the O-glycosilation pattern of A β PP protein⁽¹⁷⁾. Changes in N-glycosilation have been observed in AD cerebral biopsies with the use of these lectins^(14, 44). In our study, the changes in the glycosilation pattern can be related to the increase of NO⁽⁴⁵⁾ and to the exposition of endothelial cells to serum A β . It has been shown that serum A β concentrations are higher in MCI in comparison to AD serum samples⁽²²⁾. Endothelial cells show A β deposits in the reticulum and mitochondria⁽³⁰⁾ although the entrance mechanism remains to be determined it is possible that A β maintained in the cell reticulum could be the origin of these alterations since reticulum is the major site in the process of glycosilation⁽⁶⁾.

Our results clearly demonstrate that the clinically considered mid-phase of Alzheimer’s disease progression is related to early and not severe but continuous damage to the endothelium that is represented by the selective

increase in certain pro-inflammatory cytokines, increases in non-specific N- and O-glycosylation of serum proteins and consequently the decrease in superior cerebral functions as determined by the MMSE test. We propose that the determination of serum abnormal profile comprised by pro-inflammatory cytokines, serum iNOS and nitric oxide concentration, and changes in N- and O- glycosylation protein patterns might be a helpful instrument in the early diagnosis of MCI, a stage in the natural history of AD that remains largely uncomprehended.

Acknowledgements

Castillo LM is a postgraduate student at the Biological Sciences Postgraduate Course, Universidad Nacional Autónoma de México, and a recipient of CONACyT-scholarship 288676.

The *Amaranthus leucocarpus* lectin was donated by Dr. Edgar Zenteno (Department of Biochemical, Facultad de Medicina; UNAM).

References

1. Broussard L, Myers R, Lemoine J. Preparing pediatric nurses: the role of simulation-based learning. *Issues Compr Pediatr Nurs.* 2009;32(1):4-15.
2. Li J, Yang JY, Yao XC, Xue X, Zhang QC, Wang XX, et al. Oligomeric A β -induced microglial activation is possibly mediated by NADPH oxidase. *Neurochemical research.* 2013;38(2):443-52.
3. Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(7):463-77.
4. Monsonogo A, Imitola J, Zota V, Oida T, Weiner HL. Microglia-mediated nitric oxide cytotoxicity of T cells following amyloid beta-peptide presentation to Th1 cells. *J Immunol.* 2003;171(5):2216-24.
5. Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol.* 1999;57(6):563-81.
6. Schedin-Weiss S, Winblad B, Tjernberg LO. The role of protein glycosylation in Alzheimer disease. *FEBS J.* 2014;281(1):46-62.
7. Tan J, Town T, Suo Z, Wu Y, Song S, Kundtz A, et al. Induction of CD40 on human endothelial cells by Alzheimer's beta-amyloid peptides. *Brain Res Bull.* 1999;50(2):143-8.
8. Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:756357.
9. Szczepanik AM, Funes S, Petko W, Ringheim GE. IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A β (1-42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. *Journal of neuroimmunology.* 2001;113(1):49-62.
10. Rota E, Bellone G, Rocca P, Bergamasco B, Emanuelli G, Ferrero P. Increased intrathecal TGF- β 1, but not IL-12, IFN- γ and IL-10 levels in Alzheimer's disease patients. *Neurol Sci.* 2006;27(1):33-9.
11. Backman L, Jones S, Berger AK, Laukka EJ, Small BJ. Multiple cognitive deficits during the transition to Alzheimer's disease. *J Intern Med.* 2004;256(3):195-204.
12. Vom Berg J, Prokop S, Miller KR, Obst J, Kalin RE, Lopategui-Cabezas I, et al. Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Nat Med.* 2012;18(12):1812-9.
13. Swardfager W, Lancot K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 2010;68(10):930-41.
14. Guevara J, Espinosa B, Zenteno E, Vazquez L, Luna J, Perry G, et al. Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology.* 1998;57(10):905-14

15. Marklová E AZ, Vališ M. Microheterogeneity of some serum glycoproteins in neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci* 2012;15(314):5.
16. Maguire TM, Gillian AM, O'Mahony D, Coughlan CM, Dennihan A, Breen KC. A decrease in serum sialyltransferase levels in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 1994;15(1):99-102.
17. Kitazume S, Tachida Y, Kato M, Yamaguchi Y, Honda T, Hashimoto Y, et al. Brain endothelial cells produce amyloid {beta} from amyloid precursor protein 770 and preferentially secrete the O-glycosylated form. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(51):40097-103.
18. Town T, Tan J, Mullan M. CD40 signaling and Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurochem Int*. 2001;39(5-6):371-80.
19. Rajadas J, Sun W, Li H, Inayathullah M, Cereghetti D, Tan A, et al. Enhanced Abeta(1-40) production in endothelial cells stimulated with fibrillar Abeta(1-42). *PloS one*. 2013;8(3):e58194.
20. Fernandez-Vizarra P, Fernandez AP, Castro-Blanco S, Encinas JM, Serrano J, Bentura ML, et al. Expression of nitric oxide system in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*. 2004;15(2):287-305.
21. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Jr., Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):263-9.
22. Luis CA, Abdullah L, Paris D, Quadros A, Mullan M, Mouzon B, et al. Serum beta-amyloid correlates with neuropsychological impairment. *Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn*. 2009;16(2):203-18.
23. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):270-9.
24. Segal-Gidan F, Cherry D, Jones R, Williams B, Hewett L, Chodosh J, et al. Alzheimer's disease management guideline: update 2008. *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):e51-9.
25. México SdS. Mini examen del estado mental. Normas oficiales mexicanas.
26. Katusic ZS, Austin SA. Endothelial nitric oxide: protector of a healthy mind. *Eur Heart J*. 2014;35(14):888-94.
27. Abdullah L, Luis C, Paris D, Ait-ghezala G, Mouzon B, Allen E, et al. High serum Abeta and vascular risk factors in first-degree relatives of Alzheimer's disease patients. *Molecular medicine*. 2009;15(3-4):95-100.
28. Faro ML, Fox B, Whatmore JL, Winyard PG, Whiteman M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. *Nitric Oxide*. 2014.
29. Tamaoka A, Fukushima T, Sawamura N, Ishikawa K, Oguni E, Komatsuzaki Y, et al. Amyloid beta protein in plasma from patients with sporadic Alzheimer's disease. *Journal of the neurological sciences*. 1996;141(1-2):65-8.
30. Soriano FX, Galbete JL, Forloni G. Effect of beta-amyloid on endothelial cells: lack of direct toxicity, enhancement of MTT-induced cell death and intracellular accumulation. *Neurochem Int*. 2003;43(3):251-61.
31. Lodeiro M, Ibanez C, Cifuentes A, Simo C, Cedazo-Minguez A. Decreased cerebrospinal fluid levels of L-carnitine in non-apolipoprotein e4 carriers at early stages of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2014;41(1):223-32.
32. Sachdeva R, Babbar R, Puri V, Agarwal S, Krishana B. Correlation between cognitive functions and nitric oxide levels in patients with dementia. *Clinical EEG and neuroscience*. 2011;42(3):190-4.
33. Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Bianchi G, Martelli M, Talerico T, et al. Plasma amino acid concentrations in patients with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80(2):483-8.
34. Tohgi H, Abe T, Yamazaki K, Murata T, Isobe C, Ishizaki E. The cerebrospinal fluid oxidized NO metabolites, nitrite and nitrate, in Alzheimer's disease and vascular dementia of Binswanger type and multiple small infarct type. *J Neural Transm*. 1998;105(10-12):1283-91.
35. Barbaresi P, Fabri M, Mensa E. Characterization of NO-producing neurons in the rat corpus callosum. *Brain Behav*. 2014;4(3):317-36.
36. Batra S, Iosif C, Al-Hijji J, Larsson I. Important differences in nitric oxide synthase activity and predominant isoform in reproductive tissues from human and rat. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1:10.

37. Lowry JL, Brovkovich V, Zhang Y, Skidgel RA. Endothelial nitric-oxide synthase activation generates an inducible nitric-oxide synthase-like output of nitric oxide in inflamed endothelium. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(6):4174-93.
38. Lane T, Lachmann HJ. The emerging role of interleukin-1beta in autoinflammatory diseases. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2011;11(5):361-8.
39. Cervelli T, Panetta D, Navarra T, Andreassi MG, Basta G, Galli A, et al. Effects of single and fractionated low-dose irradiation on vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2014;235(2):510-8.
40. Lubrano V, Balzan S. LOX-1 and ROS, inseparable factors in the process of endothelial damage. *Free Radic Res*. 2014;48(8):841-8.
41. Liu L, Chan C. The role of inflammasome in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 2014;15C:6-15.
42. Zenteno E, Lascrain R, Montano LF, Vazquez L, Debray H, Montreuil J. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj J*. 1992;9(4):204-8.
43. Peumans WJ, Roy S, Barre A, Rouge P, van Leuven F, van Damme EJ. Elderberry (*Sambucus nigra*) contains truncated Neu5Ac(alpha-2,6)Gal/GalNAc-binding type 2 ribosome-inactivating proteins. *FEBS letters*. 1998;425(1):35-9.
44. Espinosa B, Guevara J, Hernandez P, Slomianny MC, Guzman A, Martinez-Cairo S, et al. Characterization of an O-glycosylated plaque-associated protein from Alzheimer disease brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2003;62(1):34-41.
45. Ngoh GA, Watson LJ, Facundo HT, Jones SP. Augmented O-GlcNAc signaling attenuates oxidative stress and calcium overload in cardiomyocytes. *Amino acids*. 2011;40(3):895-911.

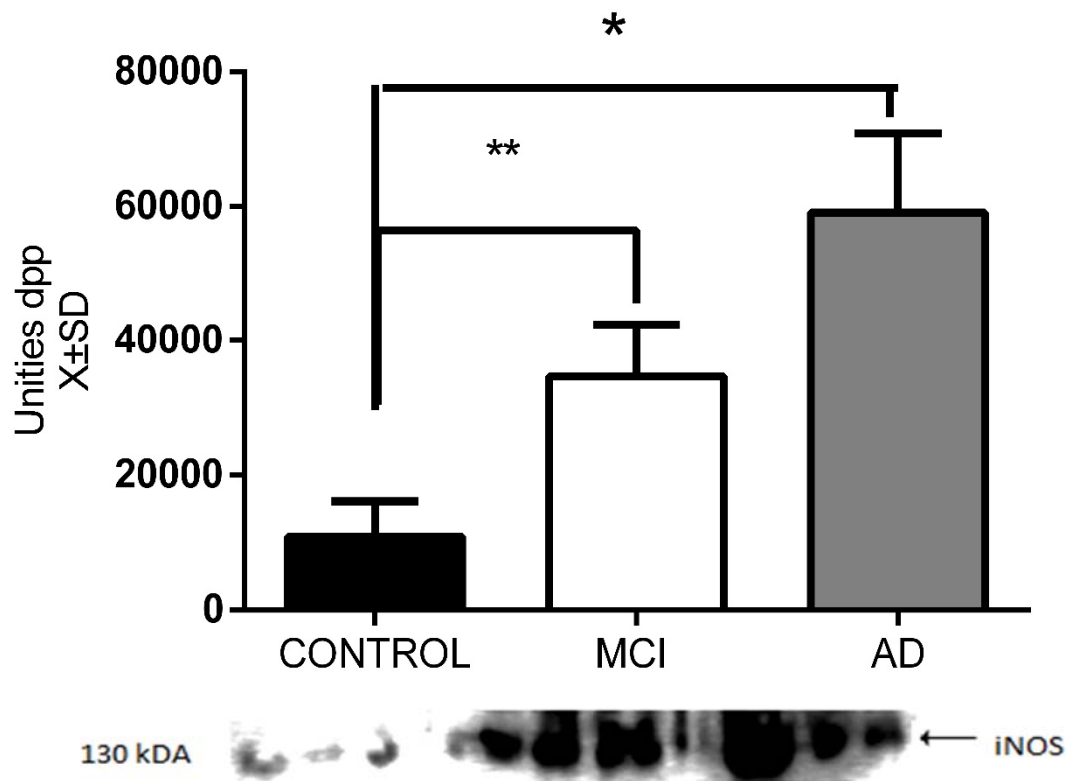


Figure 1. Comparative Western Blot density analysis of iNOS in Control, Mild Cognitive Impairment (MCI) and Alzheimer's Disease (AD) groups.
 ANOVA $p=0.0218$ Student t test= * Control vs EA $p=0.0198$ ** Control vs DCL $p=0.065$
 Control (lanes 1, 2, 3), MCI (lanes 4, 5, 6) and AD (lanes 7, 8, 9).

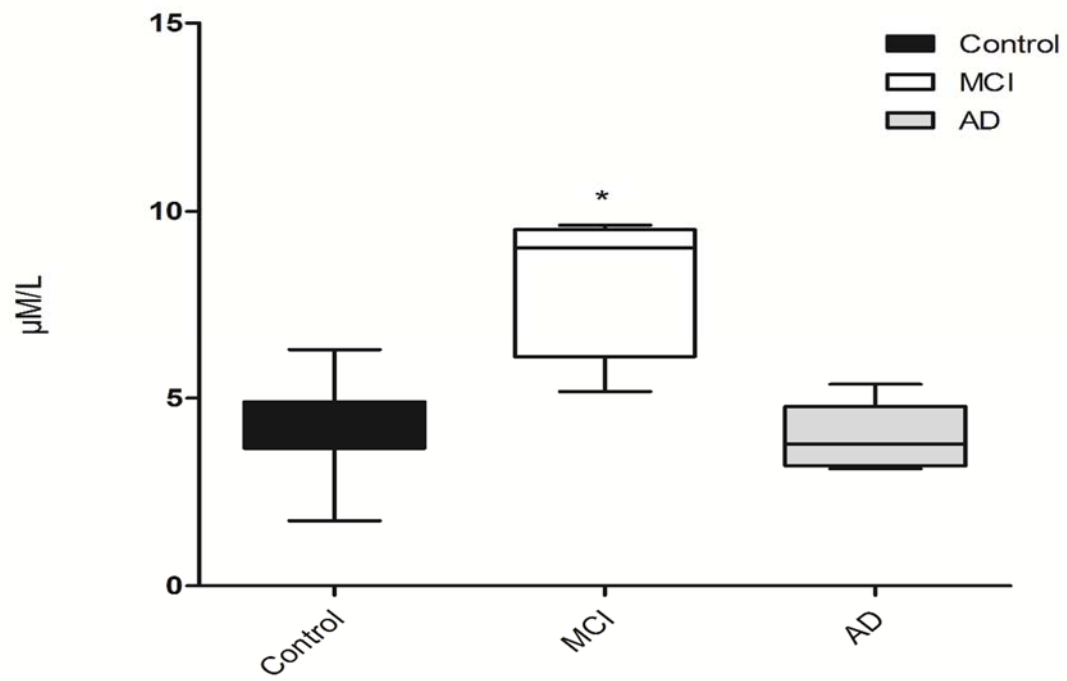


Figure 2. Serum levels of nitrites in control, Mild Cognitive Impairment (MCI) and Alzheimer's Disease (AD) groups. * $p < 0.0001$

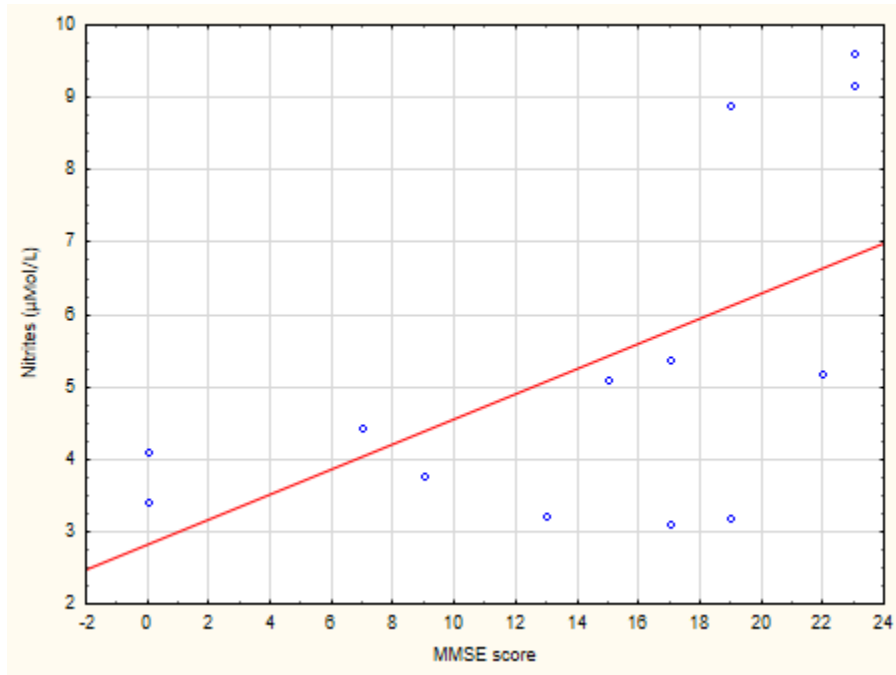


Figure 3. Correlation between MMSE score and concentration of serum nitrite in Mild Cognitive Impairment (MCI) and Alzheimer Disease groups ($r=0.58$, $p=0.0187$).

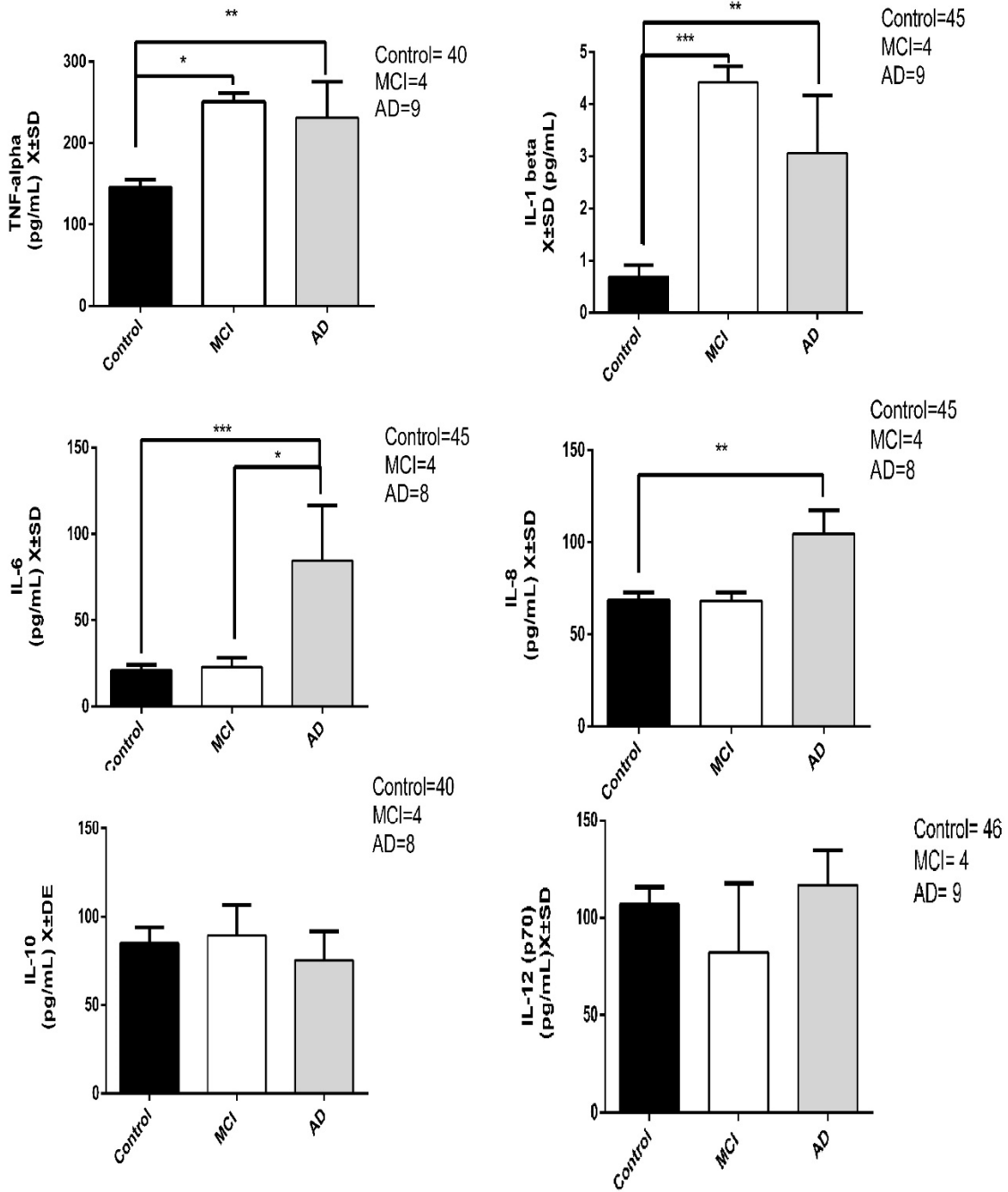


Figure 4. Serum level of interleukin in Mild Cognitive Impairment (MCI) and Alzheimer’s disease (AD) groups.

Turkey’s test: * p <0.05, ** p <0.001, ***p <0.0001. X= Mean, SD=Standard deviation

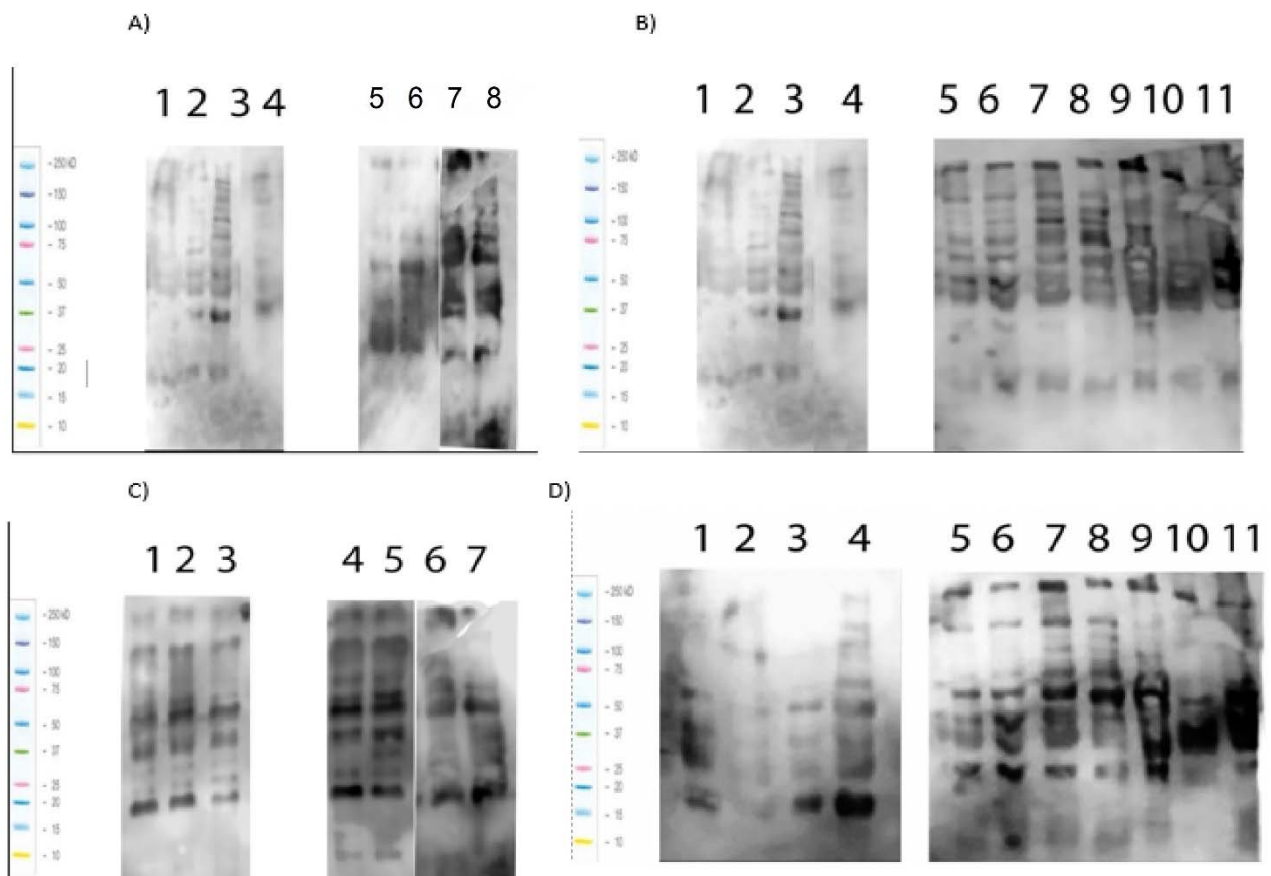


Fig. 5 Western blot staining pattern of albumin-free sera stained with ALL lectin (A and B) that recognize O-glycans and stained with SNA lectin that recognizes N and O-glycans (C and D). In the figure A and C: Control samples (lanes 1-4), MCI samples (lanes 5-8). B and D: Control samples (lanes 1-4) and AD samples (lanes 5-11)