



MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
ÁREA DE DOCENCIA E INVESTIGACIONES
DIRECCIÓN DE CIENCIA Y TÉCNICA
PROYECTO DE SALUD

I. IDENTIFICACION DEL PROYECTO
PROGRAMA AL QUE TRIBUTA EL PROYECTO: Prevención y control de enfermedades
TÍTULO DEL PROYECTO: Marcadores biológicos en plasma humano para diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer
CLASIFICACION DEL PROYECTO: De Investigación y Desarrollo (I+D)
PRIORIDAD ESTABLECIDA AL NIVEL QUE RESPONDE: Interés institucional
ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Laboratorio Central de Líquido Cefalorraquídeo (LABCEL). Facultad de Ciencias Médicas "Miguel Enríquez" Director: Dr. José Pedro Martínez Larrarte Dirección: Ramón Pintó # 202 Teléfono(s): 76902087 E-mail: reumatologia@infomed.sld.cu Firma del Director y cuño
JEFE DEL PROYECTO: Dra. Eneida Barrios Lamoth. Médico especialista en MGI e Inmunología. Grado y Categoría Científica y/o Docente: Profesor asistente. Investigador Agregado Entidad: LABCEL E-Mail: eneida@infomed.sld.cu Teléfono: 76902087 76906851 Sustituto: Dr. José Pedro Martínez Larrarte

Entidad: LABCEL

E-Mail: reumatologia@infomed.sld.cu

Teléfono: 76902087 76906851

ENTIDADES EJECUTORAS PARTICIPANTES:

1. **Facultad de Ciencias Médicas "Miguel Enríquez". Laboratorio Central de Líquido Cefalorraquídeo (LABCEL)**

Dirección :Ramón Pintó # 202

Teléfono : 76902087 y 76906851

2. **University Medical Center Goettingen (UMG), Georg-August-University, Von-Siebold-Str. 5, D-37075 Goettingen, Germany**
3. **German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Von-Siebold-Str. 3a,**

DURACIÓN Exponer el tiempo en años que se prevé dure el proyecto

Fecha de inicio: septiembre /2023

Fecha terminación: septiembre /2027

PRESUPUESTO DESGLOSADO POR AÑOS: FINANCIAMIENTO TOTAL

I Año		II Año		III Año		TOTAL	
MN	MLC	MN	MLC			MN	MLC
136919.44	5585.16	136919.44	-	136919.44		410758.32	5585.16

RESUMEN DEL PROYECTO:

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia en los pacientes mayores de 60 años y hasta la actualidad no existe un marcador biológico en sangre que se pueda utilizar como posible marcador diagnóstico de la misma. Por esto nos proponemos realizar un estudio analítico, transversal en pacientes con diagnóstico clínico de demencia pertenecientes al hospital Clínico Quirúrgico Docente “Miguel Enríquez” en el período de septiembre de 2023 a septiembre de 2027 con el objetivo de asociar el rendimiento diagnóstico de la razón A β 42 / A β 40 determinada plasma con pacientes que tienen Enfermedad de Alzheimer.

Se incluirán todos los pacientes mayores de 65 años con diagnóstico clínico de demencia, de ambos sexos, atendidos en el hospital Clínico Quirúrgico Docente “Miguel Enríquez” en el período de septiembre de 2023 a septiembre de 2027. Los pacientes serán divididos en dos subgrupos pacientes con Demencia tipo Alzheimer y pacientes con Demencia por otras causas a los cuales, previo consentimiento informado, se les realizará punción venosa en el antebrazo para obtención de plasma. A estas muestras se les realizará cuantificación de los péptidos A β 40 y A β 42 a través de un inmunoensayo de dos pasos. Esto permitirá conocer si la razón A β 42 / A β 40 se pueda utilizar como biomarcador auxiliar de la enfermedad de Alzheimer además de determinar la utilidad para estimar severidad de la misma.

Palabra claves Enfermedad Alzheimer, razón A β 42 / A β 40.

II.FUNDAMENTACIÓN DEL PROYECTO

PROBLEMA A RESOLVER.

La EA es la principal causa de demencia en los pacientes mayores de 60 años y hasta la actualidad no existe un marcador biológico en sangre o plasma que se pueda utilizar como posible marcador diagnóstico y/o pronóstico de la misma.

Hoy en día se utilizan determinaciones de péptidos beta amiloide ($A\beta$) en líquido cefalorraquídeo (LCR) que pueden confirmar la enfermedad, la toma de este líquido biológico presupone una dificultad para la generalización del mismo sobre todo en pacientes añosos.

Por esta causa se han venido desarrollando diferentes métodos para cuantificar dichos péptidos en plasma humano. Sin embargo, la sangre es un sistema biológico muy complejo y existen numerosos factores de confusión que pueden influenciar la aplicación e interpretación de los resultados obtenidos en los análisis de biomarcadores en este líquido biológico. Esto sumado a las propiedades fisicoquímicas del péptido $A\beta$ y su baja concentración en esta matriz añaden dificultades metodológicas que desafían la cuantificación fiable de este péptido en el plasma.

Wiltfang y colaboradores desarrollaron una técnica que permite realizar una pre concentración mediante inmunoprecipitación con un anticuerpo contra la región amino terminal del péptido $A\beta$ del plasma. Sus hallazgos permiten utilizar la razón $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ como un prometedor candidato a biomarcador de EA.

En el hospital Clínico Quirúrgico Docente "Miguel Enríquez" no se conocen los valores de estos péptidos determinados en plasma de pacientes con EA, por lo que los autores del presente proyecto proponen la siguiente pregunta:

¿Cuál es la utilidad de la razón $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ determinada a través de un inmunoensayo de dos pasos como un biomarcador adicional en el diagnóstico de EA?

CONTEXTO, ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DE PROYECTO: ANTECEDENTES

Dentro del síndrome demencial la EA ha recibido especial atención puesto que el número de pacientes afectados por la misma crece rápidamente en todo el mundo de manera paralela al envejecimiento de la población. Esto ha hecho de esta enfermedad un problema sanitario de primer orden en la mayoría de los países.⁽¹⁾

La EA es la enfermedad neurodegenerativa más común y se caracteriza por un desarrollo gradual de los síntomas que pueden llevar a una discapacidad mental severa. En los pacientes afectados se producen alteraciones en la

memoria, lenguaje, concentración y atención además se suma a esto alteraciones en las funciones visuoespaciales y capacidad ejecutiva. Todo lo anterior lleva al enfermo de Alzheimer a sufrir desadaptación laboral, social, y familiar con la consecuente dependencia que esto genera para todas las actividades de la vida cotidiana.^(2,3)

El hecho de que la Organización Mundial de la Salud (OMS) advierte de que para el 2050 más de 100 millones de personas pueden sufrir de EA enfatiza la importancia de establecer un diagnóstico precoz que permita una intervención médica efectiva y oportuna que pueda mejorar la calidad de vida de estos pacientes.^(2,4)

En la actualidad el diagnóstico de Alzheimer depende básicamente de la observación clínica y de pruebas cognitivas aunque existen biomarcadores que se determinan en el líquido cefalorraquídeo (LCR) como la medición de péptidos derivados de la proteína amiloide β ($A\beta_{42}$, $A\beta_{40}$, $A\beta_{38}$), la proteína tau fosforilada y estudios de neuroimagen como la tomografía por emisión de positrones (PET).^(2, 5-7)

Sin embargo la dificultad que representa realizar una punción lumbar de forma rutinaria a pacientes mayores de 60 años impide la generalización de estas determinaciones en LCR como método de pesquisaje activo para diagnóstico precoz de la EA. En el caso de los estudios de neuro imagen resultan ser métodos de costosa implementación de forma rutinaria sobre todo en países en vías de desarrollo con población envejecida como Cuba.^(5,8)

Debido a la alta prevalencia de la enfermedad desarrollar un biomarcador que se pueda utilizar como prueba de diagnóstico precoz a partir de sangre o plasma humano mejoraría considerablemente el pronóstico de estos pacientes. En este sentido se están realizando muchas investigaciones siendo la determinación de la razón $A\beta_{42}$ / $A\beta_{40}$ mediante un inmunoensayo de dos pasos unos de los más prometedores.^(5,9)

Cuba ha implementa el Plan global de acción para la demencia aprobado por la OMS 2017 y junto con el lineamiento 114 de la política económica del estado se demuestra que el envejecimiento poblacional es una prioridad para el partido y el estado.⁽¹⁰⁾ Por tanto lograr el diagnóstico precoz de esta enfermedad en nuestra población con alto envejecimiento se imbrica perfectamente en todos los planes priorizados del Estado Cubano y del Ministerio de Salud Pública.

JUSTIFICACIÓN

IMPACTO SOCIAL:

- Cuba es uno de los países afectados por el envejecimiento poblacional por tanto poder implementar una técnica de diagnóstico precoz de la EA tendrá un impacto social positivo por la siguientes razones:
 1. permitirá discriminar entre otras causas de demencia en pacientes mayores de 60 años esto a su vez permitirá

2. poder implementar líneas de tratamiento y terapias cognitivas oportunas los cuales si bien no curan la enfermedad pueden retrasar su establecimiento.

3. esto podría disminuir de forma significativa la necesidad temprana de cuidadores a tiempo completos para estos pacientes, y disminuir los años de vida potencialmente perdidos por discapacidad, Lo cual aliviaría en gran medida la sobrecarga que sufren muchas familias que conviven con pacientes aquejados por la EA.

APORTES TEÓRICOS:

- Generación de nuevos conocimientos que permitan esclarecer la fisiopatología de la EA
- Se espera poder establecer la utilidad de la razón A β 42 / A β 40 como predictor de severidad y progresión de la enfermedad de Alzheimer.

APORTES PRÁCTICOS:

- Se introducirá en nuestro laboratorio la determinación de la razón razón A β 42 / A β 40 mediante inmunoensayo de dos pasos lo que nos permitirá brindar servicio a la red nacional de hospitales.

IMPACTO ECONÓMICO:

Poder implementar una técnica que permita el diagnóstico precoz de la EA se traduce en una intervención temprana lo que favorecería:

1. la disminución del costo económico que genera la enfermedad en cuanto a instituciones de salud, cuidadores formales, productividad laboral de la persona afectada así como de los cuidadores o familiares que tiene a su cargo la atención de un paciente con EA. Los costos económicos que generan la demencia a nivel mundial se estiman en billones de dólares, Cuba no está ajena a esto como país con envejecimiento demográfico por tanto lograr implementar esta técnica podría reducir considerablemente los gastos del estado.

2. de obtener resultados satisfactorios se implantaría esta tecnología en este laboratorio. La misma sólo está disponible en instituciones de países desarrollados y en Cuba seríamos el único centro que brindaríamos este servicio con posibles clientes entre los pacientes que se atiende en los servicios de turismo de salud.

BENEFICIARIOS DIRECTOS: Pacientes mayores de 60 años, atendidos en las Instituciones de salud

CLIENTES o USUARIOS Laboratorio Central de Líquido Cefalorraquídeo (LABCEL).

Facultad de Ciencias Médicas "Miguel Enríquez"

Director: Dr. José Pedro Martínez Larrarte

Dirección:

Teléfono: 76902087

E-mail: reumatologia@infomed.sld.cu

<p>Compromisos que asume con relación a los resultados del proyecto: Poner en practica de forma rutinaria la técnica de inmunoensayo de dos pasos, y poder utilizar la razón Aβ42 / Aβ40 como método de diagnóstico auxiliar en pacientes con EA.</p> <p>Firma del Director y cuño</p>
<p>AVAL DEL ORGANO CONSULTIVO DE LA ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Presentar el aval del Consejo Científico o Técnico Asesor, según corresponda de la Entidad Ejecutora Principal.</p>
<p>III. ESTRATEGIA DEL PROYECTO</p>
<p>OBJETIVO GENERAL: Asociar el rendimiento diagnóstico de la razón Aβ42 / Aβ40 determinada plasma con pacientes que tienen Enfermedad de Alzheimer</p>
<p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Determinar los valores de péptidos Aβ40, Aβ42 en plasma humano de pacientes con demencias ➤ Asociar los valores de la de la razón Aβ42 / Aβ40 con variables clínicas ➤ Determinar la sensibilidad, especificidad de la razón Aβ42 / Aβ40 en pacientes con enfermedad de Alzheimer ➤ Identificar el punto de corte de la razón Aβ42 / Aβ40 en pacientes con enfermedad de Alzheimer
<p>RESULTADOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Poder establecer de manera rutinaria la realización de este inmunoensayo de dos pasos para la cuantificación de péptidos beta Aβ40, Aβ42 en Labcel. ➤ Utilizar la razón Aβ42 / Aβ40 como método de diagnóstico auxiliar en pacientes con EA.
<p>SALIDAS: Informe final, publicaciones. Implementación de una nueva técnica en Labcel</p>
<p>IMPACTOS: JUSTIFICACIÓN IMPACTO SOCIAL:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Cuba es uno de los países afectados por el envejecimiento poblacional por tanto poder implementar una técnica de diagnóstico precoz de la EA tendrá un impacto social positivo por la siguientes razones: <ol style="list-style-type: none"> 1. permitirá discriminar entre otras causas de demencia en pacientes mayores de 60 años esto a su vez permitirá 2. poder implementar líneas de tratamiento y terapias cognitivas oportunas los cuales si bien no curan la enfermedad pueden retrasar su establecimiento. 3. esto podría disminuir de forma significativa la necesidad temprana de cuidadores a tiempo completos para estos pacientes, y disminuir los años de vida potencialmente perdidos por discapacidad, Lo cual aliviaría en gran medida la sobrecarga que sufren muchas familias que conviven con pacientes aquejados por la EA. <p><u>APORTES TEÓRICOS:</u></p>

- Generación de nuevos conocimientos que permitan esclarecer la fisiopatología de la EA
- Se espera poder establecer la utilidad de la razón Aβ42 / Aβ40 como marcador diagnóstico adicional de la enfermedad de Alzheimer.

APORTES PRÁCTICOS:

- Se introducirá en nuestro laboratorio la determinación de la razón Aβ42 / Aβ40 mediante inmunoensayo de dos pasos lo que nos permitirá brindar servicio a la red nacional de hospitales.

IMPACTO ECONÓMICO:

Poder implementar una técnica que permita el diagnóstico precoz de la EA se traduce en una intervención temprana lo que favorecería:

1. la disminución del costo económico que genera la enfermedad en cuanto a instituciones de salud, cuidadores formales, productividad laboral de la persona afectada así como de los cuidadores o familiares que tiene a su cargo la atención de un paciente con EA. Los costos económicos que generan la demencia a nivel mundial se estiman en billones de dólares, Cuba no está ajena a esto como país con envejecimiento demográfico por tanto lograr implementar esta técnica podría reducir considerablemente los gastos del estado.

2. de obtener resultados satisfactorios se implantaría esta tecnología en este laboratorio. La misma sólo está disponible en instituciones de países desarrollados y en Cuba seríamos el único centro que brindaríamos este servicio con posibles clientes entre los pacientes que se atiende en los servicios de turismo de salud.

RIESGOS:

Riesgo posible	Acción prevista
Que no se logre la firma del convenio de colaboración con la Universidad Alemana de Göttingen	Buscar otras fuentes de financiamiento que permitan la realización del proyecto

METODOLOGÍAS. TECNOLOGÍAS, NORMAS Y MÉTODOS:

Se realizará un estudio analítico, transversal en pacientes con diagnóstico clínico de demencia pertenecientes al hospital Clínico Quirúrgico Docente “Miguel Enríquez” en el período de septiembre de 2023 a septiembre de 2027.

Universo y muestra

Se incluirán todos los pacientes mayores de 60 años con diagnóstico clínico de demencia, de ambos sexos, atendidos en el hospital Clínico Quirúrgico Docente “Miguel Enríquez” en el período de septiembre de 2023 a septiembre de 2027.

Los pacientes serán divididos en dos subgrupos

Subgrupo A

Pacientes con Demencia tipo Alzheimer

Subgrupo B

Pacientes con Demencia por otras causas

Procedimientos

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les realizará toma de muestra de sangre venosa, previa obtención del consentimiento informado, obtenidas a través de venopunción en antebrazo la sangre se pondrá en tubos monovettes con EDTA. (S-Monovette 9ml K3E; Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) y se centrifugará durante 10 minutos a 2000 ×, a temperatura ambiente, para obtener plasma sanguíneo con EDTA. Hasta su uso, el plasma de EDTA se almacenará en alícuotas de 500 µl en tubos de polipropileno a -80 ° C.

Operacionalización de las variables

Variable	Clasificación	Escala	Descripción	Indicador
Edad	Cuantitativa discreta	Según años cumplidos	Según años cumplidos	Media y desviación estándar*
Sexo	Cualitativa nominal dicotómica	Femenino Masculino	Según sexo biológico	Frecuencia absoluta y porcentaje
Presencia demencia por Enfermedad de Alzheimer	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Sí: cuando el paciente presente diagnóstico clínico de EA realizado por especialistas de psiquiatría a través de criterios establecidos(criterios de McKhann de 2011, y el diagnóstico debe considerar las pruebas psicométricas y la capacidad del paciente para funcionar en las actividades diarias habituales) No: caso contrario	Frecuencia absoluta y porcentaje
Presencia demencia por otras causas	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Sí: cuando el paciente presente diagnóstico clínico de demencia por otras causas realizado por especialistas de psiquiatría a través de criterios establecidos No: caso contrario	Frecuencia absoluta y porcentaje
Tiempo de evolución de la Enfermedad de Alzheimer	Cuantitativa discreta	Menos de 1 año de evolución de la EA	Según datos que se obtengan por la historia clínica y declaración del paciente y/o familiar o tutor legal	Media y desviación estándar*

		Más de 1 año de evolución de la EA		
Severidad del diagnóstico clínico de Enfermedad de Alzheimer	Cualitativa ordinal politómica	leve Moderada severa	Según datos que se obtengan por la historia clínica	Frecuencia absoluta y porcentaje
Péptido Aβ40	Cuantitativa continua	Péptido Aβ40 en sangre pg / ml	Se medirán con el kit de ensayo multiplex V-Plex Aβpanel 1 (6E10) (Mesoescala Discovery (MSD))	Media y desviación estándar*
Péptido Aβ42	Cuantitativa continua	Péptido Aβ42 en sangre pg / ml	Se medirán con el kit de ensayo multiplex V-Plex Aβpanel 1 (6E10) (Mesoescala Discovery (MSD))	Media y desviación estándar*
razón Aβ42 / Aβ40 en plasma	Cuantitativa continua	Adimensional	Resultado del Cociente entre el número absoluto de péptidos Aβ42 y el número absoluto de péptidos Aβ40.	Media y desviación estándar*

Técnicas y procedimientos para la obtención de la información:

Se realizará una revisión bibliográfica del tema en los buscadores y palabra claves Enfermedad Alzheimer, razón Aβ42 / Aβ40.

Se procederá a revisar las historias clínicas de los pacientes y extraer el tiempo de evolución de la Enfermedad de Alzheimer, la severidad del diagnóstico clínico de Enfermedad de Alzheimer y se obtendrán el resto de los datos necesarios como edad y sexo.

Para la obtención de valores de péptidos Aβ42 y Aβ40 en plasma se realizará un Inmunoensayo de dos pasos que se describe a continuación⁽⁹⁾

1er paso

Preparación de perlas anti-Aβmagnéticas funcionalizadas.

Para preparar 1ml de partículas magnéticas funcionalizadas, Dynabeads™ M-280 IgG anti-ratón para ovejas (6 × 10⁸–7 × 10⁸ perlas / ml; ThermoFisher Scientific) se deben re suspender en el recipiente de vidrio original y 1 ml se transferirá a un vial de reacción de polipropileno. El vial se colocará en un soporte magnético durante unos minutos, y el sobrenadante se retirará con cuidado y se desechará. Las perlas se deben lavar dos veces con 1 ml de PBS / BSA al 0,1% (p / v) durante 3 minutos a temperatura ambiente en un mezclador. Las perlas lavadas se deben re suspender en 1 ml de PBS / BSA al 0,1% y se agregarán 40 µg de clon monoclonal de anticuerpo anti-Aβ1E8 (nanoToolsGmbH, Teningen, Alemania).

La mezcla se incubará durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4 ° C en un mezclador. Luego, las perlas se lavarán 4 veces durante 30 minutos a 4 ° C y 1 vez durante 5 minutos

a temperatura ambiente con 1 ml de PBS / BSA al 0,1%. Para eliminar enlaces covalentes, las perlas se lavarán 2 veces durante 5 minutos con 1 ml de trietanolamina 0,2 M y se incubarán durante 1 hora a temperatura ambiente en un mezclador con 1 ml de dimetil-pimelidato al 0,5% (p / v) en trietanolamina 0,2 M. Para detener la reacción, el tubo se colocará en un soporte magnético, se eliminará el sobrenadante y se añadirá 1 ml de Tris / HCl 50 mM, pH 7,5. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente en un mezclador, el sobrenadante se desechará y las perlas se lavarán tres veces con 1 ml de PBS / BSA al 0,1% durante 5 min. Las perlas funcionalizadas se almacenarán hasta su uso a 4°C en 1 ml de PBS / BSA al 0,1% / NaN₃ al 0,02%.

2do Paso

Preconcentración de péptidos A β del plasma por inmunoprecipitación

Se mezclarán 400 μ l de cada muestra de plasma sanguíneo con EDTA con 100 μ l de concentrado de tampón de inmunoprecipitación (IP) 5X (HEPES 250 mM / NaOH, pH 7,4, NaCl 750 mM, Igepal CA630 al 2,5%, sodio 1,25% desoxicolato; 0,25% SDS y 1 tableta de cóctel inhibidor de la Mini proteasa completa (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) por 2 ml).

Luego, se agregarán 25 μ l de perlas magnéticas anti-A β funcionalizadas a cada muestra, y las mezclas se incubarán durante la noche a 4°C en un mezclador. Al día siguiente, los sobrenadantes se descartarán y los complejos inmunes de perlas magnéticas se lavarán 3 veces durante 5 minutos con 1 ml de PBS / BSA al 0,1% y 1 vez durante 3 minutos con 1 ml de Tris / HCl 10 mM, pH 7,5.

Inmediatamente antes de las mediciones de A β por el inmunoensayo múltiplex (ver más adelante), los péptidos A β se eluirán en 30 μ l de 20mM bicina, 0,6% CHAPS (3 - ((3-cholamidopropil) dimetilamonio) -1-propanosulfonato), pH 7,6, calentando a 95 ° C durante 5 min.

Para la medición simultánea de A β 40 y A β 42 en lecturas cuadruplicadas, se mezclarán 25 μ l de cada eluido IP en un vial separado con 95 μ l de Diluyente 35 (Mesoescala Discovery).

Ensayo de inmuno multiplexión de quimioluminiscencia.

Los niveles de A β 40 y A β 42 en los eluatos de IP se medirán con el kit de ensayo multiplex V-Plex A β panel 1 (6E10) (Mesoescala Discovery (MSD)) inmediatamente después de la elución de las perlas magnéticas y con una dilución de 4,8 veces con diluyente 35. Siguiendo las instrucciones del fabricante, la placa de ensayo se bloqueará con 150 μ l de diluyente 35 por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente en un mezclador a 300 rpm y posteriormente se lavará 3 veces con 150 μ l de PBS conteniendo 0.05% de Tween-20 (PBS-T) por pocillo. La solución del anticuerpo de detección se preparará para una placa mezclando 60 μ l del anticuerpo Sulfo-Tag 50 \times 6E10, 30 μ l de A β 40 blocker y 2910 μ l Diluent 100 (los tres reactivos proporcionados en el kit de ensayo). Luego, se pipetearán 25 μ l de solución de detección de anticuerpos y 25 μ l de muestra diluida o calibrador en los pocillos de la placa de ensayo. La placa se sellará y se incubará durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador. Después de un lavado 3x con 150 μ l de PBS-T por pocillo, se agregarán 150 μ l de tampón de lectura 2 \times a cada pocillo y la placa se leerá en un lector MESO QuickPlex SQ 120 (Mesocale Discovery).

Los límites inferiores de cuantificación de acuerdo con los certificados de análisis proporcionados con los kits de ensayo son 50pg/ml (A β 40), y 3.13pg/ml (A β 42). El límite inferior de detección se calculará con el software MSD Discovery Workbench de forma automática para cada placa de ensayo, ya que la concentración más baja produce una desviación estándar de tres desviaciones estándar por encima del calibrador cero con la opción "usar estimaciones de error mínimo" activada.

Técnicas y procedimientos para el análisis de la información

Las variables cualitativas se le aplicará frecuencia absoluta y porcentaje; Las variables cuantitativas se resumirán a través de la media y la desviación estándar (DE) una vez comprobado el cumplimiento del supuesto de normalidad a través de la prueba no paramétrica Kolmogorov-Smirnov; de no cumplirse este supuesto se calculará la mediana y el rango intercuartílico (RIC); la razón $A\beta_{42} / A\beta_{40}$ se calculará dividiendo los valores del péptido $A\beta_{42}$ entre los valores del péptido $A\beta_{40}$. Para identificar si existe diferencia de medias entre la razón $A\beta_{42} / A\beta_{40}$ en pacientes con diagnóstico clínico de Enfermedad de Alzheimer y pacientes con presencia demencia por otras causas se realizará la prueba paramétrica Comparación de medias para muestras independientes, previa comprobación de los supuestos de normalidad de las observaciones y homoscedasticidad de las varianzas (a través de la Prueba de Levene).

La sensibilidad y la especificidad para el diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer se determinarán mediante curvas ROC (Receiver Operating Characteristic). También se calculará el punto de corte de máxima precisión diagnóstica para cada parámetro analítico mediante el índice de Youden.

Para todas las pruebas de hipótesis se empleará un nivel de significación del 5%.

Tabla 2 Recursos Humanos participantes. Salario

Se deben relacionar todos los que participan en los proyectos, así como los datos que se detallan en la siguiente tabla, por año.

Investigador (Nombre y Apellidos)	Categoría ocupacional	Categoría Científica, docente o tecnológica	Institución a que pertenece	% de participación	Salario Mensual
Eneida Barrios Lamoth	Médico especialista Profesor Universitario	Investigador Agregado Profesor Asistente	LABCEL	80	6140
José Pedro Martínez Larrarte	Médico especialista Profesor Universitario	Máster Profesor auxiliar Investigador auxiliar	LABCEL	40	7050

Silvia María Pozo Abreu	Médico especialista Profesor Universitario	Máster Investigador Agregado Profesor Asistente	Hospital Clínico Quirúrgico Docente "Diez de Octubre"	40	6140
Roberto Rosendo Quesada Guillén	Licenciado en bioquímica Profesor Universitario	Máster Profesor Asistente	Hospital Clínico Quirúrgico Docente "Miguel Enríquez"	20	4900
José Carlos Rivero Oliva	Estudiante 2do año .Medicina	-	Facultad de Ciencias Médicas "Miguel Enríquez"	20	-
Yeyson Gioldis Martínez Rojas	Estudiante 3er año .Medicina	-	Facultad de Ciencias Médicas "Miguel Enríquez"	20	-

RESULTADOS Y PLANIFICACIÓN DE LAS ACTIVIDADES PRINCIPALES: (CRONOGRAMA)

Se planifican las actividades principales por resultados y entidad responsable con indicadores verificables

RESULTADOS Y PLANIFICACIÓN DE LAS ACTIVIDADES PRINCIPALES (CRONOGRAMA)

Resultados Planificados	Entidad Responsable	Actividades Principales	Inicio	Término	Indicadores verificables
Firma del Convenio de colaboración con la universidad Alemana de Goettingen	Facultad de Ciencias Médicas "Miguel Enríquez", Universidad de Ciencias médicas de la Habana y MINSAP	1. Elaboración del convenio 2. Presentación a las entidades responsables 3. Autorización por las entidades responsables	Enero 2022	Agosto 2023	Documento oficial de la firma del convenio

Llegada de reactivos e instalación en LABCEL de los equipos para realización de inmunoensayo de dos pasos	Facultad de Ciencias Médicas "Miguel Enríquez", LABCEL	<ol style="list-style-type: none"> 1. Envío de equipos y reactivos desde Alemania 2. Llegada a Cuba 3. Traslado del aeropuerto 4. Instalación en LABCEL 	Septiembre 2023	Febrero 2024	Funcionamiento y utilización de equipos en LABCEL
Entrenamiento en la técnica a desarrollar en el proyecto	LABCEL	<ol style="list-style-type: none"> 1. Reproducir la técnica por personal de Labcel con asesoramiento de la universidad alemana de Goettingen 	Septiembre 2023	Febrero 2024	Obtención de resultados
Selección de los Pacientes y extracción de las muestras de sangre	LABCEL	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención del consentimiento informado de los participantes en el estudio 2. Realización de la punción venosa en el antebrazo 	Febrero 2024	Febrero 2027	Muestras de plasma con EDTA debidamente rotuladas y almacenadas en alícuotas de 500 µl en tubos de polipropileno a -80°C.
Procesamiento de las muestras	LABCEL	<ol style="list-style-type: none"> 1. Realización de inmunoensayo de dos pasos 2. Vaciamiento de los resultados en Base de datos 	Febrero 2027	mayo 2027	Base de datos
Procesamiento estadístico de los datos	LABCEL	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aplicación de estadística descriptiva e inferencial 	Mayo 2027	Julio 2027	Base de datos

Redacción y discusión del informe final	LABCEL		Julio 2027	Septiembre 2027	Informe Final	
---	--------	--	------------	-----------------	---------------	--

PLANIFICACIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LAS ETAPAS DEL PROYECTO: Cada etapa del proyecto o unidad temporal en la planificación del mismo, se caracteriza por el método de investigación empleado y se conforma por un conjunto de tareas para las cuales se planifican los recursos humanos, financieros y materiales, y se define el resultado y las salidas que lo avalan.

Etapa	Fecha inicio	Fecha Terminación	Tareas	Recursos Humanos Instituciones Participantes	Recursos Financieros	Recursos Materiales	Resultados	Salidas

IV.RECURSOS DEL PROYECTO

Experiencia del Jefe del proyecto relacionada con el objetivo principal del proyecto (No más de 200 palabras)

La Jefa del proyecto es doctora en medicina, especialista en MGI e Inmunología. Trabaja en el Laboratorio central de líquido cefalorraquídeo (LABCEL), donde se desempeña como investigadora, por lo que participa en otros proyectos de investigación que se ejecutan en este centro. Desde el punto de vista asistencial realiza la cuantificación de inmunoglobulinas en LCR por ELISA, entre otras técnicas, para la elaboración del Reibergrama, estudio único de su tipo en el país para pacientes con procesos neuroinflamatorios o degenerativos del SNC. Ha publicado artículos tanto en revistas nacionales como internacionales abordando temáticas de la respuesta inmunológica en el LCR.

RECURSOS MATERIALES E INFRAESTRUCTURA DISPONIBLE Y/O REQUERIDA POR LAS ENTIDADES PARTICIPANTES PARA EJECUTAR EL PROYECTO

En LABCEL contamos con la siguiente infraestructura que permite el desarrollo de la investigación

- Lector de ELISA
- Balanza digital

- Medidor de ph
- Centrífuga
- Nevera para almacenar reactivos
- Computadoras con el software necesario para el procesamiento de la información
- Cristalería
- El laboratorio posee adecuadas condiciones de iluminación, se encuentra climatizado.
- Mesetas de acero inoxidable que permiten el procesamiento de muestras biológicas
- Espacios en mesetas con acceso a corriente eléctrica(110V-220V) que permite la instalación de nuevos equipos

RECURSOS MATERIALES REQUERIDOS

REACTIVO	U.M	PRECIO		CANTIDAD	IMPORTE	
		MLC	MN		MLC	MN
Puntas amarillas 20-200 µL	1000 U		240	1000 U		2240
Puntas azules 200-1000 µL	1000 U		240	1000 U		2240
Guantes quirúrgicos	1caja /50 pares		790	4		3160
Viales eppendorf 1.5 mL (paquete)	1000 U		42.46	1000 U		2242.46
Jeringuillas desechables, 5 mL, 10mL,	100 U	8.20		450 U	36.92	
Agujas	100 U	2.31		450 U	10.43	
Tubos para colección de sangre venosa de 9ml K3E EDTA	50 U	35.90		150	107.7	
Kit para péptido Aβ panel 1 (Aβ38, Aβ40, Aβ42) V-PLEX (6E10) para ECL (electro quimioluminiscencia)	1 placa de 96 pocillos	700		2	1400	
Perlas magnéticas Dynabeads™ M-280 Sheep Anti-Mouse IgG (6 × 10 ⁸ -7 × 10 ⁸ beads/ml)	2 ml	449		4	1796	
Anticuerpo monoclonal contra amiloide Beta A4 (N-Terminal)	100 µg	371		1	371	

Para preparar buffer concentrado de inmunoprecipitación:						
1. HEPES	25 g	46.93		1	46.93	
2. Igepal CA630	100 ml	88.69		1	88.69	
3. complete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail	Frasco x 25 tab	182.88		2	365.76	
Bicine	25 g	25.37		2	50.74	
CHAPS	5 G	167.46		1	167.46	
Trietanolamina	100 ml	27.65		1	27.65	
Total						9882.46

EQUIPO	U.M	PRECIO en MLC	CANTIDAD	IMPORTE
Lector MESO Quick Plex SQ 120 para electro quimioluminiscencia (ECL)(Mesocale Discovery)	1	2000	1	2000

Equipamiento que se debe adquirir a través de firma de convenio de cooperación con la Universidad alemana de Göttingen

Tabla 4. Viajes y Dietas por año de duración del Proyecto Año _____

Actividad	Lugar	Pasaje	Dieta (Alojamiento y alimentación)	Cant. de Días	Total Dieta (4)*(5)	Total pasaje y dietas/ participante (3)+(6)	Participantes	Total (7)*(8)
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
							Total	

Para el cálculo de las dietas se considerarán los montos establecidos por el MFP de 70 pesos para Alimentación (10-Desayuno, 30-Almuerzo y 30-Comida), 70 pesos para Hospedaje más el costo de la transportación.

Tabla 5. Subcontrataciones. Año _____

Institución que se subcontrata	Servicio Subcontratado	Costo

Presupuesto del Proyecto

MODELO DE PRESUPUESTO GLOBAL DEL PROYECTO

Tabla 6. Presupuesto Global del Proyecto

PRESUPUESTO GLOBAL DEL PROYECTO								
Concepto	Año 1ero		Año ____		Año ____		Total	
	CUP	CUC/ML C	CUP	CUC/ML C	CUP	CUC/ML C	CUP	CUC/ML C
Salario (1)	44949.88	-	44949.88	-	44949.88	-	134849.6 4	-
Otras retribuciones (2)	-	-	-	-	-	-	-	-
Salario complementario (9,09 % del salario total anual) (3)	12257.83		12257.83		12257.83		36773.49	
Subtotal (4)	57207.71	-	57207.71	-	57207.71	-	171623.1 3	-
Seg. Social (hasta 14% del total de los salarios) (5)	8009.07	-	8009.07	-	8009.07	-	24027.21	-
10% de impuestos por la utilización de la fuerza de trabajo (6)	5720.77	-	5720.77	-	5720.77	-		-
Recursos materiales (7)	9982.46	5585.16	-	-	-	-	9982.46	5585.16
Subcontrataciones (8)	-	-	-	-	-	-	-	-
Otros recursos (9)	-	-	-	-	-	-	-	-
Subtotal (10)	23712.3	5585.16	13729.84	-	13729.84	-	51171.98	5585.16
Total Gastos Corrientes Directos (11)	80920.01	-	80920.01	-	80920.01	-	242760.0 3	-
Gastos de Capital (12)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gastos Indirectos (13)	28603.85	-	28603.85	-	28603.85	-	85811.56	-
Total de Gasto (14)	109535.5 6	-	109535.5 6	-	109535.56	-	328597.6 8	-
Aporte al Conocimiento (15)	16430.33							
Ganancia (16)	10953.55							
Total Gastos del Proyecto (17)= 14+15+16	136919.4 4							

VI. Análisis de pre factibilidad técnico-económica y de mercado

En los proyectos aplicados o de desarrollo se expondrá la información incluyendo la base de cálculo y los datos que permitan valorar la efectividad económica de la futura implementación de los resultados esperados, así como un estudio del mercado al que se pudiera transferir y utilizar sus resultados.

Factores que aseguran la sostenibilidad de los resultados del proyecto.

Es fundamental demostrar que una vez concluido el proyecto existirán todas las condiciones necesarias para que se apliquen, mantengan o incrementen sus beneficios en las diferentes esferas (económicas, tecnológicas, medioambientales, sociales, etc).

VII. Referencias Bibliográficas utilizadas en el proyecto

Referencias bibliográficas

1. Lawrence E, Vegvari C, Ower A, Hadjichrysanthou C, De Wolff, Anderson RM. A Systematic Review of Longitudinal Studies Which Measure Alzheimer's Disease Biomarkers. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017; 59: 1359–1379. DOI 10.3233/JAD-170261.
2. Morgan AR, Touchard S, Leckey C, O'Hagan C, Nevado-Holgado AJ, Barkhof F, et al. Inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease plasma. *Alzheimer's & Dementia*. 2019; 15: 776-787. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.03.007>
3. González Rodríguez VM, Martín Martín C, Martín Prieto M, González Moneo MJ, García de Blas González F, Riu Subirana S. La enfermedad de Alzheimer. *SEMERGEN*. 2004;30(1):18-33.
4. Organización Mundial de la Salud. Plan de acción sobre salud mental 2013-2020. Consultado [11 Dic 2019]. Disponible en: www.who.int/mental_health.
5. Zetterberg H, Burnham SC. Blood-based molecular biomarkers for Alzheimer's disease. *Molecular Brain*. 2019; 12(26):1-7. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0448-1>.
6. Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafreda SG, Huntley J, Ames D, et al. Dementia prevention, intervention, and care. *The Lancet Commissions*. 2017; 390: 2673-2734.
7. Lashley T, Schott JM, Weston P, Murray CE, Wellington H, Keshavan A, et al. Molecular biomarkers of Alzheimer's disease: progress and prospects. *The Company of Biologists Ltd | Disease Models & Mechanisms*. 2018; 11:1-9. <https://doi.org/10.1242/dmm.031781>.
8. Llibre-Rodríguez JJ, Valhuerdi-Cepero A, López-Medina AM, Noriega-Fernández L, Porto-Álvarez R, Guerra-Hernández MA, et al. Cuba's Aging and Alzheimer Longitudinal Study. *MEDICC Review*. 2017, 19(1): 31-35.
9. Shahpasand-Kroner H, Klafki H W, Bauer C, Schuchhardt J, Hüttenrauch M, Stazi M, et al. A two-step immune assay for the simultaneous assessment of A β 38, A β 40 and A β 42 in human blood plasma supports the A β 42/A β 40 ratio as a promising biomarker candidate of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*. 2018, 10:121. <https://doi.org/10.1186/s13195-018-0448-x>
10. Bosch Bayard RI, Fernández Seco AE, Llibre Rodríguez JJ, Zayas Llerena T, Hernández Ulloa E, Rodríguez Blanco AL. Cuba implementa el Plan global de acción para la demencia aprobado por la Organización Mundial de la Salud 2017. *Rev habancien méd* [Internet]. [citado 11 Dic 2019]; 2019;18(3):529-538. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2120>