



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL REGIONAL DE ALTA ESPECIALIDAD “DR. IGNACIO MORONES PRIETO”

Trabajo de investigación para obtener el diploma en la subespecialidad de
Neurología Pediátrica

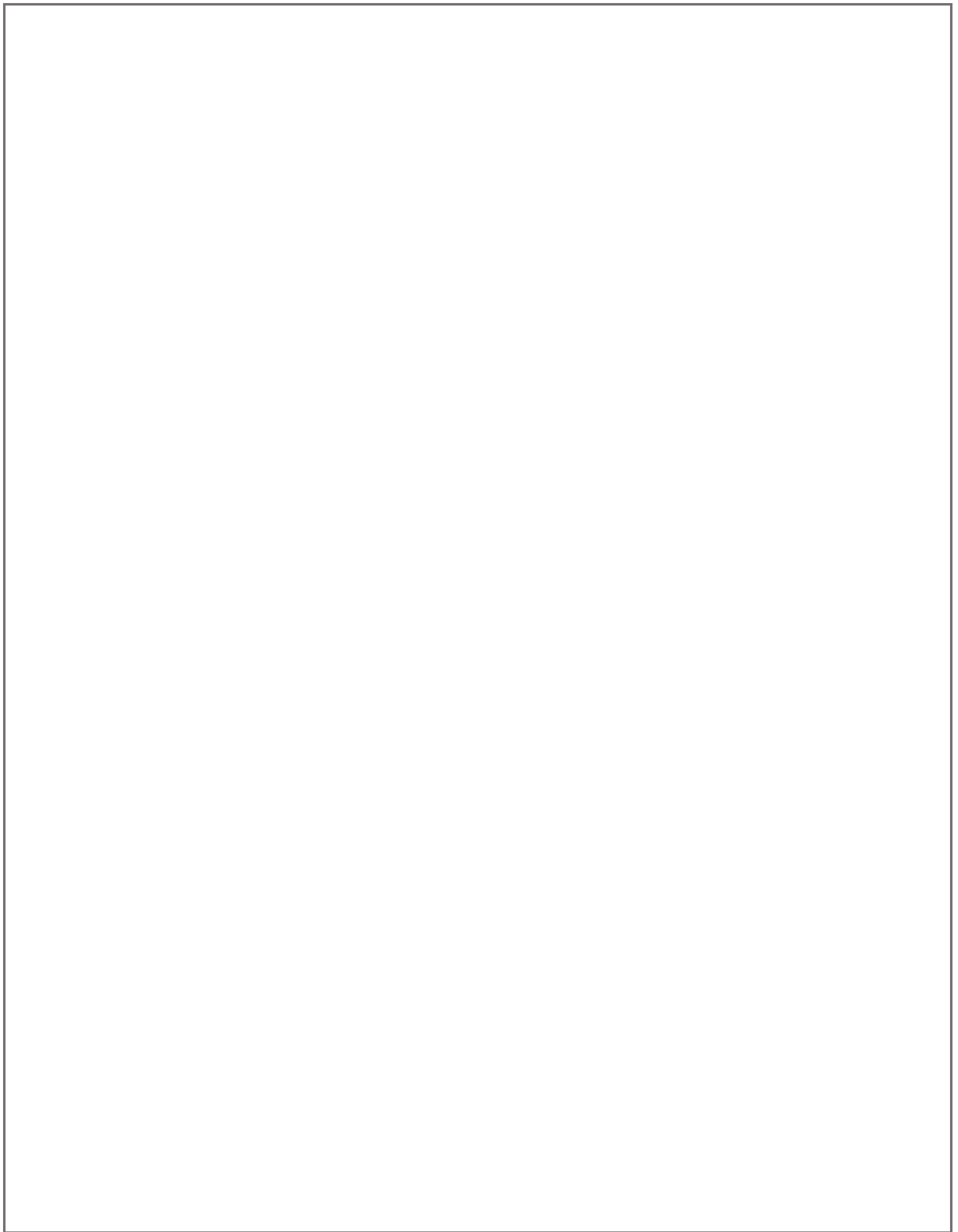
Caracterización del biomarcador neurológico proteína básica de mielina mediante espectroscopía Raman para futuras aplicaciones en diagnóstico y pronóstico de enfermedades neurológicas.

Sergio Ugarte Anchondo

DIRECTOR CLÍNICO
Dr. Antonio Bravo Oro
Subespecialista en Neurología Pediátrica

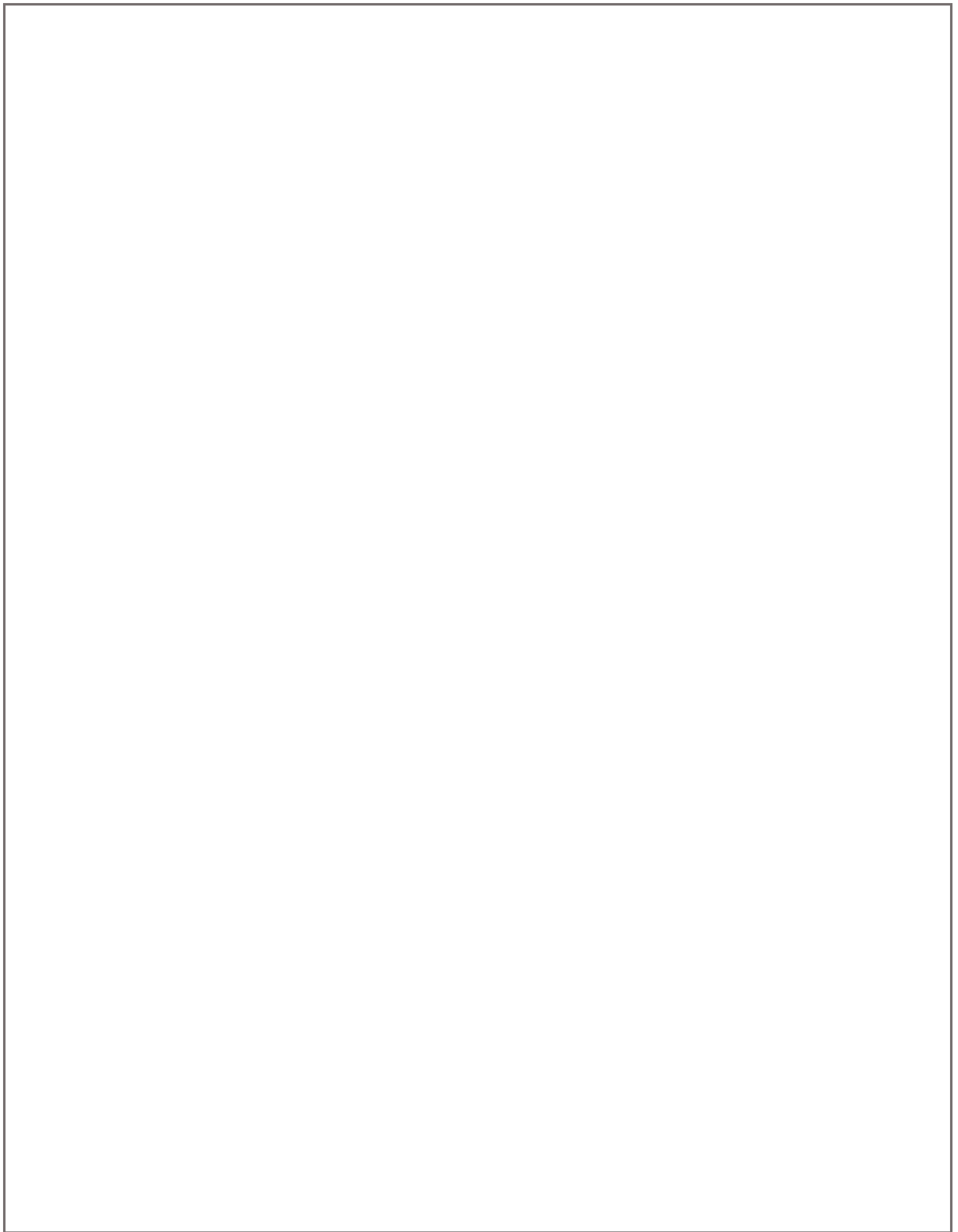
DIRECTOR METODOLÓGICO
Dra. Alejandra Ortiz Dosal
Doctorado en Ingeniería y Ciencia de Materiales

Febrero 2026





Caracterización del biomarcador neurológico proteína básica de mielina mediante espectroscopía Raman para futuras aplicaciones en diagnóstico y pronóstico de enfermedades neurológicas. © 2026 por Sergio Ugarte Anchondo se distribuye bajo Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International. Para ver una copia de esta licencia, visite <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL REGIONAL DE ALTA ESPECIALIDAD “DR. IGNACIO MORONES PRIETO”

Trabajo de investigación para obtener el diploma en la subespecialidad de
Neurología Pediátrica

Caracterización del biomarcador neurológico proteína básica de mielina mediante espectroscopía Raman para futuras aplicaciones en diagnóstico y pronóstico de enfermedades neurológicas.

Sergio Ugarte Anchondo

No. de CVU del CONACYT: 1139214 Identificador de ORCID: 0000-0002-3731-2791

DIRECTOR CLÍNICO

Dr. Antonio Bravo Oro

No. de CVU del CONACYT; Identificador de ORCID

DIRECTOR METODOLÓGICO

Dra. Alejandra Ortiz Dosal

No. de CVU del CONACYT: 290231; Identificador de ORCID: 0000-0002-0536-4394

SINODALES

Poner aquí grado y nombres completos
Presidente

Poner aquí grado y nombres completos
Sinodal

Poner aquí grado y nombres completos
Sinodal

Resumen.

Antecedentes: La espectroscopía Raman es una técnica óptica que permite identificar moléculas a partir de su huella vibracional característica, ofreciendo información sobre la estructura y composición de las proteínas sin necesidad de marcadores o procedimientos destructivos. En el ámbito biomédico, ha demostrado utilidad para analizar proteínas como la proteína básica de mielina, detectando cambios estructurales asociados a procesos de daño neuronal o desmielinización.

El uso de la espectroscopía Raman para medir proteína básica de mielina en líquido cefalorraquídeo representa una herramienta innovadora para el diagnóstico temprano de lesiones cerebrales y desmielinización, ofreciendo una alternativa complementaria a estudios con radiación como la tomografía, y contribuyendo al desarrollo de métodos diagnósticos más seguros y rápidos en neurología pediátrica.

Objetivo: Identificar y caracterizar espectroscópicamente la proteína básica de mielina en una muestra de líquido cefalorraquídeo normal mediante espectroscopía Raman.

Estudio experimental descriptivo in vitro.

Universo: Se recabará una muestra única de líquido cefalorraquídeo en un paciente con físico-citoquímico normal y cultivo negativo, al cual se le solicite la muestra como parte de un proceso diagnóstico o terapéutico. Se utilizará el remanente de la muestra posterior a su análisis. No se realizarán procedimientos invasivos adicionales al paciente.

Conclusión: Se determinó el espectro de la proteína básica de mielina mediante espectroscopía Raman y SERS en concentraciones clínicamente relevantes. El uso de razones espectrales y análisis diferencial es clave para discriminar el efecto de proteína básica de mielina frente al fondo del líquido cefalorraquídeo. Los resultados no permiten afirmar identificación específica de MBP, pero sí demuestran sensibilidad del método a su incorporación.

Palabras clave: Espectroscopía Raman, proteína básica de mielina, líquido cefalorraquídeo

ÍNDICE

	Página
Resumen.....	1
Índice.....	2
Lista de cuadros.....	3
Lista de figuras.....	4
Lista de abreviaturas.....	5
Lista de definiciones.....	6
Dedicatorias.....	7
Reconocimientos.....	8
Antecedentes.....	9
Justificación.....	16
Hipótesis.....	17
Objetivos.....	17
Sujetos y métodos.....	18
Análisis estadístico.....	21
Ética.....	27
Resultados.....	28
Discusión.....	42
Limitaciones y/o nuevas perspectivas de investigación.....	44
Conclusiones.....	45
Bibliografía.....	46
Anexo 1 (Autorización del Comité de Ética).....	50
Anexo 2 (Autorización del Comité de Investigación).....	51

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. (Variables).....	20
Cuadro 2. (Concentraciones de MBP para los experimentos de espectroscopía Raman y SERS).....	21
Cuadro 3. (Pregunta PICO).....	22
Cuadro 4. (Cronograma).....	24
Cuadro 5. (Bandas características del espectro Raman de la Proteína Básica de Mielina).....	30
Cuadro 6. (Asignación de bandas en el espectro de líquido cefalorraquídeo).....	32
Cuadro 7. (Bandas obtenidas en el experimento SERS spike-in C7 a C11 +LCR).....	35
Cuadro 8. (Comparación entre los diferentes espectros SERS obtenidos).....	39

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. (Espectro Raman de la proteína básica de mielina humana en solución acuosa.....)	28
Figura 2. (Espectro Raman de la proteína básica de mielina en solución acuosa, a concentraciones decrecientes))	29
Figura 3. (Espectro SERS de la proteína básica de mielina en solución acuosa).....)	29
Figura 4. (Espectro Raman de líquido cefalorraquídeo.).....)	31
Figura 5. (Experimentos spike-in. Espectro Raman (negro) y SERS (rojo) de la proteína básica de mielina en concentraciones decrecientes en líquido cefalorraquídeo.)	38
Figura 6. (Razones espectrales $I(1534)/I(1423)$, $I(1534)/I(1312)$ e $I(1584)/I(1442)$)	41

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- **TCE:** Traumatismo craneo encefálico.
- **EM:** Esclerosis múltiple.
- **NMO:** Neuromielitis óptica.
- **EMDA:** Encefalomiелitis diseminada aguda
- **TAC:** Tomografía axial computarizada.
- **MBP:** Proteína básica de mielina.
- **RS:** Espectroscopia Raman
- **SERS:** Espectroscopia Raman mejorada por superficie.
- **LCR:** Líquido cefalorraquídeo
- **AgNP:** Nanopartículas de plata.

LISTA DE DEFINICIONES

- **Desmielinización:** proceso patológico adquirido del sistema nervioso central y/o sistema nervioso periférico caracterizado por pérdida o daño de mielina con relativa preservación axonal inicial, demostrable por criterios clínicos, paraclínicos y, cuando existe, apoyo de biomarcadores o histopatología.
- **LCR citoquímico normal:** líquido cefalorraquídeo con recuento celular (sin pleocitosis), proteínas y glucosa dentro de rangos de referencia para la edad, sin datos de inflamación, y sin alteración atribuible a punción traumática (o ya corregida).
- **Muestra remanente de LCR:** porción sobrante del líquido cefalorraquídeo obtenida durante una punción lumbar indicada clínicamente, que no se requiere para la atención del paciente y se conserva para análisis adicional (p. ej., investigación) según protocolo.
- **Huella espectral:** patrón característico de picos Raman (posiciones en cm^{-1} e intensidades relativas) que funciona como una “firma” molecular de una muestra, reflejando su composición y estructura química.

Dedicatorias

Dedicada a mi familia, empezando por mi esposa, Mariana, el ancla que, con su apoyo y desde la distancia, hizo que la residencia fuera fácil de sobrellevar ayudándome a concentrarme en mi aprendizaje. A mis hijos que son gran fuente de motivación para seguir creciendo como persona. A mis padres y mis hermanas que llevan acompañándome desde los inicios. A la familia de mi esposa por tratarme como uno de ellos y adoptarme cuando más lo necesitaba.

Para mi abuelo Francisco, que ya no está aquí físicamente, pero sería el más alegre por ver lo que he logrado, le dedico todos mis triunfos y siempre lo llevo en mi corazón.

A mis maestros de la neurología pediátrica por su apoyo y creer siempre en mí y mis compañeros.

Agradecimientos

Para mis maestros:

Al Dr. Antonio Bravo que más que impulsarme a estudiar diario y ser un médico de excelencia también me enseñó a crecer como persona, ser amable y agradecido, un maestro del que nunca dejaré de aprender en todos los ámbitos de la vida.

Al Dr. Jorge Luis García quien con sabiduría y justicia lidera nuestro servicio, gracias por su confianza y las enseñanzas, también por ser un formador de grandes neurólogos pediatras que se ve cuando uno voltea a ver a las generaciones anteriores a la nuestra.

Al Dr. Juan José Morales quien fue quien despertó este gusto por esta hermosa rama de la pediatría, mi primer maestro de la neurología pediátrica y un gran amigo.

A la Dra. Alejandra Ortiz, el Dr. Samuel Kolosovas y a su grupo de trabajo que sin su apoyo esta investigación no hubiera sido posible, su entusiasmo por la investigación y por crear un mundo mejor son dignos de admiración.

Para mis compañeros de residencia:

De mi generación, de generaciones pasadas y las próximas, por siempre apoyarnos el uno al otro, por crear esta familia y red de apoyo, por aprender tanto de ustedes y con ustedes.

Para mi familia:

Mi esposa Mariana, por siempre confiar en mí, por apoyarme en todo lo que he hecho desde que le conozco, por ser la voz de la razón en mi cabeza, mi ayuda idónea y mi complemento que me hace mejor persona.

A Marcelo, porque no sabes cuanto he aprendido yo de ti, más de lo que yo te pudiera enseñar, eres una gran fuente de inspiración y mi confidente.

A Nicolás, aunque aún no hayas nacido ya causaste un gran impacto en mí, eres una de las razones por las que me esfuerzo para ser mejor persona.

Mi papá, mi mamá y mis hermanas por hacerme la persona en la que me estoy convirtiendo, por apoyarme desde el principio con todo lo que tuvieron a su alcance para que yo lograra mis éxitos.

A mis abuelos por siempre procurarme y desearme siempre lo mejor. Por su apoyo y su gran amor durante toda esta etapa.

A mis amigos los cuales considero mis hermanos, por distraerme de lo cotidiano y divertirme a pesar de la distancia.

1. Antecedentes.

Traumatismo craneoencefálico

El traumatismo craneoencefálico (TCE) sigue siendo de las principales causas de morbimortalidad en la infancia y adolescencia a nivel mundial. Se estima que cada año ocurren entre 200 y 500 casos por cada 100,000 niños, siendo más frecuentes en varones y en edades escolares, particularmente como consecuencia de caídas, accidentes automovilísticos y lesiones no accidentales(1,2).

A diferencia del TCE en adultos, el cerebro infantil se encuentra en desarrollo estructural y funcional, lo que lo vuelve más susceptible a lesiones difusas y a consecuencias neurocognitivas a largo plazo. En etapas tempranas, la manifestación clínica puede ser inespecífica, especialmente en lactantes, donde los signos de hipertensión intracraneal, hemorragia o edema cerebral pueden no estar presentes inicialmente(3).

El diagnóstico de TCE moderado o grave suele apoyarse en técnicas de neuroimagen, particularmente la tomografía computarizada (TAC) de cráneo. No obstante, existe controversia respecto a su uso en TCE leve o moderado, donde la probabilidad de encontrar lesiones clínicamente significativas es baja, pero donde la TAC sigue siendo frecuentemente utilizada de forma preventiva, exponiendo a los pacientes pediátricos a radiación ionizante que podría aumentar el riesgo de cáncer en el futuro(4).

Dada esta problemática, existe un interés creciente en la identificación de herramientas diagnósticas complementarias, rápidas y seguras, que permitan detectar daño cerebral sin necesidad de recurrir sistemáticamente a la neuroimagen. En este contexto, los biomarcadores moleculares han emergido como una opción prometedora para estratificar riesgo, guiar decisiones clínicas y eventualmente reducir el uso innecesario de la TAC(5,6).

Biomarcadores neurológicos en traumatismo craneoencefálico pediátrico.

El avance en la comprensión molecular del daño cerebral ha dado paso al desarrollo de biomarcadores neurológicos con aplicación diagnóstica, pronóstica y terapéutica. Particularmente en el contexto del TCE, diversas proteínas neuronales han sido propuestas como reflejo del tipo y extensión de la lesión. Una de ellas es la proteína básica de mielina (MBP). (5,6)

MBP (Myelin Basic Protein) es un componente estructural clave de la mielina en el sistema nervioso central. Su liberación en el contexto de desmielinización o daño axonal lo convierte en un marcador de afectación de sustancia blanca. Aunque ha sido más estudiada en enfermedades como esclerosis múltiple, su participación en TCE ha cobrado interés creciente, especialmente en lesiones axonales difusas, la cual, es difícil de observarse en una tomografía simple de cráneo (6).

Gil-Jardiné et al. (2023), en guías clínicas recientes para el manejo del TCE leve, resaltan que, aunque la TAC sigue siendo el estándar de imagen, es necesario identificar herramientas complementarias que permitan estratificar mejor el riesgo de lesión cerebral significativa, especialmente en pacientes pediátricos. En este sentido, el desarrollo de pruebas rápidas basadas en biomarcadores podría evitar hasta un 30% de las TAC realizadas actualmente, según estimaciones conservadoras (7,8).

El uso de biomarcadores en combinación con algoritmos clínicos ha demostrado mejorar la precisión del diagnóstico, reducir la exposición a radiación y optimizar recursos hospitalarios. No obstante, su implementación aún requiere estandarización de métodos de detección, tiempos de respuesta rápidos y validación de firmas moleculares específicas, condiciones en las que técnicas como la espectroscopía Raman podrían tener un papel fundamental. (6-9)

Fundamentos y aplicaciones de la espectroscopía Raman en biociencias

La espectroscopía Raman es una técnica analítica basada en la dispersión inelástica de la luz, descubierta por C. V. Raman en 1928, que permite obtener información sobre la estructura molecular y los enlaces químicos presentes en una sustancia. Cuando un haz de luz monocromática (generalmente láser) incide sobre una muestra, la mayoría de los fotones se dispersan elásticamente (efecto Rayleigh), pero una fracción muy pequeña sufre dispersión inelástica, generando un cambio en la energía que se registra como desplazamiento Raman (9).

Este desplazamiento es característico de los modos vibracionales de la molécula, y por tanto constituye una especie de “huella espectral” única de cada sustancia. A diferencia de otras técnicas como la espectroscopía infrarroja, la espectroscopía Raman puede aplicarse en medios acuosos, tiene baja interferencia con el agua, y no requiere etiquetas fluorescentes, lo que la hace ideal para analizar sistemas biológicos en condiciones casi fisiológicas (10).

En las últimas décadas, la espectroscopía Raman se ha consolidado como herramienta en diversas disciplinas de las ciencias biomédicas, incluyendo el análisis de tejidos, detección de cáncer, estudio de células vivas, seguimiento de interacciones fármaco-receptor y caracterización estructural de proteínas. Su sensibilidad a los enlaces amida, residuos aromáticos (como tirosina y fenilalanina), y grupos funcionales polares, permite distinguir entre estructuras secundarias como alfa-hélice y lámina beta, lo cual es especialmente útil en el estudio de proteínas con agregación patológica o desnaturalización (11,12).

También se ha utilizado la técnica de RS en el estudio de diferentes enfermedades neurodegenerativas (13), por ejemplo, en la determinación de diferencias espectrales en el plasma de pacientes con Alzheimer de inicio temprano, tardío y demencia de cuerpos de Lewy(14); en el análisis de vesículas extracelulares de pacientes con y sin enfermedad de Parkinson(15), en la caracterización de membranas plasmáticas de fibroblastos aislados de pacientes con enfermedad de Huntington (16) y en la médula

espinal en un modelo animal de esclerosis lateral amiotrófica(17). La técnica ha demostrado ser sensible, rápida y no destructiva.

Muchos trastornos del sistema nervioso central se derivan de cambios patológicos en la estructura de la mielina. Estos pueden categorizarse en dismielinización, cuando la mielina está malformada y defectuosa, y desmielinización, cuando la mielina inicialmente normal se destruye. Las condiciones dismielinizantes, también conocidas como leucodistrofias, generalmente tienen un fuerte componente genético y, por lo tanto, las alteraciones neurológicas aparecen de forma temprana. La disfunción de la mielina en las condiciones dismielinizantes puede ser causada por la falta de algún constituyente particular de la mielina, por ejemplo, de la proteína proteolipídica 1 en la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, retraso en la mielinización, como en el síndrome de Allan-Herndon-Dudley que presenta mutaciones en el gen SLC16A2 que codifica un transportador de la hormona tiroidea, o errores metabólicos, como en la enfermedad de Canavan, que es causada por mutaciones en el gen ASPA que codifica la aspartoacilasa, una enzima enriquecida en oligodendrocitos. Los trastornos desmielinizantes, como la esclerosis múltiple (EM), la neuromielitis óptica y la encefalomiелitis diseminada aguda, suelen presentarse en adultos y pueden estar causados por procesos autoinmunes e infecciones, con la contribución de factores genéticos, ambientales y dietéticos. Además, otras afecciones, como las leucoencefalopatías genéticas y ciertos trastornos metabólicos, también presentan defectos de mielinización, aunque las alteraciones de la mielina se producen tras un desarrollo neuronal anormal, pérdida neuronal y profundas anomalías sistémicas. Trastornos como el autismo, la esquizofrenia y el síndrome de Williams-Beuren se han asociado recientemente con la hipomielinización, lo que revela nuevas funciones de los oligodendrocitos y la mielina en el desarrollo del sistema nervioso(18).

Además, se han desarrollado variantes como la espectroscopía Raman mejorada por superficie (SERS), que incrementa la señal mediante la interacción de la muestra con nanopartículas metálicas, permitiendo detección en concentraciones ultra bajas. Esta variante mejora la intensidad de señal entre 10^3 y 10^6 veces gracias al efecto de resonancia superficial plasmónica generado por metales como el oro o la plata en contacto con la muestra.

No obstante, incluso sin SERS, la espectroscopía Raman convencional ofrece una plataforma poderosa para análisis bioquímicos rápidos y reproducibles. (19,20)

La aplicación en el estudio de biomarcadores asociados al traumatismo craneoencefálico, como MBP, es aún un método diagnóstico que trata de abrirse camino en las enfermedades neurológicas y un aspecto prometedor que podría tener un futuro revolucionario en el abordaje de estas. (15)

Dado que la proteína que será caracterizada en este estudio (MBP) presenta residuos aromáticos y grupos amida, su análisis mediante espectroscopía Raman con SERS es altamente prometedor para obtener firmas espectrales más intensas y específicas. Esta técnica podría ser clave para construir una base de datos espectral aplicable a futuros

métodos de diagnóstico molecular e incluso utilizarse en patologías neurológicas fuera del contexto de un TCE. (6,9)

Estado actual de la caracterización espectroscópica de MBP.

Aunque la espectroscopía Raman ha sido ampliamente utilizada para estudiar biomoléculas, son escasos los estudios que han caracterizado de forma sistemática proteínas neuroespecíficas relacionadas con daño cerebral como MBP. La mayoría de los trabajos se centran en proteínas amiloides, estructuras celulares completas o tejidos cerebrales, mientras que la caracterización individual de biomarcadores purificados sigue siendo una línea emergente de investigación. (6-9)

MBP

La MBP es una proteína estructural esencial para la firme compactación de la vaina de mielina del sistema nervioso central. Esta proteína presenta una multitud de isoformas generadas tanto por empalme alternativo complejo como por una gran cantidad de modificaciones postraduccionales. La isoforma MBP de 18.5 kDa, el principal componente de la vaina de mielina, es una proteína intrínsecamente no-estructurada, con una alta proporción (cerca de 75%) de estructuras tipo “random coils”, pero con elementos centrales de alfa-hélices y láminas beta. La MBP es uno de los principales autoantígenos de la vaina de mielina, y está implicada en la esclerosis múltiple (EM), una enfermedad inflamatoria desmielinizante humana caracterizada por la degradación activa de la vaina de mielina y en modelos animales de trastornos neurológicos autoinmunes. Las modificaciones postraduccionales de la MBP pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de la EM, por ejemplo, La diseminación de arginina se produce en varios sitios y se asocia a un aumento en la EM. El grado de diseminación (o citrulinación) de la MBP se correlaciona con la gravedad de la EM(21,22).

La MBP ha sido estudiada en modelos de desmielinización mediante técnicas espectroscópicas como Raman y CARS. Estudios en tejidos animales evidencian diferencias significativas en bandas lipídicas y proteicas asociadas a desmielinización. Sin embargo, no existen referencias que documenten espectros de MBP purificada bajo condiciones controladas, como concentración, pH o interacción con nanopartículas metálicas. (16-18)

Espectroscopía vibracional y TCE

Recientemente, Stevens et al. (2022) llevaron a cabo una revisión sistemática sobre la utilidad de la espectroscopía Raman como herramienta de neuromonitorización en TCE. Este estudio destacó la capacidad de Raman para identificar alteraciones metabólicas y estructurales en el cerebro, así como su potencial para detectar biomarcadores en fluidos biológicos. Aun así, los autores reconocen que la aplicación clínica de esta técnica aún se encuentra en etapas tempranas y que la falta de estándares moleculares limita su adopción. (23)

De manera similar, un estudio publicado por Harris et al. (2023) presentó perfiles espectrales Raman de un panel de 18 biomarcadores relevantes en TCE, incluyendo

proteínas como Tau. Los resultados mostraron la viabilidad de esta técnica para diferenciar perfiles moleculares asociados a distintas fases de la lesión cerebral. No obstante, la caracterización detallada otros marcadores como MBP, continúa siendo un vacío en la literatura. (24)

Investigaciones recientes han profundizado en la utilidad de la espectroscopía Raman para estudiar los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a enfermedades cerebrales, incluyendo neuroinflamación y estrés oxidativo. Estas aplicaciones refuerzan el valor de la técnica para el estudio no invasivo de biomoléculas clave en procesos neuropatológicos. (25)

Antecedentes de investigación en esta área

Algunos estudios anteriores han utilizado diferentes técnicas de RS en la evaluación de enfermedades neurológicas y en el análisis de MBP.

En un estudio relativamente reciente, Lariosa et al., 2022 utilizaron una plataforma ELISA de resonancia Raman mejorada (RRS) para evaluar un modelo de mielinización neonatal en ratas. El tratamiento de crías de rata con T4 aumentó significativamente los niveles de MBP en comparación con los de los grupos tratados con vehículo después de 6 a 9 días de administración. Los autores administraron hormonas tiroideas (T4) por 6-9 días y evaluaron el efecto promielinizante de T4 mediante la cuantificación de MBP en lisados cerebrales de crías de rata. El uso de la plataforma ELISA + RRS fue de utilidad y mostró resultados consistentes y reproducibles al lograr la identificación y cuantificación de MBP en el tejido cerebral. Esto es particularmente difícil, ya que la técnica de ELISA, aunque ofrece ventajas al compararla con técnicas convencionales (Western blot e IHC) en cuanto a velocidad, rendimiento y sensibilidad, presenta limitaciones. El tejido cerebral es complejo y contiene componentes "pegajosos" que se unen inespecíficamente a la MBP e interfieren con las mediciones tradicionales de ELISA sándwich debido a la alta señal de fondo inespecífica. La MBP en soluciones diluidas se une al vidrio, al plástico, a ciertas proteínas cerebrales y a los glóbulos rojos. Además, los métodos ELISA convencionales no tienen la sensibilidad suficientemente alta para permitir la detección de las bajas cantidades de MBP en el cerebro de rata en desarrollo. Por ello, los autores desarrollaron un ensayo de ELISA para cuantificar MBP basado en el método directo de detección con reactivos RRS. Este nuevo método permitió superar el problema de la unión no específica y aumentar la sensibilidad de la detección. El RRS-ELISA demostró una mayor sensibilidad que el enfoque de detección estándar y mediciones de MBP más reproducibles. El nivel de proteína MBP en el cerebro de rata se evaluó mediante la prueba RRS-ELISA basada en la cuantificación absoluta de MBP con una curva estándar de MBP purificada. En este estudio no se buscó la caracterización de la proteína MBP de rata mediante RS, sino la cuantificación de la proteína como método de evaluación de la mielinización inducida de manera farmacológica.(18)

El daño a la mielina puede provocar la pérdida de la conducción axonal y parálisis en la esclerosis múltiple y la lesión de la médula espinal. En un modelo animal de desmielinización inducida farmacológicamente, Shi et al. 2011 demostraron que la acroleína, un producto de la peroxidación lipídica, puede causar un daño significativo a la mielina en segmentos aislados de la médula espinal de cobayas. Este daño fue evaluado mediante la detección de la MBP de cobaya con inmunofluorescencia. Se utilizó una técnica especial para evaluar la vaina de mielina en los nodos de Ranvier y regiones paranodales, la dispersión Raman coherente anti-Stokes (CARS). Este marcaje permitió evidenciar el daño a la mielina inducido por acroleína. En este estudio tampoco se utilizó la técnica para describir el espectro de MBP. (26)

De Almeida et al., 2022, determinaron el espectro Raman del nervio ciático de ratas en un modelo animal de daño por compresión (lesión tipo axonotmesis). En este trabajo, la identificación de bandas Raman que corresponden al nervio ciático de rata no coinciden con las que encontramos para la proteína MBP, excepto por la de 1065 cm^{-1} (1073 cm^{-1} en nuestro estudio), atribuida a fosfolípidos, y 1270 cm^{-1} (1282 cm^{-1} en nuestro espectro), atribuida a la región amida III, alfa hélices, aleteo CH₂ en el esqueleto de glicina (1279 cm^{-1}) y las cadenas laterales de prolina (1280 cm^{-1}). (27)

En otro trabajo Wang et al., 2011, se utilizaron análogos murinos recombinantes de dos isoformas de la MBP clásica de 18.5 kDa, como proteínas modelo para comprender mejor la estructura y la función de los isómeros de carga. Esta caracterización incluyó métodos bioquímicos y biofísicos, como la cromatografía de exclusión por tamaño, la calorimetría, la resonancia de plasmones superficiales, la dispersión de rayos X y neutrones de ángulo pequeño, la espectroscopia Raman y de fluorescencia, y el dicroísmo circular de radiación convencional y de sincrotrón, para investigar las diferencias entre estas dos isoformas, tanto desde el punto de vista estructural como en cuanto a las interacciones con ligandos, como la calmodulina, diversos detergentes, análogos de nucleótidos y lípidos. Los resultados aportaron información adicional importante sobre las interacciones entre la MBP y sus ligandos, así como sobre las diferencias en la estructura y función entre los isómeros de carga de la MBP. (22)

En el trabajo de Wang et al., 2011, sí se realizó un análisis, mediante espectroscopia Raman de la conformación de la MBP recombinante murina liofilizada, a diferencia del presente proyecto, en el que analizamos la MBP recombinante humana purificada en solución, tanto en agua desionizada como en líquido cefalorraquídeo. Los espectros Raman en ambos trabajos se excitaron con un láser de 532 nm. El análisis estructural comparando los resultados de ese estudio (el cual, tras la revisión sistemática descrita, es el único que reporta el espectro Raman de la MBP -recombinante murina-) con los del presente proyecto se discutirán en resultados. (22)

Relevancia científica, brecha de conocimiento y pertinencia clínica del estudio.

El traumatismo craneoencefálico (TCE), las enfermedades neurodegenerativas y desmielinizantes en población pediátrica representan un problema clínico urgente por su alta frecuencia, impacto funcional y dificultad diagnóstica, especialmente en los casos leves o moderados donde las manifestaciones clínicas pueden ser inespecíficas y el uso de tomografía computarizada (TAC) sigue siendo frecuente, a pesar de su baja rentabilidad diagnóstica en muchos casos y los riesgos asociados a la radiación ionizante (4,7).

En este contexto, los biomarcadores neuronales como MBP han emergido como herramientas prometedoras para la detección precoz del daño cerebral. Sin embargo, su implementación clínica aún está limitada por la falta de métodos de detección rápidos, accesibles y estandarizados. Las plataformas actuales de detección en suero (inmunoensayos tipo ELISA o inmunocromatografía) requieren infraestructura específica, muestras biológicas, y no siempre permiten distinguir entre diferentes conformaciones estructurales de las proteínas, lo cual puede ser relevante para determinar el grado o tipo de lesión cerebral (8,28).

La espectroscopía Raman, y especialmente su variante Raman mejorada por superficie (SERS), se ha consolidado como una herramienta biofísica capaz de caracterizar biomoléculas con alta sensibilidad y sin necesidad de marcadores o reactivos. Su capacidad para generar huellas espectrales únicas, incluso en bajas concentraciones y en condiciones cercanas a las fisiológicas, le otorga un gran valor en la investigación de proteínas relacionadas con daño neurológico. (19)

No obstante, a pesar de su potencial, no existe hasta la fecha una base de datos espectral estructurada y comparativa de MBP obtenida mediante espectroscopía Raman bajo condiciones homogéneas y controladas. Menos aún se ha documentado el uso sistemático de SERS con esta proteína purificada utilizando un protocolo validado. (19)

2. Justificación.

El traumatismo craneoencefálico (TCE) representa una de las principales causas de consulta neurológica y hospitalización en la población pediátrica. A pesar del avance en técnicas de neuroimagen, la evaluación clínica temprana del daño cerebral sigue siendo un desafío, especialmente en lactantes y niños pequeños, donde los signos neurológicos pueden ser inespecíficos. La tomografía computarizada (TAC) es una herramienta diagnóstica frecuentemente utilizada en estos casos, pero conlleva una exposición significativa a radiación ionizante, lo cual plantea un riesgo acumulativo para el tejido cerebral en desarrollo y se asocia a un incremento potencial en el riesgo de neoplasias a largo plazo.

En cuanto a las enfermedades neurodegenerativas y desmielinizantes en pediatría causan alta discapacidad y suelen ser progresivas, pero su diagnóstico temprano es difícil porque la clínica puede ser inespecífica. Aunque la RM orienta, a veces es tardía o no concluyente y en niños pequeños puede requerir sedación, limitando el seguimiento seriado. Por ello, se necesitan herramientas complementarias que aporten información molecular objetiva para detectar y caracterizar el daño de forma más oportuna.

Frente a esta problemática, existe un interés creciente por identificar biomarcadores moleculares que permitan detectar y estratificar el daño neurológico en fases agudas, con alta sensibilidad y especificidad. Entre los candidatos más prometedores se encuentra la MBP, biomolécula que refleja distintos aspectos del daño neuronal y axonal. Su presencia y concentración en fluidos biológicos como el suero y el líquido cefalorraquídeo se ha correlacionado con la severidad del TCE, pero su análisis actual depende de métodos bioquímicos que requieren tiempos prolongados y kits especializados.

La espectroscopía Raman emerge como una técnica poderosa y no destructiva, capaz de detectar estructuras moleculares específicas mediante la obtención de “huellas espectrales” únicas para cada proteína. La caracterización de MBP mediante esta técnica representa un paso fundamental para su detección rápida y precisa en el entorno clínico. Al establecer sus firmas espectrales en condiciones controladas, se genera un atlas de referencia que puede ser aplicado en el futuro al desarrollo de sensores ópticos portátiles o sistemas de diagnóstico rápido. Por ejemplo, la implementación de sensores ópticos portátiles permitiría la detección temprana de enfermedades neurodegenerativas directamente en unidades de atención inmediata o incluso en el hogar del paciente.

Esta aproximación permitiría, en un escenario clínico futuro, seleccionar con mayor precisión qué pacientes requieren neuroimagen y cuáles pueden ser manejados conservadoramente, reduciendo así la necesidad de TAC innecesarias y, por ende, la exposición a radiación en pacientes pediátricos. En este sentido, el presente estudio no solo contribuye al conocimiento básico de las propiedades espectroscópicas de biomarcadores cerebrales, sino que también abre la puerta al desarrollo de otras herramientas diagnósticas para la población infantil.

3. Pregunta de investigación.

¿Es técnicamente viable detectar y caracterizar la proteína básica de mielina (MBP) en una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) humano mediante espectroscopía Raman, utilizando como referencia la huella espectral previamente obtenida en la MBP purificada?

4. Hipótesis.

El presente estudio es de tipo descriptivo y exploratorio, por lo que no se plantea una hipótesis formal. Su propósito principal es caracterizar espectralmente biomoléculas mediante espectroscopía Raman, sin establecer relaciones causales o comparativas entre variables.

5. Objetivos.

- **Objetivo general**

Identificar y caracterizar espectroscópicamente la proteína básica de mielina en una muestra de líquido cefalorraquídeo normal mediante espectroscopía Raman.

- **Objetivos específicos**

- Obtener y preparar muestras purificadas de MBP en condiciones controladas, compatibles con espectroscopía Raman.
- Adquirir espectros Raman de la biomolécula utilizando configuraciones experimentales estandarizadas.
- Identificar las bandas espectrales características de la proteína y analizar sus modos vibracionales asociados.
- Comparar las huellas espectrales de la biomolécula pura y en una concentración conocida en líquido cefalorraquídeo, simulando un entorno clínico real, para determinar diferencias estructurales que permitan su distinción inequívoca.
- Comparar las firmas espectrales obtenidas del LCR con la huella de referencia de la MBP purificada, identificando coincidencias en bandas vibracionales clave que permitan inferir su posible detección en el fluido biológico.
- Valorar la factibilidad técnica y analítica del método Raman para el estudio de biomarcadores proteicos en LCR, como base para su futura implementación en estudios clínicos ampliados.

- Establecer una base espectral de referencia.
- **Objetivos secundarios**
 - Documentar los procedimientos y parámetros experimentales empleados para permitir su replicación en estudios futuros.
 - Integrar los resultados en un repositorio digital de espectros que sirva como punto de partida para el desarrollo de biosensores ópticos o algoritmos de identificación automática.

Diseño del estudio.

Estudio experimental, de tipo transversal descriptivo, *in vitro*.

Lugar de realización

El estudio se llevará a cabo en el Laboratorio Nacional CIACYT, perteneciente a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, que cuenta con el equipamiento necesario para espectroscopía Raman, preparación de muestras biológicas y análisis computacional de espectros.

Las actividades experimentales incluirán la preparación de muestras de proteínas, adquisición espectral mediante sistema Raman y análisis de datos, todo dentro del entorno controlado de este laboratorio.

6. Sujetos y métodos.

Se recabará una muestra única de LCR en un paciente con físico-citoquímico normal y cultivo negativo, al cual se le solicite la muestra como parte de un proceso diagnóstico o terapéutico. Se utilizará el remanente de la muestra posterior a su análisis. No se realizarán procedimientos invasivos adicionales al paciente.

Criterios de selección

Criterios de inclusión

1. Muestra de LCR remanente de un procedimiento clínico indicado por el médico tratante (uso diagnóstico).
2. Una muestra proveniente de paciente pediátrico (0–15 años) atendido en la institución, con diagnóstico neurológico documentado (para clasificación mínima).
3. Desidentificación y codificación de la muestra previo al análisis.
4. Volumen suficiente para medición y réplicas: ≥ 0.5 mL.

5. Conservación adecuada: cadena de frío documentada y almacenamiento a -80°C , ≤ 1 ciclo de congelación–descongelación.
6. Autorizaciones vigentes: aval del Comité de Ética/Investigación y consentimiento.

Criterios de exclusión

1. Hemólisis franca o xantocromía intensa visible (interferencia óptica/fluorescencia).
2. Contaminación evidente (particulado, turbidez, contaminación microbiológica) o rotura de tubo.
3. Volumen insuficiente (< 0.5 mL) o pérdida de cadena de frío.
4. Falta de trazabilidad mínima (sin registro clínico básico) o muestra no desidentificada.

Criterios de eliminación

1. Incumplimiento sobrevenido de la cadena de frío (accidente de congelador) o múltiples descongelaciones no registradas.
2. Revocación del consentimiento por parte del tutor/representante legal antes de concluir el análisis.

Características de los Materiales

1. Biomolécula MBP.
2. Disponibilidad de la proteína en forma purificada y estable, con documentación de calidad.
3. Compatibilidad de las condiciones de disolución con espectroscopía Raman (pH fisiológico, baja fluorescencia, etc.).
4. Una muestra de 250 microlitros de LCR con analítica normal.

Cuadro 1. Variables en el estudio

Cuadro de Variables:

Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
Firma espectral Raman de la biomolécula	Espectro Raman obtenido para cada biomolécula purificada, representado como intensidad de dispersión (en unidades arbitrarias) frente a desplazamiento Raman (en cm^{-1}).	Intensidad espectral variable (en unidades arbitrarias) a lo largo de un rango de 400 a 2000 cm^{-1}	Unidades arbitrarias de intensidad (a.u) frente a desplazamiento Raman (cm^{-1})	Cuantitativa continua
Tipo de biomolécula analizada	Proteína purificada utilizada en cada medición espectroscópica.	MBP	No aplica	Variable cualitativa
Longitud de onda del laser	Fuente de excitación utilizada para espectroscopia Raman	532 nm o 785 nm (según configuración del equipo)	nanómetros	Cualitativa nominal
Concentración de la proteína	Cantidad de biomolécula disuelta por volumen de solvente. Se prepararán concentraciones decrecientes de la proteína mediante dilución seriada.	70 mg/ml hasta 0.07 ng/ml	mg/mL	Cuantitativa continua
Tiempo de exposición	Tiempo durante el cual la muestra es irradiada por el láser (Tiempo de adquisición: 20 segundos, Número de adquisiciones: 2)	40 s	segundos	Cuantitativa continua
Tipo de sustrato óptico	Material donde se deposita la muestra para evitar señal de fondo	Aluminio anodizado	No aplica	Cualitativa nominal
Disolvente / Buffer	Solución en la que se prepara la muestra	Agua desionizada Líquido cefalorraquídeo	NA	Cualitativa nominal
Temperatura ambiente	Temperatura del laboratorio durante la medición	Ej. 20 – 25 °C	Grados centígrados	Cuantitativa continua

7. Análisis estadístico.

El análisis será de tipo descriptivo, enfocado en observar y resumir las características generales del espectro obtenido de la muestra de líquido cefalorraquídeo.

Se describirán las bandas o picos más representativos del espectro y se compararán visualmente con los obtenidos previamente de la proteína básica de mielina (MBP) purificada.

Se realizará una revisión cualitativa de coincidencias entre ambos perfiles para determinar si la señal del LCR muestra características compatibles con la MBP. Asimismo, se registrarán observaciones sobre la claridad, forma y estabilidad de las señales para valorar la calidad del análisis y la factibilidad del método.

Tipo de muestreo.

No aplica.

Se incluirá una muestra de LCR remanente que cumpla criterios de inclusión/exclusión.

Cálculo del tamaño de la muestra

No aplica.

Preparación de la muestra

Se realizarán diluciones seriadas de la proteína purificada utilizando agua desionizada como diluyente para los experimentos de espectroscopía Raman. Para la técnica SERS, se agregará a la solución con la proteína el coloide de nanopartículas de plata en un volumen 1:1. Para los experimentos utilizando líquido cefalorraquídeo, se agregará a este una concentración conocida de la proteína y se intentará obtener el espectro hasta concentraciones clínicamente relevantes, es decir, en el orden de nanogramos/ml. El cuadro 2 describe esta estrategia experimental. Se prepararán cada una de las soluciones a un volumen de 40-50 microlitros en total.

Cuadro 2. Concentraciones de MBP para los experimentos de espectroscopía Raman y SERS

ID	Concentración MBP para E. Raman	Concentración MBP + Coloide de AgNP 1:1 para SERS	Pruebas con LCR + proteína MBP (<i>spike-in</i>) para Raman	Pruebas con LCR + proteína MBP (<i>spike-in</i>) Para SERS
1	70 mg/ml	35 mg/ml		
2	7 mg/ml	3.5 mg/ml	1.4 mg/ml	
3	0.7 mg/ml	0.35 mg/ml	0.14 mg/ml	0.7 mg/ml
4	0.07 mg/ml	0.035 mg/ml		
5	0.007 mg/ml	0.0035 mg/ml	0.0014 mg/ml	0.0007 mg/ml
6	700 ng/ml	350 ng/ml		
7	70 ng/ml	35 mg/ml	14 ng/ml	7 ng/ml
8	7 ng/ml	3.5 ng/ml		

9	0.7 ng/ml	0.35 ng/ml	0.14 ng/ml	0.7 ng/ml
10	0.07 ng/ml	0.035 ng/ml		
11	0.035 ng/ml			0.007 ng/ml

Método de aleatorización

No aplica.

Prueba piloto

Se llevará a cabo una prueba piloto inicial para verificar la viabilidad técnica del análisis espectroscópico. Esta consistirá en la adquisición de espectros Raman de una de la biomolécula MBP bajo diferentes condiciones de:

- Concentración
- Tiempo de exposición al láser
- Tipo de sustrato
- Potencia del láser

El objetivo de esta prueba es optimizar los parámetros instrumentales y minimizar interferencias como fluorescencia o señal de fondo. Los resultados de la prueba piloto permitirán estandarizar el protocolo para las mediciones definitivas de las concentraciones de la biomolécula posteriores. Para el presente proyecto se realizará la determinación del espectro de MBP, del LCR y la combinación de ambos, como se describió anteriormente. Esto se realizará con un tiempo de adquisición máximo de 30 segundos, con mínimo 2 adquisiciones por espectro, verificando que la temperatura generada no exceda los 39 °C.

Cuadro 3. Pregunta PICO

Paciente	Intervención	Comparación	Resultado
Biomarcadores neuronales relacionados con daño cerebral (MBP).	Espectroscopía Raman mejorada por superficie (SERS) con nanopartículas metálicas.	No aplica.	Obtención de espectros vibracionales característicos para su futura utilidad diagnóstica.

Plan de trabajo

El presente estudio se desarrollará en dos fases: una fase inicial de estandarización técnica y una fase piloto de identificación de la MBP en una única muestra de LCR proveniente de un paciente pediátrico atendido en el HRAE de San Luis Potosí.

1. Estandarización de la técnica

Se realizará la caracterización espectral de la MBP purificada mediante espectroscopía Raman, ajustando los parámetros técnicos (potencia del láser, tiempo de exposición, tipo de sustrato óptico y longitud de onda). Esta fase permitirá definir las condiciones óptimas para la detección reproducible de la MBP y servirá como referencia para la medición del LCR.

Durante este proceso se documentarán las condiciones de análisis, las réplicas realizadas y los parámetros de calibración del equipo.

2. Identificación de MBP en LCR

Posteriormente, se seleccionará una muestra remanente de LCR desidentificada, proveniente de un paciente pediátrico del HRAE de San Luis Potosí, obtenida en el contexto de un procedimiento médico con fines diagnósticos o anestésicos.

La muestra deberá contar con resultado citoquímico y fisicoquímico normal, volumen suficiente (≥ 0.5 mL), conservación a -80 °C y cumplir con los criterios de inclusión y exclusión establecidos.

A los padres o tutores legales se les informará del estudio y se solicitará consentimiento informado para el uso del remanente con fines de investigación.

3. Manejo y procesamiento de la muestra

La muestra seleccionada será trasladada al Laboratorio de Ciencia y Análisis de Materiales (CYACIT) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) en condiciones controladas y manteniendo la cadena de frío.

En el laboratorio, se realizará el procesamiento y análisis espectroscópico conforme a un procedimiento estandarizado: descongelamiento controlado, aplicación sobre el sustrato óptico y adquisición del espectro Raman bajo condiciones previamente calibradas.

Al concluir el análisis, el remanente será eliminado conforme a las normas de bioseguridad, registrando la fecha y método de eliminación.

4. Registro y análisis de datos

Los resultados se registrarán en una base de datos en Microsoft Excel, incluyendo los parámetros técnicos del análisis y observaciones sobre la calidad del espectro.

El análisis será descriptivo, enfocado en comparar visualmente la señal del LCR con la huella de referencia de la MBP purificada, con el fin de determinar la factibilidad técnica del método y su capacidad para identificar la proteína en una matriz biológica real.

5. Validación y documentación

Se verificará la consistencia y claridad de las mediciones mediante réplicas técnicas bajo las mismas condiciones instrumentales.

Finalmente, se elaborará un informe técnico con los resultados obtenidos, las condiciones experimentales optimizadas y las observaciones que orienten el diseño de una futura fase con un mayor número de muestras.

- Cuadro 4. Cronograma

Actividad	MES				
	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero/Febrero
Elaboración de protocolo de investigación	X	X			
Sometimiento al comité de ética e investigación		X	X		
Obtención de datos experimentales				X	
Análisis estadístico y procesamiento de datos					X
Elaboración de resultados y conclusiones					X
Difusión de resultados					X

Metodos

Proteína básica de mielina (Myelin Basic Protein, MBP)

Human brain

High purity

Cat. No. ALX-200-606-M001

Lot. No. M45G211

Enzo, Farmingdale, NY, 11735

Nanopartículas de plata

- Preparación de soluciones

Se prepararon diluciones seriadas de MBP con agua desionizada desde 70 mg/ml hasta 0.007 ng/ml (Etiquetadas como 1=100% a 11=0.00000001%).

- Experimento 1

Tiempo de adquisición: 20 segundos

Acumulaciones: 2

Potencia del láser: 12.5 mW

Rango espectral: 400-2500 cm⁻¹

Adquisición: al 100% tras dejar secar, en aro de café: 2 microlitros – sin observar espectro

Adquisición al 1% en solución 40 microlitros: espectro ruidoso de baja intensidad

Adquisición al 1% + AgNPs 1:1: se obtiene el espectro de MBP.

Sustrato de AgNP + 2 microlitros de MBP 100% en sólido: se obtuvo el espectro con el láser tanto a 10 como a 25%.

- Experimento 2

Mediciones en sólido – concentraciones 4 a 6 + AgNPs: se obtuvieron resultados inconsistentes, por lo que la estrategia experimental se continuó con mediciones en líquido.

Mediciones en solución 1:1 (20 microlitros de MBP + 20 microlitros de AgNP): se obtienen los espectros de las concentraciones 4 y 6 (0.07 mg/ml y 0.0007 mg/ml -700 ng/ml-).

- Experimento 3

Se preparó una solución de 40 microlitros de LCR + 10 microlitros sol. MBP 7 mg/ml: se obtuvo espectro. Esto equivale a una concentración de MBP en LCR de 1.4 mg/ml.

La misma solución al agregar AgNPs 1:1 – sin señal. Se sospecha aglomeración de las AgNP, ya que no sonicamos las nanopartículas antes del experimento.

- Experimento 4

-AgNPs sonicadas por 30 minutos

a) Preparación para Raman

1) Control: 40 microlitros de LCR + 10 ul AE

2) 40 ul LCR + 10 ul MBP conc. 3

3) 40 ul LCR + 10 ul MBP conc. 5

4) 40 ul LCR + 10 ul MBP conc. 7

5) 40 ul LCR + 10 ul MBP conc. 9

6) 40 ul LCR + 10 ul MBP conc. 11

b) Preparación para SERS

- 1) Control: 20 ul LCR + 5 ul AE + 25 ul AgNP
- 2) 20 ul LCR + 5 ul MBP conc. 3 + 25 ul AgNP
- 3) 20 ul LCR + 5 ul MBP conc. 5 + 25 ul AgNP
- 4) 20 ul LCR + 5 ul MBP conc. 7 + 25 ul AgNP
- 5) 20 ul LCR + 5 ul MBP conc. 9 + 25 ul AgNP
- 6) 20 ul LCR + 5 ul MBP conc. 11 + 25 ul AgNP

- **Caracterización mediante espectroscopía Raman/SERS**

Los espectros Raman y SERS para cada una de las concentraciones descritas se obtuvieron colocando la solución en los pozos de un soporte de aluminio anodizado. Se colocaron 50 microlitros de cada mezcla. Los espectros se obtuvieron en la Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología (CIACYT), utilizando el equipo Horiba xPlora Plus Micro Raman. Las mediciones se llevaron a cabo con un láser de 532 nm, objetivo 20x, tiempo de adquisición: 20 segundos, acumulaciones: 2, potencia del láser: 12.5 mW y rango espectral: 400-2500 cm^{-1} .

- **Análisis espectral**

Tras la adquisición de los espectros Raman en el rango fingerprint ($\sim 400\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$) para:

MBP purificada, LCR control, LCR + MBP en distintas concentraciones (C3, C5, C7, C9, C11), se realizó la comparación directa de espectros (cuadro 8) y el análisis cualitativo MBP vs LCR.

Evaluación de similitud espectral (correlación) entre cada muestra y el MBP puro.

Análisis diferencial: cálculo de espectros diferencia: $(C_x - \text{LCR control})$ para aislar contribuciones atribuibles al agregado de MBP.

Selección de bandas relevantes:

Se priorizaron regiones con contraste consistente entre MBP y LCR, principalmente asociadas a Amida II y Amida III, en concordancia con estudios Raman previos sobre MBP y proteínas en matrices biológicas (Wang et al., 2011).

Construcción de razones de intensidades:

Se definió un panel de razones espectrales (I_{1534}/I_{1423} , I_{1534}/I_{1312} , I_{1584}/I_{1442}) para minimizar efectos de fondo y variaciones instrumentales, siguiendo estrategias reportadas en estudios clínicos de Raman en LCR.

Exclusión de la muestra C9:

C9 mostró comportamiento espectral inconsistente (baja correlación con MBP y razones cercanas al LCR). Se decidió excluirla del análisis principal por posible problema experimental o de preparación.

8. Aspectos éticos.

Investigación sin riesgo ()

Investigación con riesgo mínimo (X)

Investigación con riesgo mayor al mínimo ()

El presente estudio no contraviene los aspectos éticos considerados en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud de los Estados Unidos Mexicanos en el Título Segundo en sus capítulos 13, 14, 16, 17, 20, 21, 36, 39, 40 y 51 ni las contempladas en la Declaración de Helsinki y sus modificaciones en 75th WMA (*World Medical Association*) en Finlandia Helsinki. 2024. (29,30)

De acuerdo con lo anterior, el presente protocolo se considera una investigación con riesgo mínimo, ya que contempla el uso de una muestra de líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, esa muestra no será obtenida para la realización de este proyecto, sino que se utilizará la muestra remanente de un análisis clínico solicitado con fines de diagnóstico para el paciente involucrado. No se recabarán datos de dicho paciente, sino que únicamente se utilizará la muestra como material de experimentación. La muestra será desechada posterior al análisis de acuerdo con la NOM para el manejo de residuos biológico-infecciosos. El estudio se realizará exclusivamente con proteínas purificadas de origen comercial (MBP) en un entorno de laboratorio controlado, mediante técnicas de espectroscopía Raman y SERS. No se llevará a cabo ningún procedimiento que represente intervención, modificación o afectación directa o indirecta sobre la integridad física o psicológica de individuos, por lo que no existe riesgo para el paciente.

El presente estudio ha sido evaluado por los Comités de Ética en Investigación e Investigación, así como el comité académico de neurología pediátrica del Hospital Regional de Alta Especialidad "Dr. Ignacio Morones Prieto.

9. Resultados

Se describen en esta sección los resultados del “Experimento 4” elegido tras la optimización de la técnica por presentar resultados consistentes y reproducibles. Los resultados de los tres experimentos anteriores se describieron brevemente en la sección de métodos.

La intensidad de los espectros Raman tanto de la MBP en solución acuosa como en LCR fue muy baja, por lo que se agregaron nanopartículas de plata como sustrato para amplificación. Tras esto, el espectro SERS fue claramente identificable en todas las mediciones, obteniendo un factor de amplificación adecuado. Se obtuvo el espectro SERS de la proteína MBP purificada, con la banda de mayor intensidad en 1572 cm^{-1} , así como bandas de menor intensidad en 1132, 1475, 1609 cm^{-1} , y también en 928, 1073, 1170, 1218 y 1282 cm^{-1} (Figuras 1, 2, 3). La relación completa de las bandas encontradas en el espectro Raman/SERS de MBP y la asignación de modos vibracionales propuestos se describen en el cuadro 5. La banda obtenida en 1813 cm^{-1} no se observa típicamente en moléculas biológicas, ya que se encuentra en una “región silenciosa” del espectro Raman atribuidos a enlaces triples que no son comunes en este tipo de muestras. En esta región pueden aparecer vibraciones de los enlaces de las “etiquetas” agregadas artificialmente en el proceso de purificación de las proteínas, las cuales pueden contener un grupo alquino o nitrilo. (31)

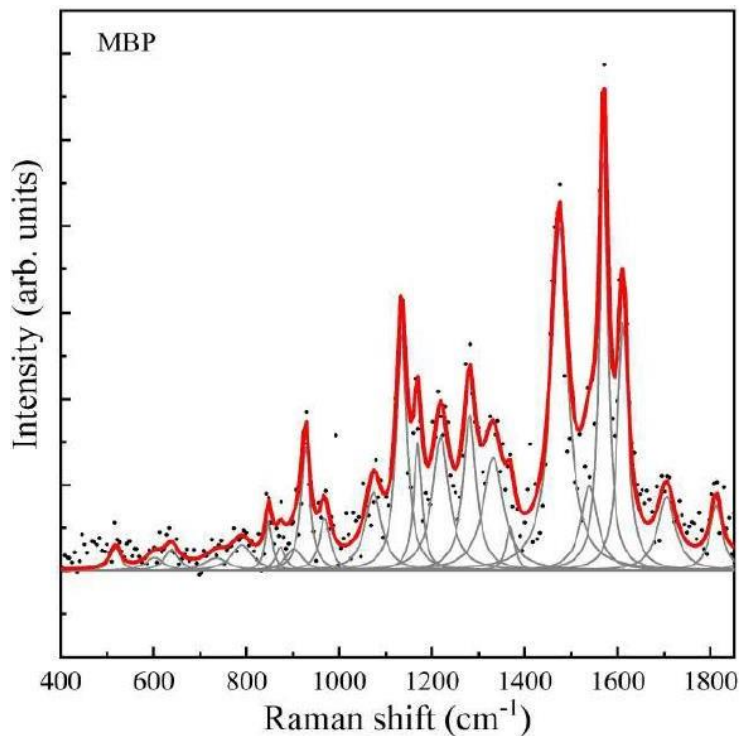


Figura 1. Espectro Raman de la proteína básica de mielina humana (MBP) en solución acuosa, a una concentración de 70 mg/ml.

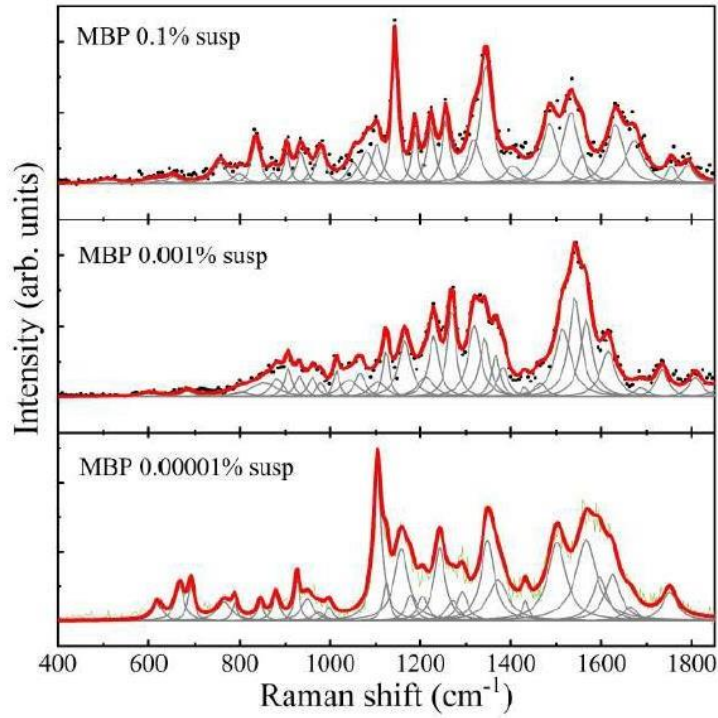


Figura 2. Espectro Raman de la proteína básica de mielina en solución acuosa, a concentraciones decrecientes: 0.7 mg/ml, 0.0007 mg/ml y 0.000007 mg/ml (7 ng/ml).

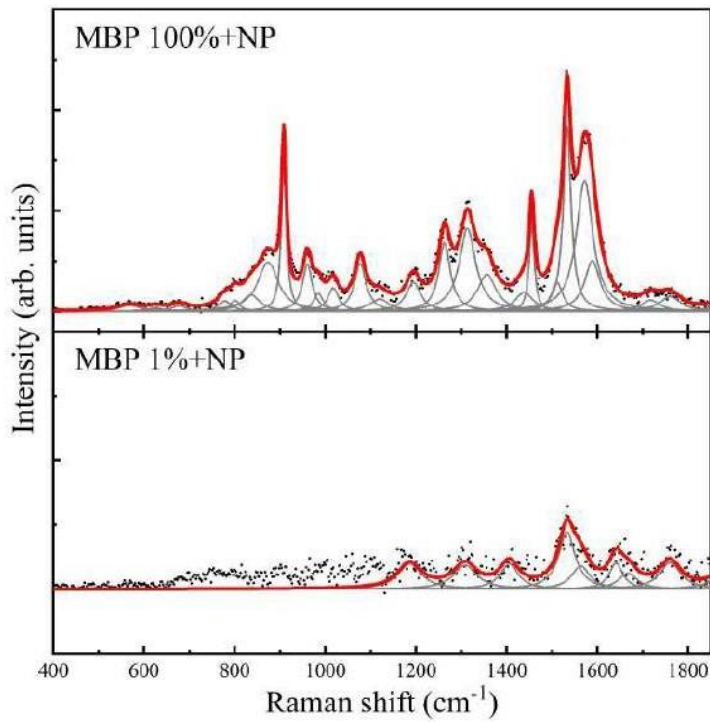


Figura 3. Espectro SERS de la proteína básica de mielina en solución acuosa a una concentración de 70 mg/ml (panel superior), y 0.7 mg/ml (panel inferior).

Cuadro 5. Bandas características del espectro Raman de la Proteína Básica de Mielina a una concentración de proteína de 0.07 mg/ml en agua desionizada. (10)

Corrimiento Raman cm^{-1} (Raman Shift)	Asignación de bandas propuesta
516	S-S estrechamiento disulfuro (509, 524) v(S-S) gauche-gauche-trans (cisteína) (509)
639	v(C-S) gauche (metionina) (630-670) Estrechamiento C-S y torsión C-C de tirosina (643, 646, 649) Torsión C-C de fenilalanina (645)
789	Triptófano, d(anillo) (760) Estrechamiento C-C (813)
848	Estrechamiento de enlaces en valina (850) Respiración del anillo de tirosina (Resonancia de Fermi) y estrechamiento C-C de prolina (853) d(CCH) fenilalanina
875	Estrechamiento C-C, hidroxiprolina (876) Probable respiración del anillo de tirosina (Resonancia de Fermi) d(anillo) triptófano (880)
928	Estrechamiento C-C en prolina, hidroxiprolina y valina (928-50) Esqueleto C-C, alfa-hélices (932)
966	Aleteo C-C (971) Esqueleto C-C (972-73) Estrechamiento C-C láminas-beta (980)
1073	Prolina (1066-67)
1132	Estrechamiento C-N en proteínas (1128)
1170	Flexión en el plano de C-H en tirosina (1170) Estrechamiento C=C (1168)
1218	Región Amida III (proteínas) (1200-1300) Estrechamiento C-N y Flexión N-H (1200-1350) Hidroxiprolina y tirosina (1206) v(C-C ₆ H ₅), triptófano, fenilalanina (1208) Estrechamiento C-N (1216) y C=N=C (1220) Amida III (estructura en láminas beta) (1220)
1282	Amida III (alfa-hélices) (1279) Aleteo CH ₂ en el esqueleto de glicina y las cadenas laterales de prolina (1280)
1331	Aleteo y torsión CH ₃ CH ₂ (1335) Aleteo CH ₂ en el esqueleto de glicina y las cadenas laterales de prolina (1337) Triptófano (1337-39)

	Aleteo, flexión y/o torsión CH ₂ /CH ₃ en proteínas (1337-39)
1368	Triptófano (1365)
1475	Interacción Fermi d(CH ₂), y g(CH ₂) (1463) Estrechamiento C=N (1470)
1572	Amida II (acoplamiento del estrechamiento CN y la flexión en el plano del grupo N-H) (1480-1575) Estrechamiento C-C (1580) Flexión C=C fenilalanina (1582-83)
1609	Amida I por vibraciones de estrechamiento C=O del esqueleto peptídico (1600-1800) Flexión en el plano de C=C en fenilalanina y tirosina (1603-1607)
1706	v(C=O)OH (en los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico) (1700-1750) Estrechamiento C=O (1716-41)
1813	Región "silenciosa". Estrechamiento del grupo carbonilo C=O (región carbonilo: 1600-1900)

Al analizar el espectro SERS de LCR se obtuvieron las bandas de mayor intensidad en la región de 1200-1450 cm⁻¹, siendo la más intensa la banda a 1312, y logrando identificar algunas bandas de menor intensidad en la región de 900-1050 cm⁻¹ (Cuadro 6, Figura 4). El espectro difiere de lo reportado por otros autores (Ranasinghe et al., 2024), probablemente por la mejora de las características espectrales tras la adición de nanopartículas de plata. (32)

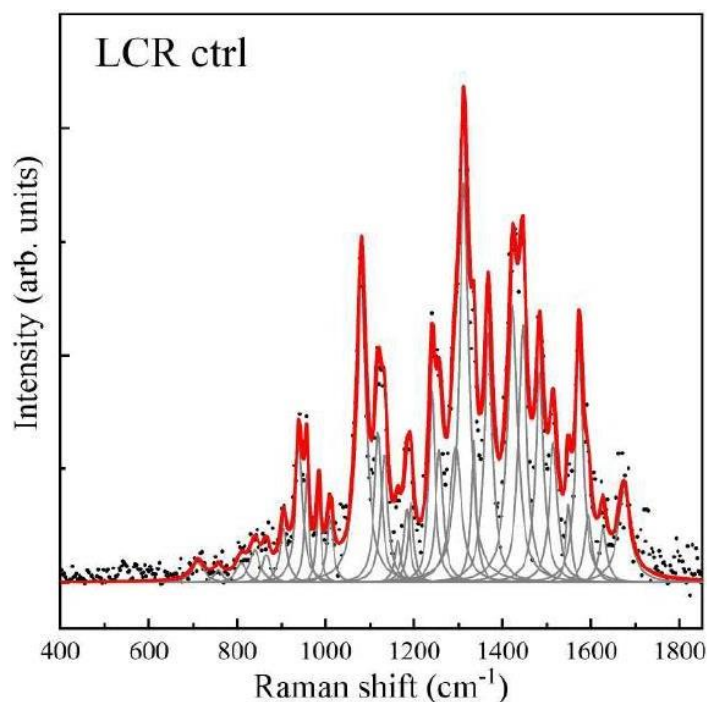


Figura 4. Espectro Raman de líquido cefalorraquídeo.

Cuadro 6. Asignación de bandas en el espectro de líquido cefalorraquídeo (Movasaghi et al., 2007).

Corrimiento Raman cm^{-1} (Raman Shift)	Asignación de bandas propuesta
711	v(C-S) metionina (700-745) Colesterol (702) C-N cabeza de los fosfolípidos de membrana / nucleótidos - adenina (717-19) $\text{CN}_2(\text{CH}_3)_3$ (lípidos) (717-19) Estrechamiento simétrico del grupo colina $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, característico de fosfolípidos (719) Fosfatidilcolina, esfingomiolina (719) Estrechamiento simétrico C-C- N^+ en fosfatidilcolina (lípidos) (719)
756	Modo de respiración simétrica del anillo de triptófano (752-760)
811	Estrechamiento O-P-O en RNA (811) Estrechamiento C-C en prolina (815)
839	Estrechamiento asimétrico O-P-O en tirosina (831) Deformación de grupos amina (838) α -Anómeros (840) Glucosa, estructura de polisacáridos (840-60)
864	Tirosina (859) Grupos fosfato – ácido fosfático (860) Vibración del anillo de ribosa, uno de los modos vibracionales de RNA (867, 915 y 974) Estrechamiento C-C (868) Monosacáridos (β -fructosa), disacáridos (sucrosa), polisacáridos (amilosa y amilopectina) esqueleto (C-O-C) (868) Estrechamiento en enlaces simples de prolina, valina y polisacáridos (869-70) Estrechamiento C-C (870)
906	Monosacáridos (β -glucosa), disacáridos (maltosa), esqueleto (C-O-C) (898) Glucosa (913) Prolina (918)
939	Estrechamiento C-C del esqueleto de carbono (938-41), polisacáridos
956	Vibraciones de estrechamiento de los enlaces simples de prolina, valina y polisacáridos (950) $\nu_s(\text{CH}_3)$ de proteínas (alfa-hélice) (951) Lípidos (968)
984	Estrechamiento C-C de láminas beta (proteínas) (980)

	Flexión =CH (lípidos) (980)
1009	Modo de respiración simétrica del anillo de fenilalanina (1000-34) NADH unido y libre (1000)
1081	Estrechamiento simétrico PO_2^- de DNA (1070-1090) Estrechamiento C-C o C-O en fosfolípidos (1078-80) Estrechamiento simétrico de enlaces de fosfato (1078), Grupos fosfodiéster en ácidos nucleicos (1080-4) $\nu_1CO_3^{2-}$, $\nu_3PO_4^{3-}$, $\nu(C-C)$ esqueleto de carbono y grupos acil en lípidos (conformación gauche) (1081,1086-7) Ácidos nucleicos (1082) Estrechamiento C-N en proteínas y lípidos (1083)
1120	Glucosa (1117) Estrechamiento C-C (lípidos) (1117-9) Banda C-O de ribosa (marcador del contenido de RNA en la solución) (1120) Estrechamiento C-C en lípidos y proteínas, estrechamiento C-N (1123-1130)
1164	Estrechamiento C-C/C-N (proteínas) (1155-58) Flexión en el plano del enlace C-H de tirosina (1163-72)
1189	Adenina, citosina, guanina (118-84) Vibraciones antisimétricas de fosfato (1185-300)
1239	Amida III (1200-1300) (resultado del acoplamiento del estrechamiento C-N y el enlace N-H, mezclada con la vibración de cadenas laterales de aminoácidos) Vibraciones de aleteo CH_2 del esqueleto de glicina y las cadenas laterales de prolina (1237-1239) Amida III (láminas beta y <i>random coils</i> b) (1242) Estrechamiento asimétrico de enlaces fosfato [PO_2^-] (1243) Estrechamiento aromático C-O ₄ (1243) Aleteo CH_2 , estrechamiento C-N y bases de pirimidina (C, T) (1243)
1256	Citosina y guanina (NH_2) (1250-2) Estrechamiento aromático C-O ₄ (1252) Estrechamiento en plano C-N (1254) Lípidos (1255) Modos de respiración del anillo de las bases A, T del DNA/RNA - amida III (protein) 1257 Amida III, adenina, cytosina (1258) Guanina, citosina (NH_2) (1259) Amida II (1259)
1312	Estrechamiento asimétrico C-N en aminas aromáticas (1308) Torsión, aleteo o flexión CH_3/CH_2 en proteínas y lípidos (1300-14) Modo de respiración del anillo de las bases de DNA/RNA, deformación C-H en proteínas (1318)

	Amida III (alfa-hélices) (1318-21)
1334	Modo de aleteo CH ₃ CH ₂ en cadenas de proteínas y nucleótidos (1335-45) Amida III y aleteo CH ₂ del esqueleto de glicina y las cadenas laterales de prolina (1337) Modo de respiración del anillo de las bases nitrogenadas A, G de DNA, deformación C-H (proteínas) (1337) Triptófano (1337-9)
1367	Triptófano (1359-69) Estrechamiento CH ₃ (fosfolípidos) (1367)
1423	$\nu(\text{C}=\text{O})$ O ⁻ (ácido aspártico y ácido glutámico) (1400-30) Modos de flexión y tijereteo CH ₂ en proteínas y lípidos, deformación CH (DNA/RNA, proteínas, lípidos y carbohidratos) (1420-80) Deformación en el plano NH (1423)
1445	Deformación y tijereteo CH ₂ (1437-53) en proteínas y lípidos
1484	Amida II (principalmente por el acoplamiento del estrechamiento CN y la flexión en el plano del grupo N-H) (1480-575) Guanina, adenina (modos de respiración del anillo de bases de DNA) (1485) DNA (1490) Estrechamiento C-N acoplado con la flexión en el plano C-H aminoácidos catiónicos (1491)
1515	Citosina (1515) Vibraciones en el plano del enlace -C=C- (1525) $\nu(\text{C}-\text{C})$, $\nu(\text{C}=\text{C})$ (1514-38)
1548	Vibraciones de hidrógenos aromáticos y grupos amida carbonilo (1540-680) Amida II (1544) Modo de deformación C ₆ -H (1545) NADH unido y libre (1546) $\nu(\text{C}=\text{C})$, triptófano (1548-1560) $\nu(\text{CN})$ y $d(\text{NH})$ amida II (1558) Tirosina, amida II, COO ⁻ (1558)
1573	Triptófano (1560, 1573) Guanina, adenina (modos de respiración del anillo de bases de DNA) (1573, 1575) Estrechamiento C-C (1580) Modos de flexión $d(\text{C}=\text{C})$, C=C de fenilalanina (1582-83)
1626	Amida I, por el estrechamiento de enlaces C=O de proteínas (1600-800) Triptófano y/o láminas beta β (1622) Estrechamiento C α =C α (1628)

	Estrechamiento Amida C=O absorción de la forma-β -en films de polipéptidos (1628) Banda amida I (ambos alfa-hélices y láminas-b) (1634-45) <i>Random coils</i> (1647)
1673	Estrechamiento C=C (1670-4) Amida I (estrechamiento C=O acoplado a la flexión N-H) (1673) Amida I (láminas-β) (1676)

Al realizar la determinación de los espectros SERS con la técnica de spike-in se observan bandas de baja intensidad en la región 700-985, de manera interesante, la banda en 708 es de mayor intensidad mientras la proteína se encuentra en menor concentración (C9 y C11), semejante a lo que se ha reportado con otras proteínas (Ortiz-Dosal et al., 2024) (33). Se encuentran bandas de mayor intensidad en la región 1000 a 1631. El análisis de las bandas y la asignación de bandas propuesta se describen en el cuadro 7, Figura 5.

Cuadro 7. Bandas obtenidas en el experimento SERS spike-in C7 a C11 +LCR (concentración de MBP en la solución: 7 ng/ml a 0.00007 ng/ml). (10)

Corrimiento Raman cm⁻¹ (Raman Shift)	Asignación de bandas propuesta
708	v(C-S) metionina (700-745) Colesterol (702) C-N cabeza de los fosfolípidos de membrana / nucleótidos - adenina (717-19) CN ₂ (CH ₃) ₃ (lípidos) (717-19) Estrechamiento simétrico del grupo colina N ⁺ (CH ₃) ₃ , característico de fosfolípidos (719) Fosfatidilcolina, esfingomielina (719) Estrechamiento simétrico C-C-N ⁺ en fosfatidilcolina (lípidos) (719)
858	Tirosina (Resonancia de Fermi) (850) Estrechamiento C-C del anillo de prolina y tirosina (852-6) Glucógeno (853) Vibración de las cadenas laterales de prolina e hidroxiprolina, así como vibración del enlace C-C del esqueleto de proteínas (856) Tirosina (859) Grupos fosfato – ácido fosfatídico (860) Vibración del anillo de ribosa, uno de los modos vibracionales de RNA (867, 915 y 974) Estrechamiento C-C (868)

	<p>Monosacáridos (b-fructosa), disacáridos (sucrosa), polisacáridos (amilosa y amilopectina) esqueleto (C-O-C) (868)</p> <p>Estrechamiento en enlaces simples de prolina, valina y polisacáridos (869-70)</p> <p>Estrechamiento C-C (870)</p>
897	<p>Hidroxiprolina y triptófano (879)</p> <p>Deformación del anillo de triptófano (880)</p> <p>Bandas de polisacáridos (891)</p> <p>Vibraciones C-C del esqueleto de carbono (893)</p> <p>Fosfodiéster, desoxirribosa (893-6)</p> <p>Monosacáridos (b-glucosa), disacáridos (maltosa), esqueleto (C-O-C) (898)</p> <p>Glucosa (913)</p> <p>Prolina (918)</p>
959	<p>Vibraciones de estrechamiento en prolina, valina y polisacáridos (950)</p> <p>ν_s (CH₃) de proteínas (alfa-hélice) (951)</p> <p>Lípidos (968)</p>
984	<p>Estrechamiento C-C láminas-beta (980)</p> <p>Flexión =CH en lípidos (980)</p>
1020	<p>ν(CO), ν(CC), δ(OCH), de estructuras en anillo (polisacáridos, fenilalanina)</p> <p>Modo de respiración simétrica del anillo de fenilalanina (1000-34)</p> <p>Glucógeno (1022-25)</p>
1084	<p>Estrechamiento simétrico PO²⁻ de DNA (1070-1090)</p> <p>Estrechamiento C-C o C-O en fosfolípidos (1078-80)</p> <p>Estrechamiento simétrico de enlaces de fosfato (1078), Grupos fosfodiéster en ácidos nucleicos (1080-4)</p> <p>ν_1CO₃²⁻, ν_3PO₄³⁻, ν(C-C) esqueleto de carbono y grupos acil en lípidos (conformación gauche) (1081,1086-7)</p> <p>Ácidos nucleicos (1082)</p> <p>Estrechamiento C-N en proteínas y lípidos (1083)</p>
1125	<p>Glucosa (1117)</p> <p>Estrechamiento C-C (lípidos) (1117-9)</p> <p>Banda C-O de ribosa (marcador del contenido de RNA en la solución) (1120)</p> <p>Estrechamiento C-C en lípidos y proteínas, estrechamiento C-N (1123-1130)</p>
1162	<p>Estrechamiento C-C/C-N (proteínas) (1155-58)</p> <p>Flexión en el plano del enlace C-H de tirosina (1163-72)</p>
1250	<p>Citosina y guanina (NH₂) (1250-2)</p> <p>Estrechamiento aromático C-O₄ (1252)</p> <p>Estrechamiento en plano C-N (1254)</p>

	<p>Lípidos (1255) Modos de respiración del anillo de las bases A, T del DNA/RNA - amida III (protein) 1257 Amida III, adenina, citosina (1258) Guanina, citosina (NH₂) (1259) Amida II (1259)</p>
1317	<p>Estrechamiento asimétrico C-N en aminas aromáticas (1308) Torsión, aleteo o flexión CH₃/CH₂ en proteínas y lípidos (1300-14) Modo de respiración del anillo de las bases de DNA/RNA, deformación C-H en proteínas (1318) Amida III (alfa-hélices) (1318-21)</p>
1367	<p>Triptófano (1359-69) Estrechamiento CH₃ (fosfolípidos) (1367)</p>
1428	<p>$\nu(\text{C}=\text{O})$ O⁻ (ácido aspártico y ácido glutámico) (1400–30) Modos de flexión y tijereteo CH₂ en proteínas y lípidos, deformación CH (DNA/RNA, proteínas, lípidos y carbohidratos) (1420-80) Deformación en el plano NH (1423)</p>
1495	<p>Amida II (principalmente por el acoplamiento del estrechamiento CN y la flexión en el plano del grupo N-H) (1480–575) Guanina, adenina (modos de respiración del anillo de bases de DNA) (1485) DNA (1490) Estrechamiento C-N acoplado con la flexión en el plano C-H aminoácidos catiónicos (1491)</p>
1517	<p>Citosina (1515) Vibraciones en el plano del enlace -C=C- (1525) $\nu(\text{C}-\text{C})$, $\nu(\text{C}=\text{C})$ (1514-38)</p>
1542	<p>Vibraciones de hidrógenos aromáticos y grupos amida carbonilo (1540–680) Amida II (1544) Modo de deformación C₆-H (1545) NADH unido y libre (1546) $\nu(\text{C}=\text{C})$, triptófano (1548-1560) $\nu(\text{CN})$ y $d(\text{NH})$ amida II (1558) Tirosina, amida II, COO⁻ (1558)</p>
1567	<p>Triptófano (1560, 1573) Guanina, adenina (modos de respiración del anillo de bases de DNA) (1573, 1575) Estrechamiento C-C (1580) Modos de flexión $d(\text{C}=\text{C})$, C=C de fenilalanina (1582-83)</p>
1631	<p>Amida I, por el estrechamiento de enlaces C=O de proteínas (1600–800) Triptófano y/o láminas beta β (1622)</p>

Estrechamiento $C\alpha=C\alpha$ (1628)
Estrechamiento Amida C=O absorción de la forma- β -en films de polipéptidos (1628)
Banda amida I (ambos alfa-hélices y láminas-b) (1634-45)
Random coils (1647)

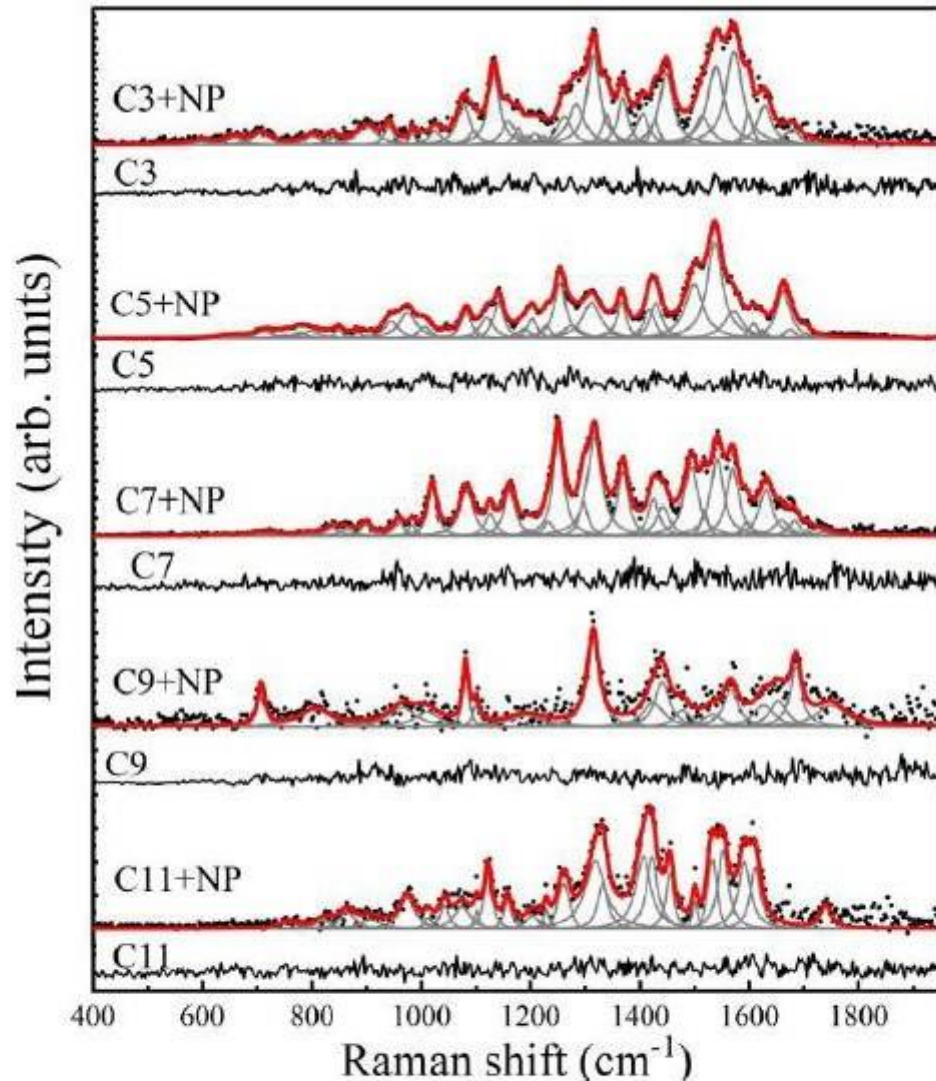


Figura 5. Experimentos *spike-in*. Espectro Raman (negro) y SERS (rojo) de la proteína básica de mielina en concentraciones decrecientes en líquido cefalorraquídeo. Las concentraciones C3, C5, C7, C9 y C11 corresponden a 0.7 mg/ml, 0.007 mg/ml, 70 ng/ml, 0.7 ng/ml y 0.07 ng/ml, respectivamente.

Como resultado de los experimentos SERS, se identificaron 19 modos en el espectro de MBP, 27 modos en el espectro de LCR y 18 modos en los espectros correspondientes a los experimentos spike-in (Cuadro 8). Todos los modos obtenidos en este último experimento se pueden relacionar con los modos obtenidos en el LCR sin la adición de MBP. Sin embargo, algunas bandas son comunes a las tres soluciones, principalmente en la región 1070-1170, en donde existe la coincidencia de tres modos vibracionales en las tres soluciones analizadas. Estos modos corresponden a estrechamientos C-C y C-N de proteínas (ver Cuadros 5, 6 y 7). También en las tres soluciones coinciden las bandas 966/956/959, 1368/1367/1367, 1475/1484/1495, 1572/1573/1567 en el espectro de MBP, LCR y en el modelo *spike-in*, respectivamente (Cuadro 8). Debido a estos resultados, no es posible proponer el análisis aislado de la posición de las bandas para discriminar la presencia de MBP en LCR, aunque sí existen diferencias en la intensidad y el ancho de las bandas. Por esto, se realizó un análisis de razones espectrales, semejante a la estrategia reportada por Sathyavathi et al., 2013, para determinar si existe un patrón espectral reproducible asociado a la presencia de MBP en la matriz de LCR. (34)

Cuadro 8. Comparación entre los diferentes espectros SERS obtenidos. Se indican las asignaciones de bandas que son comunes a los tres espectros (10)

MBP	LCR	MBP+LCR	Asignación
848	839	858	Estrechamiento C-C del anillo de prolina y tirosina (852-6)
966	956	959	Vibraciones de estrechamiento en prolina, valina (950)
1073	1081	1084	Estrechamiento C-N (1083)
1132	1120	1125	Estrechamiento C-C y C-N (1123-1130)
1170	1164	1162	Flexión en el plano del enlace C-H de tirosina (1163-72)
1368	1367	1367	Triptófano (1359-69)
1475	1484	1495	Amida II (principalmente por el acoplamiento del estrechamiento CN y la flexión en el plano del grupo N-H) (1480–575) C-H aminoácidos catiónicos (1491)
1572	1573	1567	Triptófano (1560, 1573) Modos de flexión d(C=C), C=C de fenilalanina (1582-83)
1609	1626	1631	Amida I, por el estrechamiento de enlaces C=O de proteínas (1600–800) Triptófano y/o láminas beta β (1622) Estrechamiento C α =C α (1628) Estrechamiento Amida C=O absorción de la forma- β -en films de polipéptidos (1628) Banda amida I (ambos alfa-hélices y láminas-b) (1634-45) <i>Random coils</i> (1647)

Análisis de razones espectrales

Comparación MBP vs LCR

El espectro de MBP puro presenta incrementos claros en las regiones Amida II (~1534–1562 cm^{-1}) y Amida III (~1260–1310 cm^{-1}) respecto al LCR.

El LCR muestra mayor contribución relativa en bandas asociadas a mezclas lipídicas, carbohidratos y fondo biológico, como se reporta en estudios previos de Raman en LCR.

Similitud espectral

Las muestras C3, C5, C7 y C11 presentan mayor similitud con MBP que el LCR control. Existe una tendencia consistente: las muestras con mayor MBP muestran mayor correlación con el espectro de MBP puro.

La muestra C9 rompe esta tendencia y se comporta espectralmente similar al LCR.

Razones como $I(1534)/I(1423)$, $I(1534)/I(1312)$ e $I(1584)/I(1442)$ separan claramente MBP puro, LCR control y muestras intermedias de los experimentos spike-in (Figura 6).

Colocan a C3/C5/C7/C11 entre MBP y LCR, como se espera para mezclas.

Al excluir C9, el comportamiento del conjunto es coherente y reproducible, en línea con metodologías reportadas en estudios Raman clínicos (Sathyavathi et al., 2013). (34)

La razón de bandas $I1534/I1423$ correlaciona con la concentración de MBP en LCR cuando ésta se encuentra por debajo de 0.7 mg/ml.

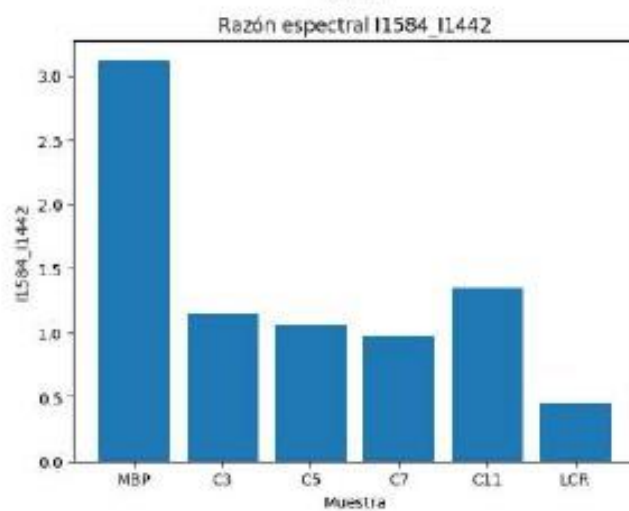
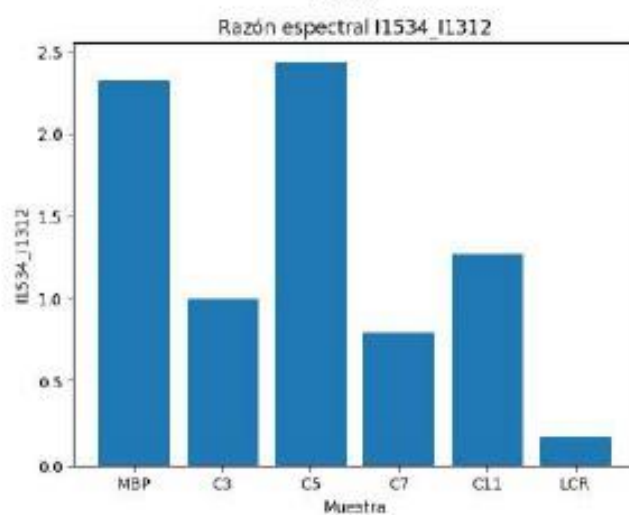
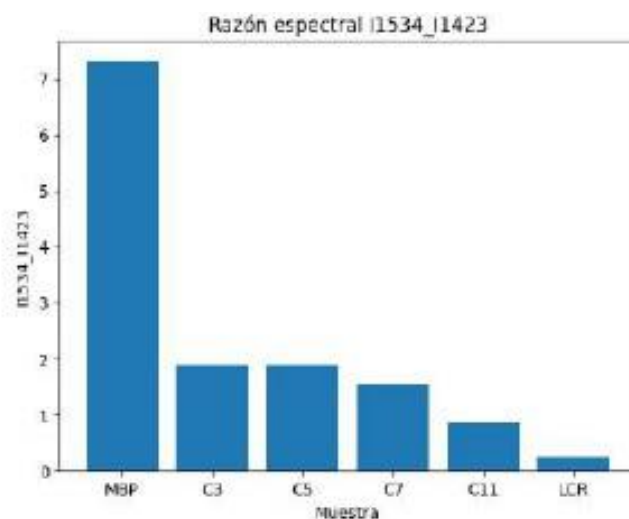


Figura 6. Razones espectrales $I(1534)/I(1423)$, $I(1534)/I(1312)$ e $I(1584)/I(1442)$. El análisis separa el espectro de MBP purificada, LCR control y las diluciones *spike-in*.

10. Discusión.

La RS podría proponerse como una técnica útil para observar la conformación de MBP en solución y estudiar su interacción con otras moléculas y los cambios relacionados con las modificaciones en su estructura secundaria. Para ello se requiere el análisis del espectro de la proteína. En este proyecto, inicialmente se obtuvo el espectro de la proteína MBP purificada, en solución acuosa y en sustrato SERS. El espectro de MBP obtenido permitió identificar bandas particularmente la región amida III, la cual es sensible a las vibraciones moleculares del esqueleto de carbono de la proteína, así como a las cadenas laterales de los aminoácidos que la constituyen (Cuadro 5, Figuras 1, 2, 3).

Detalles estructurales del espectro Raman de MBP recombinante murina (Wang et al., 2011) y su comparación con los resultados de MBP humana del presente estudio

Los anillos aromáticos son buenos dispersores Raman y, por lo tanto, las bandas Raman características de los aminoácidos aromáticos son bastante fuertes y pueden identificarse en el espectro proteico, aunque podrían solaparse con bandas de amida y otros grupos de la cadena lateral. En el caso del espectro reportado por Wang et al., 2011, de la MBP recombinante murina, el modo de anillo de la fenilalanina a 1004 cm^{-1} es muy característico (Esta banda no se observó en el espectro de MBP humana en solución). Otras vibraciones indicativas de fenilalanina en la MBP murina se encontraron a 1606 cm^{-1} , 1204 cm^{-1} , 819 cm^{-1} y 622 cm^{-1} . En la MBP humana se encontraron bandas indicativas de fenilalanina en 1609 cm^{-1} , 1218 cm^{-1} , 848 cm^{-1} y 639 cm^{-1} . El número de banda es prácticamente igual, si se considera que, al estar en solución, la localización del mismo modo vibracional puede desplazarse hasta 33 cm^{-1} , en este caso todos los desplazamientos ocurrieron hacia el infrarrojo. En la MBP murina se encontraron bandas vibracionales asignadas a triptófano a 1617 cm^{-1} , 1576 cm^{-1} , 1421 cm^{-1} y el doblete de Fermi a 1357 cm^{-1} y 1339 cm^{-1} , respectivamente. En el espectro de MBP humana, encontramos bandas correspondientes a enlaces de triptófano en 789 cm^{-1} , 875 cm^{-1} , 1218 cm^{-1} , 1331 cm^{-1} , y el doblete de Fermi en 1368 y 1475 cm^{-1} . En el caso de la MBP humana, encontramos una mayor intensidad en las bandas de la región amida II, particularmente en 1475 cm^{-1} , 1572 cm^{-1} y 1609 cm^{-1} (Figura 1). La asignación de estas bandas corresponde a vibraciones moleculares de los enlaces C=N, C=C de aminoácidos con estructuras en anillo, específicamente de tirosina y fenilalanina (Cuadro 5).

La tirosina presenta un doblete de Fermi alrededor de 850 cm^{-1} y 830 cm^{-1} . La relación de intensidad de las dos bandas puede correlacionarse con los estados de enlace de hidrógeno del grupo hidroxilo de la tirosina. Mientras mayor es la relación relativa (I_{854}/I_{838} en la MBP murina, y I_{875}/I_{848} en la MBP humana), menor es la capacidad de la molécula de actuar como un donante de enlaces de hidrógeno. En la MBP murina se encuentran más bandas Raman de tirosina a 644 cm^{-1} , 1182 cm^{-1} y 1617 cm^{-1} ; ésta última se superpone con la banda de triptófano. En el caso de la MBP humana, encontramos bandas asignadas a tirosina en 639 cm^{-1} , 1170 cm^{-1} , 1218 cm^{-1} (ésta

superpuesta con vibraciones de fenilalanina y triptófano), 1368 cm^{-1} (superpuesta con triptófano) y 1609 cm^{-1} (superpuesta con fenilalanina).

La MBP presenta una estructura desordenada en solución acuosa (Harauz et al., 2004), y tiende a plegarse en cierto grado de estructura helicoidal tras el secado lento sobre una superficie. La banda amida I se encuentra alrededor de 1666 cm^{-1} . Esta banda vibracional se debe al modo de estiramiento C=O del enlace peptídico. Dependiendo de la estructura secundaria, la posición exacta del número de onda puede cambiar entre 1640 y 1680 cm^{-1} . Si se forman enlaces de hidrógeno entre C=O y NH de diferentes cadenas principales peptídicas, la banda amida I se puede encontrar alrededor de 1670 cm^{-1} . La posición de la banda amida I también sugiere la presencia de estructuras secundarias, que podrían ser inducidas por la liofilización (Wang et al., 2011). Este fenómeno podría observarse en el cambio de posición de las bandas en la región amida I en los espectros Raman de la proteína en solución acuosa. En el caso del espectro de la MBP humana, éste se obtuvo en solución, tanto en agua desionizada como en líquido cefalorraquídeo. Por lo que se obtuvieron diferentes posiciones en las bandas en las regiones amida I, II y III, algunas de ellas asociadas con diferentes estructuras secundarias (hélices alfa y láminas beta) que las que se obtuvieron en el espectro de la MBP murina liofilizada. Estas diferencias pudieran ser atribuidas al comportamiento de la proteína en solución, más que a las diferencias por especie. (21,22)

Aplicación del análisis de razones de bandas

En matrices biológicas complejas como el LCR, Raman espontáneo no permite identificar proteínas individuales de forma directa. Estudios estructurales de MBP mediante Raman demuestran que las bandas Amida reflejan contenido y conformación proteica, pero no constituyen firmas moleculares exclusivas de MBP.

La literatura especializada en Raman aplicado a biofluidos y biopsia líquida indica que el enfoque metodológicamente correcto es analizar patrones espectrales, usar razones de bandas, comparar contra controles biológicos y evitar atribuciones moleculares absolutas sin captura específica o SERS.

Este enfoque ha sido aplicado exitosamente en estudios clínicos de LCR para la detección de condiciones patológicas mediante firmas Raman, sin identificación directa de biomarcadores individuales. (32)

Por ello, el análisis se centró en detectar un patrón compatible con la presencia de MBP, no en asignar picos exclusivos. Los resultados del análisis de razones espectrales indican la presencia de una firma Raman asociada al incremento de contenido proteico compatible con MBP en LCR. Las bandas observadas no son exclusivas de MBP, pero su variación sistemática con la concentración añadida apoya la sensibilidad del método a cambios inducidos por MBP y valida el uso de Raman como herramienta exploratoria. Este comportamiento es consistente con reportes previos donde Raman en LCR detecta patrones bioquímicos asociados a biomarcadores, pero no identifica proteínas individuales sin estrategias de amplificación o captura específica.

Con esta estrategia experimental, observamos que la razón de bandas I1534/II423 está relacionada directamente con la concentración de MBP en LCR cuando ésta se

encuentra por debajo de 0.7 mg/ml, sin embargo, se requiere un mayor número de mediciones para confirmar esta tendencia.

Aplicaciones en enfermedades humanas

Un estudio publicado recientemente comparó la huella espectral del suero de pacientes con esclerosis múltiple y controles sanos. Los autores encontraron diferencias en la intensidad de las bandas 623, 721-735 y 1048-1076 cm^{-1} con un porcentaje de discriminación de 60-65% para cada banda. En dicho estudio, la banda 623 cm^{-1} fue asociada a vibraciones C-H en fosfolípidos y colesterol, componentes de las vainas de mielina. El rango 721-735 se atribuyó a vibraciones en los enlaces amida, lo que, de acuerdo con los autores del estudio, podría reflejar cambios en la estructura peptídica de proteínas como MBP. La región 1048-1076 se atribuyó a vibraciones en la estructura de membranas celulares y glicoproteínas involucradas en los procesos de inflamación y activación inmunológica observados en pacientes con esclerosis múltiple. Contrario a esas asignaciones de banda, en este estudio, al analizar el espectro de la proteína MBP, no encontramos bandas significativas en la región 721-735, y sí en 639 cm^{-1} (atribuida a vibraciones C-S de los aminoácidos metionina y tirosina, y C-C de tirosina y fenilalanina) y en 1073 cm^{-1} (atribuida a vibraciones en los enlaces de prolina), por lo que la consideración de los autores de la atribución de modos en la región 721-735 cm^{-1} parece ser incorrecta en cuanto a lo que se refiere a estructura de MBP. (35)

Actualmente, existe una tendencia a no sólo usar marcadores tempranos de diagnóstico, sino indicadores encontrados en fluidos biológicos. Ninguno de los reportes encontrados en Pubmed describen la estructura de la MBP humana en solución. En ese sentido, en este proyecto se analizó el espectro Raman de líquido cefalorraquídeo, con diferentes concentraciones de la proteína MBP. Fue posible amplificar la señal de la proteína purificada utilizando nanopartículas de plata. También se obtuvo una señal adecuada tanto del espectro de líquido cefalorraquídeo como de los arreglos *spike-in*. Utilizando únicamente como indicador la posición de las bandas de Raman obtenidas en el análisis de MBP purificada y MBP en líquido cefalorraquídeo, no es posible determinar una región que corresponda a con la diferente concentración de MBP.

11. Limitaciones

Nuestro estudio tiene varias limitaciones. Es una aproximación experimental inicial y en ese sentido, no es posible determinar con exactitud si los resultados serán extrapolables a situaciones clínicas reales. El uso de Raman espontáneo no permite especificidad molecular absoluta en LCR. Se utilizó únicamente una muestra de líquido cefalorraquídeo de un paciente con analítica normal, por lo que este ensayo debe considerarse como una prueba de concepto, ya que existe una falta de réplicas estadísticas y validación cuantitativa, además de que no se considerará el análisis de otras moléculas presentes en LCR. Es muy probable que las características espectrales de personas en condiciones patológicas sean variables, y, por lo tanto, aunque la concentración de MBP en esas condiciones sea igual a la que evaluamos en este proyecto, la interacción de la proteína en esos biofluidos con distinta composición

podría dar lugar a diferentes modos vibracionales. Se requieren estudios con diferentes estrategias experimentales para poder proponer la espectroscopía Raman como una herramienta de tamizaje o diagnóstico en el futuro.

12. **Conclusión**

Se determinó el espectro de la proteína MBP mediante espectroscopía Raman y SERS en concentraciones clínicamente relevantes. El uso de razones espectrales y análisis diferencial es clave para discriminar el efecto de MBP frente al fondo del LCR. Los resultados no permiten afirmar identificación específica de MBP, pero sí demuestran sensibilidad del método a su incorporación. El enfoque seguido es metodológicamente consistente con la literatura actual en Raman aplicado a biofluidos.

Este proyecto representa una primera aproximación para el estudio de las aplicaciones de espectroscopía Raman en enfermedades neurológicas, una herramienta que en el futuro podría ser de utilidad en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con este tipo de patología.

13. **Bibliografía**

1. Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J Head Trauma Rehabil.* 2006;21(5):375–8.
2. Dewan MC, Mummareddy N, Wellons JC, Bonfield CM. Epidemiology of Global Pediatric Traumatic Brain Injury: Qualitative Review. *World Neurosurg.* julio de 2016;91:497-509.e1.
3. Kochanek PM, Tasker RC, Carney N, Totten AM, Adelson PD, Selden NR, et al. Guidelines for the Management of Pediatric Severe Traumatic Brain Injury, Third Edition: Update of the Brain Trauma Foundation Guidelines. *Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc.* marzo de 2019;20(3S Suppl 1):S1–82.
4. Mathews JD, Forsythe AV, Brady Z, Butler MW, Goergen SK, Byrnes GB, et al. Cancer risk in 680,000 people exposed to computed tomography scans in childhood or adolescence: data linkage study of 11 million Australians. *BMJ.* el 21 de mayo de 2013;346:f2360.
5. Bazarian JJ, Biberthaler P, Welch RD, Lewis LM, Barzo P, Bogner-Flatz V, et al. Serum GFAP and UCH-L1 for prediction of absence of intracranial injuries on head CT (ALERT-TBI): a multicentre observational study. *Lancet Neurol.* septiembre de 2018;17(9):782–9.
6. Mondello S, Sorinola A, Czeiter E, Vámos Z, Amrein K, Synnot A, et al. Blood-Based Protein Biomarkers for the Management of Traumatic Brain Injuries in Adults Presenting to Emergency Departments with Mild Brain Injury: A Living Systematic Review and Meta-Analysis. *J Neurotrauma.* el 15 de abril de 2021;38(8):1086–106.
7. Gil-Jardiné C, Payen JF, Bernard R, Bobbia X, Bouzat P, Catoire P, et al. Management of patients suffering from mild traumatic brain injury 2023. *Anaesth Crit Care Pain Med.* agosto de 2023;42(4):101260.
8. Huie JR, Mondello S, Lindsell CJ, Antiga L, Yuh EL, Zanier ER, et al. Biomarkers for Traumatic Brain Injury: Data Standards and Statistical Considerations. *J Neurotrauma.* el 15 de septiembre de 2021;38(18):2514–29.
9. Colthup NB, Daly LH, Wiberley SE, editores. *Front Matter.* En: *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy (Third Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 1990 [citado el 3 de agosto de 2025]. p. iii. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080917405500016>
10. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl Spectrosc Rev.* septiembre de 2007;42(5):493–541.
11. Kneipp K, Kneipp H, Itzkan I, Dasari RR, Feld MS. Surface-enhanced Raman scattering and biophysics. *J Phys Condens Matter.* abril de 2002;14(18):R597.

12. Krafft C, Dietzek B, Popp J. Raman and CARSmicrospectroscopy of cells and tissues. *Analyst*. el 1 de junio de 2009;134(6):1046–57.
13. C C, J Q, Y L, D L, L W, R L, et al. Applications of Raman spectroscopy in the diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases. *Front Neurosci* [Internet]. el 2 de febrero de 2024 [citado el 3 de febrero de 2026];18. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38370434/>
14. Paraskevaïdi M, Morais CLM, Halliwell DE, Mann DMA, Allsop D, Martin-Hirsch PL, et al. Raman Spectroscopy to Diagnose Alzheimer’s Disease and Dementia with Lewy Bodies in Blood. *ACS Chem Neurosci*. el 21 de noviembre de 2018;9(11):2786–94.
15. Gualerzi A, Picciolini S, Carlomagno C, Terenzi F, Ramat S, Sorbi S, et al. Raman profiling of circulating extracellular vesicles for the stratification of Parkinson’s patients. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. noviembre de 2019;22:102097.
16. Muratore M. Raman spectroscopy and partial least squares analysis in discrimination of peripheral cells affected by Huntington’s disease. *Anal Chim Acta*. el 2 de septiembre de 2013;793:1–10.
17. Picardi G, Spalloni A, Generosi A, Paci B, Mercuri NB, Luce M, et al. Tissue degeneration in ALS affected spinal cord evaluated by Raman spectroscopy. *Sci Rep*. el 30 de agosto de 2018;8(1):13110.
18. Lariosa-Willingham K, Leonoudakis D, Bragge T, Tolppanen L, Nurmi A, Flanagan M, et al. An in vivo accelerated developmental myelination model for testing promyelinating therapeutics. *BMC Neurosci*. el 25 de mayo de 2022;23(1):30.
19. Zong C, Xu M, Xu LJ, Wei T, Ma X, Zheng XS, et al. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bioanalysis: Reliability and Challenges. *Chem Rev* [Internet]. el 11 de abril de 2018 [citado el 3 de agosto de 2025]; Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemrev.7b00668>
20. Sharma B, Frontiera RR, Henry AI, Ringe E, Van Duyne RP. SERS: Materials, applications, and the future. *Mater Today*. el 1 de enero de 2012;15(1):16–25.
21. Harauz G, Ishiyama N, Hill CMD, Bates IR, Libich DS, Farès C. Myelin basic protein-diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis. *Micron Oxf Engl* 1993. 2004;35(7):503–42.
22. Wang C, Neugebauer U, Bürck J, Myllykoski M, Baumgärtel P, Popp J, et al. Charge isomers of myelin basic protein: structure and interactions with membranes, nucleotide analogues, and calmodulin. *PLoS One*. 2011;6(5):e19915.
23. Stevens AR, Stickland CA, Harris G, Ahmed Z, Goldberg Oppenheimer P, Belli A, et al. Raman Spectroscopy as a Neuromonitoring Tool in Traumatic Brain Injury: A

Systematic Review and Clinical Perspectives. *Cells*. el 5 de abril de 2022;11(7):1227.

24. Harris G, Stickland CA, Lim M, Goldberg Oppenheimer P. Raman Spectroscopy Spectral Fingerprints of Biomarkers of Traumatic Brain Injury. *Cells*. el 8 de noviembre de 2023;12(22):2589.
25. Terrones O, Olazar-Intxausti J, Anso I, Lorizate M, Nieto-Garai JA, Contreras FX. Raman Spectroscopy as a Tool to Study the Pathophysiology of Brain Diseases. *Int J Mol Sci*. el 25 de enero de 2023;24(3):2384.
26. Shi Y, Sun W, McBride JJ, Cheng JX, Shi R. Acrolein induces myelin damage in mammalian spinal cord. *J Neurochem*. mayo de 2011;117(3):554–64.
27. de Almeida Melo Maciel Manguieira M, Caparelli-Dáquer E, Filho OPG, de Assis DSFR, Sousa JKC, Lima WL, et al. Raman spectroscopy and sciatic functional index (SFI) after low-level laser therapy (LLLT) in a rat sciatic nerve crush injury model. *Lasers Med Sci*. septiembre de 2022;37(7):2957–71.
28. Zetterberg H, Smith DH, Blennow K. Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood. *Nat Rev Neurol*. abril de 2013;9(4):201–10.
29. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Participants. *JAMA*. el 7 de enero de 2025;333(1):71–4.
30. López-Pacheco MC, Pimentel-Hernández C, Rivas-Mirelles E, Arredondo-García JL, López-Pacheco MC, Pimentel-Hernández C, et al. Normatividad que rige la investigación clínica en seres humanos y requisitos que debe cumplir un centro de investigación para participar en un estudio clínico en México. *Acta Pediátrica México*. junio de 2016;37(3):175–82.
31. Vardaki MZ, Gregoriou VG, Chochos CL. Biomedical applications, perspectives and tag design concepts in the cell - silent Raman window. *RSC Chem Biol*. el 3 de abril de 2024;5(4):273–92.
32. Ranasinghe JC, Wang Z, Huang S. Unveiling brain disorders using liquid biopsy and Raman spectroscopy. *Nanoscale*. el 27 de junio de 2024;16(25):11879–913.
33. Ortiz-Dosal A, Rodríguez-Aranda MC, Ortiz-Dosal LC, Núñez-Leyva JM, Rivera-Pérez E, Cuellar Camacho JL, et al. Quasi-spherical silver nanoparticles for human prolactin detection by surface-enhanced Raman spectroscopy. *RSC Adv*. el 21 de febrero de 2024;14(10):6998–7005.
34. Sathyavathi R, Dingari NC, Barman I, Prasad PSR, Prabhakar S, Narayana Rao D, et al. Raman spectroscopy provides a powerful, rapid diagnostic tool for the detection of tuberculous meningitis in ex vivo cerebrospinal fluid samples. *J Biophotonics*. agosto de 2013;6(8):567–72.

35. Neupokoeva A, Bratchenko I, Bratchenko L, Khivintseva E, Shirolapov I, Shusharina N, et al. Raman liquid biopsy: a new approach to the multiple sclerosis diagnostics. *Front Neurol.* 2025;16:1516712.

