

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 925 148**

21 Número de solicitud: 202130281

51 Int. Cl.:

C07K 14/52

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

30.03.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.10.2022

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

05.08.2024

Fecha de concesión:

02.10.2024

45 Fecha de publicación de la concesión:

09.10.2024

73 Titular/es:

**SERVICIO DE SALUD DE CASTILLA-LA MANCHA
(SESCAM) (75.0%)**

Avenida Rio Guadiana, 4

45071 Toledo (Toledo) ES y

FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN

BIOMÉDICA DEL HOSPITAL 12 DE OCTUBRE

(25.0%)

72 Inventor/es:

MOURIÑO ÁLVAREZ, Laura;

LÓPEZ ALMODOVAR, Luis Fernando;

RODRÍGUEZ PADIAL, Luis;

CORBACHO ALONSO, Nerea;

SATRE OLIVA, Tamara;

SOLÍS MARTÍN, Jorge;

CORROS VICENTE, Cecilia y

GONZÁLEZ BARDERAS, María Eugenia

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

54 Título: **MÉTODO DE DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO O PREDICCIÓN DE LA EVOLUCIÓN DE LA ESTENOSIS AÓRTICA**

57 Resumen:

Método de diagnóstico, pronóstico o predicción de la evolución de la estenosis aórtica.

La presente invención se refiere a un método de diagnóstico de estenosis aórtica (EA), pronóstico del desarrollo de una EA o de la predicción de progresión de EA, mediante la cuantificación del gen que codifica la proteína Trombospondina y/o el gen que codifica la proteína Endoplasmina. Así mismo, la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico, pronóstico y predicción de la EA.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.

Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 925 148 B2

DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico, pronóstico o predicción de la evolución de la estenosis aórtica

5

La presente invención se refiere a un método de diagnóstico de estenosis aórtica (EA), pronóstico del desarrollo de una EA o de la predicción de progresión de EA, mediante la cuantificación del gen que codifica la proteína Trombospondina y/o el gen que codifica la proteína Endoplasmina. Así mismo, la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico, pronóstico y predicción de la EA. Por lo tanto, la presente invención pertenece al campo de la medicina.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

La estenosis aórtica (EA) es la enfermedad valvular del corazón más común en los países desarrollados, siendo muy frecuente en pacientes con edad avanzada y, cuya prevalencia, se espera que aumente bruscamente debido al incremento de la esperanza de vida de la población (Latham S., Ann Transl Med. 2018 Jan;6(1):14.). De hecho, aproximadamente un tercio de los individuos mayores de 65 años presentan evidencia sub-clínica de EA en forma de esclerosis valvular así, en España, un 7% de las personas mayores de 85 años presentan algún grado de estenosis (Ferreira-Gonzalez, I., et al., Eur J PrevCardiol, 2012. 20(6): 1022-1030).

20

25

Durante años, la EA degenerativa ha sido considerada consecuencia inevitable del envejecimiento y se pensaba en ella como un proceso pasivo secundario al depósito de calcio en la válvula aórtica. En la actualidad, aunque no se conoce con certeza su etiología, diversos autores han señalado que comparte los mismos factores de riesgo que la aterosclerosis, ya que la EA es más frecuente en pacientes con hipercolesterolemia, hipertensión arterial, tabaquismo y diabetes (Nalini et al. Circulation 2003; 107:2181-84).

30

35

Uno de los mayores desafíos de esta patología es el aumento de opciones terapéuticas. La EA presenta un período asintomático que normalmente dura varios años, pero cuando se diagnostica, la evolución de la enfermedad es inevitable, progresando rápidamente y presentando mal pronóstico. A pesar de los esfuerzos, el manejo de la enfermedad es complejo debido a que el único tratamiento efectivo es el reemplazo

valvular, ya sea quirúrgicamente o mediante implantación transcatéter (Vahanian A. et al., Eur Heart J. 2012 Oct; 33(19):2451-96). Actualmente, tras la exploración física, la técnica más empleada para confirmar la EA es el ecocardiograma, mientras que la ecocardiografía Doppler es la técnica elegida para valorar su gravedad dado que permite

5 la visualización detallada de la válvula aórtica y la evaluación de su engrosamiento, calcificación, disminución de movilidad y aumento del gradiente transvalvular, todos ellos elementos característicos de la esclerosis y la estenosis valvular aórtica (Freeman R.V., et al. Circulation 2005; 111:3316-3326).

10 Respecto a los tratamientos farmacológicos, aunque se han realizado estudios tanto con estatinas como con otros fármacos relacionados con el metabolismo del calcio y del fosfato, sigue sin existir, en la actualidad, terapias capaces de frenar o alterar el proceso de calcificación. Por otro lado, también se ha relacionado a la calcificación valvular con fenómenos inmunológicos, encontrándose aumentos de expresión de la interleuquina

15 6 y TNF-alfa, lo cual favorecería la mineralización de las VICs, principales componentes de la válvula aórtica. Estos hallazgos parecen indicar que tratamientos dirigidos directamente a la respuesta inmune en EA podrían ser una alternativa a este proceso crónico que afecta a la población envejecida (Mathieu P., et al., J Immunol Res 2015; 24:199-206).

20

El desarrollo de paneles moleculares predictores es de vital importancia para todo el sistema sanitario. De hecho, actualmente existen diferentes perfiles que combinan de forma habitual la medición de proteínas y metabolitos en la práctica clínica para evaluar el funcionamiento de un órgano concreto. Los más utilizados son el perfil renal

25 (nitrógeno de urea, creatinina, ácido úrico, proteína total, albúmina/globulina calcio, glucosa), lipídico (colesterol, LDL, HDL, triglicéridos), hepático (bilirrubina, total y directa, AST, LDH) y tiroideo (TSH, T3, T4). Marcadores moleculares desarrollados hasta el momento como los divulgados en el documento WO2012049560 o el documento WO2007146229, no son específicos para EA, pero para enfermedades reumatoides

30 generales del corazón.

El desarrollo de un perfil de enfermedad valvular permitiría una evaluación más rápida por parte de los profesionales de la salud, lo que facilitaría y mejoraría el manejo de esta enfermedad. Además, los pacientes recibirían un diagnóstico fiable y podrían reducir el

35 número de revisiones necesarias. Esto, sumado al hecho de que se utilizarían métodos

de detección rápidos y relativamente baratos, reduciría enormemente los gastos del servicio de salud.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

Los inventores han detectado genes cuyos niveles de expresión de sus productos cambian significativamente en pacientes que sufren de estenosis aórtica (EA). Esto ha permitido a los inventores desarrollar un método sencillo y rápido de diagnóstico o pronóstico de EA, y que además permite predecir la evolución de EA, a partir de una muestra aislada de un individuo, evitando así procedimientos demorados y costosos.

10

La presente invención proporciona, por tanto, una respuesta a la necesidad de disponer de marcadores que permitan el diagnóstico y el pronóstico de modo sencillo y rápido de la EA. Así, la presente invención hace referencia a marcadores de EA, especialmente a los genes que codifican las proteínas Trombospondina y Endoplasmina, así como a métodos de diagnóstico, pronóstico y de predicción de evolución de EA haciendo uso de dichos marcadores.

15

Así, un primer aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico o pronóstico de EA, o para predecir la evolución de EA en un sujeto, de ahora en adelante el método de la invención, donde el método comprende:

20

a) cuantificar los niveles de expresión del gen que codifica la proteína Trombospondina y/o el gen que codifica la proteína Endoplasmina en una muestra aislada del sujeto; y

25

b) comparar los niveles de expresión obtenidos en la etapa (a) con valores de referencia,

donde una reducción en los niveles de expresión del gen que codifica la proteína Trombospondina y/o del gen que codifica la proteína Endoplasmina en la muestra del sujeto respecto a los valores de referencia para dicho gen, es indicativo de que dicho sujeto padece EA, esta predispuesto a padecer EA, o de que la evolución de EA es negativa.

30

Como se indica, los inventores hacen uso del nivel de expresión de genes en un método *in vitro* de "diagnóstico". Dicho término, tal como se usa en la presente invención, se refiere al procedimiento por el cual se identifica una determinada enfermedad, entidad

35

- nosológica, síndrome, o cualquier condición de salud-enfermedad, mediante el análisis de una serie de parámetros clínicos o síntomas característicos de dicha enfermedad, y que la distinguen de otras enfermedades con cuadros clínicos semejantes. En la presente invención la enfermedad a identificar es “estenosis aórtica”, o su sigla “EA”,
- 5 que tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la estenosis de la válvula aórtica, que es una valvulopatía (cardiopatía valvular) caracterizada por el estrechamiento anormal del orificio de la válvula aórtica del corazón. Esta reducción del orificio valvular puede ser congénita o adquirida.
- 10 De igual modo que el método de la invención permite el diagnóstico de EA, también permite el pronóstico de EA. El término “pronóstico” en la presente invención se refiere al procedimiento por el cual se determina la probabilidad o posibilidad de que un sujeto desarrolle una determinada enfermedad, entidad nosológica, síndrome, o cualquier
- 15 condición de salud-enfermedad, mediante el análisis de una serie de parámetros clínicos o síntomas característicos de dicha enfermedad, y que la distinguen de otras enfermedades con cuadros clínicos semejantes. En la presente invención la enfermedad a pronosticar es EA, y el parámetro clínico es el nivel de expresión de los genes que codifican las proteínas descritas en la presente invención. Como entenderán los expertos en la materia, tal valoración de pronóstico, aunque se prefiere que sea,
- 20 normalmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que se van a pronosticar. El término, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se pueda identificar como que padecen la enfermedad o que tienen predisposición a la misma. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes
- 25 herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse a, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor significación P , test de *Student* o funciones discriminantes de *Fisher*, medidas no paramétricas de *Mann Whitney*, correlación de *Spearman*, regresión logística, regresión lineal, área bajo la curva de ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al
- 30 menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite pronosticar correctamente la enfermedad de forma diferencial en al menos el 70%, más preferiblemente en al menos el 80%, mucho más preferiblemente en al menos el 90% de los sujetos de un
- 35 determinado grupo o población analizada.

Además de permitir el diagnóstico o pronóstico de EA, el método de la invención permite, también, predecir la evolución de la enfermedad EA. La expresión “predecir la evolución de EA”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere, pero no se limita a, a la progresión de la EA o a la probabilidad de presentar insuficiencia cardíaca o de muerte por insuficiencia cardíaca, así como a la predicción de la respuesta a un determinado tratamiento de la EA. Como entenderán los expertos en la materia, tal determinación, aunque se prefiere que sea, normalmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos a los que se va a predecir la evolución de la enfermedad. La expresión, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se pueda identificar como que tendrán una progresión de EA a insuficiencia cardíaca. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor significación *P*, test de *Student* o funciones discriminantes de *Fisher*, medidas no paramétricas de *Mann Whitney*, correlación de *Spearman*, regresión logística, regresión lineal, área bajo la curva de ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de *p* es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la respuesta a tratamiento favorable de forma diferencial en al menos el 70%, más preferiblemente en al menos el 80%, mucho más preferiblemente en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

El método de la invención permite diagnosticar, pronosticar o predecir la evolución de EA en un sujeto, a través de la cuantificación del nivel de expresión del producto del gen que codifica la proteína Trombospondina y/o el gen que codifica la proteína Endoplasmina. Para cualquiera de los fines del método de la invención, una “reducción de los niveles de expresión” de los productos cuantificados indica que el sujeto padece, puede venir a padecer o tiene predisposición a padecer (o sufrir de) EA. Además, dicha reducción, es igualmente indicativa, para un sujeto que sufre de EA, de una “evolución de EA negativa”. Dicha expresión, “evolución de EA negativa”, tal como se usa en la presente descripción, se refiere a que la enfermedad EA progrese de una fase inicial (esclerosis valvular) donde se observa un leve engrosamiento de la válvula, calcificación, disminución de movilidad y aumento del gradiente transvalvular progresivo

sin síntomas o síntomas leves, hasta una fase avanzada o EA severa donde la disminución en el área valvular aórtica llega a ser de 1.5 a 1 cm² y se recomienda la cirugía para tratar la enfermedad.

5 Tal como se ha descrito anteriormente, el método de la invención comprende una etapa donde se cuantifican los niveles de expresión de un gen que codifica la proteína Trombospondina y/o el gen que codifica para la proteína Endoplasmina. El término “proteína Trombospondina”, tal como se usa en la presente descripción, se refiere a la secuencia de aminoácidos que comprende la proteína Trombospondina, una variante
10 de la proteína Trombospondina o un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante y/o dicho fragmento sean funcionalmente equivalentes. El término “proteína Endoplasmina” se refiere a la secuencia de aminoácidos que comprende la proteína Endoplasmina, una variante de la proteína Endoplasmina o un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante y/o dicho fragmento sean funcionalmente equivalentes.

15 En la presente invención se entiende por “fragmento de la proteína” a la secuencia de aminoácidos que comprende uno o más aminoácidos ausentes de su extremo amino terminal o carboxilo terminal con respecto a la secuencia de aminoácidos completa de la proteína(s) codificada(s) por lo(s) gen(es) aquí descrito(s), en donde el fragmento
20 mantiene la función de la proteína original.

El término “variante de la proteína” tal como se usa en la presente invención se refiere a una proteína en la cual al menos un residuo de aminoácido difiere de la secuencia nativa de aminoácidos de dicha proteína, como resultado de una delección, inserción,
25 sustitución no conservativa o conservativa, o combinaciones de las mismas.

Dicho fragmento de la proteína y/o variante de la proteína deberán ser “funcionalmente equivalentes”. Dicho término tal como se usa en la presente descripción se refiere a que el fragmento de la proteína y/o la variante de la proteína deberá realizar funciones
30 idénticas a la proteína nativa, es decir, la proteína sin alteraciones en la secuencia, pero donde dichas funciones se pueden realizar con los mismos o con un incremento o reducción de uno o más parámetros de la actividad de la proteína. Para poder determinar si un fragmento o una variante de una proteína es funcionalmente equivalente es necesario determinar si dicho fragmento y/o variante realiza las mismas
35 funciones que la proteína nativa. Como el experto en la materia comprenderá dicha

determinación dependerá que la proteína en cuestión. Ejemplo de un método para poder determinar si un fragmento y/o variante de una proteína es funcionalmente equivalente a la proteína nativa es reemplazar dicha proteína nativa con un fragmento y/o variante en células en cultivo y verificar si las funciones de la proteína nativa son realizadas por dicho fragmento y/o variante. Técnicas para realizar dicho reemplazamiento son generalmente conocidas en el estado del arte (Lanigan *et al.*, Genes (Basel) 2020 Mar; 11(3): 291, 1-21).

Las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 son las secuencias de aminoácidos de la proteína Trombospondina y Endoplasmina, respectivamente, de *Homo sapiens* (humanos) con el número de acceso P07996 (versión 2 de la secuencia) y P14625 (versión 1 de la secuencia), respectivamente, de la base de datos UNIPROT. En una realización preferida del método de la invención, la proteína Trombospondina comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1. En otra realización preferida del método de la invención, la proteína Trombospondina consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1

MGLAWGLGVFLMHVCGTNRIPESGGDNSVFDIFELTGAARKGSGRRLVKGPDPSSPAFR
 IEDANLIPPVPDDKFQDLVDAVRAEKGFLLLASLRQMCKTRGTLALERKDHSGQVFSV
 SNGKAGTLDLSLTVQKQHVSVVEEALLATGQWKSITLQVQEDRAQLYIDCEKMENAELD
 VPIQSVFTRDLASIALRLIAKGGVNDNFQGVQLQNVRFVFGTTPEDILRNKGCSSSTSVLL
 TLDNNVVGSSPAIRTNVYIGHKTKDLQAICGISCEDELSSMVLELRGLRTIVTTLQDSIRK
 VTEENKELANELRRPPLCYHNGVQYRNNEEWTVDSCTECHCQNSVTICKKVSCPIMPCSN
 ATVPDGECCPRCWPSDSADDGWSPWSEWTSCSTSCGNGIQQRGRSCDSLNNRCEGSSVQT
 RTCHIQECDKRFKQDGGWSHWSPWSSCSVTGCGVITRIRLCNSPSPQMNGKPCGEARE
 TKACKKDACPINGGWGPWSPWDICSVTCGGGVQKRSRLCNNPTPQFGGKDCVGDVTENQI
 CNKQDCPIDGCLSNPCFAGVKCTSYPDGSKGACPPGYSGNGIQCTDVDECKEVPDACF
 NHNGEHRCENTDPGYNCLPCPPRFTGSQPFQGVHATANKQVCKPRNPCTDGTDCNKN
 AKCNYLGHYSDPMYRCECKPGYAGNGIICGEDTDLGWPNNENLVCVANATYHCKKDNCPN
 LPNSGQEDYDKDGIGDACDDDDNDKIPDDRDNCPFHYNPAQYDYDRDDVGDRCNCPYN
 HNPQADTDNNGEGDACAADIDGDGILNERDNCQYVYNVDQRDMDMGVGDQCDNCPLEH
 NPDQLSDSDRIGDTCNNDQDIDEDGHQNNLDNCPYVPNANQADHDKDGKGDACDHDDDN
 DGIPDDKDNCRCLVPNPDQKDSGDGRGDACKDDFDHDSVPDIDDICPENVDISETDFRRF

QMIPLDPKGTSONDPNWVVRHQGKELVQTVNCDPGLAVGYDEFNAVDFSGTFFINTERDD
 DYAGFVFGYQSSSRFYVMWKQVTQSYWDTNPTRAQGYSGLSVKVNSTTGPGHELRNAL
 WHTGNTPGQVRTLWHDPRHIGWKDFTAYRWRLSHRPKTGFIRVVMYEGKKIMADSGPIYD
 KTYAGGRLGLFVFSQEMVFFSDLKYECRDP

5

En otra realización preferida del método de la invención, la proteína Endoplasmina comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% identidad con la SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida del método de la invención la proteína Endoplasmina consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

10

SEQ ID NO: 2

MRALWVLGLCCVLLTFGSVRADDEVDVDGTVEEDLGKSREGSRTDDEVVQREEEAIQLDG
 LNASQIRELREKSEKFAFQAEVNRMMKLIINSLYKNKEIFLRELISNASDALDKIRLISL
 15 TDENALSGNEELTVKIKCDKEKNLLHVTDTGVGMTREELVKNLGTIAKSGTSEFLNKMTE
 AQEDGQSTSELIGQFGVGFYSAFLVADKVIVTSKHNNDTQHIWESDSNEFSVIADPRGNT
 LGRGTTITLVLKEEASDYLELDTIKNLVKKYSQFINFPIYVWSSKTETVEEPMEEEEAAK
 EEKEESDDEAAVEEEEEEEKPKTKKVEKTVWDWELMNDIKPIWQRPSKEVEEEDYKAFYK
 SFSKESDDPMAYIHFTAEGEVTFKSILFVPTSAPRGLFDEYGSKSDYIKLYVRRVFITD
 20 DFHDMMPKYLNFVKGVVDSDDLPLNVSRETLLQHKLLKVIRKKLVRKTLDMIKKIADDKY
 NDTFWKEFGTNIKLGVIEDHSNRTRLAKLLRFQSSHHPTDITSLDQYVERMKEKQDKIYF
 MAGSSRKEAESSPFVERLLKKGYEVIYLTEPVDEYCIQALPEFDGKRFQNVAKEGVKFDE
 SEKTKESREAVEKEFEPLLNWMKDKALKDKIEKAVVSQRLTESPCALVASQYGWSGNMER
 IMKAQAYQTGKDISTNYYASQKKTFEINPRHPLIRDMLRRIKEDEDDKTVLDDLAVVLFET
 25 ATLRSGYLLPDTKAYGDRIERMLRLSLNIDPDAKVEEEPEEEPEETAEDTTEDTEQDEDE
 EMDVGTDEEEETAKESTA EKDEL

En adición a los genes que codifican las proteínas Trombospondina y/o Endoplasmina, en otra realización preferida del método de la invención, en la etapa (a) se cuantifica además los niveles de expresión de, al menos, un gen que codifica una proteína seleccionada de la lista que consiste en: colagenasa tipo IV de 72 kDa, Alcohol deshidrogenasa 1B, Glicoproteína 1 alfa-1-ácido, Alfa-1-antichimotripsina, Alfa-1-antitripsina, Alfa-2-HS-glicoproteína, Alfa-2-macroglobulina, Alfa-enolasa, Angiotensinógeno, Anexina A1, Anexina A2, Apolipoproteína B-100, Apolipoproteína C-II, Beta-1,4-galactosyltransferase 2, Biglicano, Complejo 1 subunidad 5 de la Biogénesis

35

de organelos relacionados con el lisosoma, Proteína de unión a calcineurina cabina-1, proteína de la matriz oligomérica del cartílago, Catepsina B, Catepsina D, CD9 antígeno, Ceruloplasmina, Quiitinase-3-like proteína 1, Quiitinase-3-like proteína 2, Clusterina, Colágeno cadena alfa-1(III), Colágeno cadena alfa-1(VI), Colágeno cadena alfa-1(XIV),

5 Colágeno cadena alfa-2(I), Complemento C1s subcomponente, Complemento C3, Cistatina-C, Decorina, Proteína 1 de la matriz extracelular similar a la fibulina que contiene EGF, Fibronectina, Proteína 3 relacionada con la folistatina, Proteína 2 de la matriz extracelular relacionada con FRAS1, Galectina-1, Gelsolina, Glutación peroxidasa 3, Fosforilasa de glucógeno, forma de hígado, Haptoglobina, Hemopexina, Histona H2A

10 tipo 1-H, Región C de la cadena gamma-1 de la Ig, Proteína 5 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, Proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, Interleukina-6, Receptor de células asesinas tipo inmunoglobulina 3DL3, Miembro 9 del grupo de receptores leucocitario, Cadena A L-lactato deshidrogenasa, Lumican, Inhibidor 1 de la metaloproteínasa, Inhibidor 3 de la metaloproteínasa,

15 Moesina, Subunidad p100 del factor nuclear NF-kappa-B, Proteína PTX3 relacionada con la pentraxina, Peptidil-prolyl cis-trans isomerasa A, Periostina, Peroxiredoxina-1, Fosfoglicerato quinasa 1, Proteína de transferencia de fosfolípidos, Factor derivado del epitelio pigmentario, Inhibidor de la proteasa plasmática C1, Inhibidor 1 del activador del plasminógeno, Proteína 1 que interactúa con el factor de transcripción Leucemia pre-

20 célula B, Potenciador 2 de la endopeptidasa C del procolágeno, Prolargina, Prosaposina, isomerasa-D Prostaglandina-H2, Subunidad 3E reguladora de la proteína fosfatasa 1, Proteína S100-A6, Proteasa Serina HTRA1, Serotransferrina, Albúmina sérica, Componente amiloide P sérico, Paraoxonasa/lactonasa sérica 3, Spondina-1, Superóxido dismutasa [Cu-Zn], Superóxido dismutasa [Mn] mitocondrial, subunidad

25 SMARCC1 del complejo SWI/SNF, Tenascina-X, Proteína ig-h3 inducida por el factor de crecimiento transformante, Transgelina, Triosa-fosfato isomerasa, Cadena de tubulina beta, Vimentina y cualquiera de sus combinaciones, y donde una modificación en los niveles de expresión de al menos uno de los genes en la muestra del sujeto respecto a los valores de referencia para cada uno de ellos, es indicativo de una

30 evolución de EA negativa.

En la Tabla 1 se indican los números de acceso de la secuencia aminoacídica de las proteínas descritas en el párrafo anterior en la presente descripción.

35 Tabla 1: Designaciones de las proteínas detectados como marcadores de EA.

Numero de acceso UNIPROT	Versión de secuencia en UNIPROT	Nombre de la proteína	Sigla del gen
P08253	2	colagenasa tipo IV de 72 kDa	MMP2_HUMAN
P00325	2	Alcohol deshidrogenasa 1B	ADH1B_HUMAN
P02763	1	Glicoproteína 1 alfa-1-ácido	A1AG1_HUMAN
P01011	2	Alpha-1-antichimotripsina	AACT_HUMAN
P01009	3	Alfa-1-antitripsina	A1AT_HUMAN
P02765	2	Alfa-2-HS-glicoproteína	FETUA_HUMAN
P01023	3	Alfa-2-macroglobulina	A2MG_HUMAN
P06733	2	Alfa-enolasa	ENOA_HUMAN
P01019	1	Angiotensinógeno	ANGT_HUMAN
P04083	2	Anexina A1	ANXA1_HUMAN
P07355	2	Anexina A2	ANXA2_HUMAN
P04114	2	Apolipoproteína B-100	APOB_HUMAN
P02655	1	Apolipoproteína C-II	APOC2_HUMAN
O60909	1	Beta-1,4-galactosyltransferase 2	B4GT2_HUMAN
P21810	2	Biglicano	PGS1_HUMAN
Q8TDH9	1	Complejo 1 subunidad 5 de la Biogénesis de organelos relacionados con el lisosoma	BL1S5_HUMAN
Q9Y6J0	1	Proteína de unión a calcineurina cabina-1	CABIN_HUMAN
P49747	2	proteína de la matriz oligomérica del cartílago	COMP_HUMAN
P07858	3	Catepsina B	CATB_HUMAN
P07339	1	Catepsina D	CATD_HUMAN
P21926	4	CD9 antígeno	CD9_HUMAN
P00450	1	Ceruloplasmina	CERU_HUMAN
P36222	2	Quiitinase-3-like proteína 1	CH3L1_HUMAN
Q15782	1	Quiitinase-3-like proteína 2	CH3L2_HUMAN
P10909	1	Clusterina	CLUS_HUMAN
P02461	4	Colágeno cadena alfa-1(III)	CO3A1_HUMAN
P12109	3	Colágeno cadena alfa-1(VI)	CO6A1_HUMAN
Q05707	3	Colágeno cadena alfa-1(XIV)	COEA1_HUMAN
P08123	7	Colágeno cadena alfa-2(I)	CO1A2_HUMAN
P09871	1	Complemento C1s subcomponente	C1S_HUMAN
P01024	2	Complemento C3	CO3_HUMAN
P01034	1	Cistatina-C	CYTC_HUMAN
P07585	1	Decorina	PGS2_HUMAN

Numero de acceso UNIPROT	Versión de secuencia en UNIPROT	Nombre de la proteína	Sigla del gen
Q12805	2	Proteína 1 de la matriz extracelular similar a la fibulina que contiene EGF	FBLN3_HUMAN
P02751	5	Fibronectina	FINC_HUMAN
O95633	1	Proteína 3 relacionada con la folistatina	FSTL3_HUMAN
Q5SZK8	2	Proteína 2 de la matriz extracelular relacionada con FRAS1	FREM2_HUMAN
P09382	2	Galectina-1	LEG1_HUMAN
P06396	1	Gelsolina	GELS_HUMAN
P22352	2	Glutación peroxidasa 3	GPX3_HUMAN
P06737	4	Fosforilasa de glucógeno, forma de hígado	PYGL_HUMAN
P00738	1	Haptoglobina	HPT_HUMAN
P02790	2	Hemopexina	HEMO_HUMAN
Q96KK5	3	Histona H2A tipo 1-H	H2A1H_HUMAN
P01857	1	Región C de la cadena gamma-1 de la Ig	IGHG1_HUMAN
P24593	1	Proteína 5 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	IBP5_HUMAN
Q16270	1	Proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	IBP7_HUMAN
P05231	1	Interleukina-6	IL6_HUMAN
Q8N743	2	Receptor de células asesinas tipo inmunoglobulina 3DL3	KI3L3_HUMAN
Q96B70	2	Miembro 9 del grupo de receptores leucocitario	LENG9_HUMAN
P00338	2	Cadena A L-lactato deshidrogenasa	LDHA_HUMAN
P51884	2	Lumican	LUM_HUMAN
P01033	1	Inhibidor 1 de la metaloproteinasas	TIMP1_HUMAN
P35625	2	Inhibidor 3 de la metaloproteinasas	TIMP3_HUMAN
P26038	3	Moesina	MOES_HUMAN
Q00653	4	Subunidad p100 del factor nuclear NF-kappa-B	NFKB2_HUMAN
P26022	3	Proteína PTX3 relacionada con la pentraxina	PTX3_HUMAN
P62937	2	Peptidil-prolilo cis-trans isomerasa A	PPIA_HUMAN
Q15063	2	Periostina	POSTN_HUMAN
Q06830	1	Peroxiredoxina-1	PRDX1_HUMAN

Numero de acceso UNIPROT	Versión de secuencia en UNIPROT	Nombre de la proteína	Sigla del gen
P00558	3	Fosfoglicerato quinasa 1	PGK1_HUMAN
P55058	1	Proteína de transferencia de fosfolípidos	PLTP_HUMAN
P36955	4	Factor derivado del epitelio pigmentario	PEDF_HUMAN
P05155	2	Inhibidor de la proteasa plasmática C1	IC1_HUMAN
P05121	1	Inhibidor 1 del activador del plasminógeno	PAI1_HUMAN
Q96AQ6	1	Proteína 1 que interactúa con el factor de transcripción Leucemia pre-célula B	PBIP1_HUMAN
Q9UKZ9	1	Potenciador 2 de la endopeptidasa C del procolágeno	PCOC2_HUMAN
P51888	1	Prolargina	PRELP_HUMAN
P07602	2	Prosaposina	SAP_HUMAN
P41222	1	isomerasa-D Prostaglandina-H2	PTGDS_HUMAN
Q9H7J1	2	Subunidad 3E reguladora de la proteína fosfatasa 1	PPR3E_HUMAN
P06703	1	Proteína S100-A6	S10A6_HUMAN
Q92743	1	Proteasa Serina HTRA1	HTRA1_HUMAN
P02787	3	Serotransferrina	TRFE_HUMAN
P02768	2	Albumina sérica	ALBU_HUMAN
P02743	2	Componente amiloide P sérico	SAMP_HUMAN
Q15166	3	Paraoxonasa/lactonasa sérica 3	PON3_HUMAN
Q9HCB6	2	Spondina-1	SPON1_HUMAN
P00441	2	Superóxido dismutasa [Cu-Zn]	SODC_HUMAN
P04179	3	Superóxido dismutasa [Mn] mitocondrial	SODM_HUMAN
Q92922	3	subunidad SMARCC1 del complejo SWI/SNF	SMRC1_HUMAN
P22105	5	Tenascina-X	TENX_HUMAN
Q15582	1	Proteína ig-h3 inducida por el factor de crecimiento transformante	BGH3_HUMAN
Q01995	4	Transgelina	TAGL_HUMA
P60174	4	Triosa-fosfato isomerasa	TPIS_HUMAN
P07437	2	Cadena de tubulina beta	TBB5_HUMAN
P08670	4	Vimentina	VIME_HUMAN

La determinación de los niveles de expresión de los productos de los genes anteriormente mencionados, se hace de acuerdo con el método de la invención en el paso a) de dicho método. Así, la expresión “cuantificar los niveles de expresión” en la muestra obtenida, tal y como se emplea en esta descripción, hace referencia a la detección y a la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semicuantitativa o cuantitativa, del producto de la expresión del gen que codifica la proteína Trombospondina y/o del gen que codifica la proteína Endoplasmina o demás genes que codifican las proteínas descritas en la Tabla 1. La medida puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del producto de expresión de los genes que codifican las proteínas descritas en esta descripción, basada en una señal que se obtiene directamente de dicho producto de expresión y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de producto de expresión del gen, presentes en la muestra. Dicha señal puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física del producto de expresión. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario (por ejemplo, un componente distinto de los productos de expresión) o un sistema de medida biológica (por ejemplo, la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

Dichas mediciones, directas o indirectas, se hacen en una muestra obtenida del sujeto. Así, en la presente invención se entiende por “muestra aislada” a una parte o cantidad pequeña de una cosa que se considera representativa del total y que se toma o se separa de ella para someterla a estudio, análisis o experimentación. En la presente invención, dicho estudio, análisis o experimentación hace referencia a la determinación del nivel de expresión de los genes que codifican las proteínas descritas en la presente invención. En una realización preferida, la muestra aislada en el paso (a) del método de la invención es una muestra biológica. Dicha muestra puede ser un tejido y/o un fluido biológico. Además, la muestra biológica aislada en el paso (a) del método de la invención puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse a, fresca, congelada, fijada o embebida en parafina. Así, en una realización preferida, la muestra aislada en el paso (a) del método de la invención es un tejido o un fluido biológico.

El tejido puede ser, por ejemplo y sin limitación a, una biopsia o un aspirado por aguja fina. En una realización preferida del método de la invención la muestra aislada en el

paso (a) es un tejido de válvula aórtica.

El fluido biológico, tal como se usa en la presente descripción, comprende fluidos excretados o secretados del cuerpo, así como fluidos que normalmente no lo son. El fluido biológico comprende, aunque sin limitarse a, líquido amniótico que rodea el feto, humor acuoso, fluido intersticial, linfa, leche materna, moco (incluyendo el drenaje nasal y la flema), saliva, sebo (grasa de la piel), suero, sudor, lágrimas, orina, líquido pericárdico, sangre y plasma sanguíneo. En una realización preferida del método de la invención, el fluido biológico es sangre, plasma sanguíneo o suero sanguíneo.

La muestra biológica aislada del paso (a) puede, además, comprender otros componentes, como células. Así, en otra realización preferida la muestra aislada del paso (a) comprende células. Preferiblemente, dichas células son de la válvula aórtica del organismo del cual se aísla la muestra. Dichas células pueden además estar presentes en el fluido biológico. Así, en otra realización preferida del método de la invención, el fluido biológico comprende células.

Tal como se ha mencionado previamente, la muestra del paso (a) es una muestra aislada de un sujeto, como un humano o animal, y puede provenir de un fluido biológico y/o cualquier célula y/o tejido de dicho sujeto. El término "sujeto", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. Asimismo, en una realización preferida del método de la invención, el sujeto es un mamífero, preferiblemente un humano.

De acuerdo con el método de la presente invención, la cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica la proteína Trombospondina y/o del gen que codifica la proteína Endoplasmina, o cualquier otro gen que codifica una de las proteínas descritas en la Tabla 1, puede ser llevada a cabo por cualquier método conocido en el estado de la técnica para cuantificar productos de expresión de genes

En una realización preferida del método de la invención, la cuantificación del nivel de la expresión del gen se lleva a cabo mediante la cuantificación del ADN complementario (ADNc), o un fragmento de dicho ADNc, del ARN mensajero (ARNm) o un fragmento de dicho ARNm, o de la proteína codificada por dicho gen o un fragmento de dicha proteína.

La cuantificación del nivel de ADNc o ARNm se puede realizar, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos; *microarrays* de ADN elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; *microarrays* de ADN elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación *in situ* utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de marcaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante resonancia magnética nuclear o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio. Así, en una realización preferida del método de la invención la cuantificación del ADNc o del ARNm, se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa, un array de ADN o del ARN, o una hibridación.

En la presente invención se entiende por “fragmento de ADNc” o “fragmento de ARNm” a la secuencia de nucleótidos de los genes que codifican las proteínas aquí descritas que comprenden uno o más nucleótidos ausentes de los extremos 3' y/o 5' con respecto a la secuencia de nucleótidos completa de dichos genes.

Tal como para el ADNc o el ARNm, la cuantificación del nivel de una proteína codificada por un gen, variante y/o fragmento de dicha proteína, se puede hacer por cualquier técnica conocida. En una realización preferida del método de la invención la cuantificación de la proteína se lleva a cabo por Western Blot, técnicas inmunohistoquímicas, ELISA, array de proteínas, inmunoprecipitación o radioinmunoensayo.

La técnica Western Blot, o inmunodetección en membrana, o una variante denominada inmunoblot, son técnicas que permiten detectar una proteína o un fragmento de dicha proteína. Para llevar a cabo dicha técnica, se obtiene un extracto de proteínas a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto y se separan las proteínas mediante electroforesis en un medio de soporte capaz de retenerlas. Una vez separadas las proteínas se transfieren a un soporte diferente o membrana donde pueden ser

detectadas mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen la proteína Trombospondina y/o la proteína Endoplasmina, sus variantes o los fragmentos de las mismas, o cualquiera de las otras proteínas descritas en la Tabla 1. Esta membrana se hibrida con un primer anticuerpo específico (o anticuerpo primario) que reconoce la proteína Trombospondina y/o la proteína Endoplasmina, sus variantes o fragmentos de las mismas, o cualquiera de las otras proteínas descritas en la Tabla 1. A continuación, la membrana se hibrida con un segundo anticuerpo (o anticuerpo secundario) capaz de reconocer de manera específica al anticuerpo primario y que se encuentra conjugado o unido con un compuesto marcador. En una realización alternativa, es el anticuerpo primario que reconoce la proteína Trombospondina y/o la proteína Endoplasmina, sus variantes o fragmentos de las mismas, o cualquiera de las otras proteínas descritas en la Tabla 1, el que está conjugado o unido a un compuesto marcador, y no es necesario el uso de un anticuerpo secundario. Son conocidos en el estado de la técnica diferentes formatos, soportes y técnicas que pueden ser empleados para la realización de este aspecto preferido del método de la invención.

Las técnicas de inmunohistoquímica permiten la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas de determinantes antigénicos característicos. El análisis mediante inmunohistoquímica se realiza sobre cortes de tejido, ya sea congelado o incluido en parafina, procedente de una muestra biológica aislada de un sujeto. Estos cortes se hibridan con un anticuerpo específico o anticuerpo primario que reconoce a la proteína Trombospondina y/o la proteína Endoplasmina, sus variantes o fragmentos de las mismas, o cualquiera de las otras proteínas descritas en la Tabla 1. A continuación, los cortes se hibridan con un anticuerpo secundario capaz de reconocer de manera específica el anticuerpo primario y que se encuentra conjugado o unido con un compuesto marcador. En una realización alternativa, es el anticuerpo primario que reconoce la proteína Trombospondina y/o la proteína Endoplasmina, sus variantes o fragmentos de las mismas, o cualquiera de las otras proteínas descritas en la Tabla 1, el que está conjugado o unido a un compuesto marcador, y no es necesario el uso de un anticuerpo secundario.

Un inmunoensayo es un ensayo bioquímico que mide la concentración de una sustancia en una muestra biológica usando una reacción de un anticuerpo o anticuerpos contra su antígeno. El ensayo se basa en la unión específica de un anticuerpo con su antígeno. El término anticuerpo, tal como aquí se utiliza, incluye anticuerpos monoclonales,

anticuerpos policlonales, fragmentos recombinantes de anticuerpos, combibodies, fragmentos Fab y scFv de anticuerpos, así como los dominios de unión a ligando. Anticuerpos específicos de las proteínas aquí descritas están disponibles comercialmente.

5

La detección y/o cuantificación del anticuerpo y/o del antígeno puede realizarse con diversos métodos. Uno de los más comunes es el marcaje del antígeno o el anticuerpo. Este marcaje puede consistir, aunque sin limitarse, en una enzima, un radioisótopo (radioinmunoensayo), un marcador magnético (inmunoensayo magnético) o un
 10 fluoróforo. Además, hay otras técnicas como la aglutinación, la nefelometría, la turbidimetría o el *immunoblot*. Los inmunoensayos heterogéneos pueden ser competitivos o no competitivos. En un inmunoensayo competitivo la respuesta es inversamente proporcional a la concentración de antígeno de la muestra. En un ensayo no competitivo, también llamado ensayo en sándwich, los resultados son directamente
 15 proporcionales a la concentración de antígeno. Una técnica de inmuno ensayo que puede usarse en la presente invención es el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (del inglés “*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*”). En otra técnica de inmunoensayo, la inmunoprecipitación, la proteína de interés se precipita o aísla de la muestra por precipitación de dicha proteína con un antígeno, tal como un anticuerpo que
 20 reconoce dicha proteína, donde dicho anticuerpo está acoplado a un sustrato sólido que posibilita la separación de la proteína diana de la muestra.

La tecnología de arrays se basa, por ejemplo, pero sin limitarse a, en la fijación en un soporte sólido de una molécula que reconoce el producto de expresión de la presente
 25 invención. El array de anticuerpos es uno de los más comunes arrays de proteínas. En este caso los anticuerpos se colocan en pequeños puntos, se fijan en el soporte sólido (llamado chip de proteínas) y se usan para capturar moléculas y así detectar las proteínas en una muestra biológica, como pueden ser un lisado celular, un medio condicionado, suero u orina.

30

El término “soporte sólido” tal y como se emplea en la presente descripción se refiere a una gran variedad de materiales, por ejemplo, pero sin limitarse, resina de intercambio iónico o adsorción, vidrio, plástico, látex, nylon, gel, ésteres o celulosa, esferas paramagnéticas o una combinación de algunos de ellos.

35

Las técnicas descritas en la presente descripción permiten la detección de la proteína diana, así como de un fragmento de la misma. En la presente invención se entiende por “fragmento de la proteína” a la secuencia de aminoácidos de proteínas que comprende uno o más aminoácidos ausentes de su extremo amino terminal o carboxilo terminal con respecto a la secuencia de aminoácidos completa de la proteína(s) codificada(s) por lo(s) gen(es) aquí descrito(s), en donde el fragmento mantiene la función de la proteína original.

Todas las técnicas y métodos aquí descritos para cuantificar el producto de expresión del gen que codifica la proteína Trombospondina y/o del gen que codifica la proteína Endoplasmina son igualmente válidos, así como sus definiciones, para todos los genes que codifican las demás proteínas descritas en la presente descripción.

Una vez que se cuantifican los niveles de expresión en el paso a) del método de la invención, se procede a realizar el paso b) del método la invención, es decir, “comparar los niveles de expresión obtenidos en la etapa (a) con valores de referencia”. Los términos “comparar” y “comparación”, tal y como se emplea en la descripción del método de la invención, se refieren, pero no se limitan, a la comparación de la cantidad de producto de expresión del gen que codifica la proteína Trombospondina y/o del gen que codifica la proteína Endoplasmina, o el gen que codifica cualquiera de las demás proteínas descritas en la Tabla 1, de la muestra a analizar, también llamada muestra problema, con una cantidad de producto de expresión del mismo gen o genes en una muestra de referencia deseable, descrita en otra parte de la presente descripción. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente junto con la muestra biológica problema. La comparación del paso (b) del método de la invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

El término “valores de referencia”, tal y como se emplea en la descripción del método de la invención, se refiere a la cantidad absoluta o relativa de producto de expresión del gen que codifica la proteína Trombospondina y/o del gen que codifica la proteína Endoplasmina o el gen que codifica para cualquiera de las demás proteínas descritas en la Tabla 1, que permite discriminar la presencia de la EA. Los valores estándar adecuados pueden ser determinados por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o

consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Más preferiblemente, los valores estándar pueden derivarse de los límites de distribución normal de una cantidad fisiológica encontrada en una población de sujetos control, preferiblemente donde dichos sujetos control no sufren de la enfermedad EA o cualquier otra enfermedad cardíaca o reumatoide, u otra enfermedad que pueda afectar la función cardíaca del sujeto. Dicha cantidad fisiológica puede ser determinada por varias técnicas bien conocidas, como, por ejemplo, el cálculo de la media de la cantidad de producto de expresión del gen que codifica la proteína Trombospondina y/o del gen que codifica la proteína Endoplasmina o el gen que codifica para cualquiera de las demás proteínas descritas en la Tabla 1 en una población de sujetos control determinado mediante el método de la presente invención.

La comparación en el paso (b) del método de la invención comprende determinar una modificación de los niveles de expresión en relación a los valores de referencia. El término “modificación en los niveles de expresión” tal y como se usa en la presente descripción hace referencia a una desviación significativa, que puede ser una reducción o un aumento, de la cantidad absoluta o relativa del producto de expresión de al menos uno de los genes que codifican para cualquiera de las proteínas descritas en la Tabla 1 en comparación con los valores de referencia para dichos genes.

La desviación significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor *p*, test de *Student* o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de *p* es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

La invención aquí descrita contempla el uso de los niveles de expresión de los productos de genes para determinar la presencia, posible presencia o evolución de una enfermedad, la EA, a partir de una muestra aislada de un sujeto. Así, otro aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* de los niveles de expresión del gen que codifica la proteína Trombospondina y/o el gen que codifica la proteína Endoplasmina, de ahora

en adelante el uso de la invención, para:

a) el diagnóstico o el pronóstico de EA; o

b) predecir la evolución de EA,

en una muestra aislada de un sujeto.

5

De forma análoga al método de la invención, en una realización preferida del uso de la invención, una reducción en los niveles de expresión del gen que codifica la proteína Trombospondina y/o del gen que codifica la proteína Endoplasmina en la muestra del sujeto respecto a los valores de referencia para dicho gen, es indicativo de que dicho

10 sujeto padece EA, está predispuesto a padecer EA, o de que la evolución de EA es negativa.

Tal como se ha explicado en párrafos anteriores, el uso de la invención comprende los genes que codifican para las proteínas Trombospondina y Endoplasmina. En una

15 realización preferida del uso de la invención la proteína Trombospondina comprende una secuencia de amino ácidos con al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 99 o 100% identidad con la SEQ ID NO: 1. En otra realización preferida del uso de la invención la proteína Trombospondina consiste en la SEQ ID NO: 1.

20 En otra realización preferida del uso de la invención la proteína Endoplasmina comprende una secuencia de amino ácidos con al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 99 o 100% identidad con la SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida del uso de la invención la proteína Endoplasmina consiste en la SEQ ID NO: 2.

25

El uso de la invención comprende además el uso de los genes que codifican las proteínas descritas en la Tabla 1. Así, en otra realización preferida el uso de la invención comprende además los niveles de expresión de al menos uno gen que codifica para una proteína seleccionada de la lista que consiste en: colagenasa tipo IV de 72 kDa, Alcohol

30 deshidrogenasa 1B, Glicoproteína 1 alfa-1-ácido, Alpha-1-antichimotripsina, Alfa-1-antitripsina, Alfa-2-HS-glicoproteína, Alfa-2-macroglobulina, Alfa-enolasa, Angiotensinógeno, Anexina A1, Anexina A2, Apolipoproteína B-100, Apolipoproteína C-II, Beta-1,4-galactosyltransferase 2, Biglicano, Complejo 1 subunidad 5 de la Biogénesis de organelos relacionados con el lisosoma, Proteína de unión a calcineurina cabina-1,

35 proteína de la matriz oligomérica del cartílago, Catepsina B, Catepsina D, CD9 antígeno,

Ceruloplasmina, Quiitinase-3-like proteína 1, Quiitinase-3-like proteína 2, Clusterina, Colágeno cadena alfa-1(III), Colágeno cadena alfa-1(VI), Colágeno cadena alfa-1(XIV), Colágeno cadena alfa-2(I), Complemento C1s subcomponente, Complemento C3, Cistatina-C, Decorina, Proteína 1 de la matriz extracelular similar a la fibulina que
 5 contiene EGF, Fibronectina, Proteína 3 relacionada con la folistatina, Proteína 2 de la matriz extracelular relacionada con FRAS1, Galectina-1, Gelsolina, Glutación peroxidasa 3, Fosforilasa de glucógeno, forma de hígado, Haptoglobina, Hemopexina, Histona H2A tipo 1-H, Región C de la cadena gamma-1 de la Ig, Proteína 5 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, Proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a la
 10 insulina, Interleukina-6, Receptor de células asesinas tipo inmunoglobulina 3DL3, Miembro 9 del grupo de receptores leucocitario, Cadena A L-lactato deshidrogenasa, Lumicana, Inhibidor 1 de la metaloproteínasa, Inhibidor 3 de la metaloproteínasa, Moesina, Subunidad p100 del factor nuclear NF-kappa-B, Proteína PTX3 relacionada con la pentraxina, Peptidil-prolyl cis-trans isomerasa A, Periostina, Peroxiredoxina-1,
 15 Fosfoglicerato quinasa 1, Proteína de transferencia de fosfolípidos, Factor derivado del epitelio pigmentario, Inhibidor de la proteasa plasmática C1, Inhibidor 1 del activador del plasminógeno, Proteína 1 que interactúa con el factor de transcripción Leucemia pre-célula B, Potenciador 2 de la endopeptidasa C del procolágeno, Prolargina, Prosaposina, isomerasa-D Prostaglandina-H2, Subunidad 3E reguladora de la proteína
 20 fosfatasa 1, Proteína S100-A6, Proteasa Serina HTRA1, Serotransferrina, Albúmina sérica, Componente amiloide P sérico, Paraoxonasa/lactonasa sérica 3, Spondina-1, Superóxido dismutasa [Cu-Zn], Superóxido dismutasa [Mn] mitocondrial, subunidad SMARCC1 del complejo SWI/SNF, Tenascina-X, Proteína ig-h3 inducida por el factor de crecimiento transformante, Transgelina, Triosa-fosfato isomerasa, Cadena de
 25 tubulina beta, Vimentina y cualquiera de sus combinaciones, y donde una modificación en los niveles de expresión de al menos un gen en la muestra del sujeto respecto a los valores de referencia para cada uno de ellos, es indicativo de que el sujeto padece EA, esta predispuesto a padecer EA, o de que la evolución de EA es negativa.

30 Tanto el método de la invención como el uso de la invención se pueden llevar a cabo a través de un kit que comprende los componentes necesarios. Así, otro aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* de un kit o dispositivo para el diagnóstico o pronóstico de EA, o para predecir la evolución de EA, de ahora en adelante el uso de un kit de la invención, que comprende sondas, cebadores y/o anticuerpos específicos para la
 35 cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica la proteína

Trombospondina y/o el gen que codifica la proteína Endoplasmina en una muestra aislada un sujeto.

En una realización preferida del uso del kit de la invención, el kit además comprende

5 sondas, cebadores y/o anticuerpos específicos para la cuantificación de los niveles de expresión de al menos uno de los genes que codifican una proteína seleccionada de la lista que consiste en: collagenasa tipo IV de 72 kDa, Alcohol deshidrogenasa 1B, Glicoproteína 1 alfa-1-ácido, Alpha-1-antichimotripsina, Alfa-1-antitripsina, Alfa-2-HS-glicoproteína, Alfa-2-macroglobulina, Alfa-enolasa, Angiotensinógeno, Anexina A1,

10 Anexina A2, Apolipoproteína B-100, Apolipoproteína C-II, Beta-1,4-galactosyltransferase 2, Biglicano, Complejo 1 subunidad 5 de la Biogénesis de organelos relacionados con el lisosoma, Proteína de unión a calcineurina cabina-1, proteína de la matriz oligomérica del cartílago, Catepsina B, Catepsina D, CD9 antígeno, Ceruloplasmina, Quitinase-3-like proteína 1, Quitinase-3-like proteína 2, Clusterina,

15 Colágeno cadena alfa-1(III), Colágeno cadena alfa-1(VI), Colágeno cadena alfa-1(XIV), Colágeno cadena alfa-2(I), Complemento C1s subcomponente, Complemento C3, Cistatina-C, Decorina, Proteína 1 de la matriz extracelular similar a la fibulina que contiene EGF, Fibronectina, Proteína 3 relacionada con la folistatina, Proteína 2 de la matriz extracelular relacionada con FRAS1, Galectina-1, Gelsolina, Glutación peroxidasa

20 3, Fosforilasa de glucógeno, forma de hígado, Haptoglobina, Hemopexina, Histona H2A tipo 1-H, Región C de la cadena gamma-1 de la Ig, Proteína 5 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, Proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, Interleukina-6, Receptor de células asesinas tipo inmunoglobulina 3DL3, Miembro 9 del grupo de receptores leucocitario, Cadena A L-lactato deshidrogenasa,

25 Lumicana, Inhibidor 1 de la metaloproteinasas, Inhibidor 3 de la metaloproteinasas, Moesina, Subunidad p100 del factor nuclear NF-kappa-B, Proteína PTX3 relacionada con la pentraxina, Peptidil-prolyl cis-trans isomerasa A, Periostina, Peroxiredoxina-1, Fosfoglicerato quinasa 1, Proteína de transferencia de fosfolípidos, Factor derivado del epitelio pigmentario, Inhibidor de la proteasa plasmática C1, Inhibidor 1 del activador del plasminógeno, Proteína 1 que interactúa con el factor de transcripción Leucemia pre-célula B, Potenciador 2 de la endopeptidasa C del procolágeno, Prolargina, Prosaposina, isomerasa-D Prostaglandina-H2, Subunidad 3E reguladora de la proteína fosfatasa 1, Proteína S100-A6, Proteasa Serina HTRA1, Sero transferrina, Albúmina sérica, Componente amiloide P sérico, Paraoxonasa/lactonasa sérica 3, Spondina-1,

35 Superóxido dismutasa [Cu-Zn], Superóxido dismutasa [Mn] mitocondrial, subunidad

SMARCC1 del complejo SWI/SNF, Tenascina-X, Proteína ig-h3 inducida por el factor de crecimiento transformante, Transgelina, Triosa-fosfato isomerasa, Cadena de tubulina beta, Vimentina y cualquiera de sus combinaciones.

5 El término “cebadores” se refiere a los oligonucleótidos con secuencias nucleotídicas idénticas o complementarias reversas que permitan la amplificación de algún fragmento del ADNc o ARNm del gen que codifica la proteína Trombospondina y/o del gen que codifica la proteína Endoplasmina, o de otro gen que codifica cualquiera de las proteínas descritas en la Tabla 1, mediante, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa
10 (PCR). El término “cebador” se refiere a secuencias de entre 15-30 nucleótidos que hibridan con una de las cadenas del ácido nucleico molde y permiten la amplificación de una secuencia de ADN mediante una reacción de PCR. El término “sonda” se refiere a una secuencia de ARN o ADN idéntica o complementaria reversa a la secuencia del ADNc o ARNm del gen que codifica la proteína Trombospondina y/o el gen que codifica
15 la proteína Endoplasmina, o de otro gen que codifica cualquiera de las proteínas descritas en la Tabla 1, capaz de hibridar con dicha secuencia y que puede estar marcada o no con cualquier compuesto marcador conocido en el estado de la técnica.

El término “anticuerpo”, tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a
20 moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión y fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con una proteína. Hay cinco isotipos o clases principales de inmunoglobulinas: inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) e
25 inmunoglobulina E (IgE).

Todos los términos y expresiones definidos anteriormente en relación al método de la invención, y que se encuentran referidos en relación a los aspectos de uso de la invención o uso de un kit de la invención de la presente descripción, son igualmente
30 válidos para los aspectos de uso y de uso del kit de la presente invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se
35 desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los

siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

Fig. 1: Western Blot realizados en una cohorte independiente de sujetos.

EJEMPLOS

10 A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

EJEMPLO 1: Detección y cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica la proteína Endoplasmina y el gen que codifica la proteína Trombospondina en muestras de pacientes con EA y de individuos control –
 15 **Materiales y Métodos**

Selección de sujetos para el estudio

Las válvulas aórticas estenóticas (n=20) fueron obtenidas de pacientes de ambos sexos
 20 (55% hombres, 45% mujeres) con una edad media $74 \pm 3,9$ años que fueron sometidos a reemplazo valvular por estenosis aórtica (EA) degenerativa. Todos los pacientes (100%) presentaban hipertensión, el 50% tenían hiperlipemia y un 60%, diabetes. La cirugía fue realizada según las guías de práctica clínica habituales. La enfermedad arterial coronaria estaba presente en el 60% de los sujetos incluidos en el estudio.
 25 Aquellos pacientes con insuficiencia aórtica, enfermedad de la válvula mitral o cualquier sospecha de enfermedad reumática no fueron incluidos en el estudio (Tabla 2).

Tabla 2. Características clínicas de los individuos con estenosis aórtica.

Característica	% Pacientes
Edad	$75 \pm 3,93$
Sexo (H/M)	55/45
HTA	76,16
Diabetes	33,00
Dislipemia	52,51

Las válvulas aórticas de sujetos controles fueron obtenidas en las autopsias de individuos fallecidos por enfermedades no cardiovasculares, sin enfermedad coronaria o diabetes *mellitus* y cuyas válvulas aórticas presentaban un aspecto macroscópicamente normal (n = 20) (Tabla 3).

Tabla 3: Características clínicas de los individuos del grupo control.

Paciente	Edad	Sexo	Causa muerte	Estado válvulas
1	64	H	bronconeumonía aguda bilateral	normal
2	51	M	shock séptico	normal
3	47	H	sepsis	normal
4	47	M	neumonía bacteriana	normal
5	47	M	carcinomatosis	normal
6	34	H	pancreatitis aguda	normal
7	64	M	sepsis bacteriana	normal
8	78	M	bronconeumonía aspirativa	normal
9	76	H	sepsis y bronconeumonía	normal
10	66	H	bronconeumonía bilateral	normal

El estudio fue realizado de acuerdo a las recomendaciones de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Virgen de la Salud (Toledo, España) y el Hospital 12 de Octubre (Madrid, España). El consentimiento informado fue obtenido de todos los sujetos incluidos en el estudio.

15 Preparación de las muestras de tejido para análisis proteómico

Las válvulas con EA fueron procesadas en un plazo máximo de 2 horas desde que se realizó la cirugía, manteniéndose el tejido a 4 ° C en suero fisiológico. Se lavaron 3 veces con tampón fosfato para reducir los contaminantes de sangre. Las válvulas controles fueron procesadas en un tiempo máximo de 8 horas desde el fallecimiento del individuo.

Para realizar la extracción proteica, un fragmento de válvula fue congelado en nitrógeno líquido y homogeneizado con mortero. Entre 0,1-0,3 g del polvo obtenido fue resuspendido en 400µl de tampón de extracción de proteína (10 mM Tris pH 7,5, 500mM NaCl, 0,1% Triton X-100, el 1% β-mercaptoetanol, 1 mM PMSF). El homogeneizado fue

centrifugado a 21.000 g durante 15 minutos a 4 ° C. El sobrenadante (E1), con la mayor parte de las proteínas solubles, fue recogido y almacenado a -20 ° C. El *pellet* fue solubilizado en tampón de lisis (7 M Urea, 2M Tiourea, 4% CHAPS) y centrifugado de nuevo a 21.000 g. Este segundo sobrenadante (E2) estaba enriquecido en proteínas hidrofóbicas, principalmente proteínas de membrana. Los restos celulares y los lípidos fueron eliminados. Ambos extractos proteicos E1 y E2 fueron analizados conjuntamente para el análisis de iTRAQ. La concentración de proteínas fue determinada mediante el método Bradford-Lowry.

10 Sistema de marcaje isobárico iTRAQ

Las muestras de plasma se deplecionaron previamente de las proteínas mayoritarias, el resto de las muestras se digirieron sin ningún tratamiento previo. El iTRAQ permite el marcaje de los aminoácidos terminales (lisinas).

15 Las muestras se analizaron por cromatografía líquida acoplada al espectrofotómetro de masas 4000 QTrap y/o LTQ-Orbitrap-Velos. Debido a la complejidad del análisis en términos de identificación y de cuantificación, es necesario el uso de programas específicos como el Scaffold que incluye las herramientas necesarias para la validación de los resultados obtenidos. Se realizaron electroforesis en geles de acrilamida/bisacrilamida (30%/0,8%) en condiciones desnaturalizantes. Las muestras a
20 analizar se cuantificaron empleando el método de Bradford, para luego cargarlas en los geles SDS-PAGE. Se dejó correr 25µg de cada una de las muestras hasta el momento exacto en el que el frente pasó del gel concentrador al gel separador, de modo que toda la mezcla proteica se concentrara en una única banda en el gel concentrador. Esto
25 permitió eluir las muestras del gel eliminando posibles contaminantes, principalmente sales, lo que las hace más compatibles con el LC-MS/MS que, si fueran digeridas directamente en disolución y, además, permite una mayor reproducibilidad entre muestras para la comparativa posterior y simplifica el análisis por LC-MS/MS. Los geles se tiñeron con Coomassie G-250 (Fermentas) y se cortó la banda que contenía toda la
30 mezcla proteica de cada una de las muestras en múltiples secciones que se digirieron con tripsina (Promega) en una relación 1:50 durante toda la noche a 37°C. Después de la digestión las muestras se secaron en "Speedvac" (Thermo Fisher) y se resuspendieron en 1% ácido acético para el posterior análisis en el LTQ-Orbitrap-Velos. Los péptidos tripticos resultantes se inyectaron en una nano-columna de fase reversa
35 C-18 (diámetro interno de 100 µm y 12cm de longitud, Mediterraneasea, Teknokroma)

en la que se separaron. Para la identificación de las proteínas se lanzaron búsquedas con los espectros de fragmentación en Sequest (Thermo Scientific, versión 1.0.43.2) y MASCOT (MatrixScience, versión 2.2.01), empleando el paquete informático ProteomeDiscoverer 1.0 (Thermo Fisher). Las bases de datos empleadas fueron
 5 SwissProt en el caso de MASCOT, y NCBI nr para el de Sequest.

Los análisis cuantitativos diferenciales mediante label-free LC-MS/MS de las proteínas de plasma se realizaron utilizando dos métodos diferentes: 1) midiendo las variaciones en la intensidad de los picos (m/z), utilizando el programa Sieve para el análisis de
 10 expresión diferencial y 2) variaciones “en *spectralcounts*”, utilizando el programa Scaffold. El programa Sieve usa los datos de full scan de cada archivo de datos de forma que los cromatogramas se alinean utilizando un algoritmo específico. El programa genera entonces un patrón (frame) para cada grupo de picos en un m/z seleccionado y un intervalo de tR (tiempo de retención), incorporando todos los picos de valor superior
 15 al umbral. Comparando *frame a frame*, se identifican automáticamente todas las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de muestras comparadas, basadas en las intensidades MS. En el programa Scaffold las diferencias en las abundancias de las proteínas se cuantifican en base al número total de espectros de masas obtenidos (*spectral counting*).

20

Obtención del secretoma

Para realizar los estudios de secretoma mediante LC-MS/MS se emplearon válvulas aórticas (VA) controles (procedentes de necropsias) y válvulas aórticas (VA) con estenosis (procedentes de cirugía por reemplazo valvular). Se realizaron lavados
 25 previos al cultivo del tejido con PBS suplementado con antibióticos, amikacina (Normon, S.A.) y Fungicida anfotericina B (Fungizona, Bristol-Myers Squibb) a unas concentraciones de 250mg/ml y 5mg/ml, respectivamente. Una vez lavado el tejido, se procedió a su escisión en 6-7 fragmentos de pequeño tamaño, para favorecer el intercambio con el medio y se dispusieron en una placa Petri Dish (Cell Star®) a la cual
 30 se añadieron 2 ml de medio RPMI 1640 sin L-Glutamina y sin aminoácidos naturales (Gibco, Invitrogen) suplementado con antibióticos, amikacina y Fungicida anfotericina B, a las mismas concentraciones anteriormente mencionadas (medio A). Se realizó un método de cultivo descrito previamente por Álvarez-Llamas y col. con algunas modificaciones. Tras 1 hora de incubación realizamos un cambio de medio de cultivo y
 35 añadimos medio A suplementado con aminoácidos L-lisina (2HCl (U-13C6, 97-99%) y

- L-arginina (HCl (U-13C6, 97-98%), marcados por la sustitución del carbono 6, 12C por 13C (Cambridge Isotope Laboratories), y a unas concentraciones de 2 mg/ml y 10 mg/ml respectivamente (medio B). Posteriormente, realizamos otros tres cambios más de medio utilizando el medio B en todos los intercambios, a la mañana siguiente y, tras éste, otros dos cada 4 horas. A continuación, realizamos una curva de tiempo (*time-course*) para ver cuando se producía la máxima secreción de proteínas. Para ello se recogieron los sobrenadantes a diferentes horas a partir del último cambio de medio: 24, 48, 72, 96 y 120 h. Tras comprobar que el punto de máxima secreción ocurría a las 96h, repetimos el experimento tres veces más, recogiendo siempre los sobrenadantes tras 96 h. Una vez recogido el secretoma, se concentró mediante filtración por centrifugación, 1 hora a 4000 x g en un equipo Eppendorf 5840R para lo cual se emplearon filtros Amicon Ultra – 4 (Millipore), que retienen todas las moléculas mayores de 5 kDa de peso molecular.
- Los secretomas concentrados se valoraron mediante el método de Bradford-Lowry y una vez valorados se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Procesamiento de secretomas para su análisis mediante Orbitrap

- Para analizar las muestras de secretoma por LC-MS/MS en el espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL ETD™ (Thermo Fisher Scientific), se empleó la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes producidas por la presencia de SDS (*SDS-Poliacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). El SDS-PAGE utilizado está basado en el método descrito por Laemmli (73). Los geles de electroforesis empleados fueron geles de acrilamida/bisacrilamida (30%/0,8%) y se corrieron en el sistema de electroforesis MINIPROTEAN II (BioRad). Los geles se polimerizan formando dos fases con diferentes condiciones de concentración de acrilamida y pH, y contienen a lo largo de todo el gel un 10% de SDS, lo que mantiene las condiciones desnaturizantes a lo largo de todo el proceso. El gel concentrador es el primero por el que pasa la muestra, tiene una concentración de 4% de acrilamida que se obtiene diluyendo la disolución madre de acrilamida/bisacrilamida en Tris-HCl 1.5 M pH 6,8, SDS 10% (p/v) y agua bidestilada. El gel separador puede tener una concentración variable de acrilamida, dependiendo de la MW de las proteínas a analizar, en este caso se utilizó una concentración de 12% de acrilamida que se obtiene diluyendo la disolución madre de acrilamida/bisacrilamida en Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 10% y agua bidestilada. En ambas fases del gel se lleva a cabo la reacción de polimerización gracias a la adición

de los catalizadores persulfato amónico (APS, BioRad) como iniciador y N,N,N',N'-51 tetrametiletilendiamina (TEMED, BioRad) como propagador. Las muestras analizadas fueron cuantificadas empleando el método de Bradford, y se diluyeron en un tampón de carga compuesto por Tris-HCl 0,2M pH 8,0, SDS 3,5%, glicerol 16,5%, β -5 mercaptoetanol (Sigma) 8%, y azul de bromofenol (BioRad), para luego cargarlas en los geles SDS-PAGE. Previamente a la electroforesis, las muestras se calentaron 5 min. a 95°C para favorecer la desnaturalización de las proteínas. Basándonos en un método recientemente descrito, 25µg de proteína se dejaron correr hasta el momento exacto en el que el frente pasó del gel concentrador al gel separador, de modo que toda la mezcla 10 proteica se concentró en una única banda en el gel concentrador. Esto permite eluir las muestras del gel eliminando posibles contaminantes, principalmente sales, lo que las hace más compatibles con el LC-MS/MS que si fueran digeridas directamente en disolución y además permite una mayor reproducibilidad entre muestras para la comparativa posterior y simplifica el análisis por LC-MS/MS. Se tiñeron los geles con 15 Coomassie G-250 (Fermentas) y se cortó la banda que contenía toda la mezcla proteica de cada una de las muestras en múltiples secciones que fueron digeridas con tripsina (Promega) en una relación 1:50 durante toda la noche a 37°C. Después de la digestión las muestras se secaron en —*speedvac* (Thermo Fisher) y se resuspendieron en 1% ácido acético para el posterior análisis LC-MS.

20

Generación y análisis de modelos *in-silico*:

Los modelos “*in silico*” de la enfermedad se generaron mediante la tecnología TPMS (desarrollada por la empresa Anaxomics Biotech) (Herrando-Grabulosa et al., 2016; Iborra-Egea et al., 2017). Brevemente, esta aproximación consistió en:

- 25 (1) la creación de una extensa red de proteínas a partir las moléculas con una actividad reconocida en el proceso estudiado, que
- (2) en un segundo paso se cargó con la información sobre la funcionalidad de dichas proteínas, y
- 30 (3) finalmente se “entrenó” matemáticamente con información conocida sobre respuestas humanas a estímulos clínicos y moleculares.

Dicho entrenamiento utiliza técnicas de inteligencia artificial, aprendizaje artificial, teoría 35 de grafos y reconocimiento estadístico de patrones para modelar el comportamiento de

redes complejas. Los modelos generados fueron analizados para extraer información sobre los más probables mecanismos moleculares capaces de explicar todos los datos obtenidos, y de acuerdo con la fisiopatología humana, y para predecir los puntos de intervención (dianas terapéuticas; individuales o combinadas) con un mayor efecto en el proceso.

Cuantificación de la proteína Endoplasmina y la proteína Trombospondina por inmunoblot

Anticuerpos

Los anticuerpos contra la Endoplasmina (anticuerpo policlonal producido mediante la inmunización de conejos con péptidos sintéticos) y contra la Trombospondina (referencia ab85762, Abcam) fueron utilizado para realizar los *inmunoblots* (Figura 1).

Preparación de las muestras de plasma para análisis proteómico

Aproximadamente 7 ml de sangre fueron extraídos de cada paciente o individuo control en tubos estériles con EDTA. La sangre fue centrifugada a 750 g durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener el plasma, que fue dividido en partes alícuotas y almacenado a -80 ° C.

Inmunodetección

La electroforesis unidimensional de proteínas obtenidas a partir de muestras de plasma sanguíneo de los pacientes con EA y controles (Figura 1), fue realizada en geles SDS-PAGE al 8% utilizando el sistema de electroforesis Miniprotean II de Bio-Rad, aplicando un voltaje inicial de 80 V durante 5-10 minutos, seguido de un voltaje constante de 25 mA durante 1 hora. Después del SDS-PAGE las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) mediante transferencia semiseca durante 40 minutos a 20 V, utilizando el siguiente tampón de transferencia: Tris 25 mM, Glicina 151,8 mM y metanol al 20% (v/v). A continuación, las proteínas fueron teñidas sumergiendo las membranas de nitrocelulosa en una solución de Rojo Ponceau al 0,2% en ácido tricloroacético 30% (p/v) y ácido sulfosalicílico al 30% (p/v) durante 1 minuto, tras lo cual las membranas fueron lavadas con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Una imagen digitalizada de cada membrana fue tomada con el escaner HP Office jet Pro L7680. Las proteínas fueron bloqueadas utilizando un tampón fosfato con Tween20 0,05% (v/v) y con leche en polvo desnatada 7,5% (p/v) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10

minutos en un tampón fosfato con Tween20 0,1% (v/v).

A continuación, las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo específico contra Endoplasmina y Trombospondina, diluido 1:100 en el
 5 tampón de lavado con 5% (p/v) de leche en polvo desnatada. Tras realizar otros 3 lavados de 10 minutos en el tampón de lavado, las membranas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (anticuerpo anti-conejo desarrollado en cabra y unido a la peroxidasa, referencia #7074P2, Cell Signaling), diluido 1:1.000 en tampón de lavado con 5% (p/v) de leche en
 10 polvo desnatada. Finalmente, tras otros 3 lavados de 10 minutos, las membranas fueron incubadas durante 1 minuto con el sustrato quimioluminiscente ECL (GE Healthcare). A continuación, se utilizó el sistema de imagen molecular automatizado Amersham 600 para la digitalización de la imagen y su posterior análisis mediante el programa informático ImageQuant TL. Los resultados obtenidos fueron analizados con el
 15 programa informático de análisis estadístico SPSS 15.0, mediante una prueba T para determinar diferencias significativas con valores $p < 0,05$.

EJEMPLO 2: Cuantificación del gen que codifica la proteína Endoplasmina y el gen que codifica la proteína Trombospondina en muestras de pacientes con EA y 20 de individuos control – Resultados

Para realizar el análisis proteómico de pacientes con estenosis aórtica vs pacientes sanos se utilizaron dos técnicas proteómicas complementarias: iTRAQ y Secretoma. Para el análisis mediante iTRAQ, los lisados de 4 muestras de válvulas aórticas sanas
 25 (control) y de 4 muestras estenóticas se marcaron con el KIT comercial iTRAQ 4plex (ABSciex). Se prepararon cuatro mezclas de péptidos marcados de modo que todas las muestras se compararon entre ellas. Después del procedimiento de marcado y separación por nano-LC, los péptidos derivados se identificaron y cuantificaron mediante análisis MS / MS. Los datos generados por el análisis LC-MS / MS se buscaron
 30 en la base de datos RefSeq humana utilizando Proteome Discoverer. Como resultado se identificaron 712 proteínas de las cuales 40 estaban diferencialmente expresadas (Tabla 4).

Tabla 4. Proteínas encontradas diferencialmente expresadas en el análisis de muestras de tejido con la técnica proteómica iTRAQ.

Numero de acceso UNIPROT	Versión de secuencia en UNIPROT	Nombre de la proteína	Sigla del gen
P00325	2	Alcohol deshidrogenasa 1B	ADH1B_HUMAN
P02763	1	Glicoproteína 1 alfa-1-ácido	A1AG1_HUMAN
P01009	3	Alfa-1-antitripsina	A1AT_HUMAN
P02765	2	Alfa-2-HS-glicoproteína	FETUA_HUMAN
P06733	2	Alfa-enolasa	ENOA_HUMAN
P04083	2	Anexina A1	ANXA1_HUMAN
P07355	2	Anexina A2	ANXA2_HUMAN
P21810	2	Biglicano	PGS1_HUMAN
Q8TDH9	1	Complejo 1 subunidad 5 de la Biogénesis de organelos relacionados con el lisosoma	BL1S5_HUMAN
Q9Y6J0	1	Proteína de unión a calcineurina cabina-1	CABIN_HUMAN
P12109	3	Colágeno cadena alfa-1(VI)	CO6A1_HUMAN
P07585	1	Decorina	PGS2_HUMAN
P14625	1	Endoplasmina	ENPL_HUMAN
P09382	2	Galectina-1	LEG1_HUMAN
P22352	2	Glutación peroxidasa 3	GPX3_HUMAN
P00738	1	Haptoglobina	HPT_HUMAN
P02790	2	Hemopexina	HEMO_HUMAN
Q96KK5	3	Histona H2A tipo 1-H	H2A1H_HUMAN
P01857	1	Región C de la cadena gamma-1 de la Ig	IGHG1_HUMAN
P00338	2	Cadena A L-lactato deshidrogenasa	LDHA_HUMAN
P51884	2	Lumicana	LUM_HUMAN
P26038	3	Moesina	MOES_HUMAN
P62937	2	Peptidil-prolyl cis-trans isomerasa A	PPIA_HUMAN
Q15063	2	Periostina	POSTN_HUMAN
Q06830	1	Peroxiredoxina-1	PRDX1_HUMAN
P00558	3	Fosfoglicerato quinasa 1	PGK1_HUMAN
P51888	1	Prolargina	PRELP_HUMAN
P06703	1	Proteína S100-A6	S10A6_HUMAN
P02787	3	Serotransferrina	TRFE_HUMAN
P02768	2	Albúmina sérica	ALBU_HUMAN
P02743	2	Componente amiloide P sérico	SAMP_HUMAN
P00441	2	Superóxido dismutasa [Cu-Zn]	SODC_HUMAN

P04179	3	Superóxido dismutasa [Mn] mitocondrial	SODM_HUMAN
Q15582	1	Proteína ig-h3 inducida por el factor de crecimiento transformante	BGH3_HUMAN
Q01995	4	Transgelina	TAGL_HUMA
P60174	4	Triosa-fosfato isomerasa	TPIS_HUMAN
P07437	2	Cadena de tubulina beta	TBB5_HUMAN
P08670	4	Vimentina	VIME_HUMAN
P02655	1	Apolipoproteína C-II	APOC2_HUMAN

En el caso de los estudios mediante secretoma, se obtuvo el secretoma de válvulas controles y estenóticas a partir de 3 pacientes y 3 controles. Posteriormente se estudiaron las proteínas marcadas y detectadas mediante análisis proteómico. El número máximo de proteínas marcadas de válvulas patológicas y sanas se obtuvo a las 96 h, (248 proteínas). Entre ellas, aparecieron proteínas que estaban marcadas en al menos una de las tres réplicas del secretoma en cualquiera de los dos grupos (control, válvulas sanas, o paciente, válvulas con estenosis aórtica), 12 de ellas aparecieron en común en ambos grupos de estudio. Todas las proteínas marcadas se analizaron utilizando el software SecretomeP para predecir su secreción: la presencia del péptido señal indicaba que la secreción se producía por la vía clásica y una puntuación NN superior a 0,5, en ausencia de un péptido señal, indicó que no se trataba de proteínas secretadas por la vía clásica. De las proteínas secretadas, 36 contenían el péptido señal y otras 9 no eran secretadas de forma no clásica. Entre las restantes, 5 se habían detectado previamente en suero / plasma (según la base de datos de referencia de proteínas humanas: www.hprd.org). La Tabla 5, muestra el listado de proteínas secretadas.

Tabla 5. Proteínas encontradas diferencialmente expresadas en el análisis de muestras de tejido tras realizar su secretoma.

Referencia Uniprot	Versión de secuencia en UNIPROT	Nombre del gel	Acrónimo del gen
P01023	3	Alfa-2-macroglobulina	A2MG_HUMAN
P01011	2	Alpha-1-antichimotripsina	AACT_HUMAN
P01019	1	Angiotensinógeno	ANGT_HUMAN
P04114	2	Apolipoproteína B-100	APOB_HUMAN
O60909	1	Beta-1,4-galactosiltransferasa 2	B4GT2_HUMAN
P21810	2	Biglicano	PGS1_HUMAN

Referencia Uniprot	Versión de secuencia en UNIPROT	Nombre del gel	Acrónimo del gen
P09871	1	Complemento C1s subcomponente	C1S_HUMAN
P07858	3	Catepsina B	CATB_HUMAN
P07339	1	Catepsina D	CATD_HUMAN
P21926	4	CD9 antígeno	CD9_HUMAN
P00450	1	Ceruloplasmina	CERU_HUMAN
P36222	2	proteína 1 como la Quiitinasas-3	CH3L1_HUMAN
Q15782	1	proteína 2 como la Quiitinasas-3	CH3L2_HUMAN
P10909	1	Clusterina	CLUS_HUMAN
P08123	7	Colágeno cadena alfa-2(I)	CO1A2_HUMAN
P01024	2	Complemento C3	CO3_HUMAN
P02461	4	Colágeno cadena alfa-1(III)	CO3A1_HUMAN
P12109	3	Colágeno cadena alfa-1(VI)	CO6A1_HUMAN
Q05707	3	Colágeno cadena alfa-1(XIV)	COEA1_HUMAN
P49747	2	proteína de la matriz oligomérica del cartílago	COMP_HUMAN
P01034	1	Cistatina-C	CYTC_HUMAN
Q12805	2	Proteína 1 de la matriz extracelular similar a la fibulina que contiene EGF	FBLN3_HUMAN
Q5SZK8	2	Proteína 2 de la matriz extracelular relacionada con FRAS1	FREM2_HUMAN
P02751	5	Fibronectina	FINC_HUMAN
O95633	1	Proteína 3 relacionada con la folistatina	FSTL3_HUMAN
P06396	1	Gelsolina	GELS_HUMAN
Q92743	1	Proteasa Serina HTRA1	HTRA1_HUMAN
P24593	1	Proteína 5 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	IBP5_HUMAN
Q16270	1	Proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	IBP7_HUMAN
P05155	2	Inhibidor de la proteasa plasmática C1	IC1_HUMAN
P01857	1	Región C de la cadena gamma-1 de la Ig	IGHG1_HUMAN
P05231	1	Interleukina-6	IL6_HUMAN
Q8N743	2	Receptor de células asesinas tipo inmunoglobulina 3DL3	KI3L3_HUMAN
Q96B70	2	Miembro 9 del grupo de receptores leucocitario	LENG9_HUMAN
P51884	2	Lumicana	LUM_HUMAN
P08253	2	colagenasa tipo IV de 72 kDa	MMP2_HUMAN
Q00653	4	Subunidad p100 del factor nuclear NF-kappa-B	NFKB2_HUMAN

Referencia Uniprot	Versión de secuencia en UNIPROT	Nombre del gel	Acrónimo del gen
P05121	1	Inhibidor 1 del activador del plasminógeno	PAI1_HUMAN
Q96AQ6	1	Proteína 1 que interactúa con el factor de transcripción Leucemia pre-célula B	PBIP1_HUMAN
Q9UKZ9	1	Potenciador 2 de la endopeptidasa C del procolágeno	PCOC2_HUMAN
P36955	4	Factor derivado del epitelio pigmentario	PEDF_HUMAN
P55058	1	Proteína de transferencia de fosfolípidos	PLTP_HUMAN
Q15166	3	Paraoxonasa/lactonasa sérica 3	PON3_HUMAN
Q9H7J1	2	Subunidad 3E reguladora de la proteína fosfatasa 1	PPR3E_HUMAN
P41222	1	isomerasa-D Prostaglandina-H2	PTGDS_HUMAN
P26022	3	Proteína PTX3 relacionada con la pentraxina	PTX3_HUMAN
P06737	4	Fosforilasa de glucógeno, forma de hígado	PYGL_HUMAN
P07602	2	Prosaposina	SAP_HUMAN
Q92922	3	subunidad SMARCC1 del complejo SWI/SNF	SMRC1_HUMAN
Q9HCB6	2	Spondina-1	SPON1_HUMAN
P22105	5	Tenascina-X	TENX_HUMAN
P01033	1	Inhibidor 1 de la metaloproteinasa	TIMP1_HUMAN
P35625	2	Inhibidor 3 de la metaloproteinasa	TIMP3_HUMAN
P07996	2	Trombospondina	TSP1_HUMAN

A continuación, mediante la realización de modelos matemáticos, *in-silico*, se priorizaron las proteínas candidatas en función de su asociación con la estenosis aórtica degenerativa y con procesos específicos como la hipertrofia o la fibrosis miocárdica, a través de un enfoque basado en biología de sistemas y redes neuronales artificiales (ANN), con el fin de comprender el papel potencial de estas candidatas dentro de la enfermedad. Las ANN evalúan las relaciones entre conjuntos de proteínas o regiones dentro de la red proporcionando una puntuación predictiva que cuantifica la probabilidad de la existencia de una relación funcional entre las regiones evaluadas. Cada puntuación se asocia con un valor p que describe la probabilidad de que el resultado sea un resultado positivo verdadero. Con el objetivo de facilitar la comprensión de los resultados, la puntuación de la clasificación se ha dividido en cinco categorías (Tabla 6):

Tabla 6. Priorización de categorías mediante modelos *in-silico*.

Valor ANN	Categoría ANN	p-valor asociado
>92	MUY ALTO	<0,01
78-92	ALTO	0,01 – 0,05
63-78	MEDIO-ALTO	0,05 – 0,15
38-63	MEDIO	0,15 – 0,25
<38	BAJO	>

Según esta clasificación se predice que las proteínas pueden:

- 5
 - tener una “relación fuerte” con los procesos en estudio si presentan una relación pronosticada muy alta, alta o media-alta con alguno de los subprocesos utilizados en la caracterización, y han sido considerados buenos candidatos;
 - tener una “relación media” con los procesos en estudio si presentan al menos una relación media predicha con alguno de los subprocesos utilizados en la
- 10
 - Tener una “relación baja o nula” con los procesos en estudio si presentan una relación baja predicha con todos los subprocesos utilizados en la caracterización.
- 15

Para aquellas proteínas que presentan una puntuación de ANN dentro de las categorías Muy alto, Alto o Medio-alto (valores de ANN del 63 al 100%), según el análisis de ANN, se realizó una búsqueda bibliográfica para determinar si había literatura científica disponible que relacionase esas proteínas a procesos asociados con la EA y / o sus motivos fisiopatológicos.
- 20

Posteriormente se detallaron las relaciones evaluadas entre cada una de las proteínas candidatas y cada uno de los procesos implicados en EA, según los modelos matemáticos. El resultado dio lugar a 2 proteínas candidatas a estar implicadas en los mecanismos patológicos de la EA y que han mostrado una fuerte asociación
- 25

mecanicista. Es muy importante el señalar aquí que nunca se ha descrito implicación o relación alguna con la EA ni con su caracterización molecular (Tabla 7).

Tabla 7. Proteínas candidatas a estar implicadas en los mecanismos patológicos de la EA y que presentan una fuerte asociación mecanística.

Gen	Proteína	Score	Motivo de relación
HSP90B1	Endoplasmina	86,4	Inflamación
		74,62	Disfunción endotelial
		65,44	Acumulación de lipoproteína
THBS1	Trombospondina	76,17	Disfunción endotelial
		71,70	Fibrosis miocárdica
		63,52	RAAS

La proteína Endoplasmina está presente en las cuatro réplicas de cualquiera de los dos grupos (EA y Control) después del análisis 2D-LC iTRAQ (criterio de determinación de sobreexpresión o infraexpresión del análisis iTRAQ: cambio de veces > 1,5 o <0,67).

5

La proteína Trombospondina aparece diferencialmente expresada en el análisis de secretoma de tejido de la válvula aórtica mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

- 10 Para estudiar más a fondo los resultados obtenidos mediante los análisis *in-silico*, estas proteínas, se validaron mediante la técnica ortogonal de *Western blot*, en una cohorte independiente de pacientes. El resultado corroboró los resultados previos obtenidos mediante técnicas de proteómica de descubrimiento como muestra la Figura 1.

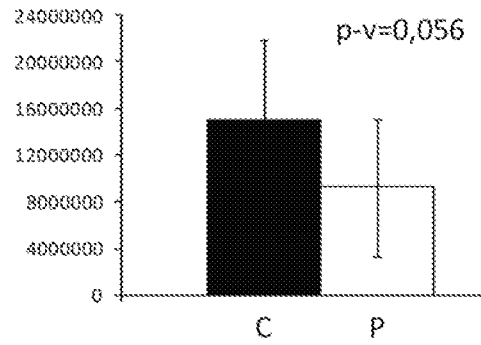
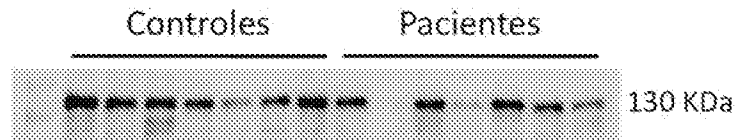
REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para el diagnóstico de estenosis aórtica (EA) en un sujeto, donde el
5 método comprende:
 - a) cuantificar los niveles de expresión del gen que codifica la proteína Trombospondina 1 o cuantificar los niveles de expresión proteica de dicha proteína, en una muestra aislada del sujeto; y
 - b) comparar los niveles de expresión obtenidos en la etapa (a) con valores de
10 referencia, donde el valor de referencia es el nivel de expresión del gen que codifica la proteína Trombospondina 1, o nivel de expresión proteica de dicha proteína, en un sujeto sin estenosis aórtica;
donde una reducción en los niveles de expresión del gen que codifica la proteína Trombospondina 1 en la muestra del sujeto respecto a los valores de referencia
15 para dicho gen, es indicativo de que dicho sujeto padece EA, y donde los valores de referencia son la cantidad de producto de expresión del gen medida en una muestra procedente de un sujeto que no sufre de EA.
2. El método según la reivindicación 1, donde la proteína Trombospondina 1
20 comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.
3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, donde la muestra es un fluido biológico.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la muestra es
25 sangre o suero o plasma sanguíneo.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la muestra comprende células.
- 30 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la cuantificación del nivel de expresión del gen se lleva a cabo mediante la cuantificación del ADNc, ARNm, o de la proteína codificada por dicho gen.
7. El método según la reivindicación 6 en donde la cuantificación del ADNc o del
35 ARNm, se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa, un array

de ADN o del ARN, o una hibridación.

8. El método según la reivindicación 6 en donde la cuantificación de la proteína codificada por el gen se lleva a cabo mediante Western Blot, técnicas
5 inmunohistoquímicas, ELISA, array de proteínas, inmunoprecipitación o radioinmunoensayo.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el sujeto es un mamífero.
10
10. Uso *in vitro* de los niveles de expresión del gen que codifica la proteína Trombospondina 1 para el diagnóstico de EA en una muestra aislada de un sujeto, donde una reducción en los niveles de expresión del gen que codifica la proteína Trombospondina 1 en la muestra del sujeto respecto a los valores de referencia para
15 dicho gen, es indicativo de que dicho sujeto padece EA.
11. Uso según la reivindicación 10 donde la proteína Trombospondina 1 comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.
- 20 12. Uso *in vitro* de un kit o dispositivo para el diagnóstico de EA que comprende sondas, cebadores y/o anticuerpos específicos para la identificación y cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica la proteína Trombospondina 1, o de los niveles de la proteína Trombospondina 1, en una muestra aislada un sujeto.

A) Trombospondina



B) Endoplasmina

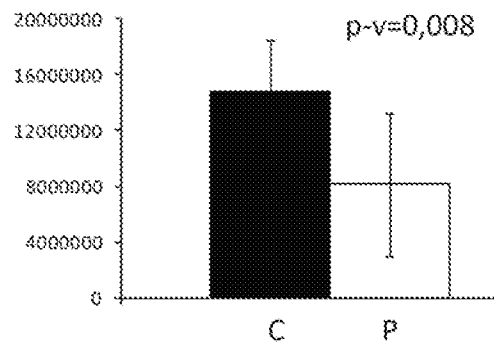
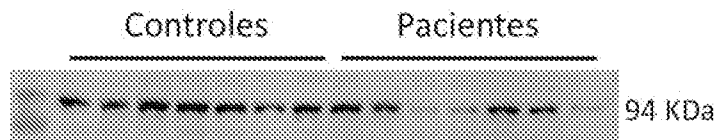


Fig. 1