

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 208**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

G16B 20/00 (2009.01)

G16B 40/00 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2020** **PCT/EP2020/081459**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2021** **WO21089866**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2020** **E 20800688 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024** **EP 4055191**

54 Título: **Diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar mediante biomarcadores de edición de ARN en sangre**

30 Prioridad:

08.11.2019 EP 19208126

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.12.2024

73 Titular/es:

**ALCEDIAG (100.0%)
Route des Michels La Corneirelle
13790 Peynier, FR**

72 Inventor/es:

**WEISSMANN, DINAH;
SALVETAT, NICOLAS y
CHIMIENTI, FABRICE**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 992 208 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar mediante biomarcadores de edición de ARN en sangre

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano a partir de una muestra biológica de dicho paciente, usando al menos dos biomarcadores de ARN de edición de A a I particulares asociados a una puntuación y algoritmo de depresión específicos. La presente invención se dirige también a un método para monitorizar el tratamiento para el trastorno bipolar o unipolar, implementando dicho método el método para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar de la presente invención. La presente invención también abarca un kit para determinar si un paciente presenta un trastorno bipolar frente a un trastorno depresivo unipolar o paciente de control sano.

El trastorno bipolar (BD) es una enfermedad común, grave y crónica que afecta a más del 1 % de la población en todo el mundo, independientemente del origen, la etnia o el estado socioeconómico. La depresión bipolar se compone de episodios fluctuantes de depresión y manía o hipomanía. Los síntomas de los episodios maniáticos pueden incluir un aumento inusual y persistente de la actividad o euforia, una menor necesidad de sueño, un aumento de la autoconfianza o de la impulsividad (para una revisión, véase¹). Los pacientes con trastorno bipolar a menudo reciben un diagnóstico erróneo, aproximadamente el 70 % de ellos reciben un diagnóstico erróneo de depresión unipolar o trastorno depresivo mayor. El retraso resultante en el diagnóstico correcto y el tratamiento apropiado da como resultado un peor pronóstico y tiene consecuencias devastadoras para los pacientes y, en última instancia, puede aumentar el riesgo de suicidio. Se estima que el intervalo promedio entre la aparición de los síntomas del BD y el diagnóstico y tratamiento adecuados es de 5,8 años. Además, la resistencia al tratamiento que se observa comúnmente con los antidepresivos clásicos en la depresión unipolar es debida a menudo a un diagnóstico erróneo de depresión bipolar².

Las clasificaciones diagnósticas más ampliamente reconocidas son la décima revisión de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10) y la quinta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-5), aunque este último sigue siendo controvertido para el diagnóstico preciso del trastorno bipolar¹. Ambos se basan en la entrevista clínica y, por lo tanto, pueden parecer “subjetivos”, ya que se basan en la opinión del psiquiatra; no hay ningún objetivo; pruebas de laboratorio o marcadores biológicos para establecer la frontera entre los diferentes subtipos de depresión. Además, es mucho más probable que los pacientes bipolares acudan a los médicos durante un episodio depresivo. Por lo tanto, un objetivo principal de la investigación es identificar biomarcadores fiables y clínicamente útiles para diferenciar el trastorno bipolar de la depresión unipolar. Durante la última década, una serie de estudios han investigado la formación de neuroimágenes o los biomarcadores circulantes en el BD. En un estudio usando fMRI, Grotegerd y sus colaboradores han mostrado que la fMRI y la clasificación de patrones podrían clasificar a los sujetos deprimidos como unipolares o bipolares con buena confianza, aunque usando un tamaño de muestra pequeño de pacientes medicados³. Más recientemente, un método de RM para medir la activación y la conectividad del complejo amigdalino durante el procesamiento de las emociones faciales distinguió a los pacientes con BP de los pacientes con TDM con una precisión del 80 %. Sin embargo, el estudio no implicó a pacientes con TDM que estuvieran deprimidos en ese momento o, en el caso de pacientes con BP, que tuvieran síntomas maniáticos o hipomaniáticos en ese momento. De manera similar, actualmente no existen biomarcadores circulantes válidos para el BD. Una etapa importante sería identificar biomarcadores circulantes para el diagnóstico temprano en los pacientes. Hasta la fecha, muchas investigaciones se han centrado en las alteraciones de las rutas en el BD, incluyendo el estrés oxidativo y la desregulación de factores inflamatorios y tróficos (para una revisión, véase⁴). Un metanálisis de 52 estudios identificó que los niveles disminuidos de BDNF plasmático, un miembro de la familia de factores de crecimiento de las neurotrofinas, se replicaron de manera consistente. Resulta interesante observar que los niveles de BDNF disminuyen durante los episodios tanto maniáticos como depresivos, al contrario que en la eutimia. Sin embargo, los autores sugirieron que los niveles de BDNF solo podrían usarse como parte de una medida compuesta de proteínas sanguíneas de laboratorio debido a la falta de especificidad. La bibliografía existente también notifica consistentemente la existencia de estrés oxidativo en el BD. La peroxidación lipídica, el daño al ADN/ARN y el óxido nítrico se aumentan significativamente en pacientes con BD. Sin embargo, debido nuevamente a la falta de especificidad y robustez, no se ha identificado ningún biomarcador de estrés oxidativo como clínicamente útil *per se*. Se han mostrado sistemáticamente alteraciones de los marcadores inflamatorios periféricos en los trastornos del estado de ánimo, incluyendo la depresión unipolar y el BD, aunque no está claro si son causantes o una consecuencia de la enfermedad. Se ha mostrado un desequilibrio de las citocinas circulantes, incluyendo CXCL8, CXCL10 y CXCL11, en el BD en comparación con los controles. Sin embargo, no se hallaron diferencias durante los episodios de eutimia y manía. Un estudio piloto del mismo grupo también identificó niveles de TNFR1 solubles más altos en pacientes con BD. Además, los niveles de sTNFR1 fueron más altos durante la manía que en pacientes eutímicos, lo que confirma un informe previo donde las citocinas proinflamatorias, IL-2, IL-4 e IL-6, aumentaron en comparación con sujetos sanos. Un análisis transcriptómico mostró recientemente que solo unos pocos cambios en la expresión genética en sangre completa estaban asociados con el BD, mientras que el tratamiento con litio tiene un impacto más fuerte, lo que sugiere que monitorizar los niveles de expresión genética será de una utilidad pobre para desarrollar herramientas de diagnóstico para el BD.

Los métodos más prometedores parecen radicar en un panel de biomarcadores de múltiples parámetros, para lo cual existe una justificación biológica. Estos biomarcadores deberían cuantificarse usando una muestra de sangre rutinaria y una metodología de laboratorio estándar; a menudo se desarrolla en paralelo un algoritmo de diagnóstico específico. A modo de ejemplo, un enfoque metabólico basándose en la RMN de protones (RMN de 1H) identificó muy recientemente un panel de 10 compuestos diferentes que podrían usarse como biomarcadores para discriminar entre

controles sanos, BD y esquizofrenias. La evidencia acumulada ha indicado que la edición de ARN, que se realiza principalmente por las enzimas ADAR (adenosina desaminasa que actúa sobre el ARN), puede estar críticamente implicada en enfermedades neurológicas o inmunitarias, entre otras patologías (para una revisión, véase ⁶). La disminución de la edición de los sitios R/G de los receptores AMPA debido a la regulación por disminución de ADAR2

El documento US2017/211144 se refiere a genes y rutas expresados diferencialmente en el trastorno bipolar y/o el trastorno depresivo mayor.

En el estudio actual, nos centramos en la modificación de edición de ARN a nivel de todo el transcriptoma mediante Sec-ARN en pacientes unipolares y con BD para identificar variantes de edición que podrían usarse como biomarcadores para establecer un ensayo de diagnóstico clínicamente útil para el diagnóstico diferencial del BD. Se identificó una edición diferencial significativa en un número de genes implicados en diferentes rutas relevantes para los trastornos del estado de ánimo, por ejemplo, el sistema inmunitario y la función del SNC, por ejemplo, la regulación de MECP2, que se expresa altamente en las neuronas, donde participa en el proceso de formación de sinapsis. El panel de variantes de edición de ARN permitió el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar con alta especificidad y selectividad. Este estudio es el primero en evaluar múltiples variantes de edición de ARN en muestras de sangre de controles sanos y pacientes que padecen depresión unipolar o bipolar. Nuestros hallazgos contribuirán a una mejor comprensión de la fisiopatología molecular del BD y allanarán el camino para el desarrollo de un ensayo diagnóstico para el BD con aplicación clínica.

Se describe, pero no forma parte de la invención reivindicada, un método para seleccionar un biomarcador, preferiblemente una combinación de al menos dos biomarcadores, que puede usarse para diagnosticar diferencialmente el trastorno bipolar y la depresión unipolar en un paciente humano, comprendiendo dicho método la etapa de:

a) analizar el conjunto de datos de Sec-ARN usando una canalización de análisis del editoma e identificar posiciones editadas diferencialmente de A a I con una cobertura mínima de 30x, lo que garantiza un alto grado de confianza en posiciones de bases particulares;

b) realizar un análisis diferencial para identificar sitios cuya edición podría ser específicamente diferente entre la depresión unipolar y los controles sanos,

c) aplicar los siguientes criterios de calidad preespecificados del grupo que consiste en: cobertura >30; AUC >0,6; 0,95 >Múltiplo de variación>1,05, $p < 0,05$ y exclusión de sitios intergénicos;

d) opcionalmente, comprobar que no se observaron diferencias en la edición de ARN global entre pacientes y controles, preferiblemente calculando el índice de edición de Alu (AEI) global, que es una medida de la tasa global de edición de ARN en las repeticiones de Alu; e) mediante GSEA (análisis de enriquecimiento sobre conjuntos de genes) sobre los biomarcadores seleccionados en la etapa c) o d), preferiblemente usando herramientas de ontología genética, identificar y seleccionar biomarcadores que reflejen cambios en diferentes procesos biológicos, incluyendo funciones inmunitarias y del SNC (sistema nervioso central); y

f) aplicar los siguientes criterios de calidad especificados del grupo que consiste en: cobertura >30; AUC >0,8; 0,8 >Múltiplo de variación>1,20 y $p < 0,05$ a una combinación de varios biomarcadores seleccionados en la etapa e) que representan diferentes mecanismos biológicos, y se seleccionaron aquellos que discriminaban claramente a los pacientes que presentaban trastorno bipolar y a los pacientes que presentaban depresión unipolar en dos grupos separados.

En una realización preferida, en la etapa f), se seleccionan las combinaciones de al menos dos biomarcadores si dichas combinaciones son estadísticamente significativas entre control y casos con un valor de $p < 10^{-4}$.

Los síntomas que sirven como criterio para los trastornos bipolares, los trastornos depresivos y el TDM son bien conocidos por el experto y se describen, por ejemplo, en el libro DSM-5™ de la Asociación Estadounidense de Psiquiatría (2013, páginas p123-154 de DSM-V);

Los diagnósticos incluidos en este capítulo son trastorno bipolar I, trastorno bipolar II, trastorno ciclotímico, trastorno bipolar y relacionado inducido por sustancias o medicamentos, trastorno bipolar y relacionado debido a otra afección médica, otro trastorno bipolar y relacionado especificado y trastorno bipolar y relacionado no especificado. Sin embargo, la gran mayoría de las personas cuyos síntomas cumplen los criterios de un episodio maníaco completamente sintomático también experimentan episodios depresivos mayores durante el transcurso de sus vidas. El trastorno bipolar II, que requiere la experiencia a lo largo de la vida de al menos un episodio de depresión mayor y al menos un episodio de hipomanía, ya no se considera una afección “más leve” que el trastorno bipolar I, en gran parte debido a la cantidad de tiempo que las personas con esta afección pasan deprimidas y porque la inestabilidad del estado de ánimo experimentado por las personas con trastorno bipolar II suele ir acompañada de un deterioro grave en la actividad laboral y social. El diagnóstico de trastorno ciclotímico se da a adultos que experimentan al menos 2 años (para los niños, un año completo) de períodos tanto de hipomanía como de depresión sin cumplir nunca los criterios para un episodio de manía, hipomanía o depresión mayor.

Los síntomas que sirven como criterio para la depresión unipolar también son bien conocidos por el experto y se describen, por ejemplo, en el libro DSM-5™ de la Asociación Estadounidense de Psiquiatría (2013, páginas 155-188). Los trastornos depresivos incluyen el trastorno de desregulación disruptiva del estado de ánimo, el trastorno depresivo mayor (incluyendo el episodio depresivo mayor), el trastorno depresivo persistente (distimia), el trastorno disfórico premenstrual, el trastorno depresivo inducido por sustancias o medicamentos, el trastorno depresivo debido a otra afección médica, otro trastorno depresivo especificado y trastorno depresivo no especificado.

La presente invención se dirige a un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano a partir de una muestra biológica de dicho paciente, comprendiendo dicho método:

a) determinar al menos dos biomarcadores de ARN de edición de A a I identificados por el método

para seleccionar un biomarcador según la invención:

- la proporción relativa de edición de ARN en un sitio de edición dado para al menos uno o una combinación de sitios que se pueden editar en el transcrito de ARN de dicho biomarcador t, y/o

- el porcentaje de una isoforma o de una combinación de isoformas del transcrito de ARN de dicho biomarcador;

en donde dichos al menos dos biomarcadores de ARN de edición de A a I se seleccionan del grupo que consiste en los biomarcadores MDM2, PRKCB, PIAS1, IFNAR1, LYN, AHR, RASSF1, GAB2, CAMK1D, IL17RA, PTPRC, KCNJ15, IFNAR2 y PDE8A;

b) determinar un valor resultante del/de los porcentaje(s) obtenido(s) en la etapa a);

c) determinar si dicho valor de resultado obtenido en la etapa b) es mayor o no es mayor que un valor de control obtenido para un sujeto unipolar de control, en donde el valor de control se determinó de una manera comparable a la del valor de resultado, obtenido en la etapa b); y

d) si dicho valor de resultado obtenido para el paciente es mayor que un umbral (por ejemplo, pero sin limitación, un punto de corte o una probabilidad), clasificar a dicho paciente como que tiene trastorno bipolar o, si dicho valor de resultado no es mayor que dicho umbral, clasificar a dicho paciente como que tiene depresión unipolar.

Preferiblemente, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano a partir de una muestra biológica de dicho paciente, comprendiendo dicho método:

a) determinar para una combinación de al menos dos biomarcadores de ARN de edición de A a I identificados mediante el método para seleccionar una combinación de al menos dos biomarcadores según la presente invención:

- para cada biomarcador seleccionado, la proporción relativa de edición de ARN en un sitio de edición dado para al menos uno o una combinación de sitios que se pueden editar en el transcrito de ARN de dichos al menos dos biomarcadores, y/o

- el porcentaje relativo de una isoforma o de una combinación de isoformas del transcrito de ARN de cada uno de dichos dos biomarcadores;

en donde dichos al menos dos biomarcadores de ARN de edición de A a I se seleccionan del grupo que consiste en los biomarcadores MDM2, PRKCB, PIAS1, IFNAR1, LYN, AHR, RASSF1, GAB2, CAMK1D, IL17RA, PTPRC, KCNJ15, IFNAR2 y PDE8A;

b) determinar un valor de resultado obtenido para cada uno de dichos al menos dos biomarcadores y un valor de resultado final basándose en un algoritmo o ecuación que incluye el valor de resultado obtenido para cada biomarcador seleccionado;

c) determinar si dicho valor de resultado obtenido en la etapa b) es mayor o no es mayor que un valor de control obtenido para un sujeto unipolar de control, en donde el valor de control se determinó de una manera comparable a la del valor de resultado; y

d) si dicho valor de resultado obtenido para el paciente es mayor que un umbral, clasificar a dicho paciente como que tiene trastorno bipolar o, si dicho valor de resultado no es mayor que dicho umbral, clasificar a dicho paciente como que tiene depresión unipolar.

Por ejemplo, pero sin limitación, en el método de diagnóstico según la presente invención, dicho umbral, punto de corte o probabilidad (denominado también “puntuación de depresión”) puede ser, pero sin limitación:

- el valor Z calculado para el paciente de control sano cuando se usa el programa mROC, o
- la probabilidad de que un paciente se considere como que padece trastornos del estado de ánimo, trastornos depresivos o MDD.

En la presente descripción, el término biomarcador o diana tienen el mismo significado y pueden usarse indistintamente.

En una realización preferida, en el método para diagnosticar la depresión según la presente invención, se seleccionan las combinaciones de al menos dos biomarcadores si dichas combinaciones son estadísticamente significativas entre sujetos de control sanos y casos (pacientes que tienen trastornos bipolares o unipolares), o entre sujetos de control bipolares y unipolares con un valor de $p < 10^{-4}$.

En una realización preferida, en el método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano según la invención, dicho biomarcador de ARN de edición de A a I se selecciona del grupo que consiste en MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A.

En una realización más preferida, en el método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano según la invención, dichos al menos dos biomarcadores de ARN de edición de A a I se seleccionan del grupo que consiste en MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A.

Se prefieren los métodos para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano según la presente invención en donde en la etapa b), el valor de resultado o valor de resultado final se calcula mediante un algoritmo que implementa un método multivariante que incluye:

- programa mROC, en particular para identificar la combinación lineal, que maximiza la curva ROC de AUC (área bajo la curva) y en donde se proporciona la ecuación para la combinación respectiva y puede usarse como un nuevo marcador virtual Z, de la siguiente manera:

$$Z = a.(\text{Biomarcador 1}) + b.(\text{Biomarcador 2}) + \dots i.(\text{Biomarcador i}) + \dots n.(\text{Biomarcador n})$$

donde i son coeficientes calculados y (Biomarcador i) son el nivel del biomarcador considerado (es decir, el nivel del sitio de edición de ARN o de isoformas para una diana/biomarcador dado); y/o

- un enfoque de bosques aleatorios (RF) aplicado para evaluar los sitios de edición de ARN y/o combinaciones de isoformas, en particular para clasificar la importancia del/de los sitio(s) de edición de ARN y/o isoforma(s), y para combinar el/los mejor(es) sitio(s) de edición de ARN y/o isoforma(s), y/u opcionalmente

- un análisis multivariante aplicado para evaluar el/los sitio(s) de edición de ARN y/o combinaciones de isoformas para el diagnóstico, seleccionándose dicho análisis multivariante, por ejemplo, del grupo que consiste en:

- modelo de regresión logística aplicado para análisis univariante y multivariante para estimar el riesgo relativo de un paciente a diferentes valores de nivel de sitio de edición de ARN o de isoformas;

- enfoque CART (árboles de clasificación y regresión) aplicado para evaluar combinaciones de sitio(s) de edición de ARN y/o isoformas; y/o

- enfoque de máquina de vectores de soporte (SVM);

- enfoque de red neuronal artificial (ANN);

- enfoque de red bayesiana;

- enfoque de WKNN (k vecinos más cercanos ponderados);

- mínimos cuadrados parciales - análisis discriminante (PLS-DA);

- análisis discriminante lineal y cuadrático (LDA/QDA), y

- cualquier otro método matemático que combina biomarcadores.

En una realización preferida, en el método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano según la invención, dicho trastorno de depresión unipolar es principalmente un trastorno depresivo mayor (TDM).

En una realización preferida, en el método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano según la invención, dicha muestra biológica es sangre completa, suero, plasma, orina o líquido cefalorraquídeo, siendo la sangre completa la muestra biológica más preferida

- 5 Se prefieren biomarcadores seleccionados en donde el valor de resultado o la puntuación de depresión obtenida en la etapa c) es estadística/específicamente diferente de dicho valor de resultado de control en $p < 0,05$.

También se prefieren los métodos de la presente invención en donde han de satisfacerse los siguientes criterios para el biomarcador o para la combinación de biomarcadores seleccionados en la etapa a):

- 10
- la cobertura >30 ;
 - $AUC >0,6$, más preferido $AUC >0,8$;
 - 15 – $0,95 > \text{Múltiplo de variación} > 1,05$, y
 - $p < 0,05$.

- 20 También se prefieren los métodos de la presente invención en donde dicho(s) biomarcador(es) de edición de ARN A a I seleccionado(s) comprendido(s) en la etapa a) se selecciona(n) del grupo que consiste en una combinación que comprende al menos 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de los siguientes biomarcadores: MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A, preferiblemente la combinación de los 8 biomarcadores citados.

- 25 También se prefieren los métodos de la presente invención en donde dicho(s) biomarcador(es) de ARN de edición de A a I seleccionado(s) comprende(n) en la etapa a) la combinación de los siguientes 5 biomarcadores: GAB2, IFNAR1, KCNJ15, MDM2 y PRKCB.

- 30 También se prefieren los métodos de la presente invención en donde dicho(s) biomarcador(es) de ARN de edición de A a I seleccionado(s) comprende(n) en la etapa a) la combinación de los siguientes 5 biomarcadores: GAB2, IFNAR1, KCNJ15, MDM2 y PRKCB y al menos otro biomarcador seleccionado del grupo que consiste en los siguientes biomarcadores; CAMK1D y LYN, preferiblemente la combinación de los siguientes 6 biomarcadores: GAB2, IFNAR1, KCNJ15, MDM2, PRKCB y LYN cuando el modelo se ajusta por edad, sexo, tratamiento psiquiátrico y adicción, o los siguientes 6 biomarcadores: GAB2, IFNAR1, KCNJ15, MDM2, PRKCB y CAMK1D cuando el modelo se ajusta por edad y sexo, preferiblemente cuando se usa un algoritmo de bosques aleatorios (RF) aplicado para evaluar los sitios de edición de ARN y/o combinaciones de isoformas, en particular para clasificar la importancia del/de los sitio(s) de edición de ARN y/o isoforma(s), y para combinar el/los mejor(es) sitio(s) de edición de ARN y/o isoforma(s).

- 40 También se prefieren los métodos de la presente invención en donde dicho(s) biomarcador(es) de ARN de edición de A a I seleccionado(s) comprende(n) en la etapa a) la combinación de los siguientes 5 biomarcadores: GAB2, IFNAR1, KCNJ15, MDM2 y PRKCB y al menos otro biomarcador seleccionado del grupo que consiste en los siguientes biomarcadores; CAMK1D y LYN, y en donde el cálculo del porcentaje relativo de al menos uno del sitio de edición de ARN o isoforma se basa en el sitio de edición de ARN o isoforma enumerado en las Tablas 5.1 y 5.2, preferiblemente cuando se usa un algoritmo de bosques aleatorios (RF) aplicado para evaluar los sitios de edición de ARN y/o combinaciones de isoformas, en particular para clasificar la importancia del/de los sitio(s) de edición de ARN y/o isoforma(s), y para combinar el/los mejor(es) sitio(s) de edición de ARN y/o isoforma(s)

- 45 También se prefieren los métodos de la presente invención en donde dicho biomarcador de ARN de edición de A a I seleccionado comprende en la etapa a) uno o una combinación de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 biomarcadores seleccionados y en donde el cálculo del porcentaje relativo de al menos uno del sitio de edición de ARN o isoforma se basa en el sitio de edición de ARN o isoforma enumerado en las Tablas 2A (sitios de edición), 2B (isoformas) y 3 (sitios de edición)

- 50 También se prefieren los métodos de la presente invención en donde dicha combinación de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 biomarcadores seleccionados es una combinación seleccionada de las combinaciones de biomarcadores dadas en las Tablas 4, 5 y 6, preferiblemente las combinaciones que comprenden los siguientes 8 biomarcadores MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A.

- 55 También se prefieren los métodos de la presente invención en donde el algoritmo o la ecuación que permite el cálculo del valor de resultado o puntuación de depresión Z se seleccionan de las ecuaciones de Z enumeradas en los ejemplos, preferiblemente la ecuación implementa una combinación de los siguientes 8 biomarcadores: MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A.

- 60 En otro aspecto, la presente invención se dirige a un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano según las reivindicaciones anteriores, en donde si el paciente que se va a analizar es una mujer, en la etapa a) dicho al menos uno o combinación de al menos dos biomarcador(es) de ARN de edición de A a I se selecciona(n) del grupo de biomarcadores que consiste en los biomarcadores MDM2, PRKCB, PIAS1, IFNAR1, LYN, AHR, RASSF1, GAB2, CAMK1D, IL17RA, PTPRC, KCNJ15, IFNAR2 y PDE8A, preferiblemente

las combinaciones de biomarcadores o la ecuación de Z dadas en los Ejemplos o figuras con pacientes de la población femenina, más preferiblemente las combinaciones que comprenden los 8 biomarcadores MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A, más preferiblemente las combinaciones enumeradas en la Tabla 7.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano según las reivindicaciones anteriores, en donde si el paciente que se va a analizar es un hombre, en la etapa a) dicho al menos uno o combinación de al menos dos biomarcador(es) de ARN de edición de A a I se selecciona(n) del grupo de biomarcadores que consiste en los biomarcadores MDM2, PRKCB, PIAS1, IFNAR1, LYN, AHR, RASSF1, GAB2, CAMK1D, IL17RA, PTPRC, KCNJ15, IFNAR2 y PDE8A, preferiblemente las combinaciones de biomarcadores o la ecuación de Z dadas en los Ejemplos o figuras con pacientes de la población femenina, más preferiblemente las combinaciones que comprenden los 8 biomarcadores MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A, más preferiblemente las combinaciones enumeradas en la Tabla 8.

En una realización más preferida, la presente invención se dirige a un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial del trastorno bipolar y la depresión unipolar en un paciente humano, según la presente invención, en donde la combinación de biomarcadores y/o la ecuación de Z o el algoritmo asociado a dicha combinación es diferente si el paciente a analizar es una mujer o un hombre.

Preferiblemente, la combinación de biomarcadores y/o la ecuación de Z de si el paciente a analizar es mujer u hombre se selecciona de la combinación y/o la ecuación de Z representada en los ejemplos o en las figuras para este caso particular.

Se describe, pero no forma parte de la invención reivindicada, un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial del trastorno bipolar 1 y bipolar 2 en un paciente humano a partir de una muestra biológica, preferiblemente una muestra de sangre, del paciente, en donde dicho método comprende la etapa de:

a) determinar una combinación de al menos dos biomarcadores de ARN de edición de A a I seleccionados del grupo que consiste en los biomarcadores MDM2, PRKCB, PIAS1, IFNAR1, LYN, AHR, RASSF1, GAB2, CAMK1D, IL17RA, PTPRC, KCNJ15, IFNAR2 y PDE8A;

- para cada biomarcador seleccionado, la proporción relativa de edición de ARN en un sitio de edición dado para al menos uno o una combinación de sitios que se pueden editar en el transcrito de ARN de dichos al menos dos biomarcadores, y/o

- el porcentaje relativo de una isoforma o de una combinación de isoformas del transcrito de ARN de cada uno de dichos dos biomarcadores;

b) determinar un valor de resultado obtenido para cada uno de dichos al menos dos biomarcadores y un valor de resultado final basándose en un algoritmo o ecuación que incluye el valor de resultado obtenido para cada biomarcador seleccionado;

c) determinar si dicho valor de resultado obtenido en la etapa b) es mayor o no es mayor que un valor de control obtenido para un sujeto bipolar 1 y/o bipolar 2 de control, en donde el valor de control se determinó de una manera comparable a la del valor de resultado; y

d) si dicho valor de resultado obtenido para el paciente es mayor, o no, que un umbral, clasificar a dicho paciente como que tiene trastorno bipolar 1 o bipolar 2.

También se prefieren los métodos *in vitro* para el diagnóstico diferencial del trastorno bipolar 1 y bipolar 2 en un paciente humano de la presente invención en donde dicha combinación de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 biomarcadores seleccionados es una combinación seleccionada de los biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A, preferiblemente las combinaciones que comprenden los siguientes 8 biomarcadores MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A.

También se prefieren los métodos en donde el algoritmo o la ecuación que permite el cálculo del valor de resultado o puntuación de depresión Z se seleccionan de las ecuaciones de Z enumeradas en los ejemplos, particularmente en la Tabla 13 y la Figura 13 B, preferiblemente la ecuación implementa una combinación de los siguientes 8 biomarcadores: MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A.

Se describe, pero no forma parte de la invención reivindicada, un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de un paciente que tiene trastorno bipolar y un paciente sano a partir de una muestra biológica, preferiblemente una muestra de sangre, del paciente, en donde dicho método comprende las etapas de:

a) determinar una combinación de al menos dos biomarcadores de ARN de edición de A a I seleccionados del grupo que consiste en los biomarcadores MDM2, PRKCB, PIAS1, IFNAR1, LYN, AHR, RASSF1, GAB2, CAMK1D, IL17RA, PTPRC, KCNJ15, IFNAR2 y PDE8A;

- para cada biomarcador seleccionado, la proporción relativa de edición de ARN en un sitio de edición dado para al menos uno o una combinación de sitios que se pueden editar en el transcrito de ARN de dichos al menos dos biomarcadores, y/o

5 - el porcentaje relativo de una isoforma o de una combinación de isoformas del transcrito de ARN de cada uno de dichos dos biomarcadores;

10 b) determinar un valor de resultado obtenido para cada uno de dichos al menos dos biomarcadores y un valor de resultado final basándose en un algoritmo o ecuación que incluye el valor de resultado obtenido para cada biomarcador seleccionado;

15 c) determinar si dicho valor de resultado obtenido en la etapa b) es mayor o no es mayor que un valor de control obtenido para un sujeto sano de control y bipolar, en donde el valor de control se determinó de una manera comparable a la del valor de resultado; y

d) si dicho valor de resultado obtenido para el paciente es mayor, o no, que un umbral, clasificar a dicho paciente como paciente sano o que tiene trastorno bipolar.

20 También se prefieren los métodos *in vitro* para el diagnóstico diferencial de un paciente con trastorno bipolar y un paciente sano en un paciente humano de la presente invención en donde dicha combinación de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 biomarcadores seleccionados es una combinación seleccionada de los biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A, preferiblemente las combinaciones que comprenden los siguientes 8 biomarcadores MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A.

25 También se prefieren los métodos de la presente invención en donde el algoritmo o la ecuación que permite el cálculo del valor de resultado o puntuación de depresión Z se seleccionan de las ecuaciones de Z enumeradas en los ejemplos, particularmente en la Tabla 12 y la Figura 13 C, preferiblemente la ecuación implementa una combinación de los siguientes 8 biomarcadores: MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A.

30 También se prefieren los métodos de la presente invención, en donde en la etapa a) se miden la proporción relativa de edición de ARN en una edición dada y/o el porcentaje de una isoforma mediante NGS en dicha muestra biológica.

35 También se prefieren los métodos de la invención, en donde en la etapa a), la secuencia de amplicón/nucleica usada para la detección de los sitios de edición de ARN y/o las isoformas del transcrito de ARN de dicho biomarcador se obtiene o se puede obtener con el conjunto de cebadores enumerados en la Tabla 1 para cada uno de los biomarcadores seleccionados (Id. de sec. n.º 1 a 36). También se prefieren los métodos de la presente invención, en donde en la etapa a), la secuencia de amplicón/nucleica usada para la detección de los sitios de edición de ARN y/o las isoformas del transcrito de ARN de dicho biomarcador se obtiene o se puede obtener con un conjunto o una combinación de conjuntos de cebadores que permiten obtener un amplicón(es) o secuencia(s) de ácido nucleico que incluyen, o son idénticos a, el(los) amplicón(es) o secuencia(s) de ácido nucleico que se pueden obtener mediante el conjunto de cebadores enumerados en la Tabla 1 (Id. de sec. n.º 1 a la Id. de sec. n.º 36).

45 Dicha secuencia de amplicón o ácido nucleico usada para la detección de los sitios de edición de ARN y/o las isoformas del transcrito de ARN de dicho biomarcador podría ser la propia secuencia completa del transcrito de ARN.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a un método para monitorizar el tratamiento del trastorno bipolar o depresión unipolar en un paciente humano, a partir de una muestra biológica de dicho paciente, comprendiendo dicho método:

50 A) diagnosticar de manera diferencial trastorno bipolar o depresión unipolar en dicho ser humano mediante el método según el método de la invención antes del inicio del tratamiento que se desea monitorizar.

55 B) repetir las etapas (a) a c) del método de la invención, después de un período de tiempo durante el cual dicho paciente recibe tratamiento para dicho trastorno bipolar o depresión unipolar, para obtener un valor de resultado postratamiento;

C) comparar el valor de resultado postratamiento de la etapa (c) con:

60 - el valor de resultado obtenido antes del período de tiempo durante el cual dicho paciente recibe tratamiento para dicho trastorno bipolar o depresión unipolar, y

- el valor de resultado (valor final de control) para pacientes con trastorno bipolar o depresión unipolar de control, y

65 clasificar dicho tratamiento como efectivo si el valor de resultado postratamiento obtenido en la etapa B) es más cercano al valor de resultado obtenido antes del período de tiempo durante el cual dicho paciente recibe tratamiento para pacientes con trastorno bipolar o depresión unipolar de control.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a un método para determinar si un paciente responderá a un tratamiento de trastorno bipolar que permite que el paciente se encuentre en un estado eutímico (estado de ánimo normal) a partir de una muestra biológica, preferiblemente una muestra de sangre de dicho paciente, comprendiendo dicho método la etapa de:

A) diagnosticar de manera diferencial trastorno bipolar para dicho ser humano mediante el método según la presente invención antes del inicio del tratamiento que se desea monitorizar.

B) repetir las etapas (a) a c) del método de la presente invención, después de un período de tiempo durante el cual dicho paciente recibe tratamiento para dicho trastorno bipolar, para obtener un valor de resultado postratamiento;

C) comparar el valor de resultado postratamiento de la etapa (c) con:

- el valor de resultado obtenido antes del período de tiempo durante el cual dicho paciente recibe tratamiento para dicho trastorno bipolar, y

- el valor de resultado (valor final de control) para pacientes con trastorno bipolar de control que se encuentran en un estado eutímico, y

clasificar a dicho paciente como paciente que responde al tratamiento si el valor de resultado postratamiento obtenido en la etapa B) es más cercano al valor de resultado obtenido antes del período de tiempo durante el cual dicho paciente recibe tratamiento para pacientes con trastorno bipolar de control que se encuentran en un estado eutímico.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a un kit para diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y unipolar, preferiblemente un TDM, en un paciente humano, comprendiendo dicho kit:

1) - opcionalmente, instrucciones para aplicar el método para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano, con el fin de obtener el valor de resultado cuyo análisis determina si dicho paciente presenta un trastorno bipolar o depresión unipolar; y

2) - un par de cebadores o una combinación de al menos dos pares de cebadores seleccionados del grupo de cebadores que consiste en la Id. de sec. n.º 1 a la Id. de sec. n.º 36 y, cuya selección depende del/de los biomarcador(es) usado(s) para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano;

o

- un par o una combinación de pares de cebadores que permiten obtener un(os) amplicón(es) idéntico(s) al/a los amplicón(es) que se puede(n) obtener mediante los pares de cebadores enumerados en la Tabla 1 (Id. de sec. n.º 1 a la Id. de sec. n.º 36).

Los siguientes ejemplos y las figuras y leyendas en lo sucesivo en la presente memoria se han escogido para proporcionar a los expertos en la materia una descripción completa para poder implementar y usar la presente invención. Estos ejemplos no pretenden limitar el alcance de lo que el inventor considera que es su invención, ni pretenden mostrar que solo se llevaron a cabo los experimentos en lo sucesivo en la presente memoria.

Otras características y ventajas de la invención se irán poniendo de manifiesto en el resto de la descripción con los Ejemplos, las Figuras y las Tablas, las leyendas para las cuales se dan a continuación en la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos y las tablas

Figuras 1A-1D: Identificación y validación de sitios de edición de ARN de A a I diferencialmente entre controles sanos y pacientes con DEP usando datos de Sec-ARN de sangre humana.

A: Localización genómica de los sitios de edición detectados

B: Repartición de eventos de edición de A a I o genes editados por cromosoma.

Gris oscuro (eje y izquierdo): Repartición de eventos de edición de A a I identificados con una cobertura mínima de 30 en el estudio de Sec-ARN.

Gris claro (eje y derecho): Repartición de genes editados identificados con una cobertura mínima de 30 en el estudio de Sec-ARN

C: Gráfico de volcán de sitios editados diferencialmente entre controles y pacientes con DEP. El gráfico de volcán muestra los sitios de genes editados diferencialmente regulados al alza y a la baja entre el grupo de pacientes deprimidos (DEP) y el grupo de control. Para cada gráfico, el eje x representa el log (2) (múltiplo de variación) (FC), y

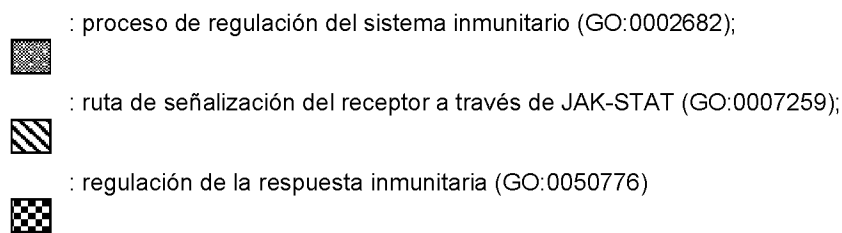
el eje y representa $-\log_{10}$ (valores de p). Los sitios de edición con un valor de p ajustado de menos de 0,05 Y FC >5 % se asignaron como editados diferencialmente y se indican en verde.

D: Índice de edición de Alu entre controles y pacientes deprimidos. Distribución de valores de índice de edición de Alu (AEI) en controles y pacientes con DEP. Los datos son la media $\pm$ EEM. El valor de p del índice de edición se calculó usando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

Figura 2: Análisis de componentes principales de las 646 variantes en 366 genes editados diferencialmente entre pacientes deprimidos y controles sanos identificados en el estudio de Sec-ARN.

El gráfico de dispersión visualiza la primera, la segunda y la tercera componentes principales y los porcentajes de varianza respectivos en los ejes x, y y z de la relación (múltiplo de variación) de los biomarcadores. círculos grises: Pacientes con DEP; círculo negro: Controles sanos.

Figura 3: Asociaciones proteína-proteína en los 14 genes editados diferencialmente usados en las cohortes de priorización. El diagrama muestra las interacciones proteína-proteína en el grupo de 14 genes seleccionados en la cohorte de priorización. Los genes fueron anotados y coloreados según su implicación en procesos biológicos.



Figuras 4A-4D: Ejemplos de rendimiento diagnóstico de la edición de ARNm de la primera cohorte de priorización (n = 35) analizado mediante monoplex.

- A: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 2 sitios de edición de ARN en 2 dianas diferentes.
- B: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 3 sitios de edición de ARN en 2 dianas diferentes.
- C: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 4 sitios de edición de ARN en 3 dianas diferentes.
- D: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 24 sitios de edición de ARN presentes en 3 dianas diferentes.

Figuras 5A-5E: Rendimiento diagnóstico de la edición de ARNm de la segunda cohorte de priorización (n = 58) analizado mediante secuenciación multiplexada.

- A: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 3 sitios de edición de ARN en 2 dianas diferentes.
- B: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 4 sitios de edición de ARN en 2 dianas diferentes.
- C: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 5 sitios de edición de ARN en 3 dianas diferentes.
- D: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 6 sitios de edición de ARN presentes en 3 dianas diferentes.
- E: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 14 sitios de edición de ARN en 4 dianas diferentes.

Figuras 6A-6C Rendimiento diagnóstico de la edición de ARNm de la cohorte de validación (n = 256) analizado mediante secuenciación multiplexada de 8 dianas.

- A: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 29 sitios de edición de ARN en 6 dianas diferentes.
- B: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 32 sitios de edición de ARN en 6 dianas diferentes.
- C: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 44 sitios de edición de ARN en 7 dianas diferentes.

Figuras 7A-7E: Rendimiento diagnóstico de la edición de ARNm de la población femenina de la cohorte de validación (n = 179) analizado mediante secuenciación multiplexada de 8 dianas.

- A: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 17 sitios de edición de ARN en 7 dianas diferentes.

- B: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 23 sitios de edición de ARN en 7 dianas diferentes.
- C: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 44 sitios de edición de ARN en 8 dianas diferentes.
- 5 D: Curva ROC obtenida tras aprendizaje automático con el método de mROC.
- E: Curva ROC obtenida tras aprendizaje automático con el método de Bosque aleatorio

Figuras 8A-8E: Rendimiento diagnóstico de la edición de ARNm de la población masculina de la cohorte de validación (n = 77) analizado mediante secuenciación multiplexada de 8 dianas.

- A: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 18 sitios de edición de ARN en 6 dianas diferentes.
- B: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 39 sitios de edición de ARN en 6 dianas diferentes.
- 15 C: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 47 sitios de edición de ARN en 6 dianas diferentes.
- D: Curva ROC obtenida tras aprendizaje automático con el método de mROC.
- 20 E: Curva ROC obtenida tras aprendizaje automático con el método de Bosque aleatorio

Figuras 9A-9C: Rendimiento diagnóstico de la edición de ARNm entre pacientes bipolares y pacientes eutímicos de la población femenina de la cohorte de validación (n = 90) analizado mediante secuenciación multiplexada de 8 dianas.

- 25 A: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 9 sitios de edición de ARN en 4 dianas diferentes.
- B: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 18 sitios de edición de ARN en 4 dianas diferentes.
- C: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 24 sitios de edición de ARN en 5 dianas diferentes.

Figuras 10A-10C: Rendimiento diagnóstico de la edición de ARNm entre pacientes bipolares y pacientes eutímicos de la población masculina de la cohorte de validación (n = 47) analizado mediante secuenciación multiplexada de 8 dianas.

- 35 A: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 12 sitios de edición de ARN en 6 dianas diferentes.
- B: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 23 sitios de edición de ARN en 6 dianas diferentes.
- C: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido mediante el uso de 28 sitios de edición de ARN en 6 dianas diferentes.

Figuras 11A-11C: Rendimiento diagnóstico de la edición de ARNm entre pacientes depresivos bipolares y controles sanos (n = 239) analizado mediante secuenciación multiplexada de 8 dianas.

- 45 A: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido en toda la población mediante el uso de 60 sitios de edición de ARN en 7 dianas diferentes.
- B: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido en mujeres mediante el uso de 32 sitios de edición de ARN en 7 dianas diferentes.
- 50 C: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido en hombres mediante el uso de 50 sitios de edición de ARN en 7 dianas diferentes.

Figuras 12A-12C: Rendimiento diagnóstico de la edición de ARNm entre pacientes eutímicos bipolares y controles sanos (n = 183) analizado mediante secuenciación multiplexada de 8 dianas.

- 55 A: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido en toda la población mediante el uso de 53 sitios de edición de ARN en 6 dianas diferentes.
- B: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido en mujeres mediante el uso de 41 sitios de edición de ARN en 8 dianas diferentes.
- 60 C: Ejemplo de rendimiento diagnóstico obtenido en hombres mediante el uso de 35 sitios de edición de ARN en 7 dianas diferentes.

Figura 14: Características demográficas y diagnóstico psiquiátrico de la población de estudio incluida en el estudio de Sec-ARN.

Los datos son la media $\pm$ EEM. Los valores p de las características principales se visualizan con la prueba t de Student; IMC: Índice de masa corporal

Figura 15: Categorización funcional de los 366 genes editados diferencialmente entre DEP y controles basándose en anotaciones de ontología genética (GO).

Se muestran los resultados de las 20 pruebas de sobrerrepresentación de GO principales para el enriquecimiento de términos GO de procesos biológicos con genes editados diferencialmente. La entrada a las herramientas de análisis de enriquecimiento de GO fue la lista de 366 genes editados diferencialmente entre DEP y los controles. Se presentan la relación entre el número de genes/número total de genes incluidos en el término GO y los valores p corregidos usando el método de Benjamini-Hochberg para múltiples pruebas. TDF, tasa de descubrimientos falsos; GO, ontología genética.

Figura 16: Análisis de enriquecimiento de la ruta de señalización de los 366 genes editados diferencialmente entre DEP y los controles.

La figura muestra las rutas significativas obtenidas realizando un análisis de sobrerrepresentación en Reactome. Se muestran la relación entre el número de genes/número total de genes incluidos en la ruta y los valores p corregidos usando el método de Benjamini-Hochberg para múltiples pruebas.

Figura 17: Variantes de edición de genes y ARN analizadas en la cohorte de priorización.

Se muestran el gen y la posición (GRCh38) de la variante de edición, la cobertura después de Sec-ARN, el cambio entre controles y pacientes con DEP, el valor de p y el área bajo la curva calculada a partir de datos de Sec-ARN. Los valores p se calcularon usando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

Figura 18: Categorización funcional de los 14 genes editados diferencialmente usados en las cohortes de priorización basándose en anotaciones de ontología genética (GO).

Se muestran los resultados de las 20 pruebas de sobrerrepresentación de GO principales para el enriquecimiento de términos GO de procesos biológicos con genes editados diferencialmente. La entrada a las herramientas de análisis de enriquecimiento de GO fue la lista de 14 genes editados diferencialmente entre DEP y controles analizados en las cohortes de priorización. Se presentan valores p corregidos usando el método de Benjamini-Hochberg para múltiples pruebas. TDF, tasa de descubrimientos falsos; GO, ontología genética.

Figura 19: Análisis de enriquecimiento de la ruta de señalización de los 14 genes analizados en las cohortes de priorización.

La figura muestra las rutas significativas obtenidas al realizar el análisis de sobrerrepresentación en Reactome. Se muestran los valores p corregidos usando el método de Benjamini-Hochberg para pruebas múltiples.

Figura 20: Las características demográficas y el diagnóstico psiquiátrico de la población de estudio incluyeron el primer estudio de priorización analizado en monoplex.

Los datos son la media $\pm$ EEM. Los valores p de las características principales se visualizan con la prueba t de Student. IMC: Índice de masa corporal. Se muestran las pruebas.

Figura 21: Las características demográficas y el diagnóstico psiquiátrico de la población de estudio incluyeron el segundo estudio de priorización analizado mediante secuenciación multiplexada.

Los datos son la media $\pm$ EEM. Los valores p de las características principales se visualizan con la prueba t de Student. IMC: Índice de masa corporal.

Figura 22: Características demográficas y diagnóstico psiquiátrico de la población de estudio incluida en la cohorte de validación.

Los datos son la media $\pm$ EEM. Los valores p de las características principales se visualizan con la prueba t de Student. IMC: Índice de masa corporal

Figura 23: Características demográficas y diagnóstico psiquiátrico de los controles sanos y pacientes bipolares.

Los datos son la media $\pm$ EEM. Los valores p de las características principales se visualizan con la prueba t de Student. CTRL: Controles sanos; IMC: Índice de masa corporal

Figura 24: Características demográficas y diagnóstico psiquiátrico de pacientes con trastorno bipolar de tipo I y tipo II.

Los datos son la media $\pm$ EEM. Los valores p de las características principales se visualizan con la prueba t de Student. CTRL: Controles sanos; IMC: Índice de masa corporal

Figura 25: Categorización funcional de los 366 genes editados diferencialmente entre DEP y controles basándose en anotaciones de g:Profiler.

Se muestran los resultados de las 20 pruebas de sobrerrepresentación de GO principales para el enriquecimiento de términos GO de procesos biológicos con genes editados diferencialmente. La entrada al g:Profiler fue la lista de 366 genes editados diferencialmente entre DEP y los controles. Se presentan la relación entre el número de genes/número total de genes incluidos en el término GO y los valores p corregidos usando el método de Benjamini-Hochberg para múltiples pruebas. TDF, tasa de descubrimientos falsos; GO, ontología genética.

Figura 26: Categorización funcional de los 366 genes editados diferencialmente entre DEP y controles basándose en anotaciones de GOnet.

Se muestran los resultados de las 20 pruebas de sobrerrepresentación de GO principales para el enriquecimiento de términos GO de procesos biológicos con genes editados diferencialmente. La entrada al GOnet fue la lista de 366 genes editados diferencialmente entre DEP y los controles. Se presentan la relación entre el número de genes/número total de genes incluidos en el término GO y los valores p corregidos usando el método de Benjamini-Hochberg para múltiples pruebas. TDF, tasa de descubrimientos falsos; GO, ontología genética.

Figuras 27A-27B: Correlación entre las puntuaciones clínicas MADRS e IDS-C30 para los sujetos incluidos en el estudio de Sec-ARN.

A: Correlación entre las puntuaciones clínicas MADRS e IDS-C30 para los pacientes con BD. El gráfico muestra una confianza de intervalos del 95 %. Se indican el coeficiente de correlación de Pearson y el valor de p .

B: Correlación entre las puntuaciones clínicas MADRS e IDS-C30 para los pacientes unipolares. El gráfico muestra una confianza de intervalos del 95 %. Se indican el coeficiente de correlación de Pearson y el valor de p .

Figura 28: Visión general de la canalización de análisis del editoma

Canalización de búsqueda de edición de ARN a partir del análisis del editoma

Figuras 29A-29B: Rendimiento diagnóstico de la edición de ARNm de la cohorte de validación ($n = 256$) analizado mediante secuenciación multiplexada de 6 dianas usando el modelo 1 (Figura 29A) y el modelo 2 (Figura 29B) de Bosque aleatorio.

A. Curva característica operativa del receptor y rendimientos diagnósticos para la depresión bipolar con el primer modelo ajustado por edad, sexo, tratamiento psiquiátrico y adicción. Se representan gráficamente las probabilidades de la respuesta correcta de los conjuntos sometidos a prueba

B. Curva característica operativa del receptor y rendimientos diagnósticos para la depresión bipolar con el segundo modelo ajustado por edad y sexo. Se representan gráficamente las probabilidades de la respuesta correcta de los conjuntos sometidos a prueba

EJEMPLO 1: Materiales y métodos

Sujetos y evaluación clínica

Pacientes deprimidos ($n = 297$; DEP) se reclutaron entre los pacientes ambulatorios del Departamento de Psiquiatría de Emergencia y Cuidados Intermedios (CHRU de Montpellier) según los principios de la Declaración de Helsinki de 1975 y sus actualizaciones sucesivas. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético local francés (CPP Sud-Méditerranée IV en Montpellier, CPP n.º A01978-41). Todos los participantes, de entre 18 y 67 años, entendieron y firmaron un consentimiento informado por escrito antes de ingresar al estudio. El estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional local, según los requisitos de aprobación y las buenas prácticas clínicas. Todos los pacientes cumplieron los criterios de depresión unipolar y trastorno bipolar del Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales IV (DSM-IV) usando la Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional MINI. La presencia o ausencia de diagnósticos psiquiátricos y estados de ánimo al momento de ingresar al estudio fueron confirmados por psiquiatras capacitados. Durante la entrevista estandarizada, los psiquiatras manejaron la versión francesa de la Escala de Calificación de Depresión de Montgomery-Åsberg (MADRS) y el Inventario de Sintomatología Depresiva de 30 ítems, Calificado por el Clínico (IDS-C30). La gravedad de los síntomas maníacos en el trastorno bipolar se evaluó mediante la Escala de calificación de manía de Young (YMRS). Es importante destacar que elegimos incluir solo pacientes cuyos niveles de gravedad de depresión eran moderados y severos (MADRS > 20 y/o IDS-C30 > 24), para evitar pacientes “límite”, por ejemplo, pacientes con puntuaciones bajas de depresión o pacientes a quienes una escala de depresión los definía como deprimidos mientras que la otra los definía como saludables. Los sujetos de control emparejados por edad, raza y sexo ($n = 143$) fueron reclutados de una lista de voluntarios del Centro de Investigación Clínica (CHRU de Montpellier).

Extracción y cualificación de ARN a partir de sangre completa

Se recuperó un volumen de 4 ml de sangre completa de cada paciente en tubos de ARN sanguíneo PAXgene™, que están optimizados para la estabilización del ARN y se almacenan a -20 °C antes de transferirse a -80 °C. Las muestras se distribuyeron aleatoriamente en los diferentes conjuntos de extracciones. Las muestras de sangre se descongelaron a 4 °C durante la noche y se centrifugaron durante 10 min a 3.000 g. El sedimento se lavó con 4 ml de DPBS 1X y se resuspendió en 400 µl de DPBS 1X. Las muestras de ARN totales se aislaron usando el kit MagNA Pure 96 Cellular RNA Large Volume (LifeScience), según el protocolo automatizado del fabricante. Los ARN se eluyeron en 100 µl de tampón de elución MagNA Pure 96. Durante la preparación de la muestra y la extracción de ARN, se tomaron precauciones estándar para evitar la degradación del ARN por las ARNasas. Las concentraciones de ARN total y los niveles de calidad se determinaron con los instrumentos Qubit Fluorometer (Invitrogen) y LabChip (Perkin-Elmer, HT RNA Reagent Kit), respectivamente.

Preparación de bibliotecas para secuenciación de ARN

Para la preparación de bibliotecas de ARN a partir de ARN derivados de la sangre, elegimos una estrategia específica destinada a agotar en un solo paso tanto el ARN ribosómico como los ARN de globina, que son dos formas de ARN abundante, para enriquecer la biblioteca con ARN totales (ARNm). Se prefirieron los ARN totales a los ARN mensajeros, ya que se ha mostrado que la edición de ARN en las células sanguíneas se enriqueció en la región intrónica de elementos repetitivos, que se eliminan durante el empalme para producir ARN mensajeros. Por ello, usamos un kit de biblioteca TruSeq Stranded Total RNA (Illumina) con Ribo-Zero Globin, que está diseñado específicamente para muestras de sangre, según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se agotaron 300 ng de ARN totales en ARN ribosómico y ARN de globina usando sondas de agotamiento de ARNr y globina en combinación con perlas magnéticas. Después de la purificación, los ARN se fragmentan en fragmentos de 250 pb en promedio usando cationes divalentes a temperatura elevada. A continuación, se logró la síntesis de ADNc de primera cadena usando la transcriptasa inversa Superscript II (Thermo Fisher Scientific) y cebadores aleatorios. A continuación, se realiza la síntesis de ADNc de segunda cadena usando la ADN polimerasa I y la ARNasa H. Durante la síntesis de ADNc de segunda cadena, se incorpora dUTP en lugar de dTTP para generar una biblioteca específica de cadena. Después de la síntesis de ADNc de segunda cadena, los extremos 3' de los fragmentos romos se adenilan en 3' antes de la ligadura del adaptador. Es importante destacar que cada índice se ha atribuido a todos los grupos para evitar un sesgo putativo debido al efecto inespecífico del índice sobre la profundidad de la secuenciación. A continuación, fragmentos de ADN que tienen moléculas adaptadoras en ambos extremos se amplificaron mediante PCR para aumentar la cantidad de ADN en la biblioteca. A continuación, se realizaron controles de calidad usando instrumentos tanto Qubit Fluorometer (Invitrogen) como LabChip (Perkin-Elmer, HT DNA 5K Reagent Kit) para la cuantificación de las plantillas de la biblioteca de ADN y el análisis de control de calidad, respectivamente. A continuación, las muestras se agruparon en una biblioteca y se purificaron usando el sistema de limpieza de PCR Magbio. La biblioteca se desnaturalizó usando NaOH 0,1 M y se secuenció en un experimento con Illumina NextSeq 500/550 de alto rendimiento usando química de extremos emparejados con una longitud de lectura de 75 pb.

Procesamiento de datos Sec-ARN, análisis de expresión diferencial y análisis del editoma

Las lecturas de extremos emparejados se generaron usando un Illumina NextSeq 500 y se desmultiplexaron usando bcl2fastq (versión 2.17.1.14, Illumina). La calidad de la secuenciación se realizó usando el software FastQC (versión 0.11.7, <https://github.com/s-andrews/FastQC>). Las alineaciones de lectura se realizaron usando la versión del genoma humano hg38 con el alineador STAR⁷, seguido de una realineación con Genome Analysis Tool Kit (GATK, versión 4.1.4.0)⁸, eliminación de duplicados de PCR y denominación de variantes de un solo nucleótido (SNV) finales. La identificación y cuantificación de los eventos de edición de A a I se realizó usando RNAEditor (versión 1.0)⁹. A continuación, se realizó un filtrado adicional y una anotación funcional de los eventos editados con ANNOVAR¹⁰, RepeatMasker¹¹ y BiomaRt¹².

Preparación y secuenciación de bibliotecas de secuenciación de próxima generación dirigida

Para la preparación de bibliotecas de secuenciación de nueva generación (NGS), elegimos un enfoque dirigido multiplexado para secuenciar selectivamente la región de interés dentro de cada diana relevante. Se usaron cebadores de PCR validados para amplificar la región de interés mediante PCR (Tabla 1). Para la amplificación por PCR, se usó la enzima Q5 Hot Start High Fidelity (New England Biolabs) según las pautas del fabricante. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Pqstar 96x usando un protocolo de PCR optimizado. Se evaluaron tanto la cantidad como la calidad del producto de PCR. La pureza del amplicón se determinó con un analizador de ácidos nucleicos (LabChipGx, Perkin Elmer) y la cuantificación se realizó usando el método Qubit basado en fluorescencia. Después del control de calidad, las reacciones de PCR se purificaron usando perlas magnéticas (sistema High Prep PCR MAGbio, Mokascience). A continuación, se cuantificó el ADN usando el sistema Qubit y se calculó el rendimiento de purificación. A continuación, las muestras se indexaron individualmente mediante amplificación por PCR usando la enzima PCR de alta fidelidad Q5 Hot start (New England Biolabs) y el kit Illumina 96 Indexes (kit Nextera XT index; Illumina). A continuación, las muestras se agruparon en una biblioteca y se purificaron usando el sistema de limpieza de PCR Magbio. La biblioteca se desnaturalizó usando NaOH 0,1 M y se cargó en un cartucho de secuenciación (Illumina MiSeq Reagent Kit V3 o Illumina NextSeq 500/550 Mid-Output) según las pautas de Illumina. Se incorporó a las bibliotecas una agrupación de ARN total comercial de leucocitos periféricos de sangre humana (Clontech, n.º 636592) para determinar la variabilidad entre diferentes células de flujo de secuenciación durante el transcurso del experimento. Se agregaron bibliotecas de NGS para introducir diversidad en las bibliotecas usando PhiX Control V3

(Illumina) y se secuenciaron (secuenciación de lectura única, longitud de lectura de 150 pb) en concentraciones estándar usando secuenciación profunda (> 50.000 secuencias por muestra).

Análisis bioinformático de datos de secuenciación dirigida

Los datos de secuenciación se descargaron de los secuenciadores NextSeq o MiSeq (Illumina). La calidad de la secuenciación se realizó usando el software FastQC (versión 0.11.7, <https://github.com/s-andrews/FastQC>). Se consideró una profundidad de secuenciación mínima de 20.000 lecturas para cada muestra para un análisis adicional. Se realizó una etapa de pretratamiento que consistió en eliminar las secuencias adaptadoras y filtrar las secuencias según su tamaño y puntuación de calidad. Se eliminaron las lecturas cortas (< 100 nucleótidos) y las lecturas con un QC promedio < 20. Para mejorar la calidad de alineación de las secuencias, se usaron herramientas de filtrado y recorte de lectura flexibles para datos NGS de Illumina (fastx_toolkit v0.0.14 y prinseq, versión 0.20.4). Después de realizar las etapas de preprocesamiento, se realizó un control de calidad adicional de cada archivo fastq limpio antes de realizar un análisis adicional.

La alineación de las lecturas procesadas se realizó usando bowtie2¹³ (versión 2.2.9) con modo sensible de extremo a extremo. La alineación se realizó con la secuencia de referencia más reciente del genoma humano¹⁴ (GRCh38). Las alineaciones no únicas, las lecturas no alineadas o las lecturas que contienen inserción/eliminación (INDEL) se eliminaron del análisis corriente abajo mediante el software SAMtools¹⁵ (versión 1.7). Se usó SAMtools mpileup¹⁶ para la denominación de SVN. La búsqueda de la posición editada en la alineación se realizó mediante secuencias de comandos internas para contar el número de nucleótidos diferentes en cada ubicación genómica. Para cada posición, la secuencia de comandos calcula el porcentaje de lecturas que tienen una 'G' [Número de lecturas 'G' / (Número de lecturas ' ' + G' Número de lecturas 'A') * 100]. Las referencias de ubicación genómica 'A' con porcentaje en lecturas 'G' > 0,1 son detectadas automáticamente por la secuencia de comandos y se consideran como 'sitio de edición de A a I'. La última etapa fue calcular el porcentaje de todas las isoformas posibles de cada transcrito. Por definición, la proporción relativa de edición de ARN en un "sitio" de edición determinado representa la suma de las modificaciones de edición medidas en esta coordenada genómica única. Por el contrario, una isoforma de ARNm es una molécula única que puede contener o no múltiples modificaciones de edición en el mismo transcrito. Por ejemplo, para un transcrito dado, la isoforma BC del ARNm contiene una modificación de A a I tanto en el sitio B como en el sitio C dentro del mismo transcrito. Se estableció una proporción relativa de al menos el 0,1 % como umbral para ser incluido en el análisis.

Análisis estadístico de datos

Todas las estadísticas y cifras se calcularon con el software estadístico de código abierto "R/Bioconductor" (versión R 3.5.3)¹⁷ o el software GraphPad Prism (versión 7.0). Los valores de los biomarcadores (es decir, los sitios de edición de ARN y las isoformas de los genes diana y la expresión de ARNm de los ADAR) se presentan habitualmente como media $\pm$ error estándar de la media (EEM). Para garantizar una distribución normal de los datos, todos los biomarcadores podrían transformarse usando el paquete R bestNormalize (versión 1.4.2). Para garantizar una distribución normal de los datos, todos los biomarcadores podrían transformarse usando el paquete R bestNormalize (versión 1.4.2). Se realizó un análisis diferencial usando la prueba más adecuada entre la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney, la prueba t de Student o la prueba t de Welch según la normalidad y la distribución de la varianza de la muestra. Un valor de *p* inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

La proporción relativa de edición de ARN, tanto en sitios como en isoformas, se analizó ajustándola al nivel de transcrito relativo del gen de referencia. Los valores de edición de ARN ajustados se calcularon de la siguiente manera:

Valor de edición ajustado* = (valor de edición de ARN X nivel de transcrito relativo)/100)

El rendimiento diagnóstico del biomarcador podría caracterizarse por: sensibilidad, que representa su capacidad para detectar el grupo "bipolar" y especificidad, que representa su capacidad para detectar el grupo "unipolar". Los resultados de la evaluación de una prueba diagnóstica se pueden resumir en una tabla de contingencia 2x2 comparando estos dos grupos bien definidos. Fijando un punto de corte, los dos grupos podrían clasificarse en categorías según los resultados de la prueba, categorizados o bien como positivos o bien como negativos. Dado un biomarcador particular, se puede identificar un número de pacientes A con un resultado positivo en la prueba dentro del grupo bipolar (el "Verdadero Positivo": TP) y pacientes B con un resultado negativo en la prueba dentro del grupo "unipolar" (el "Verdadero Negativo": TN). De la misma manera, se observan pacientes C con un resultado de prueba negativo dentro del grupo "bipolar" (el "Falso Negativo": FN) y pacientes D con un resultado de prueba positivo dentro del grupo "unipolar" (el "Falso Positivo": FP). La sensibilidad se define como TP/(TP + FN); que se denomina en la presente memoria "tasa de positivos verdaderos". La especificidad se define como TN/(TN + FP); que se denomina en la presente memoria "tasa de negativos verdaderos".

La precisión de cada biomarcador y su poder discriminatorio se evaluaron usando un análisis de características operativas del receptor (ROC)¹⁸. Las curvas ROC son la visualización gráfica de la relación recíproca entre la sensibilidad (Se) y la especificidad (Sp) de una prueba para varios valores. Además, todos los biomarcadores se combinaron entre sí para evaluar el aumento potencial de la sensibilidad y especificidad usando múltiples enfoques como, por ejemplo, el programa mROC¹⁹ o Bosque aleatorio²⁰.

mROC es un programa dedicado para identificar la combinación lineal^{21,22}, que maximiza la curva ROC de AUC (Área bajo la curva)²³. Se proporciona la ecuación para la combinación respectiva y puede usarse como un nuevo marcador virtual Z, de la siguiente manera:

$$Z = a \times \text{biomarcador 1} + b \times \text{biomarcador 2} + c \times \text{biomarcador 3}$$

donde a, b, c son coeficientes calculados y los biomarcadores 1,2,3 son el nivel del biomarcador considerado.

Se aplicó Bosque Aleatorio (RF) como anteriormente para evaluar las combinaciones de isoformas/sitios de edición de ARN. Este método combina la idea de “embolsado” de Breiman²⁰ y la selección aleatoria de características para construir una colección de árboles de decisión con varianza controlada. Por ello pueden usarse bosques aleatorios para clasificar la importancia de la edición de isoforma y combinar las mejores isoformas. Se implementó el embolsado asimétrico con reducción de tamaño múltiple (MultDS) con clasificador de variables integrado²⁴. Este método intenta aprovechar toda la información de las clases mayoritarias mediante un submuestreo múltiple pero manteniendo fija la clase minoritaria. Nuestro algoritmo generó 100 bosques aleatorios a partir del conjunto de entrenamiento, cada uno con el mismo número fijo de la clase minoritaria y un número igual o ajustado de lo muestreado aleatoriamente, generando árboles casi equilibrados. Para la clasificación de nuevos datos, los resultados se combinaron posteriormente mediante votación mayoritaria de los 100 bosques aleatorios entrenados. Para estimar los parámetros RF para cada 100 bosques aleatorios entrenados, se aplicó una validación cruzada de 10 veces. La implementación se realizó usando el paquete R randomForest (versión 4.6-14) y el paquete R caret (versión 6.0-84).

EJEMPLO 2: Resultados

Características de las muestras del estudio de descubrimiento

Los pacientes incluidos en las muestras de Sec-ARN fueron emparejados con respecto a todas las variables, por ejemplo, sexo, edad o IMC, que no fueron estadísticamente diferentes entre los grupos (Figura 14). Elegimos dos evaluaciones clínicas diferentes para confirmar la presencia de diagnósticos psiquiátricos, en concreto, MADRS e IDSC-30, ambas designadas por el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales de la Asociación Estadounidense de Psiquiatría. Tanto los pacientes unipolares como los bipolares fueron clasificados como deprimidos según las puntuaciones clínicas en las escalas de depresión MADRS e IDSC-30, y fueron estadísticamente significativos con respecto a controles sanos (Figura 14). Además, observamos una asociación significativa entre las dos evaluaciones clínicas (para BD ($r^2 = 0,747$, $p < 0,0001$ para BD, $r^2 = 0,934$, $p < 0,0001$ para Unipolar, Figuras 27A y 27B), lo que sugiere una asignación correcta de los pacientes y una homogeneidad relativa en la puntuación de la depresión. No hubo ninguna diferencia estadística en la gravedad de los síntomas maníacos evaluados por la YMRS entre los pacientes que padecían depresión unipolar o aquellos que padecían trastorno bipolar (Figura 14), lo que sugiere que los pacientes con BD incluidos en el estudio estaban en un episodio depresivo real.

Análisis del editoma

Para obtener un panorama global de la modificación de los eventos de edición de ARN en pacientes deprimidos, analizamos el conjunto de datos de Sec-ARN usando una canalización de análisis del editoma interna (véanse los métodos de la Figura 28). Identificamos 37.599 posiciones editadas diferencialmente de A a I con una cobertura mínima de 30x, lo que garantiza un alto grado de confianza en posiciones de bases particulares. La cobertura describe el número promedio de lecturas que se alinean con o “cubren” bases de referencia conocidas. La mayoría de las posiciones editadas (sitios 32, 183, un 85,6 % del total) estaban presentes en intrones (Figura 1A), en consonancia con otros estudios en tejidos humanos²⁵. El porcentaje de posiciones editadas en regiones 3' no traducidas (3'UTR) de ARNm fue del 6,2 % (2344 sitios), en línea con informes anteriores que usaron Sec-ARN. El número de sitios de edición tuvo una distribución homogénea por todo el genoma, aunque los genes editados en los cromosomas 4, 9, 18, 19, 20, 21 y 22 estuvieron ligeramente sobrerrepresentados (Figura 1B). A continuación, realizamos un análisis diferencial para identificar sitios cuya edición podría ser específicamente diferente entre DEP y controles sanos. Después de aplicar criterios de calidad preestablecidos (exclusión de sitios intergénicos, cobertura >30; AUC >0,6; 0,95 >Múltiplo de variación>1,05 y $p < 0,05$), se identificaron 646 variantes editadas diferencialmente entre pacientes deprimidos y controles sanos (Figura 1C), representando 366 genes. Los criterios de calidad se establecieron con el fin de proporcionar biomarcadores (BMK) de diagnóstico potenciales para trastornos depresivos con utilidad clínica. Es importante destacar que no se observaron diferencias en la edición global del ARN entre pacientes y controles. De hecho, calculamos el índice de edición de *Alu* (AEI) global, que es una medida de la tasa global de edición de ARN en repeticiones de *Alu*. Las repeticiones de *Alu* son, con diferencia, la región editada más común en el genoma humano y, por tanto, son indicativas de la tasa de edición global²⁶. No hallamos diferencias significativas en el AEI entre los controles y los pacientes deprimidos (media de control de AEI = $0,300 \pm 0,002$, media de DEP de AEI = $0,299 \pm 0,003$, valor de $p = 0,57$, Figura 1D). Como el índice de edición de *Alu* caracteriza el nivel de edición promedio ponderado en todas las secuencias de *Alu* expresadas, estos datos sugieren que la edición diferencial del ARN era específica de la diana en lugar de depender del estado de la enfermedad.

GSEA (análisis de enriquecimiento en conjuntos de genes) sobre estos 366 genes usando herramientas de ontología genética²⁷ mostraron un fuerte enriquecimiento de términos (tasa de falsos descubrimientos < 0,05) para los procesos biológicos, incluyendo múltiples categorías inmunitarias (respuesta, activación y regulación), activación celular y procesos

metabólicos (Figura 15). Este análisis se replicó con otras herramientas, como G:profiler²⁸ (Figura 25) o GOnet²⁹ (Figura 26), e indicó consistentemente un fuerte enriquecimiento en los procesos biológicos relacionados con el sistema inmunitario. Además, el análisis de las rutas de Reactome de esos 366 genes reveló un fuerte enriquecimiento en rutas relacionadas con el sistema inmunitario, es decir, la señalización de TCR, la translocación de ZAP-70 a la sinapsis inmunitaria o la señalización del interferón gamma (Figura 16). Cabe destacar que el análisis de componentes principales (PCA) mostró que este subconjunto de las 646 variantes de edición que representan 366 genes discriminaban claramente entre controles y pacientes deprimidos en 2 grupos separados (Figura 2), lo que sugiere que las variantes de edición en esos genes podrían usarse en combinación para discriminar selectivamente entre pacientes deprimidos y controles sanos.

Para acotar adicionalmente la lista de genes, se usaron criterios de calidad mucho más estrictos (cobertura >30; AUC >0,8; 0,8 >Múltiplo de variación>1,20 y $p < 0,05$). A continuación, la base de datos de estos marcadores se seleccionó manualmente para alcanzar una combinación de varios biomarcadores que representan diferentes mecanismos biológicos. Usando estos criterios secundarios, se seleccionó una lista de 15 variantes, que representan 13 genes (Figura 17), tanto por su rendimiento diagnóstico como por su papel potencial en el sistema inmunitario o la biología de la enfermedad psiquiátrica y para estudiarse en una cohorte de priorización posterior. Además, nominamos otra diana, PDE8A, para el cual los datos previos indicaron una edición alterada en el cerebro suicida y en la sangre de la depresión inducida por fármacos en pacientes con VHC^{30,31}. El análisis de redes de asociación proteína-proteína con la base de datos STRING³² reveló una red con fuerte enriquecimiento en la interacción proteína-proteína (valor de p de PPI $< 4,5 \cdot 10^{-6}$). Las interacciones dentro de STRING se basan en evidencia y consisten en interacciones directas (físicas) e indirectas (funcionales); en el presente caso nos centramos en una puntuación de interacción requerida mínima de 0,7, lo que es indicativo una confianza alta en las interacciones proteína-proteína reales. El análisis de red de asociación de proteínas funcionales de los 14 genes seleccionados usando herramientas de ontología genética²⁷ también mostró un fuerte enriquecimiento en genes relacionados con: proceso de regulación del sistema inmunitario (8 genes, GO:0002682; $p(\text{TDF}) = 4 \cdot 10^{-4}$), regulación de la respuesta inmunitaria, (6 genes, GO:0050776, $p(\text{TDF}) = 2,2 \cdot 10^{-3}$) o ruta de señalización del receptor a través de JAK-STAT (4 genes, GO:0007259), que generalmente se activa después de la estimulación con interferón-alfa (Figura 3 y Figura 18). Además, el análisis de las rutas de Reactome indicó que esos 14 genes estaban enriquecidos en rutas relacionadas con el sistema inmunitario (p. ej., regulación de la señalización de IFNA (HSA-912694, $p(\text{TDF}) < 0,025$) o señalización de citocinas (HSA-1280215, $p(\text{TDF}) < 0,026$)) y regulación de neurotransmisores (p. ej., tráfico de receptores AMPA (HSA-399719, $p(\text{TDF}) < 0,025$), unión de glutamato y plasticidad sináptica (HSA-399721, $p(\text{TDF}) < 0,025$) o receptores de neurotransmisores y transmisión de señales postsinápticas (HSA-112314, $p(\text{TDF}) < 0,029$)) (Figura 18). Resulta interesante observar que la ruta Top identificada en el análisis de Reactome ($p(\text{TDF}) < 0,012$) está vinculada al factor de transcripción Runx1, que recientemente se ha mostrado que media el efecto del estrés crónico por derrota social en un modelo de depresión en ratones a través de la regulación de la familia miR-30 de miARN³³.

Descripción de la diana

PRKCB: Se sabe bien que la proteína quinasa C beta (PRKCB), que pertenece a la familia de las proteínas quinasas específicas de serina y treonina, desempeña un papel crucial en el sistema inmunitario, ya que los ratones con genes inactivados para PKCB desarrollan una inmunodeficiencia caracterizada por una activación deficiente de las células B, una respuesta del receptor de las células B y defectos en las respuestas inmunitarias independientes de las células T. PRKCB también actúa como un regulador de la respuesta del eje HPA al estrés³⁴. Un estudio de asociación de 44 genes candidatos con síntomas depresivos y de ansiedad en mujeres posparto reveló una asociación entre PRKCB y la depresión mayor. De hecho, PRKCB interactúa con CREB1 y lo fosforila, lo que regula directamente la expresión de varios genes implicados en la respuesta al estrés en el cerebro, tal como BDNF, el receptor de BDNF Trk-b y el receptor de glucocorticoides³⁵.

MDM2: MDM2 es un inhibidor celular primario de p53 y podría ser una diana para el tratamiento contra el cáncer. Sin embargo, MDM2 también cataliza la ubiquitinación de la β -arrestina, que es una diana de los antidepresivos. En el SNC, MDM2 está implicado en la expresión de superficie de AMPAR (receptor de glutamato) durante la plasticidad sináptica³⁶. Resulta interesante observar que se ha mostrado que la edición de ARN en MDM2 regula los niveles de proteínas. De hecho, el aumento de la edición de ARN en el UTR 3' de MDM2 elimina la represión mediada por microARN, lo que puede aumentar sus niveles de ARNm.

PIAS1: PIAS1 (inhibidor proteico de STAT 1 activado) funciona como una SUMO ligasa que bloquea la actividad de unión al ADN de Stat1 e inhibe la activación genética mediada por Stat1 en respuesta al interferón. La sumoilación de factores de transcripción (HSA-3232118) es una de las principales rutas de Reactome en los 14 genes seleccionados para el análisis en la cohorte de priorización (Figura 19). PIAS1 inhibe selectivamente los genes inducibles por interferón y es un actor importante en la inmunidad innata³⁷. Además, Pias1 interactúa con el receptor de glutamato metabotrópico presináptico 8 (mGluR8) y agrega una modificación postranscripcional por sumoilación, lo que sugiere que PIAS1 podría tener funciones reguladoras en la orientación y modulación de la señalización del receptor mGluR8.

IFNAR1: Numerosos estudios han vinculado los interferones con cambios inducidos por la inflamación en la función cerebral y la depresión, al menos en parte a través del efecto de IL-6, CXCL10 o por la inducción de la indolamina

2,3-dioxigenasa1 (IDO1)³⁸. Además, se ha mostrado que los polimorfismos en la región promotora del receptor IFN-alfa/beta 1 (IFNAR1) pueden influir en el riesgo de desarrollar depresión. Los interferones se usan para el tratamiento de la hepatitis viral, trastornos hematoproliferativos, trastornos autoinmunitarios y enfermedades malignas. Sin embargo, independientemente de la indicación de la terapia con IFN, los IFN se asocian con un riesgo del 30 al 70 % de depresión emergente con el tratamiento. En un trabajo previo hemos mostrado que los biomarcadores de edición de ARN permitieron discriminar entre pacientes que desarrollaron una depresión emergente con el tratamiento y aquellos que no.

IFNAR2: Los interferones actúan a través de sus receptores; el receptor de interferón tipo I (IFNAR) está compuesto por dos subunidades, IFNAR1 e IFNAR2. Un polimorfismo en el gen IFNAR2 (SNP 11876) mostró una asociación con la susceptibilidad a la esclerosis múltiple ($p = 0,035$). Resulta interesante observar que el mismo estudio también identificó un polimorfismo en el gen IFNAR1 (SNP 18417), que es miembro del mismo receptor.

LYN: LYN codifica una proteína tirosina quinasa no receptora que transmite señales desde los receptores de la superficie celular. Lyn desempeña un papel importante en la regulación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas³⁹. En el sistema nervioso central de los mamíferos, Lyn se expresa en gran medida en el núcleo *accumbens*, la corteza cerebral y el tálamo. Además, Lyn participa en el control de la ruta del receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR, un receptor de glutamato ionotrópico). De hecho, las pruebas de comportamiento mostraron que la actividad motora espontánea se suprime en los ratones Lyn^{-/-}, debido a la potenciación de la señalización del receptor NMDA. Además, Lyn interactúa físicamente con el receptor AMPA, un miembro de la familia de receptores de glutamato⁴⁰. Tras la estimulación del receptor, Lyn activa la ruta de señalización de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), lo que a su vez aumenta la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Es importante destacar que la activación de receptores AMPA junto con la liberación de BDNF y la activación de las rutas de señalización sinaptogénica corriente abajo median los efectos antidepresivos de la ketamina. Las interacciones entre el receptor de glutamato y la Lyn cinasa experimentan adaptaciones drásticas en trastornos del estado de ánimo tales como el trastorno depresivo mayor.

AHR: El receptor de hidrocarburos arílicos (AHR) es un factor de transcripción dependiente de ligando altamente conservado que detecta toxinas ambientales y ligandos endógenos. El AHR también modula la diferenciación y la respuesta de las células inmunitarias⁴¹. AHR también controla la diferenciación de las células tanto T(reg) como Th17 de manera específica para cada ligando. La activación de AHR induce IDO y, por tanto, aumenta los niveles de quinurenina. El papel de la quinurenina está bien documentado en el SNC, donde desempeña un papel importante en la fisiopatología de la depresión inducida por inflamación. El bloqueo farmacológico de AHR rescató el tráfico de monocitos inducido por la inflamación sistémica, el trastorno neuroinmunitario y el comportamiento de tipo depresivo en ratones. La edición de ARN afecta a la 3'UTR del ARNm de AHR humano, creando de ese modo una secuencia de reconocimiento de microARN que modula la expresión de AHR.

RASSF1: El miembro 1 de la familia del dominio de asociación Ras (RASSF1) RASSF1A es un gen supresor de tumores cuya inactivación se ha relacionado con una amplia variedad de cánceres humanos esporádicos y se inactiva epigenéticamente con alta frecuencia en una variedad de tumores sólidos. RASSF1A se asocia con MDM2 y potencia la actividad de la autoubiquitina ligasa de MDM2⁴². Resulta interesante observar que un análisis de micromatrices identificó recientemente RASSF1A como un gen significativamente regulado a la baja en mujeres con antecedentes de depresión posparto.

GAB2: Las proteínas Gab funcionan corriente abajo de múltiples receptores, tal como los receptores de EGF, el factor de crecimiento de hepatocitos y los FGF. GAB2 es un componente importante de la diferenciación neuronal inducida por ácido retinoico, en parte al actuar corriente abajo del bFGF para mediar la supervivencia a través de la PI3 quinasa-AKT. GAB2 aumentó positivamente la expresión de IL-4 e IL-13 en células T activadas, lo que sugiere que GAB2 podría ser un regulador importante de la respuesta inmunitaria Th2 humana⁴³.

CAMK1D: CAMK1D es un miembro de la familia de la proteína quinasa 1 dependiente de calcio/calmodulina y está implicado en la ruta de transducción de señales de quimiocinas que regula la función de los granulocitos⁴⁴. En el SNC, CAMK1D se expresa principalmente en la región CA1 del hipocampo, donde se induce después de la potenciación a largo plazo (PLP), una potenciación duradera de la eficacia sináptica en el sistema nervioso central. Podría translocarse al núcleo en respuesta a estímulos que desencadenan la afluencia de Ca²⁺ intracelular, por ejemplo, glutamato, y activar la transcripción de genes dependiente de CREB. Cabe destacar que SNP rs2724812 en CAMK1D se ha asociado con la remisión después del tratamiento con inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina mediante enfoques de aprendizaje profundo.

KCNJ15: El miembro 15 de la subfamilia J del canal dependiente de voltaje de potasio (KCNJ15) codifica un canal de potasio de tipo rectificador interno, Kir4.2. En el SNC, el canal KIR4.2 se expresa tardíamente en el desarrollo tanto en ratones como en el cerebro humano. Los canales de potasio de rectificación interna (canales Kir) son reguladores importantes de la señalización neuronal y la excitabilidad de la membrana. La activación de las subunidades del canal Kir desempeña un papel crucial en las enfermedades poligénicas del SNC. Además, se halló que rs928771 en KCNJ15 estaba asociado con alteraciones en los niveles de transcrito de KCNJ15 en sangre completa; el análisis de redes de conjuntos de datos del transcriptoma de la sangre y del hipocampo sugirió que

las variantes de riesgo en el locus KCNJ15 podrían actuar a través de sus efectos reguladores sobre las rutas relacionadas con el sistema inmunitario⁴⁶.

IL17RA: El receptor A de interleucina 17 (IL17RA) es una glicoproteína de membrana tipo I, que tiene una estructura similar a IFNAR1, que se une con baja afinidad a la interleucina 17A. La interleucina 17A (IL17A) es una citocina proinflamatoria secretada principalmente por linfocitos Th17 activados. Al unirse a su receptor cognado, IL17 envía señales a través de las rutas ERK, MAPK y NFkB, la totalidad de las cuales se han implicado en el trastorno depresivo.

Las células Th17 son potentes reguladores de la función cerebral, ya que se dirigen a varias células residentes del cerebro, incluyendo neuronas, astrocitos y microglía, y participan en la neuroinflamación⁴⁷. IL17RA se expresa en gran medida en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (BHE) en las lesiones de esclerosis múltiple, donde IL17 aumenta la permeabilidad de la BHE al alterar uniones estrechas, promoviendo de ese modo la inflamación del SNC. La IL17 proinflamatoria también es secretada por microglía y astrocitos activados y tiene un efecto perjudicial sobre las neuronas. El análisis de citometría de flujo de las PBMC en sujetos deprimidos no medicados reveló un aumento significativo en el número de células Th17 periféricas y una concentración sérica elevada de IL-17, lo que sugiere un papel potencial de las células Th17 en pacientes con TDM. De manera similar, las células Th17 se aumentan en el cerebro de los ratones después de una situación de indefensión aprendida o estrés crónico por restricción, que son dos modelos comunes similares a la depresión. La inhibición de la producción o función de las células Th17 reduce la vulnerabilidad a un comportamiento similar a la depresión en los mismos modelos de ratón

PTPRC: La proteína tirosina fosfatasa, receptor tipo C (PTPRC), también conocida como antígeno leucocitario común o CD45, es una proteína tirosina fosfatasa de membrana integral, que contiene un segmento externo y es capaz de iniciar la señalización transmembrana en respuesta a ligandos externos⁴⁸. En el sistema inmunitario, PTPRC es esencial para la activación de células T y B al mediar los contactos entre células y regular las proteínas tirosina quinasas implicadas en la transducción de señales. PTPRC suprime y regula negativamente la señalización del receptor de citocinas; la interrupción selectiva de la expresión de PTPRC conduce a una activación mediada por el receptor de interferón potenciada de las proteínas quinasas JAK y STAT⁴⁹. Cabe destacar que una mutación puntual en PTPRC (transición de nucleótido C a G en la posición 77 del exón 4) se ha asociado con el desarrollo de la esclerosis múltiple, la enfermedad desmielinizante más común del SNC. En el cerebro, el comportamiento similar a la ansiedad inducido por la derrota social repetida, un modelo de depresión en ratones, se correspondió con un aumento en los macrófagos cerebrales que sobreexpresaban PTPRC. En el mismo modelo de depresión en ratones, se mostró que las benzodiazepinas clásicas revierten los síntomas y bloquean la acumulación inducida por el estrés de macrófagos que expresan niveles altos de PTPRC en el SNC. Además, en pacientes diagnosticados con trastorno depresivo mayor, el PTPRC fue mayor en los pacientes que en los sujetos sanos. La relación de PTPRC disminuyó con tratamiento antidepresivo tal como venlafaxina o fluoxetina, y se correlacionó positivamente con la gravedad de la depresión⁵⁰, lo que sugiere que el tratamiento antidepresivo contribuye a la regulación inmunológica en pacientes con trastorno depresivo mayor.

PDE8A: Los receptores de glutamato o serotonina son receptores acoplados a proteína G (GPCR) implicados en una variedad de trastornos psiquiátricos, para los cuales la regulación espacial y temporal de la concentración de segundos mensajeros es crucial para la señalización posterior. Las fosfodiesterasas (PDE) son moduladores clave de la transducción de señales y están implicadas en la activación de células inflamatorias, el comportamiento, la memoria y la cognición. PDE8A es una fosfodiesterasa específica de AMPc que se expresa en el cerebro y la sangre. Se ha identificado una edición alterada del ARN en las transcripciones de PDE8A en células T de pacientes que padecen lupus eritematoso sistémico, un trastorno autoinmunitario crónico, al igual que en células T normales con IFN- α . Hay una disminución del doble en la expresión de la fosfodiesterasa 8A (PDE8A) en la corteza temporal de pacientes con trastorno depresivo mayor (TDM)⁵¹. Recientemente hemos mostrado alteraciones específicas de la región cerebral en la edición de ARN en el ARNm de PDE8A en fallecidos por suicidio, lo que proporcionó el primer marcador cerebral relacionado con la respuesta inmunitaria para el suicidio³⁰. La edición del ARN de PDE8A también aumenta en las células de neuroblastoma SHSY-5Y tratadas con interferón alfa, como en los pacientes con VHC sometidos a terapia de combinación antiviral con IFN- α y ribavirina. Es importante destacar que la medición de la edición de ARN en PDE8A permitió discriminar entre el grupo de pacientes que desarrollaron una depresión emergente con el tratamiento y los que no, lo que sugiere que los biomarcadores de edición de ARN I-A podrían ser útiles para monitorizar la depresión emergente con el tratamiento³¹.

En el presente caso, nos centramos en las modificaciones de edición de ARN a nivel de todo el transcriptoma en pacientes unipolares y con BD para identificar variantes de edición que podrían usarse como biomarcadores para establecer un ensayo de diagnóstico clínicamente útil para el diagnóstico diferencial del BD. Con el fin de priorizar un subconjunto de variantes clínicamente útiles para un ensayo de diagnóstico para el diagnóstico diferencial del trastorno bipolar, cada uno de los genes diana descritos anteriormente se probó individualmente en dos cohortes de “priorización” separadas (n = 35, Figura 20 y n = 58, Figura 21) midiendo la tasa de edición en pacientes unipolares y con BD mediante NGS. En la primera cohorte, cada diana se secuenció individualmente, mientras que en la segunda cohorte se midieron las tasas de edición de biomarcadores multiplexando 4 BMK. Se realizó un método estadístico de análisis multivariante, evaluando para cada combinación de sitios editados de ARN y/o

isoformas, para hallar la mejor combinación de biomarcadores. Para potenciar el rendimiento diagnóstico, minimizando el número de biomarcadores, se calculó la mejor combinación con diferentes números de biomarcadores.

5 La lista de cebadores usados para la detección de sitios de edición de ARN se indica en la Tabla 1.

Tabla 1: Cebadores usados para la detección de sitios de edición de ARN

	NOMBRE DEL CEBADOR	Nombre del gen	Tamaño del producto de PCR (pb)	Secuencia de cebador (5' -> 3')	Longitud de cebador (pb)	Id. de sec. n.º
10	IFNAR1 DIRECTO_1	IFNAR1	259	ATACGGGCAAGCTCTTAACCTATT	23	1
15	IFNAR1 INVERSO_1			AACCTCCACCTCCTGTTTTTC	20	2
	IFNAR1_MiSeqF	IFNAR1	472	AAAATACGGGCAAGCTCTTAACCT	23	3
	IFNAR1_MiSeqR			CTGCACTTAGGCTCACAGGA	20	4
20	PDE8A Directo	PDE8A	225	ATGCAAGTTGTGGACATGGAG	21	5
	PDE8A Inverso			TTCTGAAAAAATGGGCACCA	21	6
	CAMK1DPCR0_F	CAMK1D	577	TGTGCAAAGGGCTCCATAC	19	7
	CAMK1DPCR0_R			CCTTGCAAGTGTCCAGTAAAC	21	8 9
25	CAMK1DMPx_F1		195	CTAGGGTGTAGGTGGTGAAT	20	
	CAMK1DMPx_R1			CAAGGCCAGGAGTTCAAGAC	20	10
30	LYN_F_PCR0	LYN	358	TTTAAAAGCTTCTCCAGTCAGC	22	11
	LYN_R_PCR0			CAAGACTGAGCATACATTATATTCACC	27	12
	LYN_MPx_F1		193	TTTAAAAGCTTCTCCAGTCAGC	22	13
	LYN_MPx_R1			TCCTGAGTAGCTGGGACCAT	20	14
35	PRKCB_MPx_F1	PRKCB	176	CAGCACATTCTGTTGCCTTC	20	15
	PRKCB_MPx_R2			GTGACTTTGCCCTCATTTG	20	16
40	KCNJ15_MPx_F1	KCNJ15	160	GGCCACTCTGTACTATGCAAATC	23	17
	KCNJ15_MPx_R2			TGAATTTGAGATGGACAGCAA	21	18
45	MDM2_F5 MPx-Rev	MDM2	302	AAGCCCATCCTCGAACTACAG	21	19
	MDM2_R5 MPx-Rev			TTGCTCTGTACCTGGACTG	20	20
50	GAB2 MPx_F1	GAB2	154	GAACCAGGCTAGGTGCAATG	20	21
	GAB2 MPx_R2			CCATGCCCTGGTAATTTTGTG	20	22
55	AHR-F1	AHR	409	TCTGATGGAATCCCAAAGTGA	23	23
	AHR_F2			TCAGAGATATTTTGTCCGAAGCCA	24	24
	IFNAR2 MPx_F1_rev	IFNAR2	344	CCCACAGTTTCAGAGGTGGT	18	25
	IFNAR2 MPx_R1_rev			GGCTCACCCCTGTAATCC	20	26
60	IL17RA_Directo1	IL17RA	172	GGGATGTAAACGCTGAATGG	20	27
	IL17RA_Inverso1			ATGTGCCACCATGACTGACT	20	28
65	RASSF1_F1		480	CCCTTCCGGCAAGAATCCAG	20	29
	RASSF1_R1			ACCCAAGCTGCATAAAAGGC	20	30

NOMBRE DEL CEBADOR	Nombre del gen	Tamaño del producto de PCR (pb)	Secuencia de cebador (5' -> 3')	Longitud de cebador (pb)	Id. de sec. n.º
PIAS1_F1 PIAS1_R2	PIAS1	407	GCAACCTTAGATCTCAATGGCTAA AGCAGAGTCACAGTCTACAGC	24 21	31 32
PTPRC-MiSeqF PTPRC-MiSeqR PTPRC F rd2-1 PTPRC R rd2-1	PTPTC PTPRC	505 215	CCGGGGCTCATTATAGGAT TGCTAGATACCGCCACATTG TAAGGACGGAGTTCCGAGACC TGAGAGAGTTTTGCTCTGTGG	20 20 20 21	33 34 35 36

Como era importante validar los resultados obtenidos en el estudio de Sec-ARN, en primer lugar realizamos un análisis diferencial de cada diana en las cohortes de priorización. Como se muestra en las tablas siguientes, se halló que todos los sitios e isoformas identificados en el estudio de Sec-ARN eran significativos en un análisis posterior sobre una población más grande.

Tabla 2A-2B: Análisis diferencial de sitios de edición e isoformas identificados en el estudio de Sec-ARN en los pacientes de la primera cohorte de priorización analizados en monoplex.

Se muestran ejemplos de datos de Sec-ARN de diferentes dianas con nombre de diana, sitio o isoforma editado diferencialmente, valor de p y múltiplo de variación del sitio o isoforma editado, curva ROC de AUC, el valor medio de la edición en el sitio considerado y el número de población.

Tabla 2A

Nombres BMQ	Cr.:Pos (Hg38)	Sitio	Valor de p	MultiploVariación	Curva ROC de AUC	% de edición	Poblaciones
PTPRC	1:198680333	X227	0,0184	1,075001787	0,6924	18,68	N = 35 [16 (0); 19 (1)]
PTPRC	1:198680346	X240	0,0314	1,071854346	0,7072	26,04	N= 35 [16 (0); 19(1)]
PIAS1	15:68138001	X201	0,0062	1,136535407	0,7500	0,65	N= 35 [16 (0); 19 (1)]
IFNAR1	21:33355744	X66	0,0054	1,263704007	0,7796	0,55	N = 35 [16 (0); 19 (1)]
IFNAR1	21:33355754	X76	0,0187	1,132685085	0,7204	4,80	N = 35 [16 (0); 19 (1)]
IFNAR1	21:33355762	X84	0,0058	1,153392283	0,7352	11,19	N = 35 [16 (0); 19 (1)]
IFNAR1	21:33355763	X85	0,0145	1,145854589	0,7368	6,65	N= 35 [16 (0); 19(1)]
IFNAR1	21:33355789	X111	0,0139	1,103258478	0,7303	19,89	N= 35 [16 (0); 19(1)]
IFNAR1	21:33355793	X115	0,0058	1,161013737	0,7566	11,51	N= 35 [16 (0); 19(1)]
IFNAR1	21:33355798	X120	0,0116	1,180535533	0,7368	1,53	N= 35 [16 (0); 19(1)]
IFNAR1	21:33355801	X123	0,0013	1,224980021	0,7747	3,23	N= 35 [16 (0); 19(1)]
IFNAR1	21:33355806	X128	0,0032	1,210179599	0,7813	2,11	N= 35 [16 (0); 19(1)]
IFNAR1	21:33355807	X129	0,0101	1,104729968	0,7401	21,19	N= 35 [16 (0); 19(1)]
IFNAR1	21:33355809	X131	0,0052	1,232781797	0,7451	1,34	N= 35 [16 (0); 19(1)]
IFNAR1	21:33355820	X142	0,0108	1,152804642	0,7451	1,40	N= 35 [16 (0); 19(1)]
IFNAR1	21:33355829	X151	0,0069	1,181169484	0,7401	6,04	N= 35 [16 (0); 19(1)]
IFNAR1	21:33355830	X152	0,0173	1,109572564	0,7138	22,08	N= 35 [16 (0); 19(1)]
IFNAR1	21:33355838	X160	0,0067	1,149938391	0,7467	8,08	N= 35 [16 (0); 19(1)]
IFNAR1	21:33355839	X161	0,0208	1,135470598	0,7188	4,12	N = 35 [16 (0); 19 (1)]
IFNAR1	21:33355840	X162	0,0113	1,1268041	0,7451	10,56	N= 35 [16 (0); 19(1)]

	Nombres BMQ	Cr.:Pos (Hg38)	Sitio	Valor de <i>p</i>	MultiploVariación	Curva ROC de AUC	% de edición	Poblaciones
5	IFNAR1	21:33355860	X182	0,009	1,180765679	0,7500	4,58	N= 35 [16 (0); 19(1)]
	IFNAR1	21:33355863	X185	0,0031	1,21778062	0,7862	2,19	N= 35 [16 (0); 19(1)]
	IFNAR1	21:33355865	X187	0,0014	1,196153448	0,8240	2,11	N= 35 [16 (0); 19(1)]
10	IFNAR1	21:33355869	X191	0,0036	1,192181699	0,7730	7,98	N= 35 [16 (0); 19(1)]
	IFNAR1	21:33355905	X227	0,0058	1,14365726	0,7845	5,72	N= 35 [16 (0); 19(1)]
	IFNAR1	21:33355909	X231	0,0055	1,150637009	0,7632	10,90	N= 35 [16 (0); 19(1)]
15	IL17RA	22:17110596	X100	0,0356	1,129120379	0,6924	0,39	N= 35 [16 (0); 19(1)]
	IL17RA	22:17110628	X132	0,0438	1,154264973	0,6793	0,24	N= 35 [16 (0); 19(1)]
	RASSF1	3:50333653	X192	0,0112	1,130138254	0,7401	1,33	N= 35 [16 (0); 19(1)]
20	RASSF1	3:50333747	X98	0,0354	1,084940073	0,7385	2,11	N= 35 [16 (0); 19(1)]
	LYN	8:56012452	X47	0,0427	1,131762974	0,7039	1,53	N= 35 [16 (0); 19(1)]
	LYN	8:56012468	X63	0,0165	1,106424238	0,7368	8,54	N= 35 [16 (0); 19(1)]
25	LYN	8:56012469	X64	0,0316	1,113571193	0,7237	4,98	N= 35 [16 (0); 19(1)]
	LYN	8:56012521	X116	0,0433	1,173270254	0,7023	1,03	N= 35 [16 (0); 19(1)]
	LYN	8:56012553	X148	0,0207	1,079245173	0,7303	18,89	N= 35 [16 (0); 19(1)]
30	LYN	8:56012556	X151	0,0122	1,105001887	0,7467	3,59	N = 35 [16 (0); 19 (1)]
	LYN	8:56012558	X153	0,0101	1,131044953	0,7516	3,99	N= 35 [16 (0); 19(1)]
	LYN	8:56012567	X162	0,0266	1,116046561	0,7138	1,96	N= 35 [16 (0); 19(1)]
35	LYN	8:56012568	X163	0,0215	1,121045291	0,7138	1,91	N = 35 [16 (0); 19 (1)]
	LYN	8:56012572	X167	0,0493	1,098662612	0,6760	5,01	N = 35 [16 (0); 19 (1)]
	LYN	8:56012596	X191	0,014	1,066625025	0,7434	31,43	N= 35 [16 (0); 19(1)]
40	LYN	8:56012604	X199	0,0398	1,105936897	0,7056	3,05	N = 35 [16 (0); 19 (1)]
	LYN	8:56012608	X203	0,0142	1,130472736	0,7500	4,68	N= 35 [16 (0); 19(1)]
	LYN	8:56012612	X207	0,0269	1,112587406	0,7039	8,00	N= 35 [16 (0); 19(1)]
45	LYN	8:56012660	X255	0,0206	1,09554913	0,7253	11,18	N = 35 [16 (0); 19 (1)]
	LYN	8:56012668	X263	0,0282	1,077150344	0,6924	12,11	N = 35 [16 (0); 19 (1)]
	LYN	8:56012689	X284	0,0033	1,162082677	0,7648	4,56	N = 35 [16 (0); 19 (1)]
50	LYN	8:56012699	X294	0,0097	1,228499121	0,7352	1,72	N= 35 [16 (0); 19(1)]

Tabla 2B

	Diana	Isoformas	Valor de <i>p</i>	MultiploVariación	Curva ROC de AUC	% de edición	Poblaciones
55	AHR	JKMNTV	0,0270	1,77	0,719	0,33	N= 35 [16 (0); 19(1)]
	IFNAR1	ABCDE	0,0115	1,16	0,740	1,16	N= 35 [16 (0); 19(1)]
	IFNAR1	ABCDEFGH	0,0026	1,29	0,776	1,08	N= 35 [16 (0); 19(1)]
60	IFNAR1	ABCDEFH	0,0116	1,21	0,727	1,40	N= 35 [16 (0); 19(1)]
	IFNAR1	ABCDEGH	0,0007	1,34	0,816	0,52	N = 35 [16 (0); 19(1)]
	IFNAR1	ABCDEH	0,0062	1,25	0,737	0,66	N= 35 [16 (0); 19(1)]
65	IFNAR1	BCDEFGH	0,0010	1,30	0,798	0,29	N= 35 [16 (0); 19(1)]

Diana	Isoformas	Valor de p	MultiploVariación	Curva ROC de AUC	% de edición	Poblaciones
IFNAR1	BCDEH	0,0040	1,21	0,760	0,27	N= 35 [16 (0); 19(1)]
IFNAR1	GH	0,0353	1,11	0,707	0,79	N= 35 [16 (0); 19(1)]
IFNAR1	Sin edición	0,0236	0,97	0,727	67,71	N= 35 [16 (0); 19(1)]
LYN	ABC	0,0267	1,12	0,717	0,46	N= 35 [16 (0); 19(1)]
LYN	ABCD	0,0252	1,19	0,738	0,22	N= 35 [16 (0); 19(1)]
LYN	ABCDMNOP	0,0224	1,22	0,702	0,44	N= 35 [16 (0); 19(1)]
LYN	ACD	0,0400	1,10	0,714	0,46	N= 35 [16 (0); 19(1)]
LYN	ACDMNOP	0,0105	1,22	0,743	0,44	N= 35 [16 (0); 19(1)]
LYN	CDMNOP	0,0159	1,18	0,743	0,53	N= 35 [16 (0); 19(1)]
LYN	D	0,0341	1,04	0,740	10,52	N= 35 [16 (0); 19(1)]
LYN	DMNOP	0,0148	1,18	0,742	0,47	N= 35 [16 (0); 19(1)]
LYN	Sin edición	0,0162	0,96	0,724	58,17	N= 35 [16 (0); 19(1)]
MDM2	GTAX	0,0014	1,20	0,849	0,22	N= 35 [16 (0); 19(1)]
MDM2	GTVA	0,0242	0,88	0,702	0,25	N= 35 [16 (0); 19(1)]
PTPRC	GAHILM	0,0458	1,25	0,717	0,58	N= 35 [16 (0); 19(1)]
PTPRC	HI	0,0228	1,11	0,727	1,67	N= 35 [16 (0); 19(1)]
PTPRC	HM	0,0150	1,37	0,794	0,20	N= 35 [16 (0); 19(1)]
PTPRC	LM	0,0422	0,86	0,702	0,56	N= 35 [16 (0); 19(1)]
RASSF1	EJ	0,0362	0,94	0,714	0,70	N = 35 [16 (0); 19 (1)]

Tabla 3: Análisis diferencial de sitios de edición e isoformas identificados en el estudio de Sec-ARN en los pacientes de la segunda cohorte de priorización analizados con secuenciación multiplexada.

Se muestran ejemplos de datos de Sec-ARN de diferentes dianas con nombre de diana, sitio editado diferencialmente, valor de p y múltiplo de variación del sitio editado, curva ROC de AUC, el valor medio de la edición en el sitio considerado y el número de población.

Núm .	Diana	Cr.:Pos (hg38)	Sitios	Valor de p	Múltiplo de variación	Curva ROC de AUC	% de edición	Población	Sexo
1	PTPRC	1:198680346	X240	0,0410	1,04	0,656	22,2	N = 58 [29 (0); 29 (1)]	M + F
2	CAMK1D	10:12378356	X64	0,0024	1,11	0,804	7,7	N=31 [15(0); 16 (1)]	Solo F
3	CAMK1D	10:12378376	X84	0,0120	1,09	0,788	22,7	N=31 [15(0); 16 (1)]	Solo F
4	CAMK1D	10:12378393	X101	0,0294	1,08	0,735	7,4	N = 31 [15 (0); 16 (1)]	Solo F
5	CAMK1D	10:12378415	X123	0,0064	1,10	0,794	25,6	N=31 [15(0); 16 (1)]	Solo F
6	CAMK1D	10:12378423	X131	0,0190	0,82	0,745	1,2	N = 27 [14 (0); 13 (1)]	Solo M
7	GAB2	11:78330899	X141	0,0165	1,04	0,754	35,4	N = 31 [15(0); 16 (1)]	Solo F
8	MDM2	12:68821522	X143	0,0150	0,71	0,760	0,7	N = 31 [15 (0); 16 (1)]	Solo F
9	MDM2	12:68821573	X194	0,0166	1,06	0,752	5,7	N=31 [15(0); 16 (1)]	Solo F
10	PDE8A	15:85212906	X116278	0,0496	0,77	0,723	0,5	N = 27 [14 (0); 13(1)]	Solo M
11	PDE8A	15:85212909	X116281	0,0482	1,21	0,660	0,6	N=31 [15(0); 16 (1)]	Solo F
12	IFNAR1	21:33355744	X66	0,0413	1,19	0,656	0,5	N = 58 [29 (0); 29 (1)]	M + F
13	IFNAR1	21:33355762	X84	0,0464	1,15	0,700	10,1	N = 31 [15 (0); 16 (1)]	Solo F

Núm .	Diana	Cr.:Pos (hg38)	Sitios	Valor de p	Múltiplo de variación	Curva ROC de AUC	% de edición	Población	Sexo
14	IFNAR1	21:33355763	X85	0,0386	1,11	0,667	5,9	N = 58 [29 (0); 29 (1)]	M + F
15	IFNAR1	21:33355789	X111	0,0414	1,06	0,654	17,3	N = 58 [29 (0); 29 (1)]	M + F
16	IFNAR1	21:33355807	X129	0,0473	1,10	0,696	18,9	N = 31 [15 (0); 16 (1)]	Solo F
17	IFNAR1	21:33355829	X151	0,0247	1,18	0,744	5,5	N=31 [15(0); 16 (1)]	Solo F
18	IFNAR1	21:33355830	X152	0,0481	1,06	0,651	19,8	N = 58 [29 (0); 29 (1)]	M + F

A continuación, se analizaron combinaciones de biomarcadores para identificar el mejor rendimiento diagnóstico para el diagnóstico diferencial del trastorno bipolar, con diferentes números de biomarcadores. En la primera cohorte, cuando solo se usaron 2 sitios de 2 dianas diferentes, obtuvimos un AUC de 0,812 (Sp 81,3 %; Se 79,0 %, Figura 4A). Otra combinación de 3 sitios, usando 2 BMK, dio resultados aún mejores, con un AUC de 0,872 (Sp 87,5 %; Se 79,0 %, Figura 4B). La ecuación usada para esta combinación es la siguiente:

$$Z = (2,03684329038398) * IFNAR1_X115_G + (12,2505281183792) * LYN_X151_F + (-0,765269706061865) * IFNAR1_X111_A$$

Cuando el número de sitios editados diferencialmente se aumentó a 4, con 3 dianas diferentes, el AUC fue de 0,901 (Sp 93,8 %; Se 89,5 %, Figura 4C). Además, cuando se combinaron y se analizaron hasta 24 sitios editados diferencialmente, todos contenidos en solo tres biomarcadores diferentes, obtuvimos un rendimiento sobresaliente, con un AUC de 1,00, con una especificidad y una sensibilidad excelentes (100 % y 100 %, respectivamente, Figura 4D). La ecuación usada para esta combinación es la siguiente:

$$Z = + (18131,4993489419) * LYN_X191_B + (-1,0712864185386) * PTPRC_X240_I + (-4,64009201823763e-05) * IFNAR1_X152_C + (0,996774248934566) * IFNAR1_X129_B + (0,0381530674132845) * PTPRC_X227_H + (1885,81023403163) * LYN_X148_A + (-0,736314805340674) * IFNAR1_X111_A + (4390,83243262018) * LYN_X263_O + (6,2909637469539) * IFNAR1_X115_G + (13,9766314855872) * IFNAR1_X84_F + (15,0973299759625) * IFNAR1_X231_D + (-32,585224895614) * IFNAR1_X162_E + (-310,251286436275) * LYN_X207_M + (-16,457803229942) * LYN_X63_C + (-2,01190201250814) * IFNAR1_X191_nan + (3,99543996199355) * IFNAR1_X160_nan + (-5,82765669149742) * IFNAR1_X85_nan + (0,883565177670863) * IFNAR1_X151_nan + (0,655717782231297) * IFNAR1_X227_H + (-16,1663006759008) * LYN_X167_I + (-72,6085985517623) * LYN_X64_D + (26,1324832381722) * LYN_X284_P + (-19,0669113948407) * IFNAR1_X76_nan + (-33,3105655669062) * IFNAR1_X182_nan$$

La lista de todas las combinaciones sometidas a prueba en esta cohorte, la totalidad de las cuales incluyeron los 35 pacientes de la cohorte, se presenta en la Tabla 4. Todas las combinaciones fueron estadísticamente significativas entre el control y los casos con un valor de $p < 0,01$.

Tabla 4: Rendimientos diagnósticos obtenidos con pacientes de la primera cohorte de priorización analizados en monoplex.

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	C195 %	Umbral	Prec. (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
1	PIAS1_X201_L + LYN_X191_B	C2	156	0,826	[0,686; 0,965]	2096,25	80,0	68,8	89,5	77,3	84,6	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
2	IFNAR1_X227_H + PIAS1_X201_L	C2	6	0,816	[0,664; 0,968]	0,00	82,9	68,8	94,7	78,3	91,7	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
3	IFNAR1_X227_H + LYN_X284_P	C2	1	0,812	[0,669; 0,956]	5,08	80,0	81,3	79,0	83,3	76,5	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
4	IFNAR1_X231_D + IFNAR1_X111_A	C2	66	0,809	[0,662; 0,957]	4,11	80,0	81,3	79,0	83,3	76,5	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
5	PIAS1_X201_L + LYN_X47_Q	C2	168	0,806	[0,658; 0,954]	-0,82	80,0	75,0	84,2	80,0	80,0	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
6	IFNAR1_X231_D + IFNAR1_X152_C	C2	70	0,803	[0,65; 0,956]	6,34	80,0	93,8	68,4	92,9	71,4	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
7	IFNAR1_X227_H + IFNAR1_X111_A	C2	13	0,786	[0,626; 0,946]	1,01	80,0	87,5	73,7	87,5	73,7	N = 35 [16 (1); 19 (2)]

ES 2 992 208 T3

	Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	C195 %	Umbral	Prec. (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	8	LYN_X191_B + PTPRC_X240_I	C2	227	0,766	[0,597; 0,936]	1678,04	80,0	68,8	89,5	77,3	84,6	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
	9	IFNAR1_X129_B + IFNAR1_X111_A	C2	238	0,757	[0,579; 0,934]	5,64	82,9	68,8	94,7	78,3	91,7	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
10	10	IFNAR1_X115_G + LYN_X151_F + IFNAR1_X111_A	C3	1129	0,872	[0,756; 0,987]	9,62	82,9	87,5	79,0	88,2	77,8	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
15	11	PIAS1_X201_L + LYN_X191_B + LYN_X199_K	C3	1943	0,852	[0,719; 0,985]	4285,00	82,9	75,0	89,5	81,0	85,7	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
	12	IFNAR1_X227_H + LYN_X284_P + LYN_X207_M	C3	21	0,849	[0,71; 0,988]	-36,88	85,7	93,8	79,0	93,8	79,0	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
20	13	PIAS1_X201_L + LYN_X148_A + LYN_X199_K	C3	2023	0,845	[0,704; 0,987]	1373,92	85,7	81,3	89,5	85,0	86,7	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
25	14	IFNAR1_X115_G + PIAS1_X201_L + IFNAR1_X111_A	C3	1108	0,842	[0,701; 0,983]	-0,97	85,7	81,3	89,5	85,0	86,7	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
30	15	LYN_X284_P + PIAS1_X201_L + LYN_X207_M	C3	492	0,836	[0,699; 0,972]	-21,34	82,9	87,5	79,0	88,2	77,8	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
	16	LYN_X153_G + IFNAR1_X129_B + IFNAR1_X111_A	C3	1462	0,829	[0,673; 0,985]	8,69	85,7	81,3	89,5	85,0	86,7	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
35	17	IFNAR1_X115_G + IFNAR1_X111_A + PTPRC_X240_I	C3	1241	0,822	[0,672; 0,972]	3,43	82,9	81,3	84,2	84,2	81,3	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
40	18	IFNAR1_X115_G + IFNAR1_X111_A + PTPRC_X240_I + LYN_X263_O	C4	10614	0,901	[0,778; 1]	316,50	91,4	93,8	89,5	94,4	88,2	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
45	19	IFNAR1_X231_D + PIAS1_X201_L + LYN_X151_F + LYN_X162_Y	C4	7041	0,898	[0,784; 1]	9,73	88,6	93,8	84,2	94,1	83,3	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
50	20	IFNAR1_X115_G + PIAS1_X201_L + LYN_X191_B + IFNAR1_X111_A	C4	9375	0,895	[0,789; 1]	3657,05	85,7	87,5	84,2	88,9	82,4	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
55	21	IFNAR1_X115_G + PIAS1_X201_L + IFNAR1_X111_A + LYN_X148_A	C4	9442	0,891	[0,778; 1]	1071,10	85,7	87,5	84,2	88,9	82,4	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
60	22	IFNAR1_X115_G + IFNAR1_X111_A + LYN_X148_A + PTPRC_X227_H	C4	10552	0,891	[0,779; 1]	1104,69	85,7	87,5	84,2	88,9	82,4	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
	23	IFNAR1_X231_D + PIAS1_X201_L + LYN_X148_A + LYN_X199_K	C4	7170	0,888	[0,767; 1]	1465,90	88,6	87,5	89,5	89,5	87,5	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
65	24	IFNAR1_X115_G + LYN_X153_G +	C4	8831	0,882	[0,757; 1]	1,36	85,7	93,8	79,0	93,8	79,0	N = 35 [16 (1); 19 (2)]

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	C195 %	Umbral	Prec. (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	PIAS1_X201_L + IFNAR1_X111_A											
10	25 IFNAR1_X227_H + LYN_X284_P + LYN_X151_F + LYN_X207_M	C4	135	0,878	[0,752; 1]	-52,29	88,6	87,5	89,5	89,5	87,5	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
15	26 IFNAR1_X227_H + IFNAR1_X115_G + PIAS1_X201_L + IFNAR1_X111_A	C4	730	0,862	[0,723; 1]	-2,98	88,6	87,5	89,5	89,5	87,5	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
20	27 IFNAR1_X227_H + IFNAR1_X115_G + IFNAR1_X111_A + PTPRC_X240_I	C4	863	0,839	[0,686; 0,991]	1,79	88,6	87,5	89,5	89,5	87,5	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
25	28 LYN_X191_B + PTPRC_X240_I + IFNAR1_X152_C + IFNAR1_X129_B + PTPRC_X227_H + LYN_X148_A + IFNAR1_X111_A + LYN_X263_O + IFNAR1_X115_G + IFNAR1_X84_F + IFNAR1_X231_D + IFNAR1_X162_E + LYN_X207_M + LYN_X63_C + IFNAR1_X191 + IFNAR1_X160 + IFNAR1_X85 + IFNAR1_X151 + IFNAR1_X227_H + LYN_X167_I + LYN_X64_D + LYN_X284_P + IFNAR1_X76 + IFNAR1_X182	C24	15	1,000	[1; 1]	12793,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	N = 35 [16 (1); 19 (2)]
30												
35												
40												
45												

En la segunda cohorte de priorización, usando secuenciación multiplexada, cuando solo se eligieron 3 sitios en 2 BMK diferentes, el AUC fue 0,759 (Sp 89,7 %; Se 69,0 %, Figura 5A). Cuando se combinaron 4 sitios en 2 BMK, el AUC aumentó a 0,772 (Sp 82,8 %; Se 75,9 %, Figura 5B). Con combinaciones de 5 y 6 sitios, el AUC aumentó a 0,815 y 0,810, con especificidades de 81,0 % y 82,8 % y sensibilidades de 93,1 % y 82,8 %, respectivamente (Figura 5C y D). Cuando se aumentó la combinación para incluir 14 sitios, el AUC fue superior a 0,85 (AUC 0,860, Sp 89,7 %, Se 82,8 %, Figura 5E). Para esta combinación, la ecuación usada es la siguiente:

$$Z = + (0,510073028938919) * \text{IFNAR1_Site85} + (0,000530246141972222) * \text{PTPRC_Site240} + (1,61121867548568) * \text{IFNAR1_Site66} + (0,000171269688832027) * \text{IFNAR1_Site152_C} + (-0,000399273936550938) * \text{PRKCB_Site152_L} - (1,99301166582376) * \text{GAB2_Site159} + (0,496425680926631) * \text{IFNAR1_Site151} + (-0,343700289838798) * \text{PRKCB_Site99} + (2,72505005033054) * \text{PRKCB_Site94} + (-0,0231770987287983) * \text{IFNAR1_Site129_B} + (0,00239888123061141) * \text{PTPRC_Site227_H} + (-0,471278382211274) * \text{IFNAR1_Site78} + (-0,0500319554438776) * \text{PTPRC_Site226_A} + (-0,852148596678129) * \text{IFNAR1_Site101}$$

La lista de todas las combinaciones sometidas a prueba en la segunda cohorte de priorización se presenta en la Tabla 5. Todas las combinaciones fueron estadísticamente significativas entre el control y los casos con un valor de $p < 0,01$.

Tabla 5: Rendimientos diagnósticos obtenidos con pacientes de la segunda cohorte de priorización analizados con secuenciación multiplexada

	Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	1	IFNAR1_Site85 + IFNAR1_Site129_B	C2	10	0,703	[0,559; 0,847]	0,3872	74,1	79,3	69,0	76,9	71,9	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
	2	IFNAR1_Site85 + GAB2_Site159	C2	6	0,719	[0,581; 0,858]	1,3141	72,4	72,4	72,4	72,4	72,4	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
10	3	GAB2_Site159 + PTPRC_Site227_H	C2	80	0,709	[0,57; 0,848]	1,5524	72,4	79,3	65,5	76,0	69,7	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
	4	PTPRC_Site240 + GAB2_Site159	C2	20	0,722	[0,585; 0,859]	1,4809	70,7	75,9	65,5	73,1	68,8	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
15	5	IFNAR1_Site85 + PRKCB_Site94	C2	9	0,698	[0,557; 0,839]	0,9817	70,7	72,4	69,0	71,4	70,0	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
	6	IFNAR1_Site85 + PRKCB_Site94 + IFNAR1_Site84 F	C3	90	0,706	[0,559; 0,854]	0,3811	79,3	89,7	69,0	87,0	74,3	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
20	7	IFNAR1_Site85 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site129_B	C3	64	0,759	[0,627; 0,89]	1,141	79,3	89,7	69,0	87,0	74,3	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
25	8	IFNAR1_Site85 + IFNAR1_Site111_A + GAB2_Site159	C3	30	0,741	[0,603; 0,879]	1,1973	77,6	86,2	69,0	83,3	73,5	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
	9	IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + IFNAR1_Site129_B	C3	9	0,744	[0,608; 0,881]	0,9526	75,9	75,9	75,9	75,9	75,9	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
30	10	IFNAR1_Site85 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 + IFNAR1_Site129_B	C4	338	0,780	[0,652; 0,908]	1,2687	81,0	93,1	69,0	90,9	75,0	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
35	11	IFNAR1_Site85 + IFNAR1_Site66 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site129_B	C4	128	0,772	[0,642; 0,901]	-0,184	79,3	82,8	75,9	81,5	77,4	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
40	12	IFNAR1_Site85 + GAB2_Site159 + PRKCB_Site94 + IFNAR1_Site129_B	C4	351	0,772	[0,643; 0,9]	1,2987	79,3	89,7	69,0	87,0	74,3	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
45	13	IFNAR1_Site85 + IFNAR1_Site111_A + GAB2_Site159 + PTPRC_Site226_A	C4	197	0,746	[0,607; 0,884]	1,4803	79,3	96,6	62,1	94,7	71,8	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
50	14	IFNAR1_Site85 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site129_B + IFNAR1_Site78	C4	358	0,760	[0,629; 0,891]	1,1449	79,3	89,7	69,0	87,0	74,3	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
55	15	IFNAR1_Site85 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site129_B + IFNAR1_Site101	C4	360	0,759	[0,627; 0,89]	1,1525	79,3	89,7	69,0	87,0	74,3	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
60	16	IFNAR1_Site85 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site129_B + PTPRC_Site227_H	C4	357	0,762	[0,631; 0,893]	1,3882	77,6	82,8	72,4	80,8	75,0	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
65	17	IFNAR1_Site85 + IFNAR1_Site111_A + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site129_B	C4	194	0,760	[0,63; 0,89]	1,0227	77,6	79,3	75,9	78,6	76,7	N = 58 [29 (1); 29 (2)]

	Núm	Combinación por mROC	Combi	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	18	IFNAR1_Site85 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 + IFNAR1_Site129_B + IFNAR1_Site78	C5	1170	0,788	[0,665; 0,912]	1,2865	81,0	93,1	69,0	90,9	75,0	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
10	19	IFNAR1_Site85 + IFNAR1_Site111_A + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 + IFNAR1_Site129_B	C5	753	0,779	[0,651; 0,907]	1,3754	81,0	93,1	69,0	90,9	75,0	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
15	20	IFNAR1_Site85 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 + IFNAR1_Site129_B + PTPRC_Site226_A	C5	1171	0,779	[0,651; 0,907]	1,422	81,0	96,6	65,5	95,0	73,7	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
20	21	IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + IFNAR1_Site66 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site129_B	C5	37	0,815	[0,697; 0,932]	0,5012	81,0	93,1	69,0	90,9	75,0	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
25	22	IFNAR1_Site85 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 + IFNAR1_Site129_B + PTPRC_Site227_H	C5	1169	0,791	[0,665; 0,917]	1,7748	81,0	93,1	69,0	90,9	75,0	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
30	23	IFNAR1_Site85 + IFNAR1_Site66 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site129_B + PTPRC_Site227_H	C5	552	0,787	[0,662; 0,912]	0,1562	79,3	82,8	75,9	81,5	77,4	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
35	24	IFNAR1_Site85 + IFNAR1_Site66 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site129_B + PTPRC_Site226_A	C5	554	0,772	[0,642; 0,901]	-0,1973	79,3	82,8	75,9	81,5	77,4	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
40	25	IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 + IFNAR1_Site129_B	C5	247	0,810	[0,689; 0,931]	1,7106	79,3	75,9	75,9	75,9	75,9	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
45	26	IFNAR1_Site85 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 + IFNAR1_Site129_B + PTPRC_Site227_H + PTPRC_Site226_A	C6	2789	0,810	[0,684; 0,936]	1,3304	82,8	82,8	82,8	82,8	82,8	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
50	27	IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 + PRKCB_Site99 + IFNAR1_Site129_B	C6	793	0,817	[0,699; 0,935]	1,7361	81,0	82,8	79,3	82,1	80,0	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
55	28	IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + IFNAR1_Site66 + IFNAR1_Site111_A +	C6	25	0,815	[0,697; 0,932]	0,5755	81,0	89,7	72,4	87,5	76,5	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
60													
65													

	Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5		GAB2_Site159 + IFNAR1_Site129_B											
10	29	IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 + IFNAR1_Site129_B + PTPRC_Site226_A	C6	807	0,812	[0,693; 0,931]	1,3813	81,0	82,8	79,3	82,1	80,0	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
15	30	IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + GAB2_Site159 + PRKCB_Site94 + IFNAR1_Site129_B + PTPRC_Site226_A	C6	843	0,812	[0,697; 0,927]	0,9701	81,0	79,3	82,8	80,0	82,1	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
20	31	IFNAR1_Site85 + IFNAR1_Site66 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site129_B + PTPRC_Site227_H + PTPRC_Site226_A	C6	1572	0,801	[0,68; 0,923]	-0,6985	81,0	86,2	75,9	84,6	78,1	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
25	32	IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + IFNAR1_Site66 + GAB2_Site159 + PRKCB_Site94 + IFNAR1_Site129_B	C6	182	0,819	[0,703; 0,936]	0,5214	81,0	86,2	75,9	84,6	78,1	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
30	33	IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + IFNAR1_Site66 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 + IFNAR1_Site129_B	C6	169	0,816	[0,697; 0,934]	1,3532	81,0	89,7	72,4	87,5	76,5	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
35	34	IFNAR1_Site85 + IFNAR1_Site66 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 + IFNAR1_Site129_B + PTPRC_Site227_H	C6	1520	0,798	[0,674; 0,921]	1,1937	81,0	93,1	69,0	90,9	75,0	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
40	35	IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + IFNAR1_Site66 + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site129_B + PTPRC_Site227_H	C6	188	0,815	[0,698; 0,931]	0,1956	79,3	79,3	79,3	79,3	79,3	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
45	36	IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + IFNAR1_Site66 + GAB2_Site159 + PRKCB_Site99 + IFNAR1_Site129_B	C6	176	0,812	[0,694; 0,93]	0,5147	79,3	79,3	79,3	79,3	79,3	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
50	37	IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + IFNAR1_Site66 + IFNAR1_Site152_C + PRKCB_Site152_L + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 +	C14	67	0,860	[0,755; 0,964]	0,166	86,2	89,7	82,8	88,9	83,9	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
55													
60													
65													

	Núm.	Combinación por mROC	Combi.	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec. (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5		PRKCB_Site99 + PRKCB_Site94 + IFNAR1_Site129_B + PTPRC_Site227_H + IFNAR1_Site78 + PTPRC_Site226_A + IFNAR1_Site101											
10													
15	38	IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + IFNAR1_Site66 + IFNAR1_Site111_A + PRKCB_Site152_L + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 + PRKCB_Site99 + PRKCB_Site94 + IFNAR1_Site129_B + PTPRC_Site227_H + IFNAR1_Site78 + PTPRC_Site226_A + IFNAR1_Site101	C14	56	0,866	[0,767; 0,964]	0,7721	84,5	82,8	86,2	83,3	85,7	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
20													
25													
30	39	IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + IFNAR1_Site66 + IFNAR1_Site152_C + PRKCB_Site152_L + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 + PRKCB_Site99 + PRKCB_Site94 + IFNAR1_Site129_B + IFNAR1_Site78 + PTPRC_Site226_A + IFNAR1_Site101 + IFNAR1_Site84_F	C14	71	0,864	[0,765; 0,964]	-0,7182	84,5	86,2	82,8	85,7	83,3	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
35													
40													
45	40	IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + IFNAR1_Site66 + IFNAR1_Site111_A + IFNAR1_Site152_C + PRKCB_Site152_L + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 + PRKCB_Site94 + IFNAR1_Site129_B + PTPRC_Site227_H + IFNAR1_Site78 + PTPRC_Site226_A + IFNAR1_Site101	C14	22	0,862	[0,764; 0,96]	1,4897	84,5	82,8	86,2	83,3	85,7	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
50													
55													
60	41	IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + IFNAR1_Site66 + IFNAR1_Site111_A + IFNAR1_Site152_C + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 + PRKCB_Site99 + PRKCB_Site94 + IFNAR1_Site129_B + PTPRC_Site227_H +	C14	47	0,862	[0,764; 0,96]	-1,1144	84,5	79,3	89,7	81,3	88,5	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
65													

Núm.	Combinación por mROC	Combi.	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec. (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	IFNAR1_Site78 + PTPRC_Site226_A + IFNAR1_Site84_F											
10	42 IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + IFNAR1_Site66 + IFNAR1_Site152_C + PRKCB_Site152_L + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 + PRKCB_Site99 + PRKCB_Site94 + IFNAR1_Site129_B + PTPRC_Site227_H + IFNAR1_Site78 + PTPRC_Site226_A + IFNAR1_Site84_F	C14	68	0,862	[0,761; 0,963]	-0,8369	84,5	86,2	82,8	85,7	83,3	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
15												
20												
25	43 IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + IFNAR1_Site66 + IFNAR1_Site111_A + PRKCB_Site152_L + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 + PRKCB_Site99 + PRKCB_Site94 + IFNAR1_Site129_B + PTPRC_Site227_H + IFNAR1_Site78 + PTPRC_Site226_A + IFNAR1_Site84_F	C14	57	0,864	[0,767; 0,962]	-0,9497	84,5	79,3	89,7	81,3	88,5	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
30												
35												
40	44 IFNAR1_Site85 + PTPRC_Site240 + IFNAR1_Site66 + IFNAR1_Site111_A + IFNAR1_Site152_C + PRKCB_Site152_L + GAB2_Site159 + IFNAR1_Site151 + PRKCB_Site94 + IFNAR1_Site129_B + PTPRC_Site227_H + IFNAR1_Site78 + PTPRC_Site226_A + IFNAR1_Site84_F	C14	23	0,861	[0,763; 0,959]	-0,5853	84,5	79,3	89,7	81,3	88,5	N = 58 [29 (1); 29 (2)]
45												
50												

En conjunto, estos datos sugieren que los diferentes biomarcadores del panel de 14 genes seleccionados en las cohortes de priorización podrían usarse para el diagnóstico diferencial del trastorno bipolar.

Se seleccionó un panel de los 8 biomarcadores más interesantes y se secuenció en un formato múltiplex para validar adicionalmente nuestros resultados en una cohorte grande (cohorte de validación) de 297 sujetos, de los cuales 160 eran pacientes depresivos unipolares. La población con trastorno bipolar estuvo compuesta por 96 pacientes bipolares en un episodio depresivo real (Figura 22) y 41 pacientes eutímicos, que no se tuvieron en cuenta en este análisis para el diagnóstico diferencial de la depresión bipolar. De esta forma, se analizó una población total de pacientes deprimidos (n = 256), que padecían depresión o bien unipolar o bien bipolar.

Todos los BMK se combinaron entre sí para evaluar el aumento potencial en la sensibilidad y especificidad usando Bosque aleatorio (RF). El análisis de las variantes de edición de ARN de 6 BMK (GAB2, IFNAR1, KCNJ15, LYN, MDM2 y PRKCB) dio una curva ROC de AUC de 0,934 (IC 95 %: [0,880 - 0,987]), con una sensibilidad del 91,2 %

y una especificidad del 84,6 % (Figura 29 A) sobre el conjunto de datos de prueba, para el primer modelo ajustado por edad, sexo, tratamiento psiquiátrico y adicción.

Tabla 5.1: Modelo de Bosque aleatorio ajustado por edad, sexo, tratamiento psiquiátrico y adicciones Modelo1, véase la Figura 29A)

Lista de dianas en el modelo 1 de Bosque aleatorio	Lista de variantes de edición de ARN I-A en el modelo 1 de Bosque aleatorio
IFNAR1, GAB2, KCNJ15, MDM2, LYN, PRKCB	IFNAR1.1_ABCG, IFNAR1.1_Site33355798, IFNAR1.1_Site33355806_M, IFNAR1.1_Site33355809, IFNAR1.1_Site33355817, IFNAR1.1_Site33355820_O, IFNAR1.1_Site33355829_I, GAB2_ADEJ, GAB2_BDEH, GAB2_BDJ, GAB2_DEH, GAB2_DEJ, GAB2_Site78330929_J, GAB2_Site78331080, KCNJ15_ACEHKL, KCNJ15_ACEKLMN, KCNJ15_Site38287584, KCNJ15_Site38287590, KCNJ15_Site38287594, MDM2_AIKTVW, MDM2_ASVX, MDM2_BG, MDM2_G, MDM2_HPQSVX, MDM2_I, MDM2_SV, MDM2_Site68821570, MDM2_Site68821571, MDM2_Site68821572_T, MDM2_Site68821576_V, MDM2_Site68821586_W, MDM2_Site68821612_A, MDM2_Site68821616_X, MDM2_Site68821625, MDM2_Site68821643, PRKCB_AD, PRKCB_M, PRKCB_Site23920874, PRKCB_Site23920921_L, LYN_AF

Además, un segundo modelo de Bosque aleatorio ajustado solo por edad y sexo usando 6 BMK (CAMK1D, IFNAR1, GAB2, MDM2, KCNJ15 y PRKCB) dio una curva ROC de AUC de 0,899 (IC 95 %: [0,826 - 0,971]), con una sensibilidad del 84,8 % y una especificidad del 83,7 % (Figura 29 B) sobre el conjunto de datos de prueba.

Tabla 5.2: Modelo de Bosque aleatorio ajustado por edad y sexo (Modelo 2, véase la Figura 29B)

Lista de dianas en el modelo 2 de Bosque aleatorio	Lista de variantes de edición de ARN I-A en el modelo 2 de Bosque aleatorio
CAMK1D, IFNAR1, GAB2, MDM2, KCNJ15, PRKCB	CAMK1D_AS, CAMK1D_Site12378440, IFNAR1.1_ABCG, IFNAR1.1_Site33355798, IFNAR1.1_Site33355806_M, IFNAR1.1_Site33355809, IFNAR1.1_Site33355817, IFNAR1.1_Site33355820_O, IFNAR1.1_Site33355829_I, GAB2_BDEH, GAB2_BDJ, GAB2_CD, GAB2_CDEJ, GAB2_DEHJ, GAB2_Site78330929_J, GAB2_Site78331080, MDM2_ASVX, MDM2_SV, MDM2_SVW, MDM2_Site68821571, MDM2_Site68821572_T, MDM2_Site68821576_V, MDM2_Site68821584, MDM2_Site68821586_W, MDM2_Site68821602, MDM2_Site68821612_A, MDM2_Site68821616_X, MDM2_Site68821625, MDM2_Site68821643, PRKCB_M, PRKCB_Site23920874, PRKCB_Site23920921_L, KCNJ15_AF

Ambos modelos permiten una clara separación entre pacientes unipolares y bipolares

Además, cuando analizamos los sitios de edición de toda la población y combinamos 29 variantes de edición en 6 BMK usando el enfoque mROC, obtuvimos un AUC de 0,829 (Sp 81,3 %, Se 78,1 %, Figura 6A). Cuando se usaron 6 biomarcadores incluidos en el múltiplex y se combinaron 32 sitios editados diferencialmente, el AUC se elevó a 0,835, con una Especificidad del 81,9 % y una Sensibilidad del 80,2 % (Figura 6B) usando también el método mROC. Cuando se añadió un biomarcador más y se aumentó adicionalmente el número de sitios de edición en esos 7 BMK para alcanzar 44 sitios, todos los cuales se secuenciaron en múltiplex en un solo experimento, el AUC aumentó adicionalmente a 0,876 (Sp 88,8 %, Se 80,2 %, Figura 6C). En este último caso, la ecuación usada es la siguiente:

$$\begin{aligned}
 Z = & + (0,329681470592662)*MDM2_Site68821571 + (0,236048209760787)*CAMK1D_Site12378440 \\
 & + (0,399861222643987)*MDM2_ASVX + (0,0160482522095354)*MDM2_Site68821612_A + \\
 & (0,375844895908091)*PRKCB_Site23920921_L + (0,116863680480038)*MDM2_Site68821643 - \\
 & (0,235485105099063)*PRKCB_M + (-0,49839847485377)*MDM2_Site68821576_V + (-0,124892097355352)* \\
 & MDM2_Site68821616_X + (0,28431910435528)*MDM2_SV + (0,066416717861871)*MDM2_Site68821625 + \\
 & (0,0585507722904674)*IFNAR1.1_Site33355798 - (0,220791132716944)*GAB2_Site78331080 + \\
 & (0,373002573187011)*IFNAR1.1_Site33355829_I + (0,177845820560045)*IFNAR1.1_Site33355809 + \\
 & (0,111074557540484)*KCNJ15_AF + (0,0432162523917806)*MDM2_Site68821586_W + (0,0198450297310912)* \\
 & MDM2_SVW + (0,185938219857141)*PRKCB_Site23920874 + (0,258962106244043)*GAB2_CDEJ + \\
 & (0,0733750604485723)*CAMK1D_AS + (0,128439671600768)*MDM2_Site68821584 + (0,2412371608579)* \\
 & IFNAR1.1_ABCG - (0,176406879704957)*PRKCB_AD + (0,239625600163975)*IFNAR1.1_Site33355817 - \\
 & (0,136223551823182)*CAMK1D_DE + (0,134350140951696)*MDM2_STX - (0,112627144618545)*GAB2_CD + (- \\
 & 0,0683274951449568)*MDM2_SWX + (-0,153964487695514)*MDM2_Site68821602 + \\
 & (0,0876023949116742)*MDM2_Site68821563 + (-0,51644072467136)*IFNAR1.1_Site33355838_P - \\
 & (0,248333456561587)*GAB2_BDEH + (0,134133017079705)*IFNAR1.1_Site33355806_M + (0,105132967365637)*
 \end{aligned}$$

MDM2_WX +(0,20172455879812)* GAB2 DEHJ - (0,14489914590203)* GAB2_AE + (-
0,309844742843455)*GAB2_Site78330929_J + (-0,03435818038963)* MDM2_AS + (-0,0215011144074209)*
LYN_AF + (-0,196845543135798)* PRKCB_Site23920844_B + (-0,349471597671111)* IFNAR1.1_Site33355830_C
+(0,131993541547468)* GAB2_BCDEJ - (0,146581798182588)* PRKCB_K

La lista de todas las combinaciones sometidas a prueba en la segunda cohorte de priorización, la totalidad de las cuales incluyeron los 86 pacientes, se presenta en la Tabla 6. Todas las combinaciones fueron estadísticamente significativas entre el control y los casos con un valor de $p < 10^{-4}$.

Tabla 6: Rendimientos diagnósticos obtenidos con pacientes deprimidos (N = 256) de la cohorte de validación analizada con secuenciación multiplexada

0	Combinación por mROC	Combi	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
1	MDM2_Site68821571	C44	7490	0,876	[0,831; 0,922]	0,3342	85,6	88,8	80,2	81,1	88,2	N = 256 [160 (1); 96 (2)]
	CAMK1D_Site12378440											
	MDM2_ASVX											
	MDM2_Site68821612_A											
	PRKCB_Site23920921_L											
	MDM2_Site68821643											
	PRKCB_M											
	MDM2_Site68821576_V											
	MDM2_Site68821616_X											
	MDM2_SV											
	MDM2_Site68821625											
	IFNAR1.1_Site33355798											
	GAB2_Site78331080											
	IFNAR1.1_Site33355829_I											
	IFNAR1.1_Site33355809											
	KCNJ15_AF											
	MDM2_Site68821586_W											
	MDM2_SVW											
	PRKCB_Site23920874											
	GAB2_CDEJ											
	CAMK1D_AS											
	MDM2_Site68821584											
	IFNAR1.1_ABCG											
	PRKCB_AD											
	IFNAR1.1_Site33355817											
	CAMK1D_DE											
	MDM2_STX GAB2_CD											
	MDM2_SWX											
	MDM2_Site68821602											
	MDM2_Site68821563											
	IFNAR1.1_Site33355838_P											
	GAB2_BDEH											
	IFNAR1.1_Site33355806_M											
	MDM2_WX											
	GAB2_DEHJ GAB2_AE											

0	Combinación por mROC	Combi	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	GAB2_Site78330929_J MDM2_AS											
10	LYN_AF PRKCB_Site23920844_B IFNAR1.1_Site33355830_C GAB2_BCDEJ PRKCB_K											
15	2 MDM2_Site68821571	C44	4162	0,874	[0,829; 0,919]	0,2976	84,8	85,6	83,3	77,7	89,5	N = 256 [160 (1); 96 (2)]
20	CAMK1D_Site12378440 MDM2_ASVX											
25	MDM2_Site68821612_A PRKCB_Site23920921_L											
30	MDM2_Site68821643 PRKCB_M											
35	MDM2_Site68821576_V MDM2_Site68821616_X MDM2_SV											
40	IFNAR1.1_Site33355820_O MDM2_Site68821625 IFNAR1.1_Site33355798											
45	GAB2_Site78331080 IFNAR1.1_Site33355829_I IFNAR1.1_Site33355809											
50	MDM2_Site68821586_W MDM2_SVW PRKCB_Site23920874											
55	MDM2_Site68821572_T GAB2_CDEJ											
60	GAB2_BDJ CAMK1D_AS MDM2_Site68821584 IFNAR1.1_ABCG											
65	PRKCB_AD IFNAR1.1_Site33355817 CAMK1D_DE MDM2_STX GAB2_CD											
	MDM2_SWX MDM2_Site68821563 IFNAR1.1_Site33355838_P GAB2_BDEH											
	MDM2_WX GAB2_DEHJ GAB2_AE											
	GAB2_Site78330929_J MDM2_AS											
	LYN_AF PRKCB_Site23920844_B											

0	Combinación por mROC	Combi	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	IFNAR1.1_Site33355830_C GAB2_BCDEJ PRKCB_K											
10	3 MDM2_Site68821571	C44	937	0,873	[0,828; 0,919]	0,3791	85,2	87,5	81,3	79,6	88,6	N = 256 [160 (1); 96 (2)]
15	CAMK1D_Site12378440 MDM2_ASVX MDM2_Site68821612_A PRKCB_Site23920921_L MDM2_Site68821643 PRKCB_M MDM2_Site68821576_V MDM2_Site68821616_X MDM2_SV IFNAR1.1_Site33355820_O MDM2_Site68821625 IFNAR1.1_Site33355798 GAB2_Site78331080 IFNAR1.1_Site33355829_I IFNAR1.1_Site33355809 KCNJ15_AF MDM2_Site68821586_W MDM2_SVW PRKCB_Site23920874 MDM2_Site68821572_T GAB2_CDEJ GAB2_BDJ CAMK1D_AS MDM2_Site68821584 IFNAR1.1_ABCG PRKCB_AD IFNAR1.1_Site33355817 MDM2_STX MDM2_SWX MDM2_Site68821602 MDM2_Site68821563 IFNAR1.1_Site33355838_P GAB2_BDEH IFNAR1.1_Site33355806_M MDM2_WX GAB2_DEHJ GAB2_AE GAB2_Site78330929_J MDM2_AS LYN_AF PRKCB_Site23920844_B IFNAR1.1_Site33355830_C GAB2_BCDEJ											
20												
25												
30												
35												
40												
45												
50												
55												
60												
65												

	0	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población												
5	4	MDM2_Site68821571	C32	4082	0,836	[0,785; 0,887]	0,2281	81,3	81,9	80,2	72,6	87,3	N = 256 [160 (1); 96 (2)]												
10		CAMK1D_Site12378440 MDM2_ASVX																							
15		MDM2_Site68821612_A MDM2_Site68821643 PRKCB_M																							
20		MDM2_Site68821576_V MDM2_Site68821616_X MDM2_SV																							
25		IFNAR1.1_Site33355820_O MDM2_Site68821625 IFNAR1.1_Site33355798 GAB2_Site78331080																							
30		IFNAR1.1_Site33355829_I IFNAR1.1_Site33355809 KCNJ15_AF																							
35		MDM2_Site68821586_W MDM2_SVW PRKCB_Site23920874 MDM2_Site68821572_T GAB2_CDEJ																							
40		GAB2_BDJ CAMK1D_AS MDM2_Site68821584 IFNAR1.1_ABCG PRKCB_AD CAMK1D_DE MDM2_STX																							
45		GAB2_CD MDM2_Site68821602 IFNAR1.1_Site33355830_C MDM2_SWX																							
50		5												MDM2_Site68821571	C32	4375	0,832	[0,78; 0,884]	0,2504	80,9	82,5	78,1	72,8	86,3	N = 256 [160 (1); 96 (2)]
55														CAMK1D_Site12378440 MDM2_ASVX											
60														MDM2_Site68821612_A MDM2_Site68821643 PRKCB_M											
65														MDM2_Site68821576_V MDM2_Site68821616_X IFNAR1.1_Site33355820_O											
														MDM2_Site68821625 IFNAR1.1_Site33355798 GAB2_Site78331080											

0	Combinación por mROC	Combi	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	IFNAR1.1_Site33355829_I											
10	IFNAR1.1_Site33355809 KCNJ15_AF											
15	MDM2_Site68821586_W MDM2_SVW											
20	PRKCB_Site23920874 GAB2_CDEJ											
25	GAB2_BDJ CAMK1D_AS											
30	MDM2_Site68821584 IFNAR1.1_ABCG											
35	PRKCB_AD IFNAR1.1_Site33355817											
40	CAMK1D_DE MDM2_STX GAB2_CD											
45	MDM2_Site68821602											
50	IFNAR1.1_Site33355830_C MDM2_SWX											
55	PRKCB_Site23920844_B											
60	MDM2_Site68821571	C32	4239	0,835	[0,784; 0,887]	0,2376	80,5	81,3	79,2	71,7	86,7	N = 256 [160 (1); 96 (2)]
65	CAMK1D_Site12378440 MDM2_ASVX											
70	MDM2_Site68821612_A											
75	MDM2_Site68821643 PRKCB_M											
80	MDM2_Site68821576_V											
85	MDM2_Site68821616_X MDM2_SV											
90	IFNAR1.1_Site33355820_O											
95	MDM2_Site68821625											
100	IFNAR1.1_Site33355798											
105	GAB2_Site78331080											
110	IFNAR1.1_Site33355829_I KCNJ15_AF											
115	MDM2_Site68821586_W MDM2_SVW											
120	PRKCB_Site23920874											
125	MDM2_Site68821572_T GAB2_CDEJ											
130	GAB2_BDJ CAMK1D_AS											
135	MDM2_Site68821584 IFNAR1.1_ABCG											
140	PRKCB_AD CAMK1D_DE MDM2_STX											
145	GAB2_CD											
150	MDM2_Site68821602											

0	Combinación por mROC	Combi	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	IFNAR1.1_Site33355830_C MDM2_SWX PRKCB_Site23920844_B											
10	7 MDM2_Site68821571	C29	2926	0,829	[0,776; 0,881]	0,1964	80,1	81,3	78,1	71,4	86,1	N = 256 [160 (1); 96 (2)]
15	CAMK1D_Site12378440 MDM2_ASVX MDM2_Site68821612_A MDM2_Site68821643 PRKCB_M MDM2_Site68821576_V MDM2_Site68821616_X MDM2_SV IFNAR1.1_Site33355820_O MDM2_Site68821625 IFNAR1.1_Site33355798 GAB2_Site78331080 IFNAR1.1_Site33355829_I IFNAR1.1_Site33355809 KCNJ15_AF MDM2_Site68821586_W MDM2_SVW PRKCB_Site23920874 MDM2_Site68821572_T GAB2_CDEJ GAB2_BDJ CAMK1D_AS MDM2_Site68821584 IFNAR1.1_ABCG PRKCB_AD IFNAR1.1_Site33355817 CAMK1D_DE MDM2_STX											
50	8 MDM2_Site68821571	C29	3063	0,828	[0,775; 0,881]	0,294	80,9	85,6	72,9	75,3	84,1	N = 256 [160 (1); 96 (2)]
55	CAMK1D_Site12378440 MDM2_ASVX MDM2_Site68821612_A MDM2_Site68821643 PRKCB_M MDM2_Site68821576_V MDM2_Site68821616_X MDM2_SV IFNAR1.1_Site33355820_O MDM2_Site68821625 IFNAR1.1_Site33355798											
60												
65												

0	Combinación por mROC	Combi	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	GAB2_Site78331080											
10	IFNAR1.1_Site33355809											
	KCNJ15_AF											
	MDM2_Site68821586_W											
	MDM2_SVW											
15	PRKCB_Site23920874											
	MDM2_Site68821572_T											
	GAB2_CDEJ											
	GAB2_BDJ CAMK1D_AS											
20	MDM2_Site68821584											
	IFNAR1.1_ABCG											
	PRKCB_AD											
	IFNAR1.1_Site33355817											
	CAMK1D_DE MDM2_STX											
	MDM2_Site68821602											
25	9 MDM2_Site68821571	C29	1277	0,829	[0,778; 0,881]	0,1885	78,9	78,1	80,2	68,8	86,8	N = 256 [160 (1); 96 (2)]
30	CAMK1D_Site12378440											
	MDM2_ASVX											
	MDM2_Site68821612_A											
	PRKCB_Site23920921_L											
35	MDM2_Site68821643											
	PRKCB_M											
	MDM2_Site68821576_V											
40	MDM2_Site68821616_X											
	MDM2_SV											
	IFNAR1.1_Site33355820_O											
	IFNAR1.1_Site33355798											
45	GAB2_Site78331080											
	IFNAR1.1_Site33355809											
	KCNJ15_AF											
	MDM2_Site68821586_W											
50	MDM2_SVW											
	PRKCB_Site23920874											
	MDM2_Site68821572_T											
	GAB2_CDEJ											
55	GAB2_BDJ CAMK1D_AS											
	MDM2_Site68821584											
	IFNAR1.1_ABCG											
60	PRKCB_AD											
	IFNAR1.1_Site33355817											
	CAMK1D_DE MDM2_STX											
	GAB2_CD											
65	10 CAMK1D_Site12378440	C18	1297	0,728	[0,663; 0,792]	0,088	74,2	76,9	69,8	64,4	80,9	N = 256 [160 (1); 96 (2)]

0	Combinación por mROC	Combi	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec. (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	PRKCB_Site23920921_L											
10	MDM2_Site68821576_V											
15	MDM2_Site68821616_X											
20	MDM2_SV											
25	IFNAR1.1_Site33355829_I											
	MDM2_Site68821586_W											
	MDM2_Site68821572_T											
	CAMK1D_AS											
	MDM2_SWX											
	MDM2_Site68821602											
	MDM2_Site68821563											
	IFNAR1.1_Site33355838_P											
	IFNAR1.1_Site33355806_M											
	MDM2_WX											
	MDM2_AS											
	PRKCB_Site23920844_B											
	IFNAR1.1_Site33355830_C											
30	11 MDM2_Site68821571	C18	824	0,754	[0,691; 0,817]	0,1197	73,1	74,4	70,8	62,4	81,0	N = 256 [160 (1); 96 (2)]
35	CAMK1D_Site12378440											
40	PRKCB_Site23920921_L											
45	MDM2_Site68821576_V											
50	MDM2_Site68821616_X											
55	MDM2_SV											
	IFNAR1.1_Site33355829_I											
	MDM2_Site68821586_W											
	MDM2_Site68821572_T											
	CAMK1D_AS											
	MDM2_SWX											
	MDM2_Site68821602											
	MDM2_Site68821563											
	IFNAR1.1_Site33355838_P											
	IFNAR1.1_Site33355806_M											
	GAB2_Site78330929_J											
	MDM2_AS											
	IFNAR1.1_Site33355830_C											
60	12 MDM2_Site68821571	C18	838	0,752	[0,689; 0,815]	0,0749	72,3	71,3	74,0	60,7	82,0	N = 256 [160 (1); 96 (2)]
65	CAMK1D_Site12378440											
	PRKCB_Site23920921_L											
	MDM2_Site68821576_V											
	MDM2_Site68821616_X											
	MDM2_SV											

0	Combinación por mROC	Combi	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	IFNAR1.1_Site33355829_I											
	MDM2_Site68821586_W											
	MDM2_Site68821572_T											
10	CAMK1D_AS											
	MDM2_SWX											
	MDM2_Site68821602											
	IFNAR1.1_Site33355838_P											
15	IFNAR1.1_Site33355806_M											
	MDM2_WX											
	GAB2_Site78330929_J											
	MDM2_AS											
20	PRKCB_Site23920844_B											

El panel de biomarcadores analizado anteriormente dio unos rendimientos diagnósticos excelentes para diagnosticar diferencialmente el BD y el trastorno unipolar en toda la población de pacientes deprimidos de la cohorte de validación (256 sujetos), lo que sugiere que nuestro panel de biomarcadores podría de hecho tener aplicaciones clínicas en el diagnóstico diferencial del BD.

A continuación, buscamos investigar si el rendimiento diagnóstico de nuestro ensayo podría mejorarse adicionalmente teniendo en cuenta las diferencias específicas según el sexo. De hecho, se ha sugerido la existencia de firmas transcripcionales específicas del sexo en la depresión. Se ha mostrado previamente que el perfil transcripcional cerebral de pacientes deprimidos difiere en gran medida según el sexo, lo que sugiere que los mecanismos moleculares subyacentes a la depresión podrían diferir entre mujeres y hombres⁵². De este modo, se analizaron por separado unas modificaciones en la edición del ARN en la población masculina y femenina de la cohorte de validación para pacientes con BD y unipolares depresivos. Cuando se introdujo la especificidad del sexo en el análisis, se observó una mejora significativa en el rendimiento diagnóstico. Cabe destacar que la cohorte de validación femenina (n = 179) incluyó más sujetos que la cohorte de validación masculina (n = 77), ya que esto refleja la proporción de machos y hembras que padecen depresión en la población general en todo el mundo. De hecho, en la población femenina de la cohorte de validación (n = 179, 110 pacientes unipolares y 69 pacientes con BD), cuando combinamos 17 variantes incluidas en 7 biomarcadores, el AUC fue de 0,834 (Sp 93,6 %; Se 65,2 %, Figura 7A). La ecuación usada en este caso es la siguiente:

$$Z = -(0,238519750711572) * PRKCB_M + (0,228320745055679) * MDM2_Site68821571 + (0,226760422516651) * LYN_AH - (0,273858599096893) * CAMK1D_DE + (0,166296414954285) * MDM2_Site68821625 + (0,0683620503515642) * PDE8A_Site85096717_C - (0,194138597912751) * GAB2_CD + (0,00210889117258426) * MDM2_Site68821572_T - (0,178806599979693) * IFNAR1.1_E - (0,0810270919845117) * GAB2_BCD + (0,118255695159956) * PRKCB_Site23920921_L + (-0,197975165223792) * MDM2_Site68821576_V - (0,213318581871191) * GAB2_Site78331080 + (0,192660926804618) * GAB2_CDEJ + (0,124216008873012) * LYN_AM + (0,102544252586713) * MDM2_ASVX + (0,107503746972775) * LYN_Site56012555$$

Cuando el número de variantes de edición de ARN se aumentó a 23, en 7 dianas diferentes, el AUC aumentó a 0,851 con una especificidad y una sensibilidad superiores al 80 % (Sp 82,7 %; Se 81,2 %, Figura 7B). Además, cuando usamos los 8 biomarcadores incluidos en el multiplex y combinamos 44 sitios editados diferencialmente, el AUC alcanzó 0,904 (Sp 90,9 %; Se 88,4 %, Figura 7C).

Usando un enfoque de aprendizaje automático con mROC y Bosque aleatorio (véanse el material y los métodos), separamos aleatoriamente las poblaciones específicas por sexo en un conjunto de entrenamiento y uno de prueba. Al dividir aleatoriamente la población femenina en un conjunto de entrenamiento (70 % de toda la población) y un conjunto de prueba (30 % de toda la población) y aplicar los métodos mencionados anteriormente, obtuvimos un AUC de 0,782 en el conjunto de prueba con el método mROC (Sp 81,8 %; Se 81,0 %, Figura 7D) y un AUC de 0,858 con el método de Bosque aleatorio (Sp 80,0 %; Se 81,0 %, Figura 7E). En conjunto, los datos obtenidos mediante dos métodos diferentes de aprendizaje automático en la cohorte de validación femenina confirmaron el excelente rendimiento diagnóstico de nuestro panel de biomarcadores.

La lista de todas las combinaciones sometidas a prueba en la cohorte de validación femenina se presenta en la Tabla 7. Todas las combinaciones fueron estadísticamente significativas entre el control y los casos con un valor de $p < 10^{-4}$.

Tabla 7: Rendimientos diagnósticos obtenidos con pacientes de la población femenina de la cohorte de validación (n = 179) analizados mediante secuenciación multiplexada de 8 dianas.

	Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec. (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	1	PRKCB_M MDM2_Site68821 571	C44	2361	0,904	[0,855; 0,952]	0,3707	89,94	90,91	88,41	85,92	92,59	N = 179 [110 (1); 69 (2)]
10		LYN_AH CAMK1D_DE MDM2_Site68821 625											
15		MDM2_Site68821 586_W											
		MDM2_Site68821 612_A											
20		PDE8A_Site85096 717_C GAB2_CD MDM2_Site68821 572_T											
		IFNAR1.1_E											
25		GAB2_BCD PRKCB_Site2392 0921_L											
		MDM2_Site68821 576_V MDM2_T											
30		GAB2_Site783310 80 GAB2_CDEJ											
		LYN_AM MDM2_ASVX											
35		MDM2_Site68821 616_X											
		IFNAR1.1_Site333 55798 LYN_W											
40		MDM2_Site68821 643 LYN_F											
		GAB2_BDEH LYN_Site5601249 1											
45		GAB2_E MDM2_SVWGAB 2_BD											
50		GAB2_AE CAMK1D_DES GAB2_CDJ											
		MDM2_Site68821 567											
55		MDM2_Site68821 584 MDM2_SWX											
		PRKCB_ADJK KCNJ15_AF											
60		LYN_Site5601255 3_A CAMK1 D_AG											
65		IFNAR1.1_Site333 55820_O GAB2_BC											

	Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec. (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5		GAB2_CE GAB2_BDJ MDM2_K											
10	2	PRKCB_M MDM2_Site68821 571	C44	13211	0,916	[0,871; 0,96]	0,245	89,4	89,1	89,9	83,8	93,3	N = 179 [110 (1); 69 (2)]
15		LYN_AH MDM2_Site68821 586_W											
		MDM2_Site68821 612_A											
20		PDE8A_Site85096 717_C GAB2_CD											
		MDM2_Site68821 572_T IFNAR1.1_E											
25		GAB2_BCD PRKCB_Site2392 0921_L											
		MDM2_Site68821 576_V MDM2_T											
30		GAB2_Site783310 80 GAB2_CDEJ											
		LYN_AM MDM2_ASVX											
35		MDM2_Site68821 616_X											
		IFNAR1.1_Site333 55798											
40		LYN_Site5601255 5 LYN_W											
		MDM2_Site68821 643 LYN_F											
45		GAB2_BDEH LYN_Site5601249 1											
		GAB2_E MDM2_SVWGAB 2_BD											
50		GAB2_AE CAMK1D_DES GAB2_CDJ											
55		MDM2_Site68821 567											
		MDM2_Site68821 584 GAB2_BCDJ											
60		MDM2_SWX PRKCB_ADJK											
		LYN_Site5601255 3_A CAMK1 D_AG											
65		MDM2_SW											

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec. (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	IFNAR1.1_Site333 55820_O GAB2_BC GAB2_CE GAB2_BDJ MDM2_K											
10												
15	3 PRKCB_M MDM2_Site68821 571 LYN_AH CAMK1D_DE MDM2_Site68821 625 MDM2_Site68821 586_W MDM2_Site68821 612_A PDE8A_Site85096 717_C GAB2_CD MDM2_Site68821 572_T IFNAR1.1_E GAB2_BCD PRKCB_Site2392 0921_L MDM2_Site68821 576_V MDM2_T GAB2_Site783310 80 GAB2_CDEJ LYN_AM MDM2_ASVX MDM2_Site68821 616_X IFNAR1.1_Site333 55798 LYN_Site5601255 5 LYN_W MDM2_Site68821 643 LYN_F GAB2_BDEH LYN_Site5601249 1 GAB2_E GAB2_BD GAB2_AE CAMK1D_DES GAB2_CDJ MDM2_Site68821 567 MDM2_Site68821 584 GAB2_BCDJ	C44	847	0,915	[0,871; 0,959]	0,274	89,4	89,1	89,9	83,8	93,3	N= 179 [110 (1); 69 (2)]
20												
25												
30												
35												
40												
45												
50												
55												
60												
65												

	Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec. (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5		MDM2_SWX PRKCB_ADJK											
10		LYN_Site5601255 3_A CAMK1D_AG											
15		MDM2_SW IFNAR1.1_Site333 55820_O GAB2_BC GAB2_BDJ MDM2_K											
20	4	LYN_AH CAMK1D_DE	C23	2584	0,842	[0,78; 0,905]	0,289	83,8	88,2	76,8	80,3	85,8	N= 179 [110 (1); 69 (2)]
25		MDM2_Site68821 625											
30		MDM2_Site68821 586_W											
35		MDM2_Site68821 612_A											
40		PDE8A_Site85096 717_C GAB2_CD											
45		MDM2_Site68821 572_T											
50		IFNAR1.1_E GAB2_BCD PRKCB_Site2392 0921_L											
55		MDM2_Site68821 576_V MDM2_T											
60		GAB2_Site783310 80 GAB2_CDEJ											
65		LYN_AM LYN_Site5601255 5											
		MDM2_Site68821 616_X											
		MDM2_Site68821 602 MDM2_SWX											
		IFNAR1.1_Site333 55806_M											
		IFNAR1.1_ABCG MDM2_Site68821 584											
	5	PRKCB_M MDM2_Site68821 571	C23	1336	0,851	[0,79; 0,911]	0,228	82,1	82,7	81,2	74,7	87,5	N = 179 [110 (1); 69 (2)]
		LYN_AH CAMK1D_DE											
		MDM2_Site68821 586_W											
		MDM2_Site68821 612_A											

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec. (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	PDE8A_Site85096 717_C GAB2_CD											
10	MDM2_Site68821 572_T IFNAR1.1_E											
15	GAB2_BCD PRKCB_Site2392 0921_L											
20	MDM2_Site68821 576_V MDM2_T GAB2_Site783310 80 GAB2_CDEJ											
25	LYN_AM MDM2_ASVX LYN_Site5601255 5											
30	MDM2_Site68821 616_X MDM2_Site68821 602 IFNAR1.1_ABCG MDM2_Site68821 584											
35	6 PRKCB_M MDM2_Site68821 571	C23	348	0,843	[0,782; 0,904]	0,220	82,1	82,7	81,2	74,7	87,5	N = 179 [110 (1); 69 (2)]
40	LYN_AH CAMK1D_DE MDM2_Site68821 625											
45	MDM2_Site68821 586_W MDM2_Site68821 612_A											
50	PDE8A_Site85096 717_C GAB2_CD MDM2_Site68821 572_T IFNAR1.1_E											
55	GAB2_BCD MDM2_Site68821 576_V GAB2_Site783310 80 GAB2_CDEJ											
60	LYN_AM MDM2_ASVX MDM2_Site68821 616_X											
65	MDM2_Site68821 602 MDM2_SWX IFNAR1.1_Site333 55806_M											

	Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec. (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5		IFNAR1.1_ABCG MDM2_Site68821 584											
10	7	MDM2_Site68821 571 LYN_AH CAMK1D_DE MDM2_Site68821 586_W PDE8A_Site85096 717_C GAB2_CD MDM2_Site68821 572_TIFNAR1.1_ E GAB2_BCD PRKCB_Site2392 0921_L MDM2_Site68821 576_V MDM2_T GAB2_Site783310 80 GAB2_CDEJ LYN_AM MDM2_ASVX LYN_Site5601255 5	C17	1088	0,829	[0,763; 0,895]	0,398	82,7	90,9	69,6	82,8	82,6	N = 179 [110 (1); 69 (2)]
35	8	PRKCB_M MDM2_Site68821 571 LYN_AH CAMK1D_DE MDM2_Site68821 625 PDE8A_Site85096 717_C GAB2_CD MDM2_Site68821 572_T IFNAR1.1_E GAB2_BCD PRKCB_Site2392 0921_L MDM2_Site68821 576_V GAB2_Site783310 80 GAB2_CDEJ LYN_AM MDM2_ASVX LYN_Site5601255 5	C17	448	0,834	[0,77; 0,897]	0,437	82,7	93,6	65,2	86,5	81,1	N= 179 [110 (1); 69 (2)]
65	9	PRKCB_M MDM2_Site68821 571	C17	517	0,824	[0,758; 0,889]	0,145	79,3	80,0	78,3	71,1	85,4	N = 179 [110 (1); 69 (2)]

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec. (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	LYN_AH CAMK1D_DE											
10	MDM2_Site68821 586_W											
15	MDM2_Site68821 612_A											
20	PDE8A_Site85096 717_C											
25	MDM2_Site68821 572_T											
30	IFNAR1.1_E											
35	GAB2_BCD											
40	PRKCB_Site2392 0921_L											
45	MDM2_T											
50	GAB2_Site783310 80											
55	GAB2_CDEJ											
60	LYN_AM											
65	MDM2_ASVX											
70	LYN_Site5601255 5											
75	PRKCB_M	C17	558	0,828	[0,762; 0,893]	0,158	78,8	79,1	78,3	70,1	85,3	N = 179 [110 (1); 69 (2)]
80	MDM2_Site68821 571											
85	LYN_AH											
90	CAMK1D_DE											
95	MDM2_Site68821 612_A											
100	PDE8A_Site85096 717_C											
105	MDM2_Site68821 572_T											
110	IFNAR1.1_E											
115	GAB2_BCD											
120	PRKCB_Site2392 0921_L											
125	MDM2_Site68821 576_V											
130	MDM2_T											
135	GAB2_Site783310 80											
140	GAB2_CDEJ											
145	LYN_AM											
150	MDM2_ASVX											
155	LYN_Site5601255 5											

El rendimiento de la población masculina fue aún mejor. De hecho, al analizar por separado la población masculina de la cohorte de validación (n = 77, 50 pacientes unipolares y 27 pacientes con BD) e incluidas 18 variantes de edición en 6 BMK, obtuvimos un AUC de 0,918 (Sp 86,0 %; Se 88,9 %, Figura 8A). En este caso, la ecuación usada es la siguiente:

$$+ (0,1918844546789) * \text{CAMK1D_AS} + (0,614946165065453) * \text{PRKCB_Site23920921_L} + (0,55731200448775) * \text{CAMK1D_CE} + (0,277761284589955) * \text{PRKCB_DJKM} + (-0,360618380284487) * \text{MDM2_SV} + (0,306320519931475) * \text{IFNAR1.1_Site33355809} + (0,456841145698979) * \text{MDM2_ASVX} + (-0,0482494197161185) *$$

CAMK1D_ES + (0,0376282919358852)* GAB2_DE - (0,710430719330234)* LYN_F + (0,118310642804172)*
MDM2_Site68821643 + (-0,135214425904151)* IFNAR1.1_Site33355820_0 + (0,309202697888314)* LYN_AF + (-
0,0028544497314405)* LYN_Site56012521 + (0,266463664183522)*MDM2_STVX + (0,315139778360142)*
CAMK1D_BD + (-0,0526783771932407)* PRKCB_Site23920868 + (0,123898740861286)* IFNAR1.1_ABCE.

5 Cuando se tuvieron en cuenta 39 variantes de edición de ARN dentro de esos 6 BMK, el AUC fue superior a 0,9 (AUC 0,954, Spe 96,0 %, Se 85,2 %, Figura 8B). Además, cuando el número de variantes de edición en esos mismos 6 BMK se aumentó a 47, obtuvimos un AUC de 0,99 (Sp 96,0 %; Se 100 %, Figura 8C).

10 Usando aprendizaje automático, dividimos aleatoriamente la población masculina en un conjunto de entrenamiento (el 65 % de toda la población) y un conjunto de prueba (el 35 % de toda la población) y obtuvimos un AUC con mROC de 0,817 (Sp 86,7 %, Se 87,5 %, Figura 8D), mientras que el método de Bosque aleatorio condujo a un AUC de 0,850 (Sp 89 %, Se 80 %, Figura 8E).

15 La lista de todas las combinaciones sometidas a prueba en la cohorte de validación masculina se presenta en la Tabla 8. Todas las combinaciones fueron estadísticamente significativas entre el control y los casos con un valor de $p < 10^{-4}$.

Tabla 8: Rendimientos diagnósticos obtenidos con pacientes de la población masculina de la cohorte de validación (n = 77) analizados mediante secuenciación multiplexada de 8 dianas.

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
25	1	C47	12517	0,990	[0,97; 1,00]	1,174	97,4	96,0	100,0	93,1	100,0	N= 77 [50 (1); 27 (2)]
30	CAMK1D_AS PRKCB_Site23920921_L CAMK1D_CE PRKCB_DJKM MDM2_BG MDM2_SV CAMK1D_EFS MDM2_ASVX											
35	CAMK1D_ES MDM2_AST GAB2_DE LYN_F MDM2_Site68821643											
40	IFNAR1.1_Site33355820_O LYN_AF LYN_Site56012521 MDM2_STVX											
45	CAMK1D_BD PRKCB_Site23920868 IFNAR1.1_ABCE MDM2_SX											
50	PRKCB_Site23920844_B PRKCB_Site23920889_F											
55	CAMK1D_Site12378439 CAMK1_D_CS MDM2_STX MDM2_Site68821571											
60	MDM2_VX MDM2_Site68821576_V MDM2_Site68821616_X CAMK1D_EF											

65

	Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5		GAB2_DEJ MDM2_KSX											
10		PRKCB_Site23920927 _M PRKCB_A											
		CAMK1D_ABEGS GAB2_BH MDM2_KS											
15		PRKCB_Site23920910 _J GAB2_BD											
		CAMK1D_DS CAMK1D_Site1237835 1											
20		PRKCB_Site23920919 _K PDE8A_E											
		CAMK1D_BES PDE8A_Site85096684 GAB2_CEJ											
25	2	CAMK1D_AS PRKCB_Site23920921 _L	C47	12956	0,988	[0,967; 1,00]	0,717	97,4	96,0	100,0	93,1	100,0	N= 77 [50 (1); 27 (2)]
30		CAMK1D_CE PRKCB_DJKM MDM2_BG											
		MDM2_SV CAMK1D_EFS MDM2_ASVX											
35		CAMK1D_ES MDM2_AST GAB2_DE											
		LYN_F MDM2_Site68821643 LYN_AF											
40		LYN_Site56012521 MDM2_STVX											
		CAMK1D_BD PRKCB_Site23920868											
45		IFNAR1.1_ABCE MDM2_SX											
		PRKCB_Site23920844 _B											
50		PRKCB_Site23920889 _F											
		CAMK1D_Site1237843 9 CAMK1D_CS											
55		MDM2_STX MDM2_Site68821571											
		MDM2_VX MDM2_Site68821576_ V											
60		MDM2_Site68821616_ X CAMK1D_EF											
65		GAB2_DEJ MDM2_KSX											

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	PRKCB_Site23920927_M PRKCB_A											
10	CAMK1D_ABEGS GAB2_BH MDM2_KS PRKCB_Site23920910_J GAB2_BD CAMK1D_DS CAMK1D_Site12378351											
15	PRKCB_Site23920919_K MDM2_Site68821612_A PDE8A_E											
20	CAMK1D_BES PDE8A_Site85096684 GAB2_Cej											
25	3 CAMK1D_AS PRKCB_Site23920921_L CAMK1D_CE PRKCB_DJKM MDM2_BG MDM2_SV IFNAR1.1_Site33355809 CAMK1D_EFS MDM2_ASVX CAMK1D_ES MDM2_AST GAB2_DE LYN_F MDM2_Site68821643 IFNAR1.1_Site33355820_O LYN_Site56012521 MDM2_STVX CAMK1D_BD PRKCB_Site23920868 IFNAR1.1_ABCE MDM2_SX PRKCB_Site23920844_B PRKCB_Site23920889_F CAMK1D_Site12378439 CAMK1D_CS MDM2_STX MDM2_Site68821571 MDM2_VX MDM2_Site68821576_V MDM2_Site68821616_X CAMK1D_EF	C47	6160	0,987	[0,963; 1,00]	1,220	97,4	96,0	100,0	93,1	100,0	N= 77 [50 (1); 27 (2)]
30												
35												
40												
45												
50												
55												
60												
65												

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	GAB2_DEJ MDM2_KSX											
10	PRKCB_Site23920927 _M PRKCB_A											
15	CAMK1D_ABEGS GAB2_BH MDM2_KS											
20	PRKCB_Site23920910 _J GAB2_BD											
25	CAMK1D_DS CAMK1D Site12378351											
30	PRKCB_Site23920919 _K PDE8A_E											
35	CAMK1D_BES PDE8A_Site85096684											
40	GAB2_Cej											
45	PRKCB_Site23920921 _L CAMK1D_CE	C27	3715	0,954	[0,912; 0,996]	0,618	92,2	96,0	85,2	92,0	92,3	N= 77 [50 (1); 27 (2)]
50	PRKCB_DJKM MDM2_BG MDM2_SV											
55	IFNAR1.1_Site333558 09 CAMK1D_EFS											
60	MDM2_ASVX CAMK1D_ES MDM2_AST											
65	GAB2_DE LYN_F MDM2_Site68821643											
70	IFNAR1.1_Site333558 20_O LYN_AF											
75	LYN_Site56012521 MDM2_STVX											
80	PRKCB_Site23920868 IFNAR1.1_ABCE											
85	MDM2_Site68821576_ V											
90	MDM2_Site68821612_ A											
95	CAMK1D_Site1237843 9											
100	PRKCB_Site23920889 _F											
105	PRKCB_Site23920872 _C											
110	MDM2_Site68821616_ X											
115	MDM2_Site68821602											
120	MDM2_Site68821571											
125	CAMK1D_AS PRKCB_Site23920921 _L	C27	1260	0,942	[0,895; 0,99]	0,099	90,9	86,0	100,0	79,4	100,0	N= 77 [50 (1); 27 (2)]

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	CAMK1D_CE PRKCB_DJKM MDM2_BG											
10	MDM2_SV IFNAR1.1_Site33355809											
15	CAMK1D_EFS MDM2_ASVX MDM2_AST GAB2_DE LYN_F											
20	MDM2_Site68821643 LYN_Site56012521 MDM2_STVX											
25	CAMK1D_BD PRKCB_Site23920868 IFNAR1.1_ABCE											
30	MDM2_Site68821576_V MDM2_Site68821612_A											
35	CAMK1D_Site12378439 PRKCB_Site23920844_B PRKCB_Site23920889_F											
40	PRKCB_Site23920872_C MDM2_Site68821616_X MDM2_Site68821602 MDM2_Site68821571											
45	6 PRKCB_Site23920921_L CAMK1D_CE PRKCB_DJKM MDM2_BG MDM2_SV IFNAR1.1_Site33355809 CAMK1D_EFS MDM2_ASVX CAMK1D_ES MDM2_AST GAB2_DE LYN_F MDM2_Site68821643 IFNAR1.1_Site33355820_O LYN_Site56012521 MDM2_STVX CAMK1D_BD PRKCB_Site23920868	C27	3755	0,939	[0,889; 0,989]	0,220	90,9	86,0	100,0	79,4	100,0	N= 77 [50 (1); 27 (2)]
50												
55												
60												
65												

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	MDM2_Site68821576_V											
10	MDM2_Site68821612_A											
	CAMK1D_Site12378439											
	PRKCB_Site23920844_B											
15	PRKCB_Site23920889_F											
	PRKCB_Site23920872_C											
20	MDM2_Site68821616_X											
	MDM2_Site68821602											
	MDM2_Site68821571											
25	7 CAMK1D_AS PRKCB_Site23920921_L	C18	649	0,918	[0,858; 0,977]	0,138	87,0	86,0	88,9	77,4	93,5	N= 77 [50 (1); 27 (2)]
30	CAMK1D_CE PRKCB_DJKM MDM2_SV				1							
35	IFNAR1.1_Site33355809 MDM2_ASVX											
	CAMK1D_ES GAB2_DE LYN_F											
	MDM2_Site68821643											
40	IFNAR1.1_Site33355820_O LYN_AF											
	LYN_Site56012521 MDM2_STVX											
45	CAMK1D_BD PRKCB_Site23920868 IFNAR1.1_ABCE											
50	8 CAMK1D_AS PRKCB_Site23920921_L	C18	646	0,917	[0,857; 0,977]	0,169	87,0	86,0	88,9	77,4	93,5	N= 77 [50 (1); 27 (2)]
	CAMK1D_CE PRKCB_DJKM MDM2_SV				1							
55	IFNAR1.1_Site33355809 MDM2_ASVX											
	CAMK1D_ES MDM2_AST GAB2_DE											
60	LYN_F IFNAR1.1_Site33355820_O											
	LYN_AF LYN_Site56012521											
65	MDM2_STVX CAMK1D_BD											

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	PRKCB_Site23920868 IFNAR1.1_ABCE											
9	PRKCB_Site23920921 _L CAMK1D _CE PRKCB_DJKM MDM2_SV IFNAR1.1_Site333558 09 CAMK1D_EFS MDM2_ASVX CAMK1D_ES MDM2_AST GAB2_DE LYN_F MDM2_Site68821643 IFNAR1.1_Site333558 20_O LYN_AF MDM2_STVX CAMK1 D_BD PRKCB_Site23920868 IFNAR1.1_ABCE	C18	1265	0,916	[0,855; 0,976]	0,145	87,0	86,0	88,9	77,4	93,5	N= 77 [50 (1); 27 (2)]

Los datos obtenidos con ambos métodos dieron, por lo tanto, rendimientos diagnósticos excelentes para el diagnóstico específico por sexo de DEP, con AUC superiores a 0,800, especificidades y sensibilidades superiores al 80 % tanto para hembras como para machos, lo que indica un ensayo diagnóstico para el diagnóstico diferencial del trastorno bipolar que podría usarse en el consultorio.

Como hemos identificado biomarcadores de edición de ARN para el diagnóstico diferencial del BD, buscamos investigar si las isoformas no editadas de las dianas validadas podrían ser útiles para discriminar las poblaciones de pacientes unipolares y bipolares y podrían usarse en combinación con biomarcadores de edición de ARN. A continuación, se calculó la ROC de AUC para cada diana no editada, junto con la significación para cada isoforma no editada. El análisis de las isoformas no editadas de MDM2 en la cohorte de validación (n = 256) dio un AUC de 0,609 y fue significativamente diferente entre Unipolar y BD (p < 0,05, Tabla 9).

Tabla 9: Rendimientos diagnósticos obtenidos con la isoforma no editada de MDM2 en la cohorte de validación analizada con secuenciación multiplexada

Diana	Valor de p	Curva ROC de AUC	% Sin editar	Población
MDM2 sin editar	0,0039	0,609	34,2	N = 256 [160 (0); 96 (1)]

Además, cuando las isoformas no editadas de las dianas validadas se combinaron con una isoforma de las mismas dianas, observamos diferencias significativas entre los pacientes unipolares y con BD (Tabla 10), lo que sugiere que las isoformas no editadas también podrían usarse en el ensayo de diagnóstico.

Tabla 10: Rendimientos diagnósticos obtenidos con isoformas no editadas combinadas con dianas editadas en la cohorte de validación analizada con secuenciación multiplexada

Diana	Relación	Valor de p	Curva ROC de AUC	Población
CAMK1D	ABIM / sin editar	0,0012	0,617	N = 256 [160 (0); 96 (1)]
CAMK1D	BCDEP / sin editar	0,0017	0,611	N = 256 [160 (0); 96 (1)]
CAMK1D	AFGNS / sin editar	0,0035	0,607	N = 256 [160 (0); 96 (1)]
CAMK1D	COS / sin editar	0,0047	0,605	N = 256 [160 (0); 96 (1)]
GAB2	ABCEFIJ / sin editar	0,0003	0,636	N = 256 [160 (0); 96 (1)]
GAB2	FHI / sin editar	0,0008	0,622	N = 256 [160 (0); 96 (1)]

Diana	Relación	Valor de p	Curva ROC de AUC	Población
GAB2	GHIJK / sin editar	0,0036	0,604	N = 256 [160 (0); 96 (1)]
GAB2	ABGHIJK / sin editar	0,0042	0,602	N = 256 [160 (0); 96 (1)]
IFNAR1	BCIJ / sin editar	0,0021	0,607	N = 256 [160 (0); 96 (1)]
IFNAR1	ABCMP / sin editar	0,0034	0,604	N = 256 [160 (0); 96 (1)]
IFNAR1	CR / sin editar	0,0046	0,602	N = 256 [160 (0); 96 (1)]
LYN	CDW / sin editar	0,0012	0,625	N = 256 [160 (0); 96 (1)]
LYN	CP / sin editar	0,0045	0,605	N = 256 [160 (0); 96 (1)]
PRKCB	ADGHJL / sin editar	0,001	0,618	N = 256 [160 (0); 96 (1)]
PRKCB	AEJK / sin editar	0,002	0,610	N = 256 [160 (0); 96 (1)]
PRKCB	DN / sin editar	0,0025	0,611	N = 256 [160 (0); 96 (1)]
PRKCB	BDFHJK / sin editar	0,0026	0,612	N = 256 [160 (0); 96 (1)]
PRKCB	DHIJa / sin editar	0,003	0,609	N = 256 [160 (0); 96 (1)]
PRKCB	M / sin editar	0,0041	0,610	N = 256 [160 (0); 96 (1)]
PRKCB	ADKLM / sin editar	0,0042	0,606	N = 256 [160 (0); 96 (1)]

La depresión bipolar se compone de episodios fluctuantes de depresión y manía. Sin embargo, los pacientes que responden al tratamiento a menudo experimentan un estado eutímico, que suele estar en medio de un rango que va de la depresión a la manía. A pesar de que el DSM-5 no definió ningún criterio diagnóstico para la eutimia⁵³, generalmente se refiere a un estado de remisión clínica, a menudo temporal, para síndromes del estado de ánimo tales como el trastorno bipolar. Como el panel de biomarcadores que identificamos permite el diagnóstico diferencial del BD, buscamos investigar si esos biomarcadores podrían diferenciar entre pacientes bipolares depresivos y pacientes eutímicos, para poder realizar un seguimiento de los pacientes durante el tratamiento y evaluar la respuesta al tratamiento. De esta forma, analizamos el rendimiento diagnóstico de los biomarcadores identificados en una población de pacientes bipolares depresivos y eutímicos (Figura 22).

En la Tabla 11 se presentan ejemplos de combinaciones sometidas a prueba en toda la población de pacientes bipolares depresivos y pacientes eutímicos ($n = 137$, véase la Figura 22). Todas las combinaciones fueron estadísticamente significativas entre el control y los casos con un valor de $p < 10^{-4}$.

Tabla 11: Rendimientos diagnósticos obtenidos con pacientes de toda la población de pacientes bipolares depresivos y pacientes eutímicos ($n = 137$) analizados mediante secuenciación multiplexada de 8 dianas.

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	GAB2_CE MDM2_T PDE8A_Site85096717_C											
10	MDM2_GM GAB2_DHJ PRKCB_ADHIJKM											
15	MDM2_ASX MDM2_BG GAB2_BDEJ GAB2_BE IFNAR1.1_Site3335582_0_O CAMK1D_P											
20	GAB2_Site78330955_G MDM2_AX MDM2_OS CAMK1D_BI MDM2_Site68821573 MDM2_Site68821612_A MDM2_Site68821656											
25	PRKCB_Site23920863 MDM2_Site68821629 MDM2_SX PRKCB DJK MDM2_SVW PRKCB_M GAB2_BDJ IFNAR1.1_Site3335575_6_K	C38	9953	0,977	[0,956; 0,999]	-1,0351	95,6	95,0	95,8	97,9	90,5	N= 136 [40 (1); 96 (2)]
30	CAMK1D_ABEGS MDM2_SWX PDE8A_Site85096729_F											
35	MDM2_Site68821616_X MDM2_SW CAMK1D_Site1237843_8											
40	PRKCB_Site23920921_L PRKCB_ADGHIJKM IFNAR1.1_Site3335579_8 LYN_Site56012567 GAB2_BDE											
45												
50												
55												
60												
65												

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	CAMK1D_Site1237844	C38	4799	0,980	[0,962; 0,997]	-0,6748	94,1	100,0	91,7	100,0	83,3	N= 136 [40 (1); 96 (2)]
10	0 GAB2_CE MDM2_T PDE8A_Site85096717_ C MDM2_GM GAB2_DHJ PRKCB_ADHIJKM MDM2_ASX MDM2_BG GAB2_BE IFNAR1.1_Site3335582 0_O CAMK1D_P GAB2_Site78330955_ G MDM2_AX CAMK1D_BI MDM2_Site68821573 MDM2_Site68821612_ A MDM2_Site68821656 PRKCB_Site23920863 MDM2_Site68821629											
15	MDM2_SX PRKCB_DJK MDM2_SVW PRKCB _M GAB2_BDJ IFNAR1.1_Site3335575 6_K CAMK1D_Site1237831 1 CAMK1D_ABEGS MDM2_SWX PDE8A_Site85096729_ F MDM2_Site68821616_ X MDM2_SW GAB2_EH CAMK1D_Site1237843 8 PRKCB_Site23920921 _L IFNAR1.1_Site3335579 8 LYN_Site56012567 GAB2_BDE											
20												
25												
30												
35												
40												
45												
50												
55												
60												
65												

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
3	CAMK1D_Site1237844 0 GAB2_CE MDM2_T PDE8A_Site85096717_ C MDM2_GM GAB2_DHJ PRKCB_ADHIJKM MDM2_ASX MDM2_BG GAB2_BDEJ GAB2_BE IFNAR1.1_Site3335582 0_O CAMK1D_P GAB2_Site78330955_ G MDM2_AX MDM2_OS CAMK1D_BI MDM2_Site68821612_ A MDM2_Site68821656 PRKCB_Site23920863 MDM2_Site68821629 PRKCB_DJK	C22	6	0,961	[0,93; 0,992]	-0,8052	91,9	87,5	93,8	94,7	85,4	N= 136 [40 (1); 96 (2)]
4	CAMK1D_Site1237844 0 GAB2_CE MDM2_T PDE8A_Site85096717_ C MDM2_GM GAB2_DHJ PRKCB_ADHIJKM MDM2_ASX MDM2_BG GAB2_BE IFNAR1.1_Site3335582 0_O CAMK1D_P GAB2_Site78330955_ G MDM2_AX MDM2_OS CAMK1D_BI MDM2_Site68821573 MDM2_Site68821612_ A MDM2_Site68821656 PRKCB_Site23920863 MDM2_Site68821629 PRKCB_DJK	C22	14	0,957	[0,924; 0,99]	-0,8048	91,9	87,5	93,8	94,7	85,4	N= 136 [40 (1); 96 (2)]

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	5	C20	313	0,958	[0,926; 0,991]	-0,7034	92,7	90,0	93,8	95,7	85,7	N= 136 [40 (1); 96 (2)]
10												
15												
20												
25												
30												
35												
40												
45												
50												
5	6	C20	508	0,960	[0,93; 0,991]	-0,9456	92,7	87,5	91,7	94,6	81,4	N= 136 [40 (1); 96 (2)]
10												
15												
20												
25												
30												
35												
40												
45												
50												

En la cohorte de validación femenina (n = 90), cuando solo se introdujeron en el análisis 9 variantes incluidas, presentes en 4 biomarcadores, el AUC fue de 0,847 (Sp 76,2 %; Se 82,6 %, Figura 9A). La ecuación usada en este caso es la siguiente:

$$Z = - (0,0895727555887869) * \text{MDM2_SWX} - (0,284497312947692) * \text{CAMK1D_Site12378438} - (0,0124820173731589) * \text{MDM2_Site68821612_A} - (0,420995574249043) * \text{GAB2_E} - (0,329608502036281) * \text{MDM2_ASX} + (0,362901517502019) * \text{MDM2_Site68821629} - (0,113622915523371) * \text{MDM2_Site68821573} - (0,0962399148413304) * \text{MDM2_SW} - (0,148613926406161) * \text{PRKCB_Site23920927_M}$$

Quando se aumentó el número de variantes de edición para alcanzar 18 variantes, presentes en 5 biomarcadores, el rendimiento aumentó y el AUC fue de 0,965 (Sp 90,5 %; Se 97,7 %, Figura 9B). Además, cuando se combinaron y se analizaron hasta 24 sitios editados diferencialmente, todos contenidos en 5 biomarcadores diferentes, obtuvimos un rendimiento sobresaliente, con un AUC de 0,984, con una especificidad y una sensibilidad excelentes (90,5 % y 98,6 %, respectivamente, Figura 9C)

El rendimiento de la población masculina fue aún mejor. De hecho, en la cohorte de validación masculina de BD deprimido y eutímicos (n = 47), cuando solo se incluyeron 12 variantes, presentes en 6 biomarcadores diferentes, obtuvimos un AUC de 0,994 (Sp 95 %, Se 100 %, Figura 10A). Cuando el número de variantes de edición se aumentó ligeramente a 23, incluidas en 6 biomarcadores diferentes, el AUC aumentó a 1,00, con una especificidad y una sensibilidad del 100 % (Figura

10B). La inclusión de 28 variantes de edición en esos 6 biomarcadores dio el mismo rendimiento: el AUC fue de 1,00, con una especificidad del 100 % y una sensibilidad del 100 % (Figura 10C). En este caso, la ecuación usada fue la siguiente:

$$Z = -(1,52336682837312) * IFNAR1.1_ABCF - (3,26057883489785) * CAMK1D_R - (0,763880452664734) * LYN_Site56012450 - (-0,561253833023493) * CAMK1D_RS - (-3,33767767845627) * GAB2_BDEHJK + (1,55430607429165) * GAB2_Site78330955_G - (4,52292549457016) * CAMK1D_ABEG - (-1,07661353764004) * GAB2_CE - (-3,45753212466969) * CAMK1D_Site12378438 + (1,32699847321958) * PRKCB_IJK - (-1,2518372990998) * GAB2_BE - (1,79465029376655) * CAMK1D_BF - (1,38897817068785) * IFNAR1.1_AB - (2,00128623265317) * PRKCB_M - (-0,237584778376622) * MDM2_A - (0,989889267419364) * CAMK1D_GS - (0,328234691570068) * IFNAR1.1_AC + (1,82350692467403) * MDM2_T + (0,69901718503897) * IFNAR1.1_Site33355820_O + (0,145098039959207) * PRKCB_Site23920874 + (2,27039659579243) * PRKCB_Site23920910_J - (-0,815680192672586) * GAB2_Site78331030 + (-0,287785099217686) * PRKCB_Site23920919_K - (0,576710638047866) * MDM2_SVW + (1,14884163937465) * PRKCB_ADGHIJKM - (0,251734426707645) * GAB2_EH + (-2,18488230071751) * PRKCB_Site23920921_L + (1,19656964307143) * PRKCB_Z.$$

En conjunto, estos datos sugieren que los diferentes biomarcadores del panel de 8 genes seleccionados en las cohortes de validación también podrían usarse para diferenciar los pacientes con trastorno bipolar depresivos de los pacientes eutímicos, lo que sugiere que esos biomarcadores también podrían usarse para el seguimiento del tratamiento.

Como el panel de biomarcadores analizado anteriormente dio unos rendimientos diagnósticos excelentes para diagnosticar diferencialmente BD y unipolar en pacientes deprimidos, buscamos investigar si esos biomarcadores podrían permitir la discriminación del BD de los controles sanos (Tabla 12). A continuación, investigamos si los biomarcadores de edición de ARN validados para el diagnóstico diferencial del BD también se editaron de manera diferencial en una población de control sana. Los sujetos de control emparejados por edad, raza y sexo (n = 143) fueron reclutados de una lista de voluntarios del Centro de Investigación Clínica (CHRU de Montpellier). Los biomarcadores de edición de ARN se midieron como se ha descrito anteriormente y se compararon con la población de pacientes deprimidos con trastorno bipolar (n = 96). En toda la población, cuando se combinaron 60 biomarcadores de edición de 7 biomarcadores diferentes, todos ellos secuenciados en múltiplex en un único experimento, la ROC de AUC fue 0,899 (Sp 88,1 %, Se 88,5 %, Figura 11A). En la Tabla 12 se presentan ejemplos de combinaciones sometidas a prueba en toda la población de pacientes bipolares depresivos y controles sanos (n = 239, véase la Figura 22). Todas las combinaciones fueron estadísticamente significativas entre el control y los casos con un valor de $p < 10^{-4}$.

Tabla 12: Rendimientos diagnósticos obtenidos con pacientes de toda la población de pacientes bipolares depresivos y controles sanos (n = 137) analizados mediante secuenciación multiplexada de 8 dianas.

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
40	PRKCB_Site23920910_J PRKCB_Site23920921_L											
45	IFNAR1.1_Site33355809 PRKCB_DIJK											
50	IFNAR1.1_Site33355798 PRKCB_Site23920911 PRKCB_Site23920919_K MDM2_W											
55	IFNAR1.1_Site33355838_P IFNAR1.1_Site33355817 PRKCB_B PRKCB_Site23920844_B MDM2_SWX											
60	PRKCB_JK GAB2_CE PRKCB_M MDM2_STX PRKCB_Site23920893_G IFNAR1.1_Site33355840_E											
65	PRKCB_Site23920889_F IFNAR1.1_Site33355829_I											

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	CAMK1D_E	C60	3755	0,899	[0,858; 0,941]	0,2352	88,3	88,1	88,5	83,3	92,0	N = 239 [143 (1); 96 (2)]
	CAMK1D_AE											
10	IFNAR1.1_Site33355839_L											
	IFNAR1.1_Site33355793_G											
	IFNAR1.1_Site33355789_A											
15	IFNAR1.1_Site33355801_N PRKCB_J KCNJ15_C											
	IFNAR1.1_Site33355807_B PRKCB_DHIJK											
20	IFNAR1.1_Site33355830_C											
	MDM2_Site68821586_W											
	GAB2_ABDE											
25	GAB2_Site78331030											
	GAB2_DE											
	LYN_Site56012490											
	PRKCB_Site23920884_D											
30	IFNAR1.1_Site33355762_F GAB2_DEJ PRKCB_AD											
	CAMK1D_Site12378346_E CAMK1D_BS											
	CAMK1D_G											
35	PRKCB_Site23920902_I											
	CAMK1D_A											
	IFNAR1.1_Site33355763_H GAB2_BC KCNJ15_CD											
40	LYN_A GAB2_EJ											
	LYN_Site56012450											
	PRKCB_DIJ											
	PRKCB_Site23920915											
45	IFNAR1.1_ABCG											
	CAMK1D_ES											
	PRKCB_Site23920897											
	CAMK1D_Site12378351											
50	MDM2_Site68821563											
	GAB2_BH											
55	PRKCB_Site23920910_J											
	PRKCB_Site23920921_L											
	IFNAR1.1_Site33355809											
	PRKCB_DIJK											
	IFNAR1.1_Site33355798											
	PRKCB_Site23920911											
60	PRKCB_Site23920919_K											
	MDM2_W											
	IFNAR1.1_Site33355838_P											
	IFNAR1.1_Site33355817											

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	PRKCB_B PRKCB_Site23920844_B MDM2_SWX											
10	PRKCB_JK GAB2_CE PRKCB_M MDM2_STX											
15	PRKCB_Site23920893_G IFNAR1.1_Site33355840_E											
20	PRKCB_Site23920889_F IFNAR1.1_Site33355829_I											
25	CAMK1D_E CAMK1D_AE IFNAR1.1_Site33355839_L											
30	IFNAR1.1_Site33355793_G IFNAR1.1_Site33355789_A											
35	IFNAR1.1_Site33355801_N PRKCB_J KCNJ15_C	C60	3957	0,906	[0,867; 0,946]	0,1692	87,9	86,7	89,6	81,9	92,5	N = 239 [143 (1); 96 (2)]
40	IFNAR1.1_Site33355807_B PRKCB_DHIJK											
45	IFNAR1.1_Site33355830_C MDM2_Site68821586_W											
50	GAB2_ABDE GAB2_Site78331030 GAB2_DE											
55	PRKCB_Site23920884_D IFNAR1.1_Site33355762_F											
60	GAB2_DEJ PRKCB_AD CAMK1D_Site12378346_E											
65	CAMK1D_BS CAMK1D_G PRKCB_Site23920902_I											
	CAMK1D_A IFNAR1.1_Site33355763_H LYN_AG											
	GAB2_BC KCNJ15_CD LYN_A GAB2_EJ											
	GAB2_Site78331054 LYN_Site56012450 PRKCB_DIJ											
	PRKCB_Site23920915 IFNAR1.1_ABCG CAMK1D_ES											
	PRKCB_Site23920897 MDM2_Site68821563 GAB2_BH											

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	PRKCB_Site23920910_J PRKCB_Site23920921_L	C38	3543	0,825	[0,77; 0,881]	0,1371	80,8	81,1	80,2	74,0	85,9	N = 239 [143 (1); 96 (2)]
10	IFNAR1.1_Site33355809 PRKCB_DIJK											
15	IFNAR1.1_Site33355798 PRKCB_Site23920911											
20	PRKCB_Site23920919_K MDM2_W											
25	IFNAR1.1_Site33355838_P IFNAR1.1_Site33355817											
30	PRKCB_Site23920844_B MDM2_SWX PRKCB_JK											
35	GAB2_CE MDM2_STX PRKCB_Site23920893_G											
40	IFNAR1.1_Site33355840_E PRKCB_Site23920889_F											
45	IFNAR1.1_Site33355829_I CAMK1D_E											
50	CAMK1D_AE IFNAR1.1_Site33355839_L											
55	IFNAR1.1_Site33355793_G IFNAR1.1_Site33355801_N											
60	PRKCB_J KCNJ15_C IFNAR1.1_Site33355807_B											
65	PRKCB_DHIJK IFNAR1.1_Site33355830_C											
70	MDM2_Site68821586_W PDE8A_Site85096729_F											
75	GAB2_ABDE GAB2_Site78331030											
80	PRKCB_Site23920884_D IFNAR1.1_Site33355762_F											
85	IFNAR1.1_Site33355763_H											
90	PRKCB_Site23920910_J PRKCB_Site23920921_L	C38	7535	0,825	[0,77; 0,88]	0,1556	80,8	81,8	79,2	74,5	85,4	N = 239 [143 (1); 96 (2)]
95	PRKCB_DIJK IFNAR1.1_Site33355798											
100	PRKCB_Site23920911 PRKCB_Site23920919_K											
105	MDM2_W IFNAR1.1_Site33355838_P											
110	IFNAR1.1_Site33355817 PRKCB_Site23920844_B											
115	MDM2_SWX PRKCB_JK GAB2_CE PRKCB_M											

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	MDM2_STX											
10	PRKCB_Site23920893_G											
	IFNAR1.1_Site33355840_E											
	PRKCB_Site23920889_F											
	IFNAR1.1_Site33355829_I											
	CAMK1D_E											
	IFNAR1.1_Site33355839_L											
15	IFNAR1.1_Site33355793_G											
	IFNAR1.1_Site33355789_A											
20	IFNAR1.1_Site33355801_N											
	PRKCB_J_KCNJ15_C											
	IFNAR1.1_Site33355807_B											
25	PRKCB_DHIJK											
	IFNAR1.1_Site33355830_C											
30	MDM2_Site68821586_W											
	PDE8A_Site85096729_F											
	GAB2_ABDE											
	GAB2_Site78331030											
35	PRKCB_Site23920884_D											
	IFNAR1.1_Site33355762_F											
	IFNAR1.1_Site33355763_H											
40	PRKCB_Site23920910_J											
	PRKCB_Site23920921_L											
	PRKCB_Site23920911											
	PRKCB_Site23920919_K											
45	MDM2_W											
	IFNAR1.1_Site33355838_P											
	PRKCB_Site23920844_B											
50	MDM2_SWX PRKCB_JK											
	PRKCB_Site23920893_G											
	IFNAR1.1_Site33355840_E											
55	PRKCB_Site23920889_F											
	IFNAR1.1_Site33355829_I											
	CAMK1D_AE											
	IFNAR1.1_Site33355839L											
60	IFNAR1.1_Site33355793_G											
	IFNAR1.1_Site33355789_A											
65	IFNAR1.1_Site33355801_N											
5		C24	314	0,778	[0,718; 0,838]	0,0533	74,9	74,1	76,0	66,4	82,2	N = 239 [143 (1); 96 (2)]

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	IFNAR1.1_Site33355807_B											
10	IFNAR1.1_Site33355830_C											
	MDM2_Site68821586_W											
	PRKCB_Site23920884_D											
15	IFNAR1.1_Site33355762_F											
	IFNAR1.1_Site33355763_H											
20	PRKCB_Site23920910_J											
	PRKCB_Site23920921_L											
	PRKCB_Site23920911											
	PRKCB_Site23920919_K											
25	MDM2_W											
	IFNAR1.1_Site33355838_P											
	MDM2_SWX											
	PRKCB_JK											
30	PRKCB_Site23920893_G											
	IFNAR1.1_Site33355840_E											
	PRKCB_Site23920889_F											
	IFNAR1.1_Site33355829_I											
	CAMK1D_AE											
35	IFNAR1.1_Site33355839_L	C24	1226	0,777	[0,717; 0,837]	0,0631	74,9	74,8	75,0	66,7	81,7	N = 239 [143 (1); 96 (2)]
	IFNAR1.1_Site33355793_G											
40	IFNAR1.1_Site33355789_A											
	IFNAR1.1_Site33355801_N											
45	KCNJ15_C											
	IFNAR1.1_Site33355807_B											
	IFNAR1.1_Site33355830_C											
50	MDM2_Site68821586_W											
	PRKCB_Site23920884_D											
	IFNAR1.1_Site33355762_F											
	IFNAR1.1_Site33355763_H											

Cuando introdujimos especificidad por sexo en el análisis y combinamos 32 biomarcadores de edición de los mismos 7 biomarcadores en la población de mujeres (n = 159, de las cuales 90 eran controles sanos y 69 pacientes con BD), el AUC subió a 0,908 (Sp 84,4 %, Se 92,8 %, Figura 11B). De manera similar, cuando se combinaron y se analizaron 50 biomarcadores de edición de los mismos 7 biomarcadores en la población masculina (n = 80, de los cuales 53 eran controles sanos y 27 pacientes con BD), separamos perfectamente los controles sanos y los pacientes con BD, con un AUC de 1 (Sp 100 %, Se 100 %, Figura 11C).

Quando se realizó el mismo análisis entre controles sanos (n = 143) y pacientes eutímicos bipolares (n = 41), con 53 biomarcadores de edición combinados de 6 biomarcadores diferentes, la ROC de AUC fue 0,972 (Sp 95,8 %, Se 95,0 %, Figura 12A)

Cuando introdujimos especificidad por sexo en el análisis y combinamos 41 biomarcadores de edición de los 8 biomarcadores en la población de mujeres (n = 121, de las cuales 90 eran controles sanos y 21 eutímicos bipolares), el AUC subió a 0,997 (Sp 98,9 %, Se 100 %, Figura 12B). De manera similar, cuando se combinaron y se analizaron 35 biomarcadores de edición de 7 biomarcadores en la población masculina (n = 73, de los cuales 53 eran controles sanos y 20 pacientes eutímicos bipolares), también separamos perfectamente los controles sanos y los pacientes con BD, con un AUC de 1 (Sp 100 %, Se 100 %, Figura 12C).

En conjunto, estos datos sugieren que los diferentes biomarcadores del panel de 8 genes seleccionados en las cohortes de validación podrían usarse para diferenciar pacientes con trastorno bipolar depresivos o pacientes eutímicos bipolares de controles sanos con una sensibilidad y una especificidad excelentes.

La depresión bipolar se compone de episodios fluctuantes de depresión y manía. Existen dos tipos principales de trastornos bipolares: el trastorno bipolar I y el trastorno bipolar II, que según el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, quinta edición (DSM5) se diferencian principalmente por la gravedad de los episodios maníacos y la experiencia de un episodio depresivo mayor⁵³. Por lo tanto, buscamos investigar si los biomarcadores seleccionados descritos anteriormente podrían usarse para discriminar entre los dos subtipos de depresión bipolar. De esta forma, analizamos el rendimiento diagnóstico de los biomarcadores identificados en la población de pacientes bipolares, que han sido clasificados por psiquiatras capacitados como BD de tipo I o de tipo II (Figura 24). Cuando analizamos los sitios de edición de toda la población (n = 140, de los cuales 58 eran BD de tipo I y 82 BD de tipo II) y combinamos 28 variantes de edición en 6 BMK, obtuvimos un AUC de 0,898 (Sp 86,2 %; Se 85,4 %, Figura 13A).

En la Tabla 13 se presentan ejemplos de combinaciones sometidas a prueba en toda la población de pacientes bipolares tipo I y tipo II (n = 140). Todas las combinaciones fueron estadísticamente significativas entre el control y los casos con un valor de $p < 10^{-4}$.

Tabla 13: Rendimientos diagnósticos obtenidos con pacientes de toda la población de pacientes bipolares de tipo I y tipo II (n = 140) analizados mediante secuenciación multiplexada de 8 dianas.

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
1	CAMK1D_AGS CAMK1D_AG CAMK1D_ABEG CAMK1D_Site12378375_G LYN_S KCNJ15_AF LYN_M GAB2_BE GAB2_Site78331030 PRKCB_DHIJKM CAMK1D_BF CAMK1D_AE LYN_C CAMK1D_Site12378316_B PRKCB_K CAMK1D_EG MDM2_Site68821643 MDM2_SVWX CAMK1D_Site12378436 GAB2_DEJ PRKCB_A KCNJ15_AE LYN_Site56012555 CAMK1D_ABEGS CAMK1D_Site12378385_A MDM2_Site68821616_X GAB2_DHJ GAB2_DE	C29	8	0,898	[0,844; 0,952]	-0,067	85,7	87,9	84,2	90,8	79,7	N= 140 [58 (1); 82 (2)]

Núm .	Combinación por mROC	Combi .	ID	Curva ROC de AUC	IC 95 %	Umbral	Prec . (%)	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Población
5	2	C29	47	0,898	[0,845; 0,952]	-0,058	85,7	86,2	85,4	89,7	80,7	N= 140 [58 (1); 82 (2)]
10												
15												
20												
25												
30												
35												
40												
45												
50												
55	3	C29	40 8	0,897	[0,843; 0,951]	-0,038	85,7	87,9	84,2	90,8	79,7	N= 140 [58 (1); 82 (2)]
60												
65												
70												
75												
80												
85												
90												
95												
100												

Cuando introdujimos especificidad por sexo en el análisis y combinamos 49 biomarcadores de edición de los 8 biomarcadores del panel en la población de mujeres (n = 88, de las cuales 36 eran BD de tipo I y 52 BD de tipo II), el AUC subió a 0,980 (Sp 97,2 %, Se 94,2 %, Figura 13B). De manera similar, cuando se combinaron y se analizaron 48 biomarcadores de edición de los mismos 8 biomarcadores en la población masculina (n = 52, de los cuales 22 eran BD de tipo I y 30 BD de tipo II), separamos perfectamente los controles sanos y los pacientes con BD, con un AUC de 1 (Sp 100 %, Se 100 %, Figura 13C).

En conjunto, estos datos sugieren que los diferentes biomarcadores del panel de 8 genes seleccionados en las cohortes de validación podrían usarse para diferenciar los dos subtipos del trastorno bipolar con una sensibilidad y una especificidad excelentes.

Referencias

1. Grande I, Berk M, Birmaher B, Vieta E. Bipolar disorder. *Lancet*. 9 de abril de 2016;387(10027):1561-1572.
2. Sharma V, Khan M, Smith A. A closer look at treatment resistant depression: is it due to a bipolar diathesis? *Journal of affective disorders*. febrero de 2005;84(2-3):251-257.
3. Grotegerd D, Suslow T, Bauer J, y col. Discriminating unipolar and bipolar depression by means of fMRI and pattern classification: a pilot study. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. marzo de 2013;263(2):119-131.
4. Sagar R, Pattanayak RD. Potential biomarkers for bipolar disorder: Where do we stand? *The Indian journal of medical research*. enero de 2017;145(1):7-16.
5. Tasic L, Larcerda ALT, Pontes JGM, y col. Peripheral biomarkers allow differential diagnosis between schizophrenia and bipolar disorder. *Journal of psychiatric research*. 23 de septiembre de 2019;119:67-75.
6. Gatsiou A, Vlachogiannis N, Lunella FF, Sachse M, Stellos K. Adenosine-to-Inosine RNA Editing in Health and Disease. *Antioxidants & redox signaling*. 20 de septiembre de 2018;29(9):846-863.
7. Dobin A, Gingeras TR. Optimizing RNA-Seq Mapping with STAR. *Methods in molecular biology*. 2016;1415:245-262.
8. DePristo MA, Banks E, Poplin R, y col. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature genetics*. mayo de 2011;43(5):491-498.
9. John D, Weirick T, Dimmeler S, Uchida S. RNAEditor: easy detection of RNA editing events and the introduction of editing islands. *Briefings in bioinformatics*. 1 de noviembre de 2017;18(6):993-1001.
10. Yang H, Wang K. Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. *Nature protocols*. octubre de 2015;10(10):1556-1566.
11. Tempel S. Using and understanding RepeatMasker. *Methods in molecular biology*. 2012;859:29-51.
12. Kasprzyk A, Keefe D, Smedley D, y col. EnsMart: a generic system for fast and flexible access to biological data. *Genome research*. enero de 2004;14(1):160-169.
13. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*. 4 de marzo de 2012;9(4):357-359.
14. Schneider VA, Graves-Lindsay T, Howe K, y col. Evaluation of GRCh38 and de novo haploid genome assemblies demonstrates the enduring quality of the reference assembly. *Genome research*. mayo de 2017;27(5):849-864.
15. Li H, Handsaker B, Wysoker A, y col. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 15 de agosto de 2009;25(16):2078-2079.
16. Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*. 1 de noviembre de 2011;27(21):2987-2993.
17. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, y col. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology*. 2004;5(10):R80.
18. Linden A. Measuring diagnostic and predictive accuracy in disease management: an introduction to receiver operating characteristic (ROC) analysis. *Journal of evaluation in clinical practice*. abril de 2006;12(2):132-139.
19. Kramar A, Faraggi D, Fortune A, Reiser B. mROC: a computer program for combining tumour markers in predicting disease states. *Computer methods and programs in biomedicine*. septiembre de 2001;66(2-3):199-207.
20. Breiman L. *Random Forests*. Machine Learning. Kluwer Academic Publishers. 2001;45:5-32.
21. Su JQ, Liu JS. Linear Combinations of Multiple Diagnostic Markers. *Journal of the American Statistical Association*. 1993;88(424):1350-1355.
22. Wang H. A note on iterative marginal optimization: a simple algorithm for maximum rank correlation estimation. *Computational Statistics and Data Analysis*. 2007;51:2803-2812.

23. Staack A, Badendieck S, Schnorr D, Loening SA, Jung K. Combined determination of plasma MMP2, MMP9, and TIMP1 improves the non-invasive detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *BMC urology*. 10 de agosto de 2006;6:19.
- 5 24. Blagus R, Lusa L. Class prediction for high-dimensional class-imbalanced data. *BMC bioinformatics*. 20 de octubre de 2010;11:523.
25. Picardi E, Manzari C, Mastropasqua F, Aiello I, D'Erchia AM, Pesole G. Profiling RNA editing in human tissues: towards the inosinome Atlas. *Scientific reports*. 9 de octubre de 2016;5:14941.
- 10 26. Bazak L, Levanon EY, Eisenberg E. Genome-wide analysis of Alu editability. *Nucleic acids research*. junio de 2014;42(11):6876-6884.
27. Consortium GO. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic acids research*. enero de 2015;43(Database issue):D1049-1056.
- 15 28. Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, y col. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic acids research*. Jul 2 2019;47(W1):W191-W198.
- 20 29. Pomaznoy M, Ha B, Peters B. GOnet: a tool for interactive Gene Ontology analysis. *BMC bioinformatics*. 7 de diciembre de 2018;19(1):470.
30. Chimienti F, Cavarec L, Vincent L, y col. Brain region-specific alterations of RNA editing in PDE8A mRNA in suicide decedents. *Translational psychiatry*. 15 de febrero de 2019;9(1):91.
- 25 31. Salvatat N, Van der Laan S, Vire B, y col. RNA editing blood biomarkers for predicting mood alterations in HCV patients. *Journal of neurovirology*. 22 de julio de 2019.
32. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, y col. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*. 8 de enero de 2019;47(D1):D607-D613.
- 30 33. Khandelwal N, Dey SK, Chakravarty S, Kumar A. miR-30 Family miRNAs Mediate the Effect of Chronic Social Defeat Stress on Hippocampal Neurogenesis in Mouse Depression Model. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2019;12:188.
- 35 34. Shelton RC. The molecular neurobiology of depression. *The Psychiatric clinics of North America*. marzo de 2007;30(1):1-11.
- 40 35. Costas J, Gratacos M, Escaramis G, y col. Association study of 44 candidate genes with depressive and anxiety symptoms in post-partum women. *Journal of psychiatric research*. agosto de 2010;44(11):717-724.
36. Colledge M, Snyder EM, Crozier RA, y col. Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. *Neuron*. 30 de octubre de 2003;40(3):595-607.
- 45 37. Liu B, Mink S, Wong KA, y col. PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity. *Nature immunology*. septiembre de 2004;5(9):891-898.
38. Murakami Y, Ishibashi T, Tomita E, y col. Depressive symptoms as a side effect of Interferon-alpha therapy induced by induction of indoleamine 2,3-dioxygenase 1. *Scientific reports*. Jul 20 2016;6:29920.
- 50 39. Brodie EJ, Infantino S, Low MSY, Tarlinton DM. Lyn, Lupus, and (B) Lymphocytes, a Lesson on the Critical Balance of Kinase Signaling in Immunity. *Frontiers in immunology*. 2018;9:401.
40. Hayashi T, Umemori H, Mishina M, Yamamoto T. The AMPA receptor interacts with and signals through the protein tyrosine kinase Lyn. *Nature*. 7 de enero de 1999;397(6714):72-76.
41. Moura-Alves P, Fae K, Houthuys E, y col. AhR sensing of bacterial pigments regulates antibacterial defence. *Nature*. 28 de agosto de 2014;512(7515):387-392.
- 60 42. Song MS, Song SJ, Kim SY, Oh HJ, Lim DS. The tumour suppressor RASSF1A promotes MDM2 self-ubiquitination by disrupting the MDM2-DAXX-HAUSP complex. *The EMBO journal*. Jul 9 2008;27(13):1863-1874.
43. Aleksandrova LR, Phillips AG, Wang YT. Antidepressant effects of ketamine and the roles of AMPA glutamate receptors and other mechanisms beyond NMDA receptor antagonism. *Journal of psychiatry & neuroscience: JPN*. junio de 2017;42(4):222-229.
- 65

44. Verploegen S, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. Identification and characterization of CKLiK, a novel granulocyte Ca(++)/calmodulin-dependent kinase. *Sangre*. 1 de noviembre de 2000;96(9):3215-3223.
- 5 45. Lin E, Kuo PH, Liu YL, Yu YW, Yang AC, Tsai SJ. A Deep Learning Approach for Predicting Antidepressant Response in Major Depression Using Clinical and Genetic Biomarkers. *Frontiers in psychiatry*. 2018;9:290.
46. Zhou X, Chen Y, Mok KY, y col. Identification of genetic risk factors in the Chinese population implicates a role of immune system in Alzheimer's disease pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 20 de febrero de 2018;115(8):1697-1706.
- 10 47. Beurel E, Lowell JA. Th17 cells in depression. *Brain, behavior, and immunity*. marzo de 2018;69:28-34.
48. Fischer EH, Charbonneau H, Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science*. Jul 26 1991;253(5018):401-406.
- 15 49. Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, y col. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature*. 18 de enero de 2001;409(6818):349-354.
- 20 50. Basterzi AD, Yazici K, Buturak V, y col. Effects of venlafaxine and fluoxetine on lymphocyte subsets in patients with major depressive disorder: a flow cytometric analysis. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 1 de febrero de 2010;34(1):70-75.
51. Aston C, Jiang L, Sokolov BP. Transcriptional profiling reveals evidence for signaling and oligodendroglial abnormalities in the temporal cortex from patients with major depressive disorder. *Molecular psychiatry*. marzo de 2005;10(3):309-322.
- 25 52. Seney ML, Huo Z, Cahill K, y col. Opposite Molecular Signatures of Depression in Men and Women. *Biological psychiatry*. Jul 1 2018;84(1):18-27.
- 30 53. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5ª ed. Washington, DC. 2013.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano a partir de una muestra biológica de dicho paciente, comprendiendo dicho método:

a) determinar, para una combinación de al menos dos ARN de edición de A a I:

-para cada biomarcador seleccionado, la proporción relativa de edición de ARN en un sitio de edición dado para al menos uno o una combinación de sitios que se pueden editar en el transcrito de ARN de dichos al menos dos biomarcadores, y/o
 -el porcentaje relativo de una isoforma o de una combinación de isoformas del transcrito de ARN de cada uno de dichos dos biomarcadores;
 en donde dichos al menos dos biomarcadores de ARN de edición de A a I se seleccionan del grupo que consiste en los biomarcadores MDM2, PRKCB, PIAS1, IFNAR1, LYN, AHR, RASSF1, GAB2, CAMK1D, IL17RA, PTPRC, KCNJ15, IFNAR2 y PDE8A;

b) determinar un valor de resultado obtenido para cada uno de dichos al menos dos biomarcadores y un valor de resultado final basándose en un algoritmo o ecuación que incluye el valor de resultado obtenido para cada biomarcador seleccionado;

c) determinar si dicho valor de resultado obtenido en la etapa b) es mayor o no es mayor que un valor de control obtenido para un sujeto unipolar de control, en donde el valor de control se determinó de una manera comparable a la del valor de resultado; y

d) si dicho valor de resultado obtenido para el paciente es mayor que un umbral, clasificar a dicho paciente como que tiene trastorno bipolar o, si dicho valor de resultado no es mayor que dicho umbral, clasificar a dicho paciente como que tiene depresión unipolar.

2. El método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano según la reivindicación 1, en donde en la etapa b), dichos al menos dos biomarcadores de ARN de edición de A a I se seleccionan del grupo que consiste en MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A.

3. El método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano según una de las reivindicaciones 1 y 2, en donde en la etapa b),

el valor de resultado o valor de resultado final, se calcula mediante un algoritmo que implementa un método multivariante que incluye:

-programa mROC, en particular para identificar la combinación lineal, que maximiza la curva ROC de AUC (área bajo la curva) y en donde se proporciona la ecuación para la combinación respectiva y se puede usar como un nuevo marcador virtual Z, de la siguiente manera:

$$Z = a.(\text{Biomarcador 1}) + b.(\text{Biomarcador 2}) + \dots i.(\text{Biomarcador } i) + \dots n.(\text{Biomarcador } n)$$

donde i son coeficientes calculados y (Biomarcador i) son el nivel del biomarcador considerado (es decir, el nivel del sitio de edición de ARN o de isoformas para una diana/biomarcador dado); y/o

-un enfoque de bosques aleatorios (RF) aplicado para evaluar los sitios de edición de ARN y/o combinaciones de isoformas, en particular para clasificar la importancia del/de los sitio(s) de edición de ARN y/o isoforma(s), y para combinar el/los mejor(es) sitio(s) de edición de ARN y/o isoforma(s), y/u opcionalmente

-un análisis multivariante aplicado para evaluar el/los sitio(s) de edición de ARN y/o combinaciones de isoformas para el diagnóstico, seleccionándose dicho análisis multivariante, por ejemplo, del grupo que consiste en:

-modelo de regresión logística aplicado para análisis univariante y multivariante para estimar el riesgo relativo de un paciente a diferentes valores de nivel de sitio de edición de ARN o de isoformas;

-enfoque CART (árboles de clasificación y regresión) aplicado para evaluar combinaciones de sitio(s) de edición de ARN y/o isoformas; y/o

-enfoque de máquina de vectores de soporte (SVM);

-enfoque de red neuronal artificial (ANN);

-enfoque de red bayesiana;

-enfoque de WKNN (k vecinos más cercanos ponderados);

-mínimos cuadrados parciales - análisis discriminante (PLS-DA);

-análisis discriminante lineal y cuadrático (LDA/ QDA), y

-cualquier otro método matemático que combina biomarcadores

4. El método de una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho trastorno de depresión unipolar es principalmente un episodio depresivo mayor (DEP).
5. El método de una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha muestra biológica es sangre completa, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo o saliva, prefiriéndose la muestra de sangre completa.
6. El método de una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde para cada biomarcador seleccionado, dicho valor de resultado es estadística/específicamente diferente de dicho valor de resultado de control a $p < 0,05$.
7. El método de una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde han de satisfacerse los siguientes criterios para el biomarcador o la combinación de biomarcadores seleccionados en la etapa a):
 - la cobertura > 30 ;
 - AUC $> 0,8$;
 - $0,95 > \text{Múltiplo de variación} > 1,05$, y
 - $p < 0,05$.
8. El método de una de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho(s) biomarcador(es) de ARN de edición de A a I seleccionado(s) comprendido(s) en la etapa a) se selecciona(n) del grupo que consiste en: una combinación que comprende al menos 3, 4, 5, 6 o 7 de los siguientes biomarcadores: MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A, preferiblemente la combinación de los 8 biomarcadores citados.
9. El método de una de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho(s) biomarcador(es) de ARN de edición de A a I seleccionado(s) comprende(n) en la etapa a) la combinación de los siguientes 5 biomarcadores: GAB2, IFNAR1, KCNJ15, MDM2 y PRKCB.
10. El método de una de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho(s) biomarcador(es) de ARN de edición de A a I seleccionado(s) comprende(n) en la etapa a) la combinación de los siguientes 5 biomarcadores: GAB2, IFNAR1, KCNJ15, MDM2 y PRKCB y al menos otro biomarcador seleccionado del grupo que consiste en los siguientes biomarcadores: CAMK1D y LYN, preferiblemente la combinación de los siguientes 6 biomarcadores: GAB2, IFNAR1, KCNJ15, MDM2, PRKCB y LYN cuando el modelo se ajusta por edad, sexo, tratamiento psiquiátrico y adicción, o preferiblemente los siguientes 6 biomarcadores: GAB2, IFNAR1, KCNJ15, MDM2, PRKCB y CAMK1D cuando el modelo se ajusta por edad y sexo.
11. El método de una de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho uno o combinación de al menos 2, 3, 4, 5, 6 o 7 biomarcadores seleccionados comprende el cálculo del porcentaje relativo de al menos uno del sitio de edición de ARN o isoforma enumerados en la Tabla 2A (sitios de edición), 2B (isoformas) u 11 (sitios de edición) para cada uno de los biomarcadores seleccionados.
12. El método de una de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicha combinación de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 biomarcadores seleccionados se selecciona de las combinaciones de biomarcadores proporcionadas en la Tabla 12 y 13, preferiblemente las combinaciones que comprenden los siguientes 8 biomarcadores MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A.
13. El método de una de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el algoritmo o la ecuación que permite el cálculo del valor de resultado o puntuación de depresión Z se seleccionan de las ecuaciones de Z enumeradas en los ejemplos, preferiblemente la ecuación implementa una combinación de los siguientes 8 biomarcadores MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A.
14. Un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano según una de las reivindicaciones 1 a 11, en donde si el paciente que se va a analizar es una mujer, en la etapa a) dicho al menos uno o combinación de al menos dos biomarcador(es) de ARN de edición de A a I se selecciona(n) del grupo de biomarcadores que consiste en los biomarcadores MDM2, PRKCB, PIAS1, IFNAR1, LYN, AHR, RASSF1, GAB2, CAMK1D, IL17RA, PTPRC, KCNJ15, IFNAR2 y PDE8A, preferiblemente las combinaciones de biomarcadores o la ecuación de Z proporcionadas en los ejemplos o figuras con pacientes de la población femenina, más preferiblemente las combinaciones que comprenden los 8 biomarcadores MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A, más preferiblemente las combinaciones enumeradas en la Tabla 6.
15. Un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano según una de las reivindicaciones 1 a 13, en donde si el paciente que se va a analizar es un hombre, en la etapa a) dicho al menos uno o combinación de al menos dos biomarcador(es) de ARN de edición de A a I se selecciona(n) del grupo de biomarcadores que consiste en los biomarcadores MDM2, PRKCB, PIAS1, IFNAR1, LYN, AHR, RASSF1, GAB2, CAMK1D, IL17RA, PTPRC, KCNJ15, IFNAR2 y PDE8A, preferiblemente las combinaciones de biomarcadores o la ecuación de Z proporcionadas en los ejemplos o figuras con pacientes de la población masculina, más preferiblemente las combinaciones que comprenden

los 8 biomarcadores MDM2, PRKCB, IFNAR1, LYN, GAB2, CAMK1D, KCNJ15 y PDE8A, más preferiblemente las combinaciones enumeradas en la Tabla 7.

- 5 16. Un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano, en donde dicho método comprende el método para el diagnóstico de depresión para un paciente humano según una de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la combinación de biomarcadores y/o la ecuación de Z asociada con dicha combinación usada para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano es diferente si el paciente que se va a analizar es una mujer o un hombre.
- 10 17. El método de una de las reivindicaciones 1 a 16, en donde en la etapa a) se miden la proporción relativa de edición de ARN en una edición dada y/o el porcentaje de una isoforma mediante NGS en dicha muestra biológica.
- 15 18. El método de una de las reivindicaciones 1 a 17, en donde en la etapa a), la secuencia de amplicón/nucleica usada para la detección de los sitios de edición de ARN y/o las isoformas del transcrito de ARN de dicho biomarcador se obtiene o se puede obtener con:
 - el conjunto de cebadores enumerados en la tabla 1 para cada uno de los biomarcadores seleccionados (Id. de sec. n.º 1 a 36), o
 - 20 -un conjunto o una combinación de conjuntos de cebadores que permiten obtener un amplicón/amplicones que incluye(n), o es/son idéntico(s) al/a los amplicón/amplicones que se puede(n) obtener mediante el conjunto de cebadores enumerados en la Tabla 1 9 (Id. de sec. n.º 1 a la Id. de sec. n.º 36).
- 25 19. Un método para monitorizar el tratamiento para el trastorno bipolar o la depresión unipolar en un paciente humano, comprendiendo dicho método:
 - A) diagnosticar de manera diferencial el trastorno bipolar o la depresión unipolar en dicho ser humano mediante el método según una de las reivindicaciones 1 a 18 antes del inicio del tratamiento que se desea monitorizar.
 - 30 B) repetir las etapas (a) a c) del método de una de las reivindicaciones 2 a 18, después de un período de tiempo durante el cual dicho paciente recibió tratamiento para dicho trastorno bipolar o depresión unipolar, para obtener un valor de resultado postratamiento;
 - C) comparar el valor de resultado postratamiento de la etapa (c) con:
 - 35 -el valor de resultado obtenido antes del período de tiempo durante el cual dicho paciente recibe tratamiento para dicho trastorno bipolar o depresión unipolar, y
 - el valor de resultado (valor final de control) para pacientes con trastorno bipolar o depresión unipolar de control, y
 - 40 clasificar dicho tratamiento como efectivo si el valor de resultado postratamiento obtenido en la etapa B) es más cercano al valor de resultado obtenido antes del período de tiempo durante el cual dicho paciente recibe tratamiento para pacientes con trastorno bipolar o depresión unipolar de control.
- 45 20. Un método para determinar si un paciente responderá a un tratamiento para el trastorno bipolar que permite que el paciente se encuentre en un estado eutímico (estado de ánimo normal) a partir de una muestra de sangre de dicho paciente, comprendiendo dicho método la etapa de:
 - A) diagnosticar de manera diferencial el trastorno bipolar para dicho ser humano mediante el método según una de las reivindicaciones 1 a 18 antes del inicio del tratamiento que se desea monitorizar.
 - 50 B) repetir las etapas (a) a c) del método de una de las reivindicaciones 2 a 18, después de un período de tiempo durante el cual dicho paciente recibió tratamiento para dicho trastorno bipolar, para obtener un valor de resultado postratamiento;
 - C) comparar el valor de resultado postratamiento de la etapa (c) con:
 - 55 -el valor de resultado obtenido antes del período de tiempo durante el cual dicho paciente recibe tratamiento para dicho trastorno bipolar, y
 - el valor de resultado (valor final de control) para pacientes con trastorno bipolar de control que se encuentran en un estado eutímico, y
 - 60 clasificar a dicho paciente como paciente que responde al tratamiento si el valor de resultado postratamiento obtenido en la etapa B) es más cercano al valor de resultado obtenido antes del período de tiempo durante el cual dicho paciente recibe tratamiento para pacientes con trastorno bipolar de control que se encuentran en un estado eutímico.
- 65 21. Kit para diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y unipolar, en un paciente humano, comprendiendo dicho kit:

- 5 1)- opcionalmente, instrucciones para aplicar el método según una de las reivindicaciones 1 a 18, con el fin de obtener el valor de resultado cuyo análisis determina si dicho paciente presenta un trastorno bipolar o depresión unipolar; y
- 2)i) una combinación de al menos dos pares de cebadores seleccionados del grupo de cebadores que consiste en la Id. de sec. n.º 1 a la Id. de sec. n.º 36 y, cuya selección depende del/de los biomarcador(es) usado(s) para el diagnóstico diferencial de trastorno bipolar y depresión unipolar en un paciente humano;
- 10 o
- ii) una combinación de al menos dos pares de cebadores que permiten obtener los amplicones idénticos a los amplicones obtenidos mediante los al menos dos pares de cebadores seleccionados en i).

Figura 1A

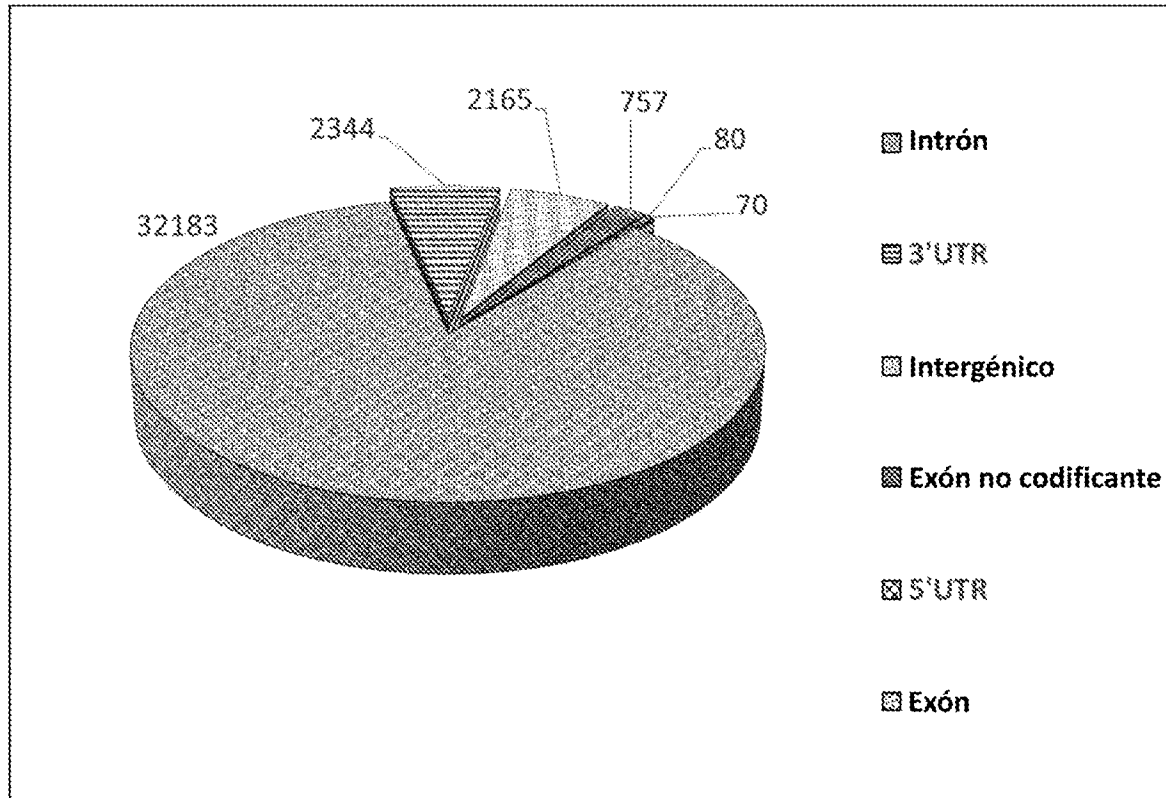


Figura 1B

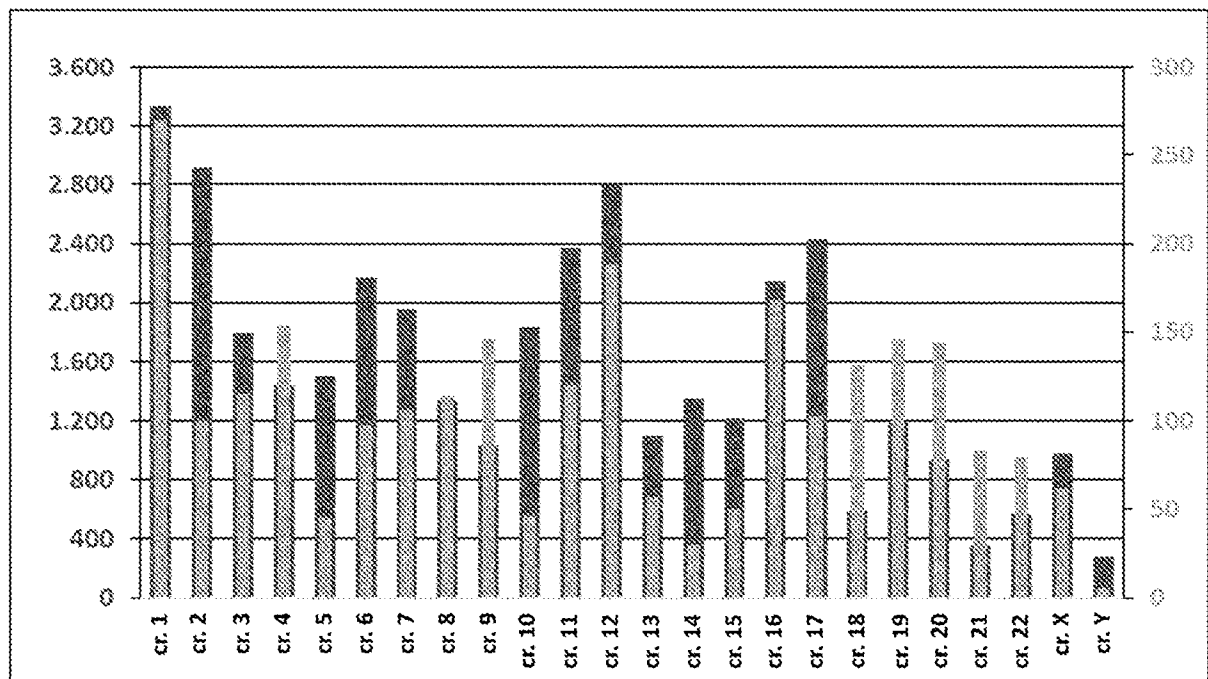


Figura 1C

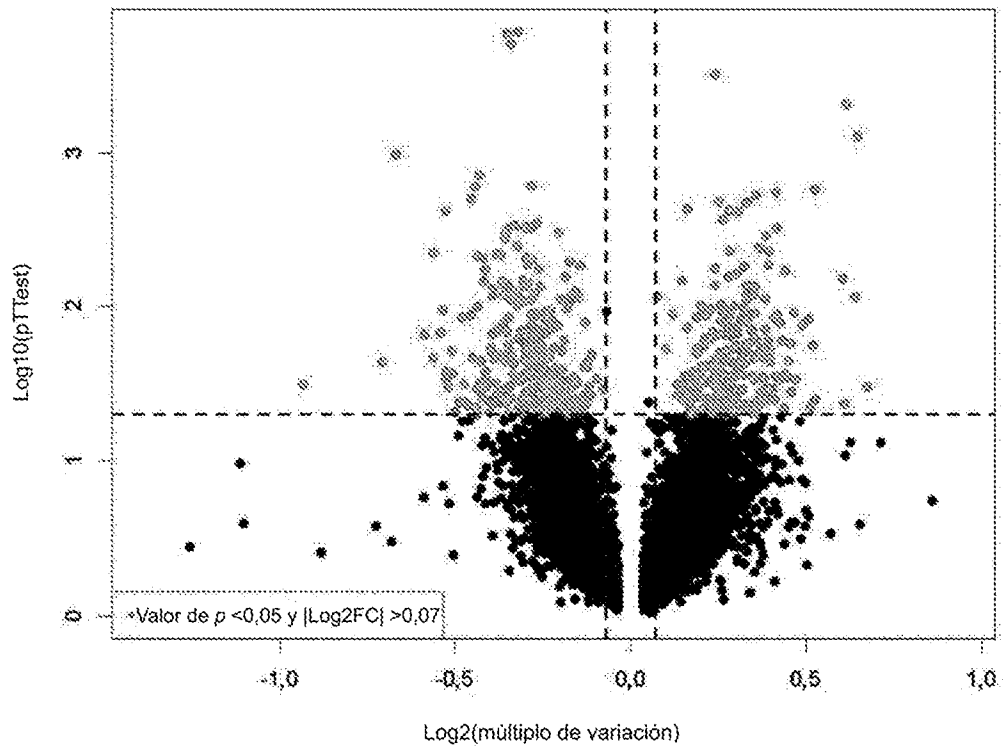


Figura 1D

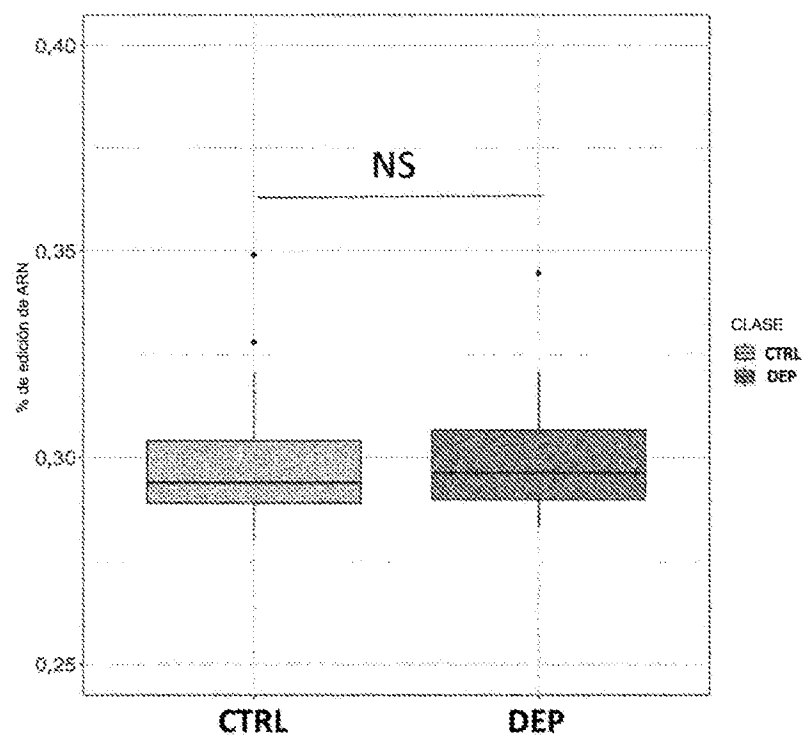


Figura 2

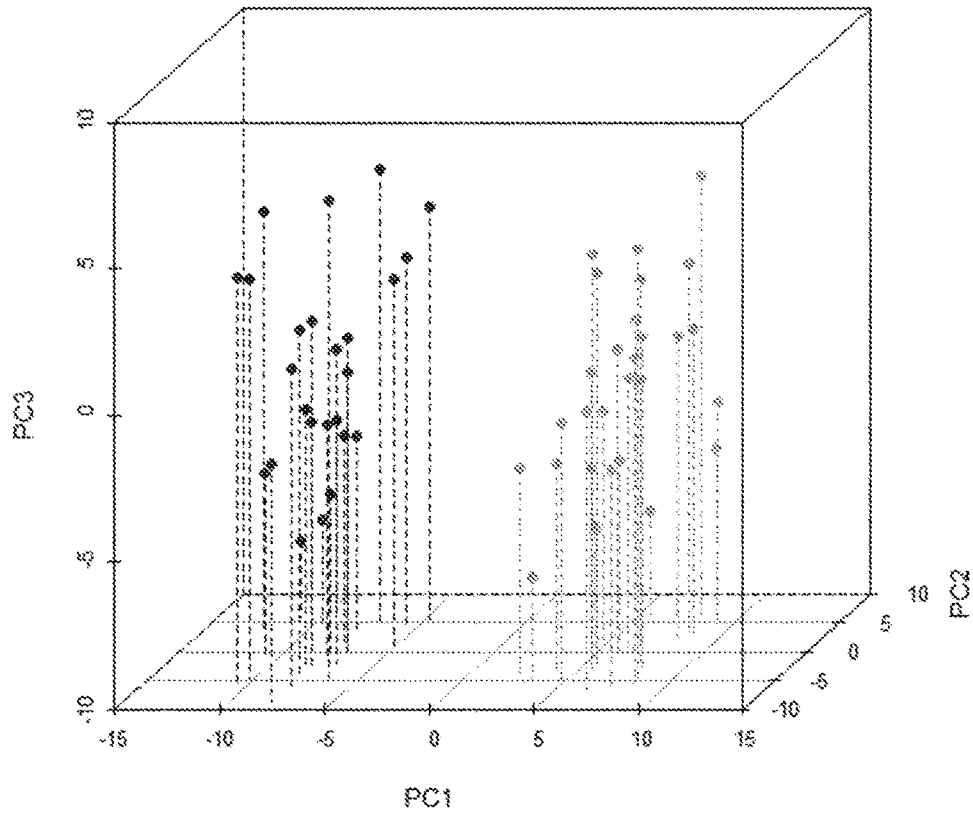


Figura 3

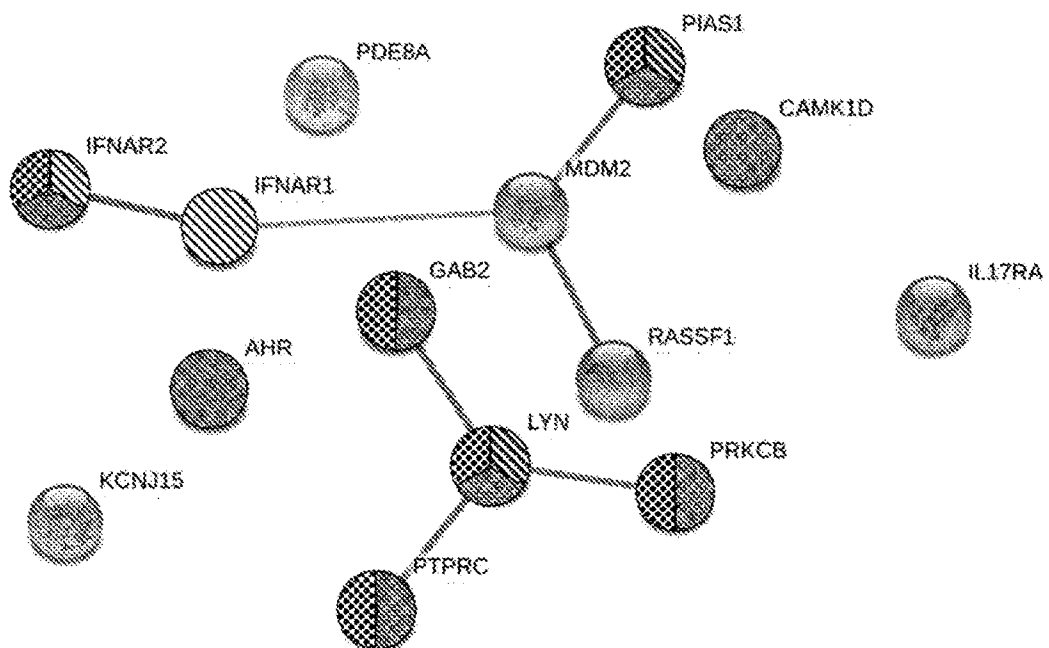


Figura 4A

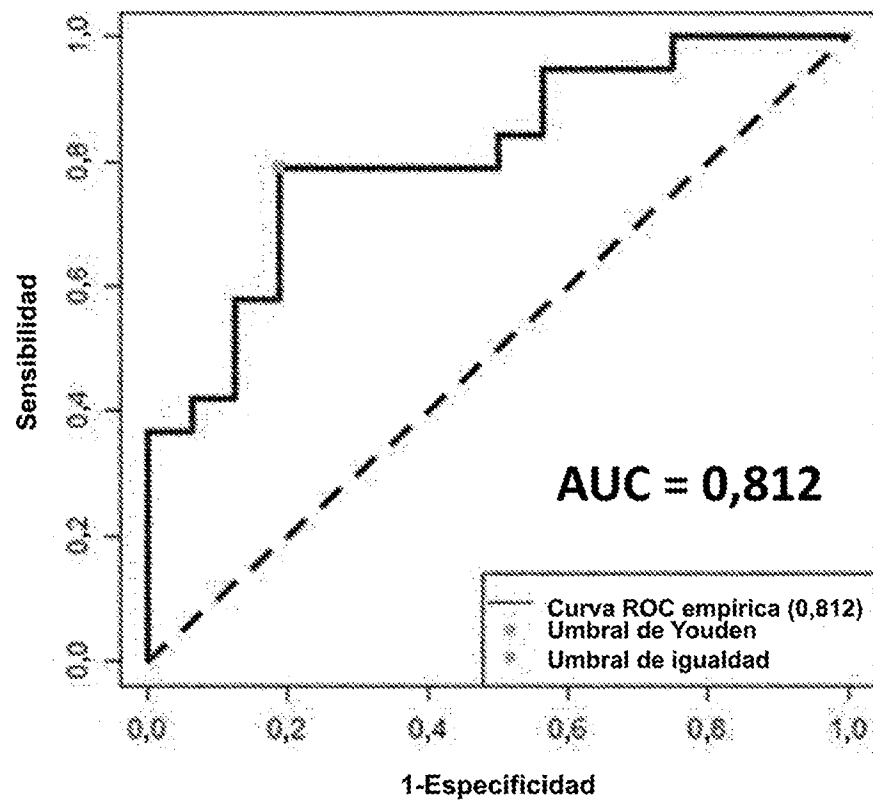


Figura 4B

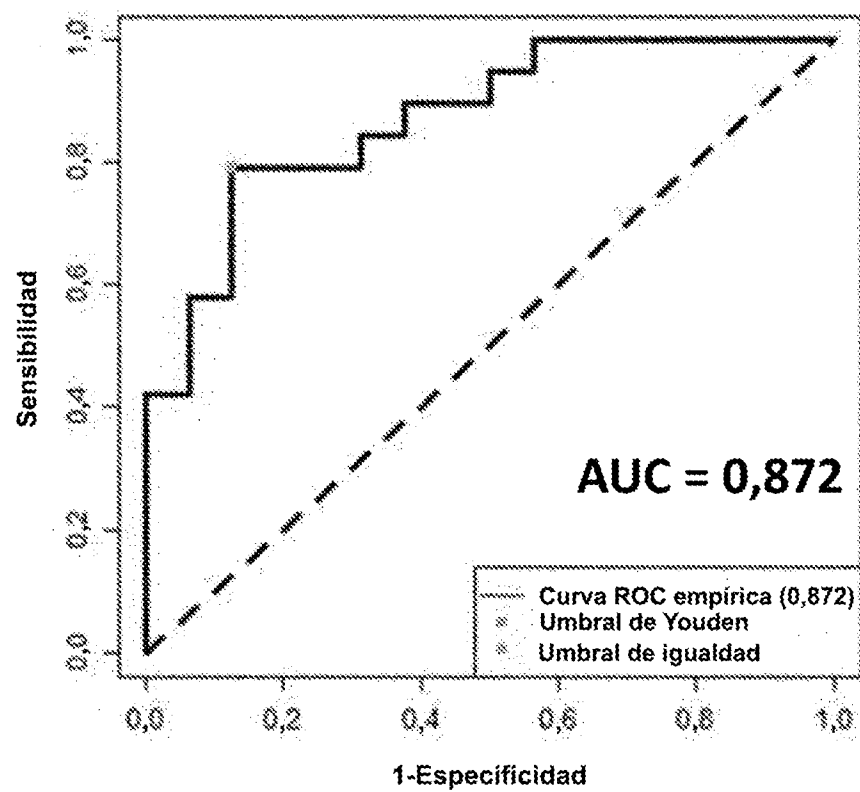


Figura 4C

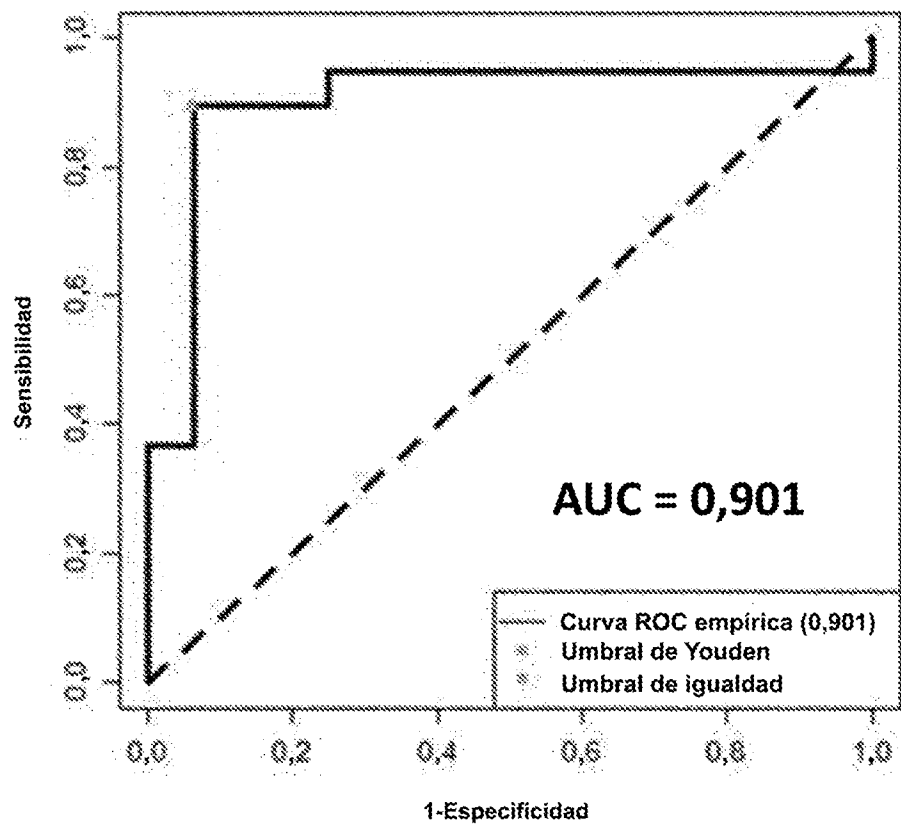


Figura 4D

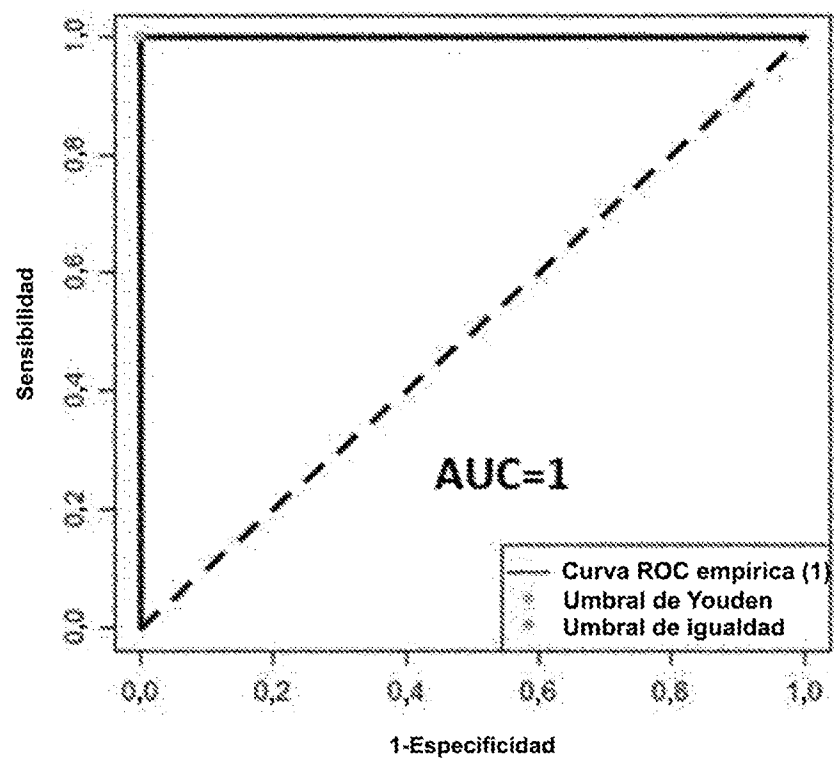


Figura 5A

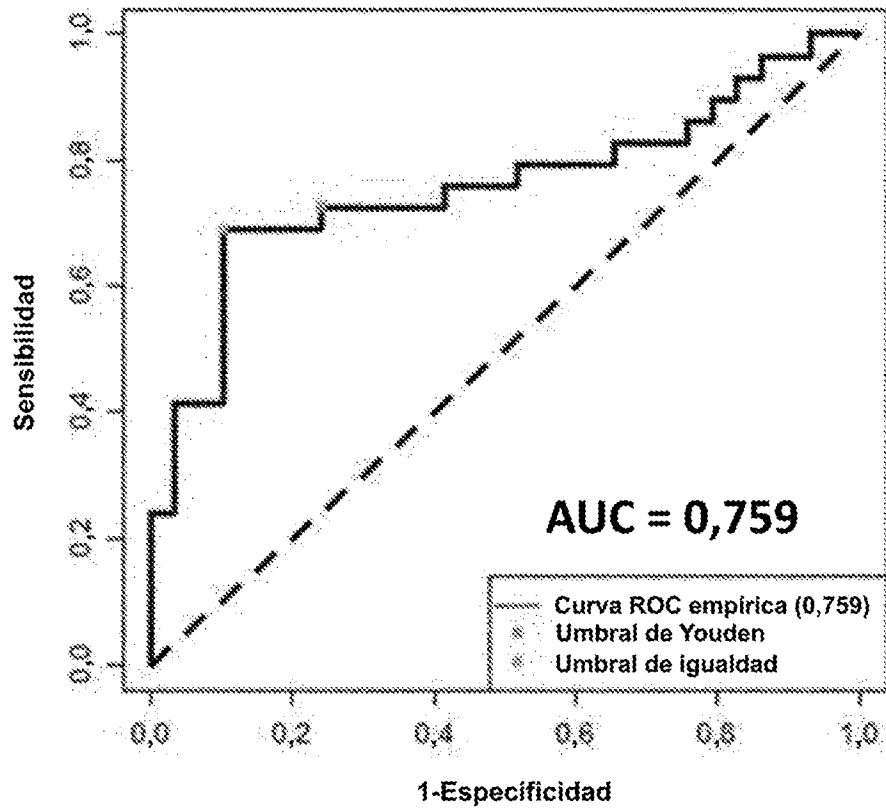


Figura 5B

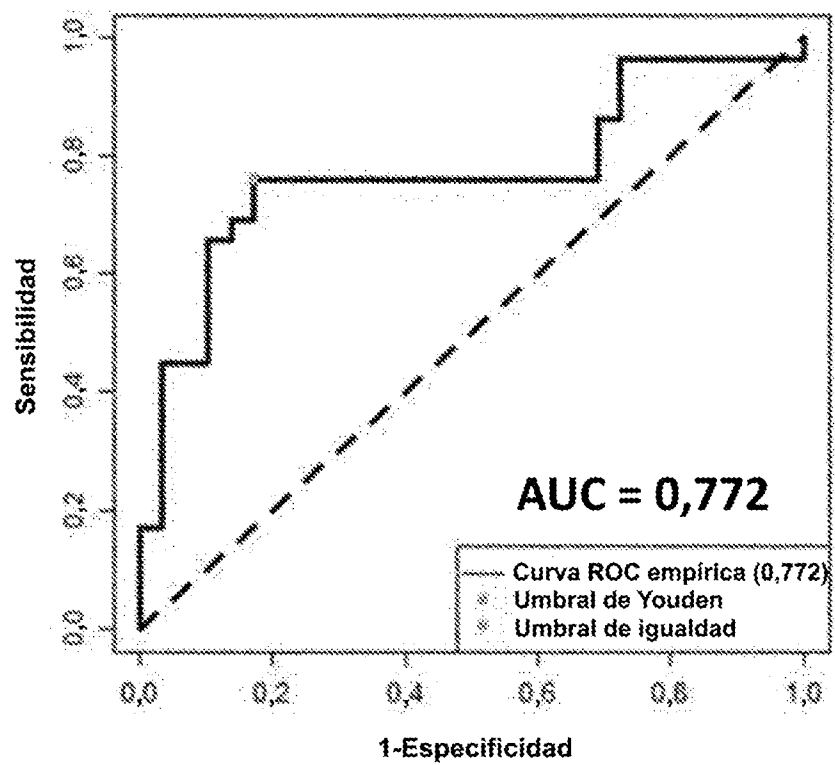


Figura 5C

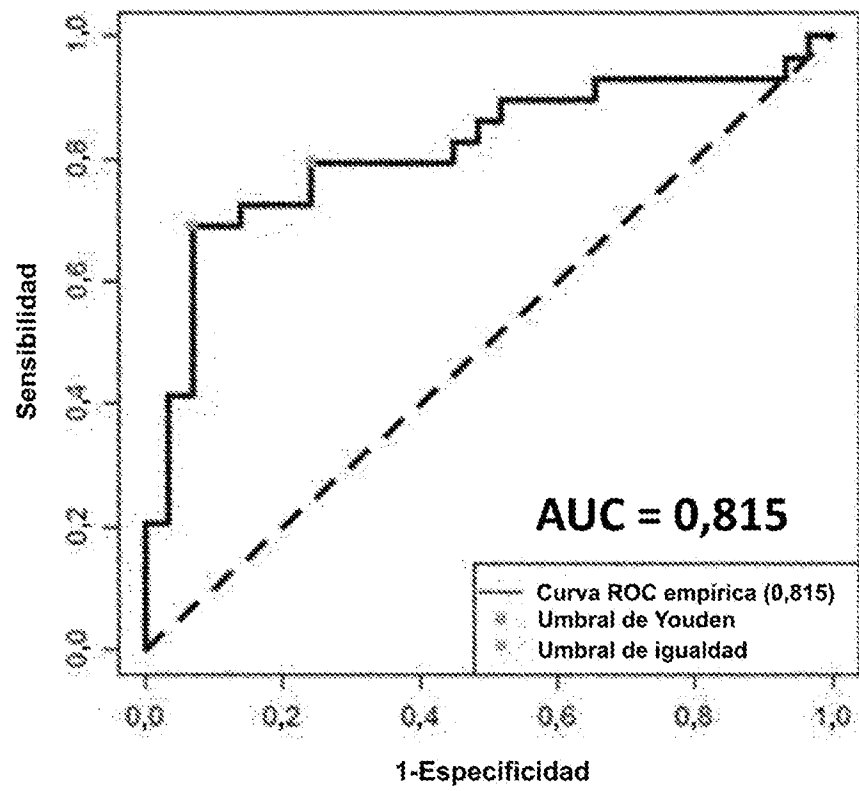


Figura 5D

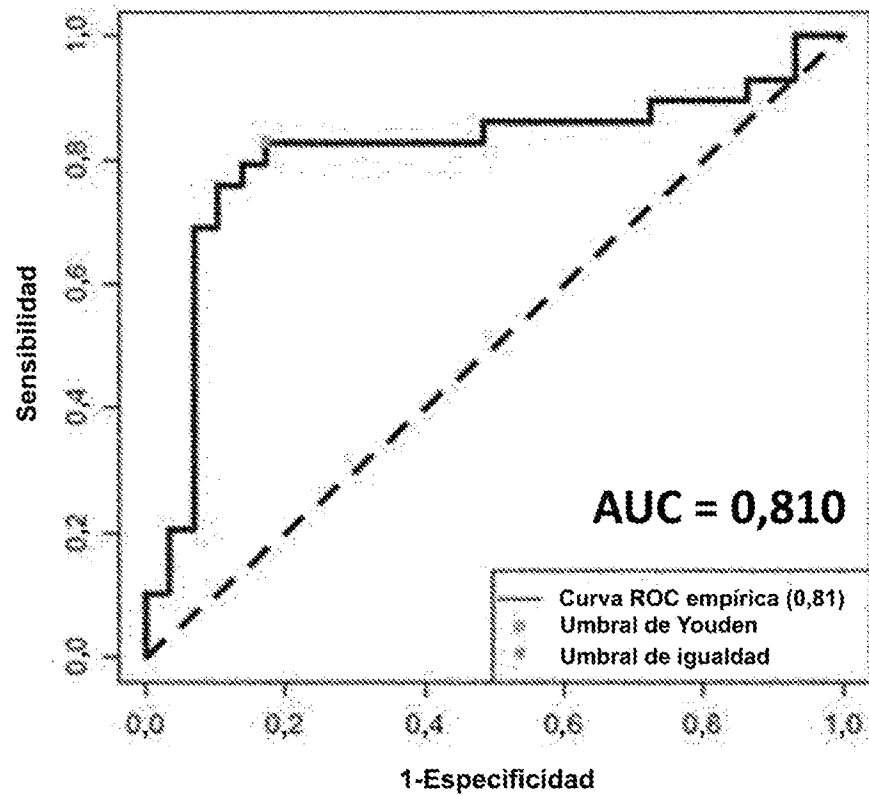


Figura 5E

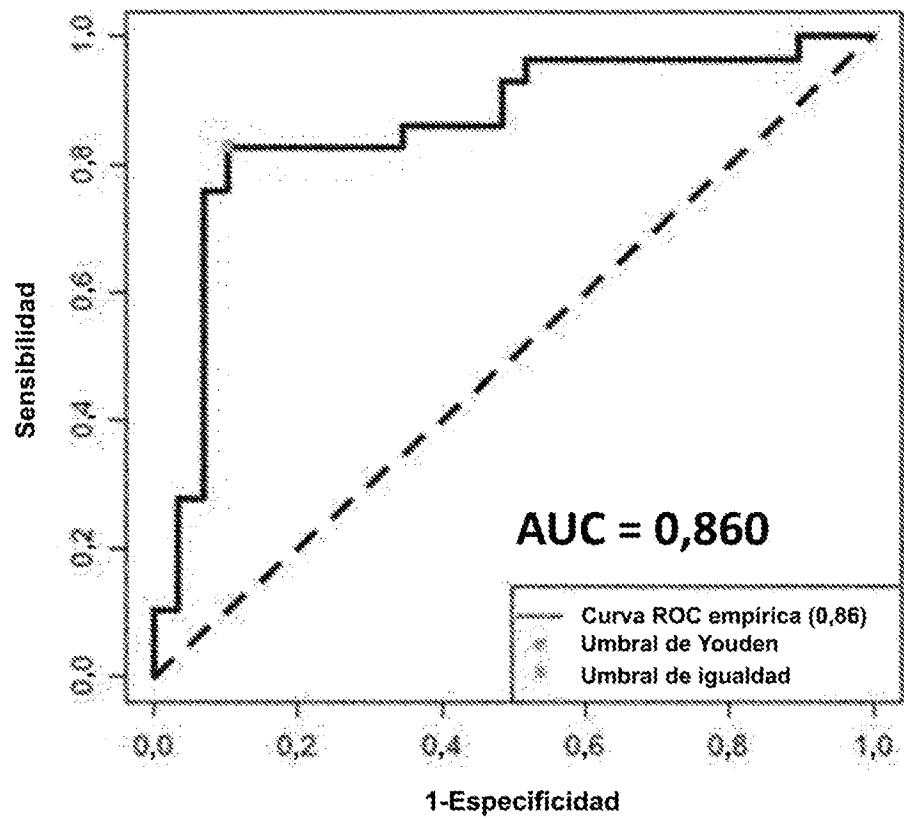


Figura 6A

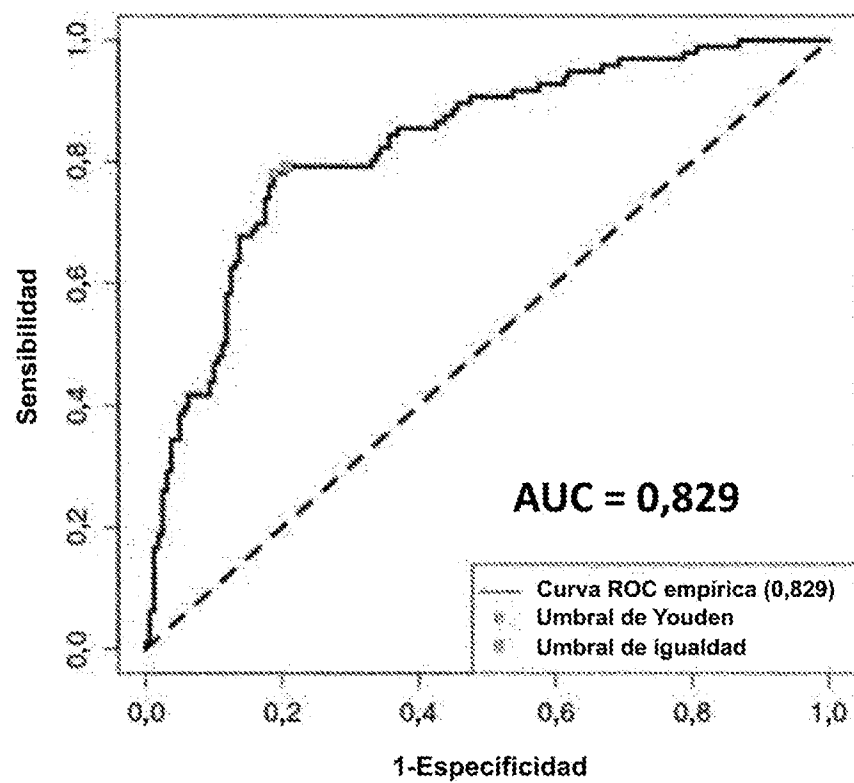


Figura 6B

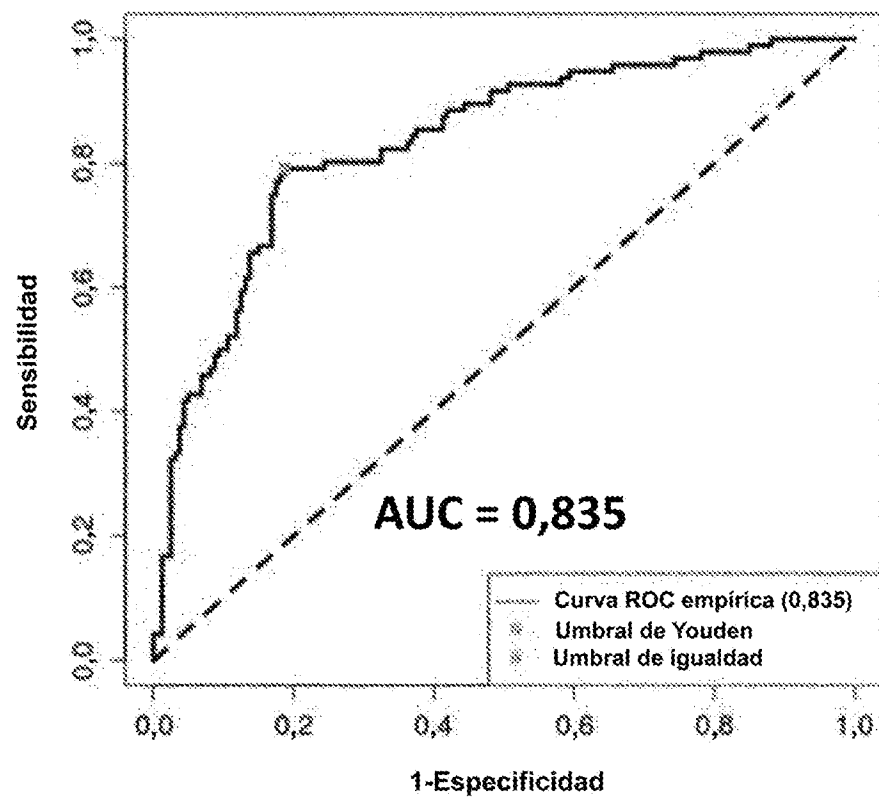


Figura 6C

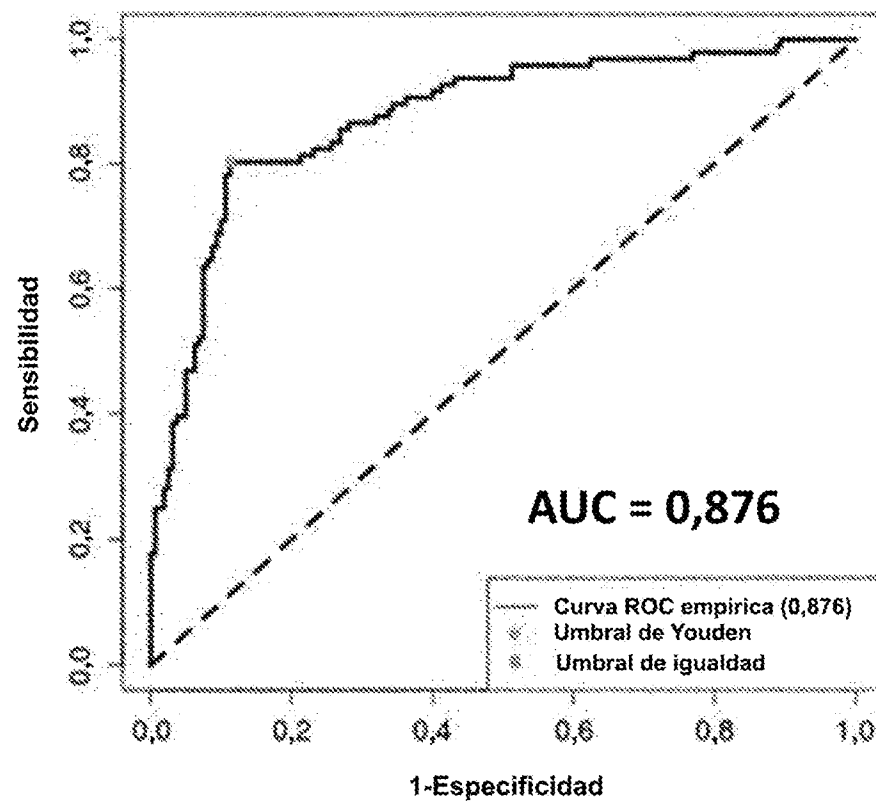


Figura 7A

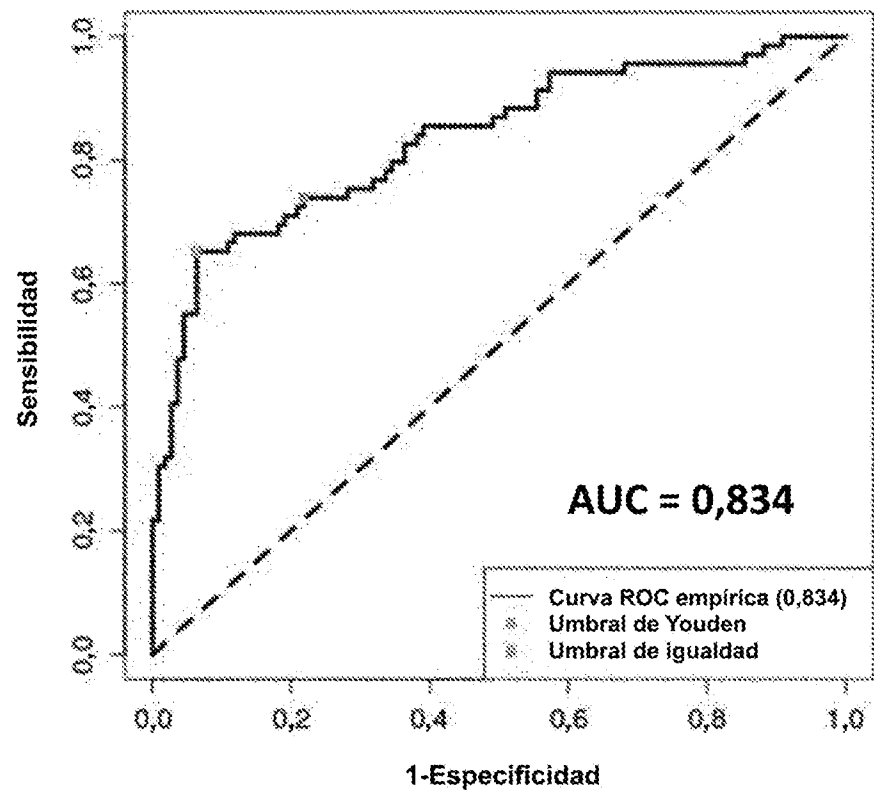


Figura 7B

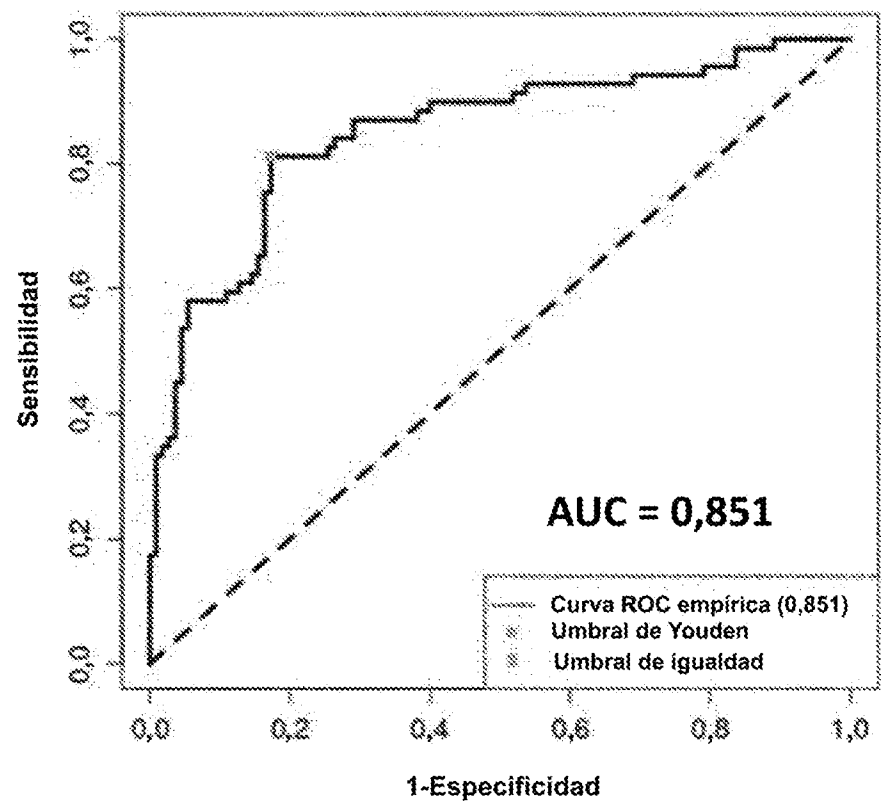


Figura 7C

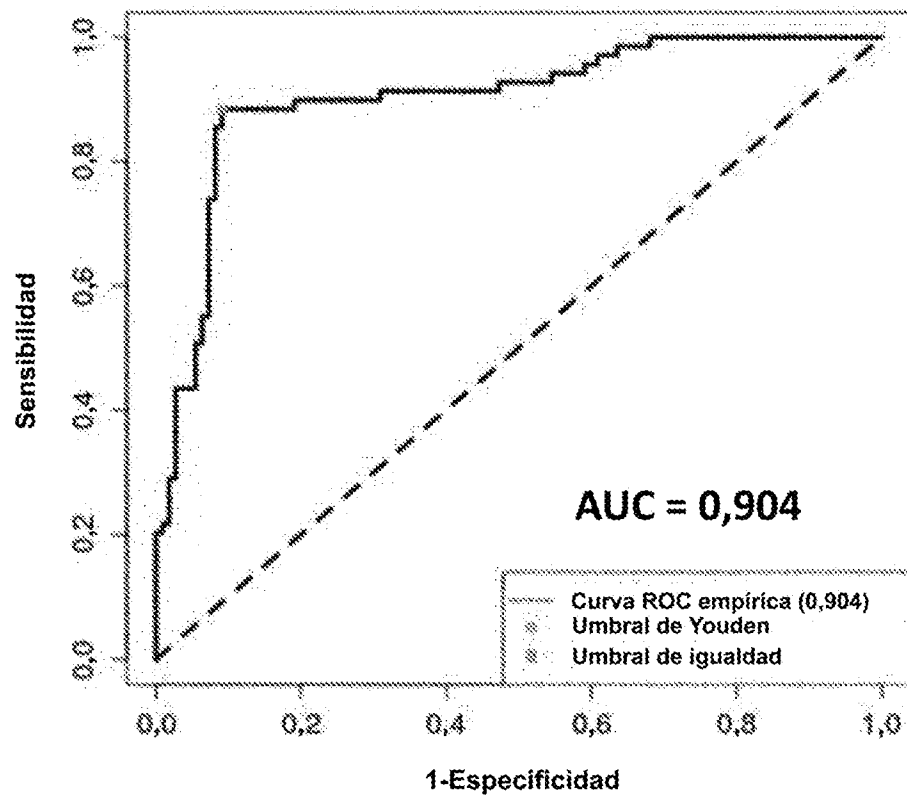


Figura 7D

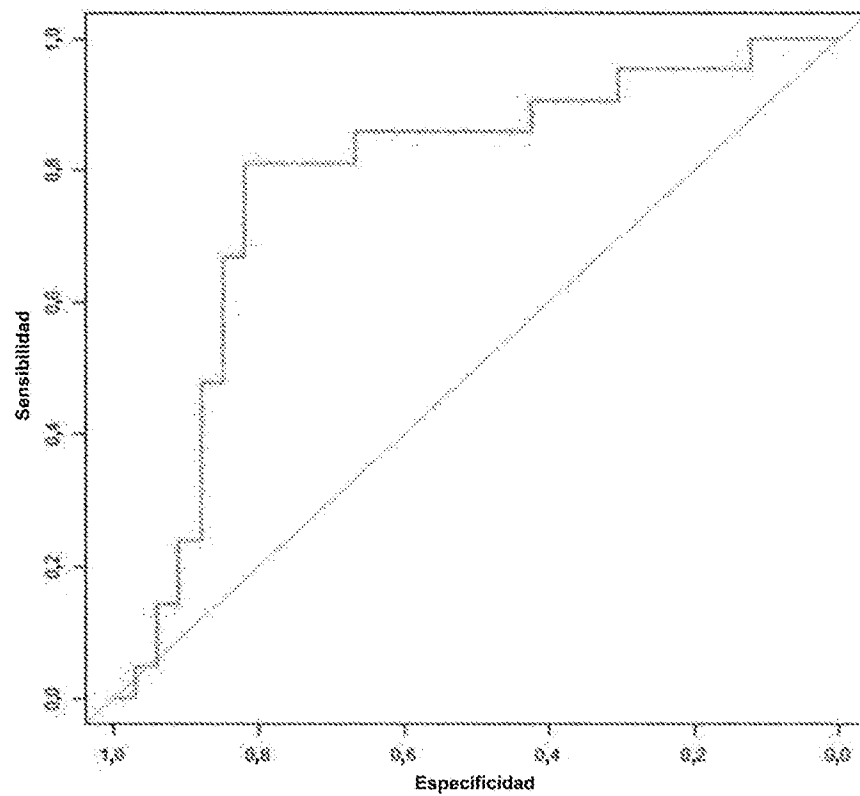


Figura 7E

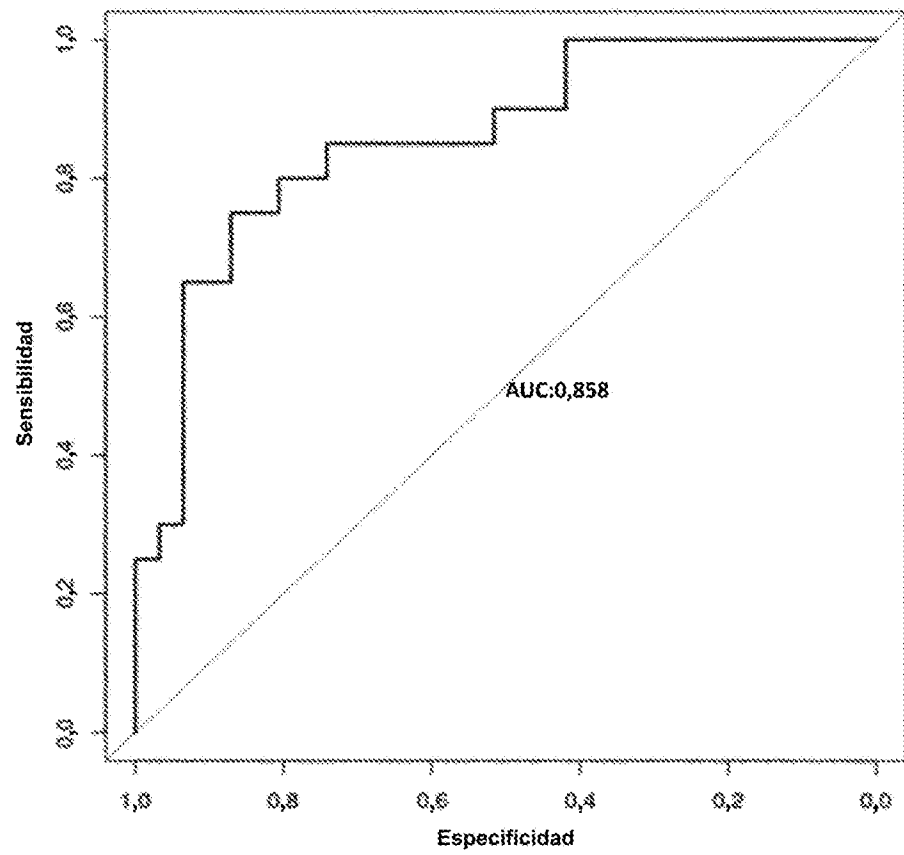


Figura 8A

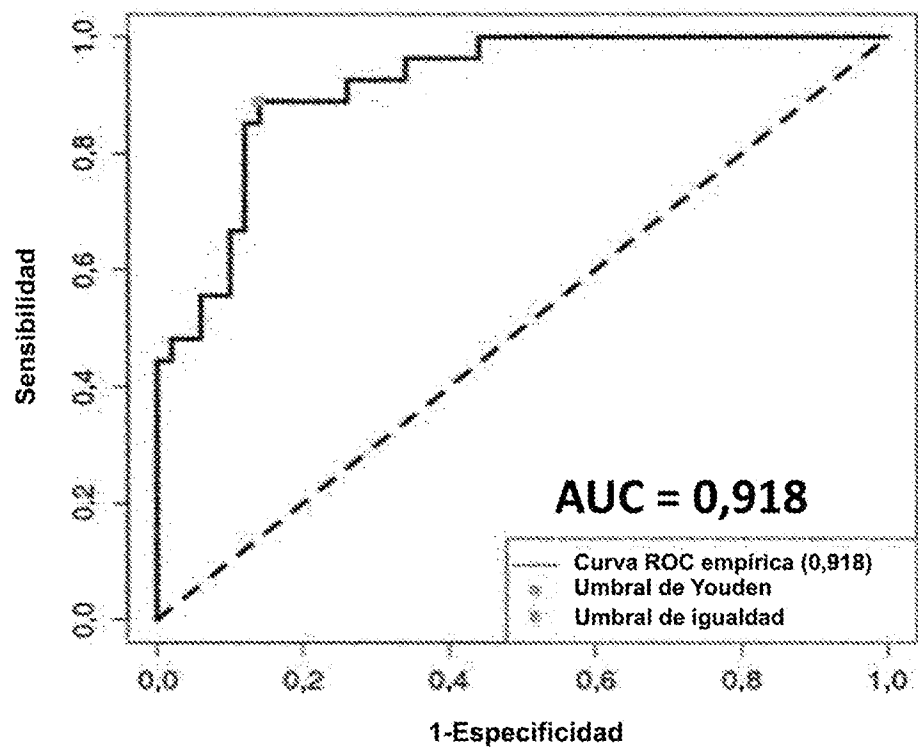


Figura 8B

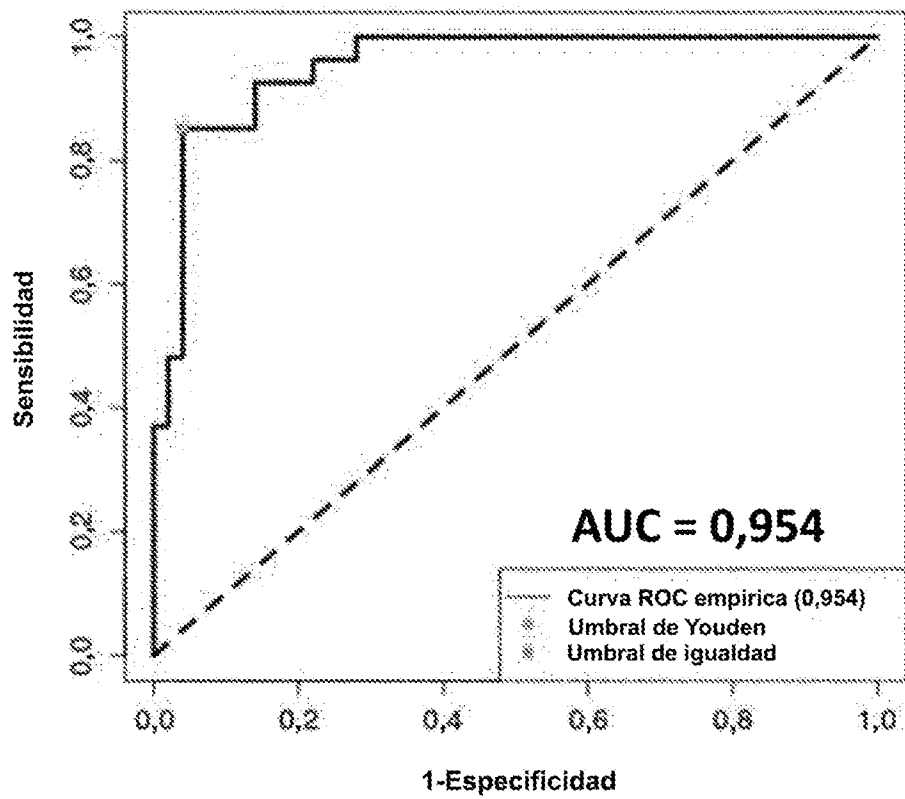


Figura 8C

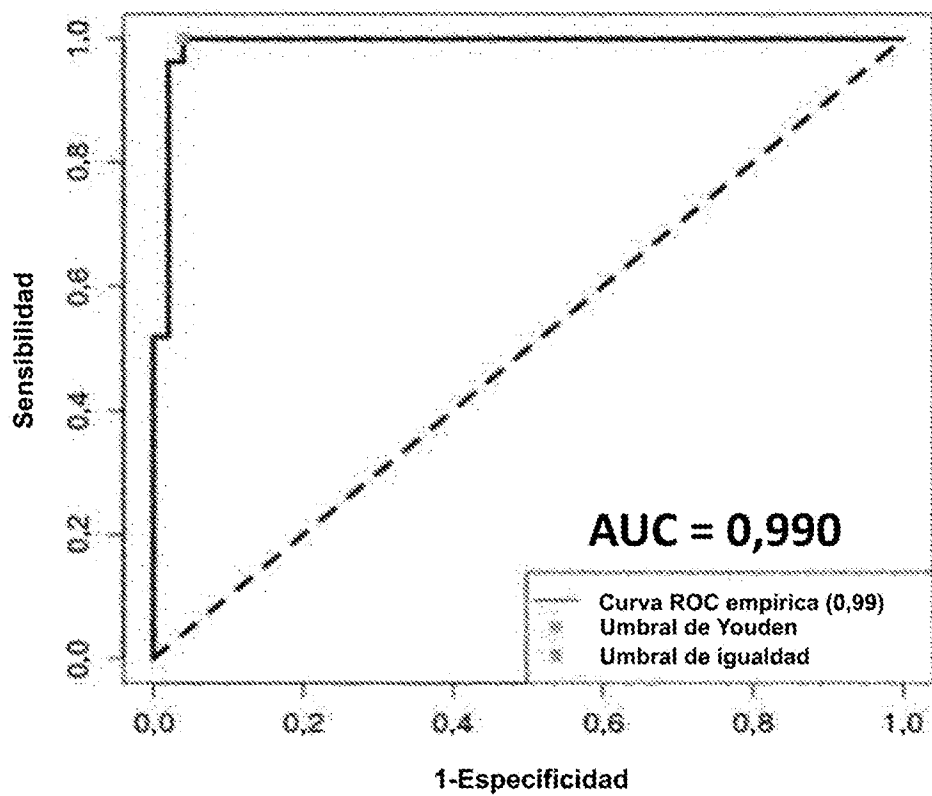


Figura 8D

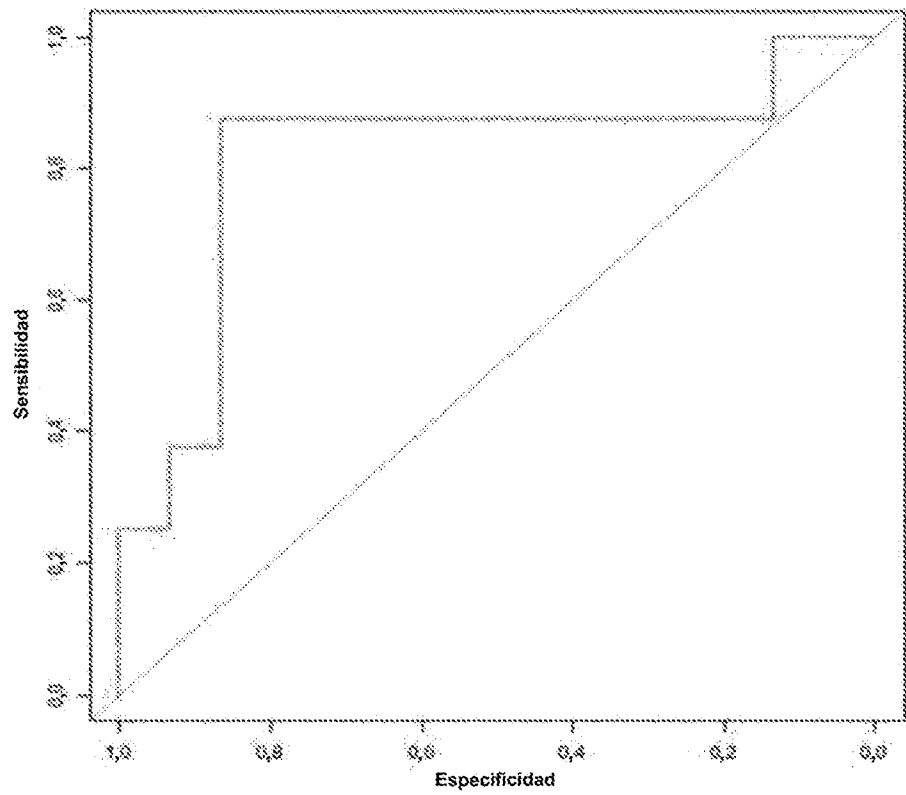


Figura 8E

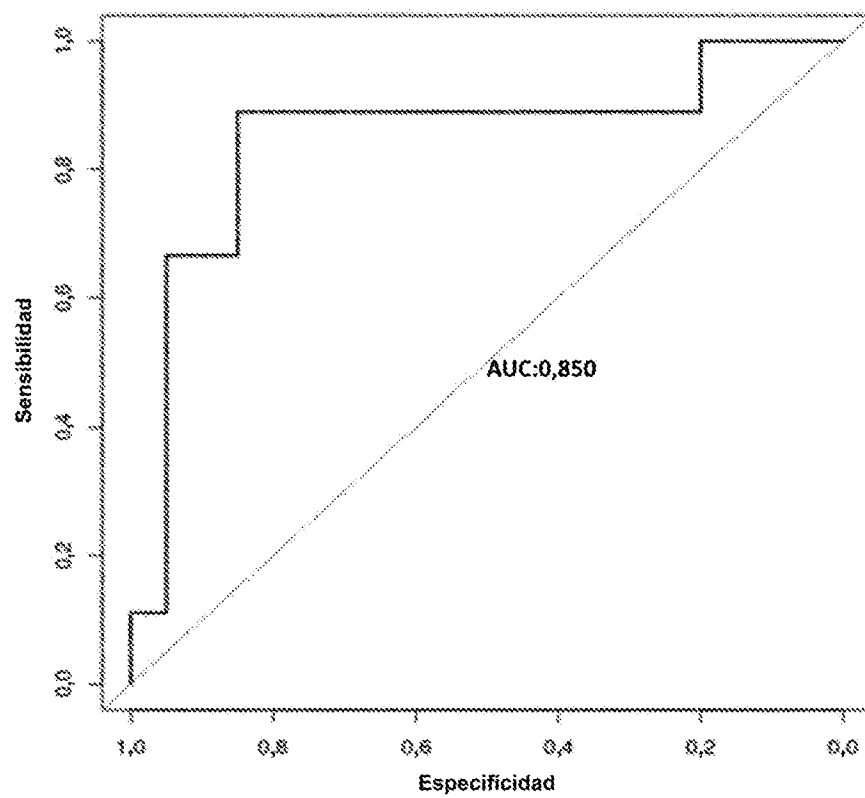


Figura 9A

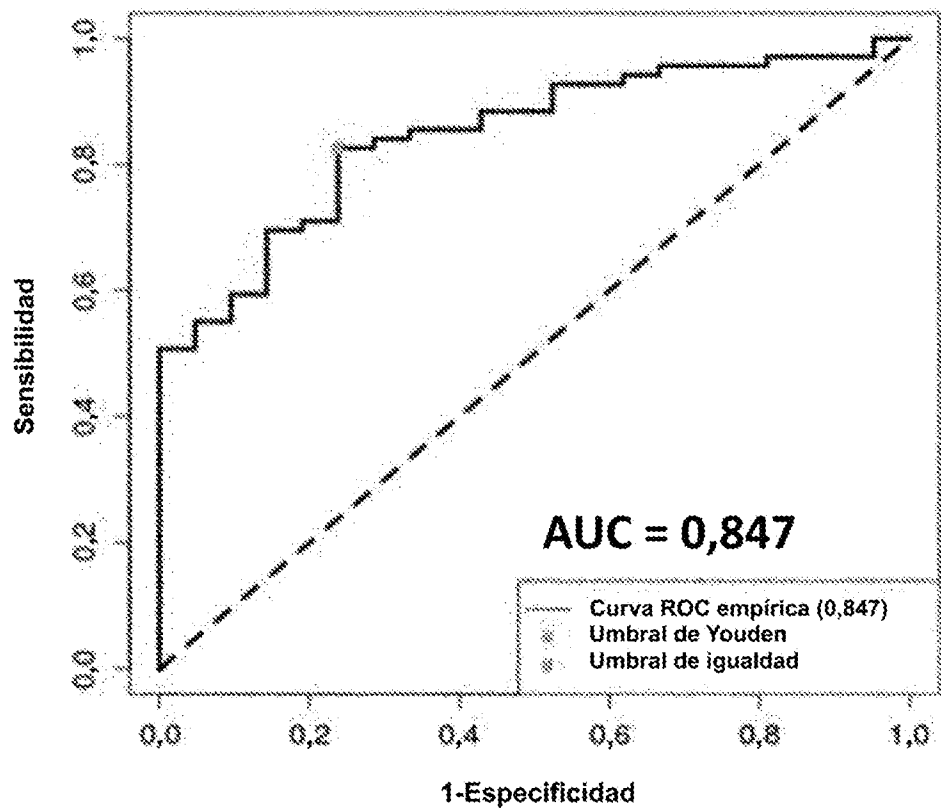


Figura 9B

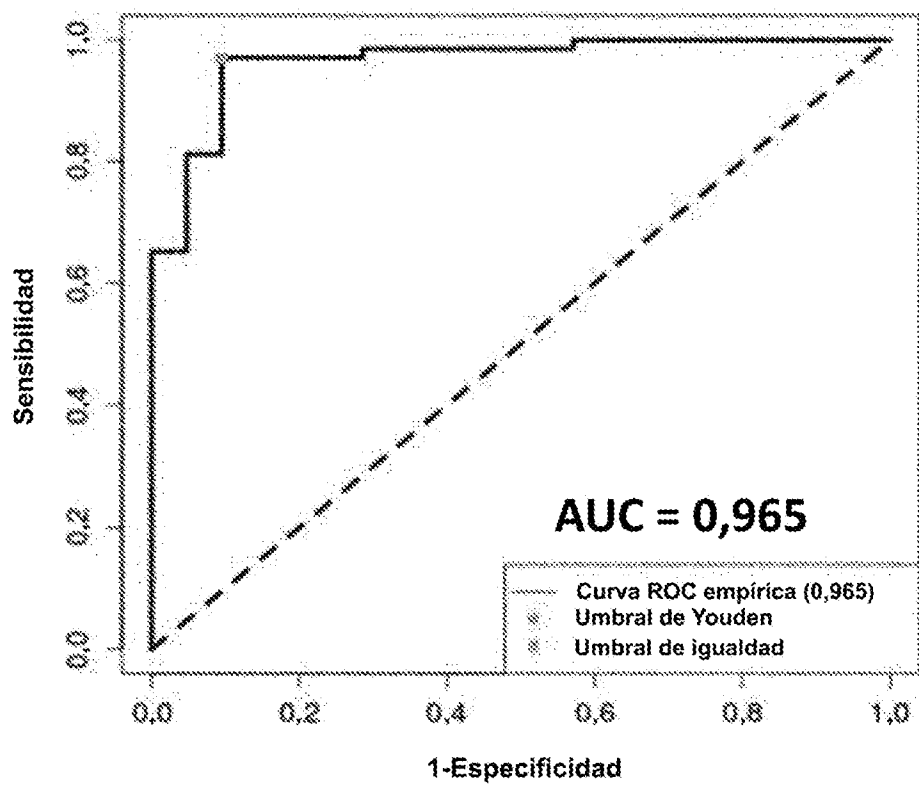


Figura 9C

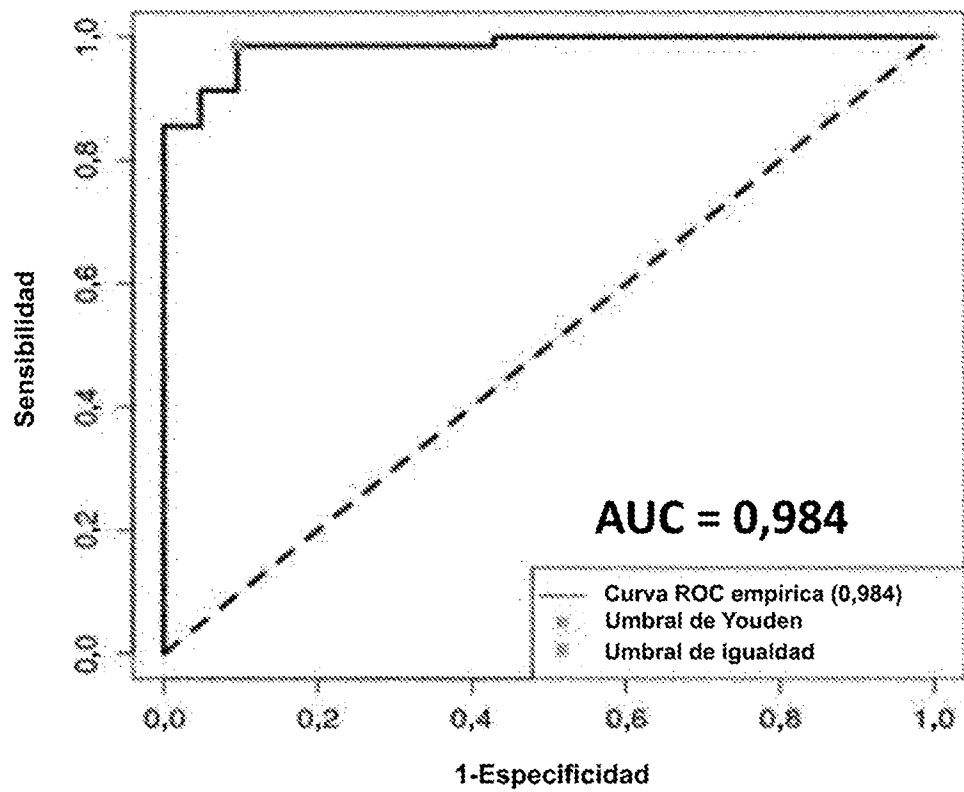


Figura 10A

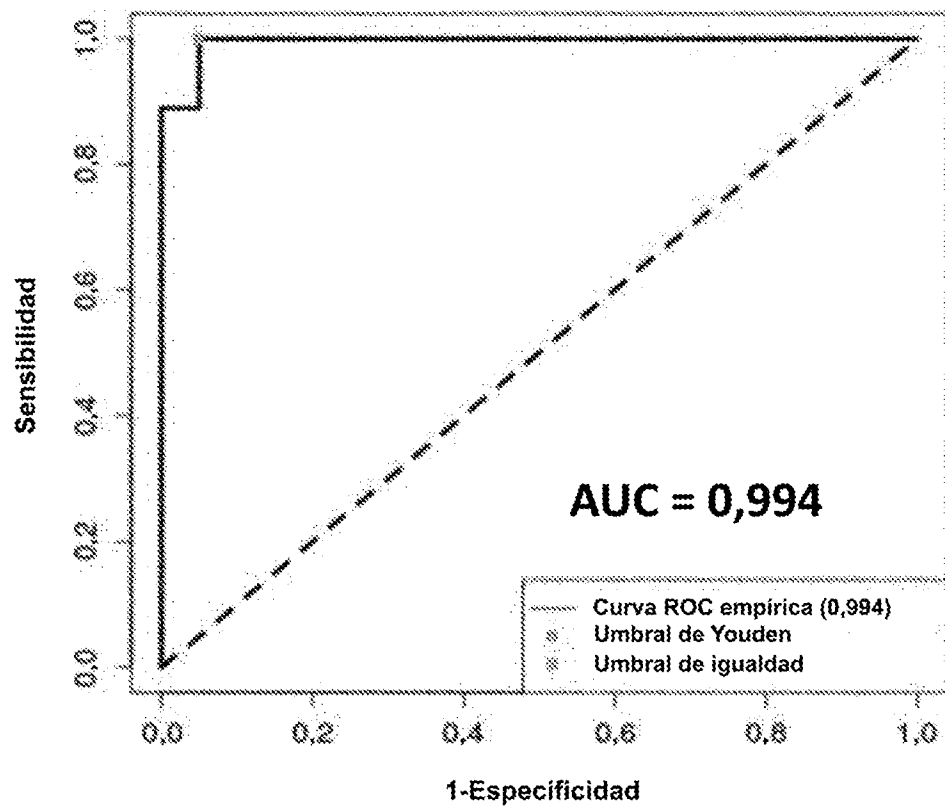


Figura10B

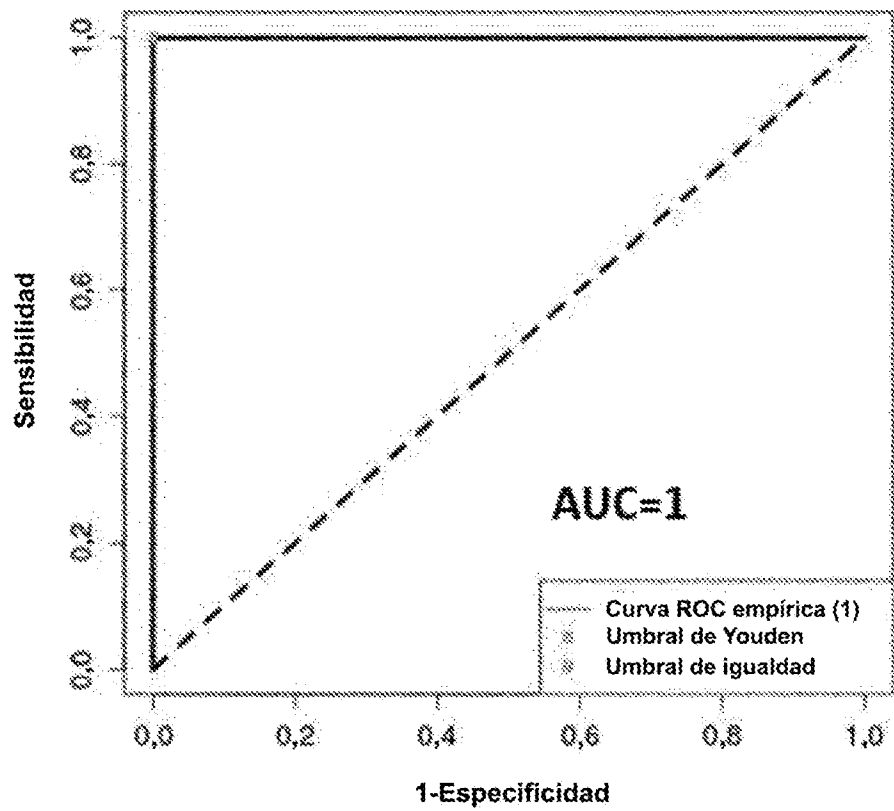


Figura 10C

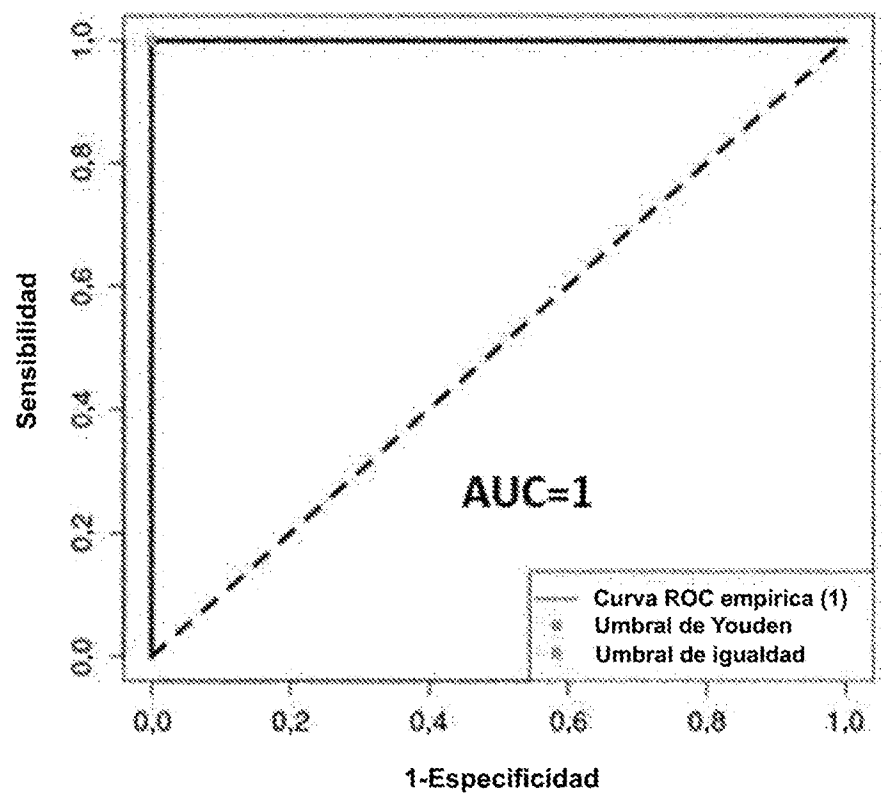


Figura 11A

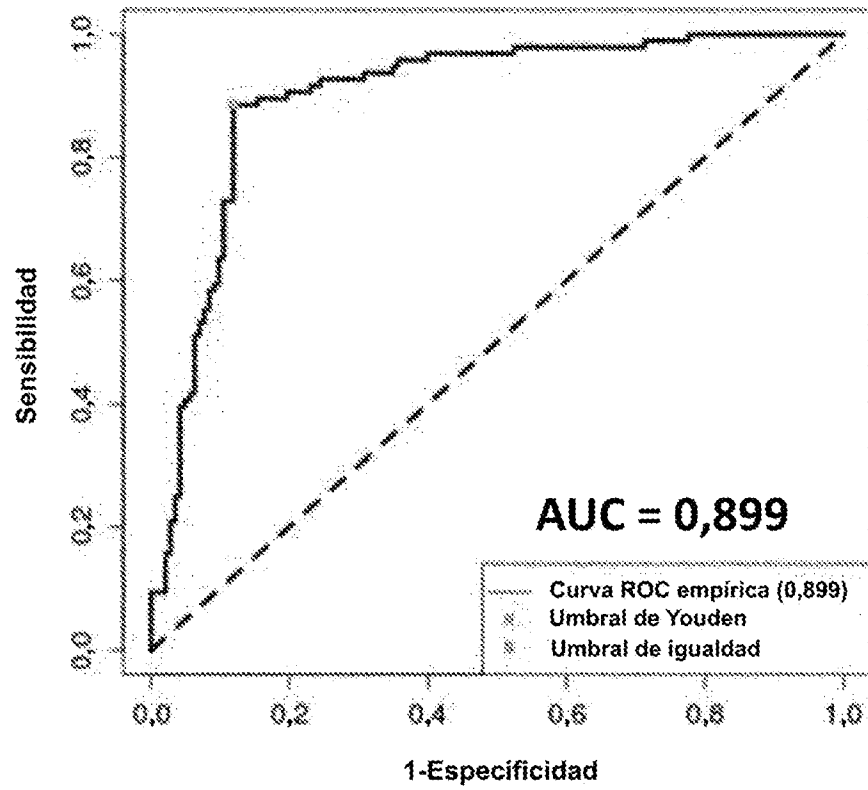


Figura11B

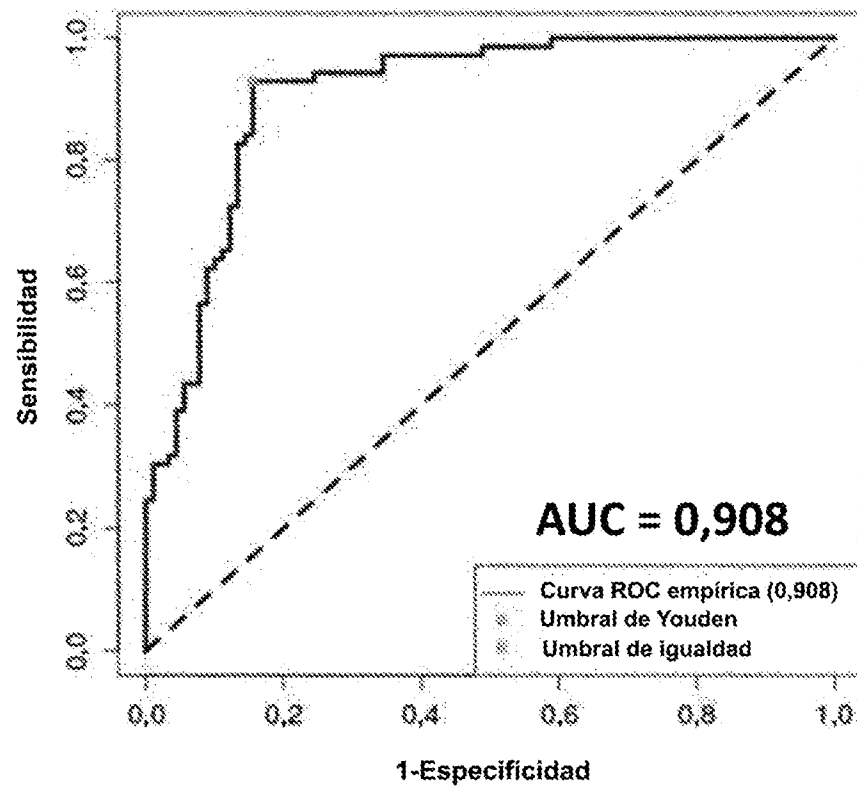


Figura 11C

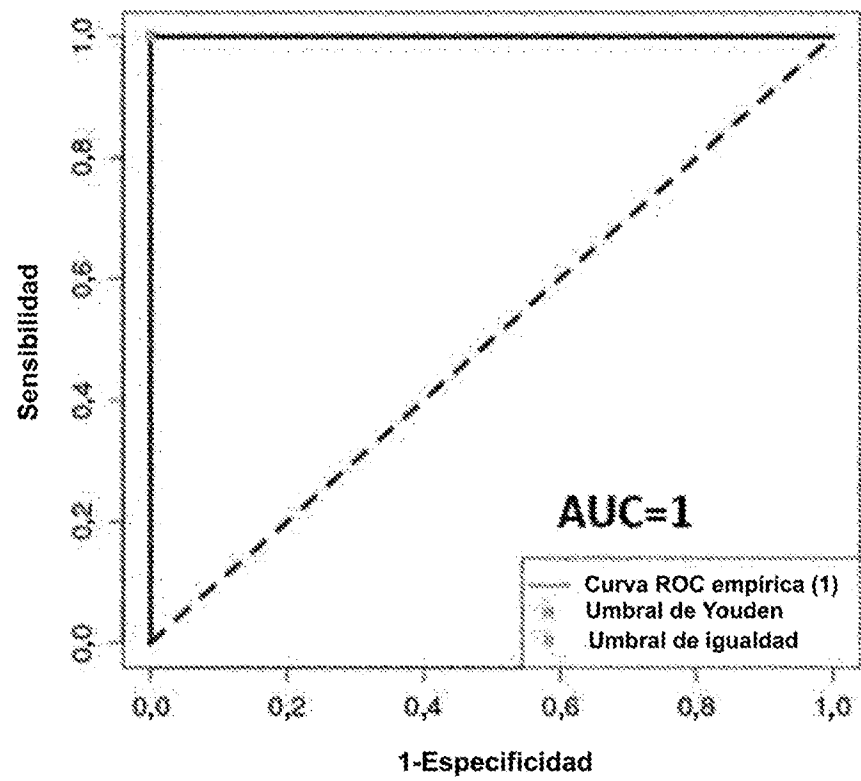


Figura 12A

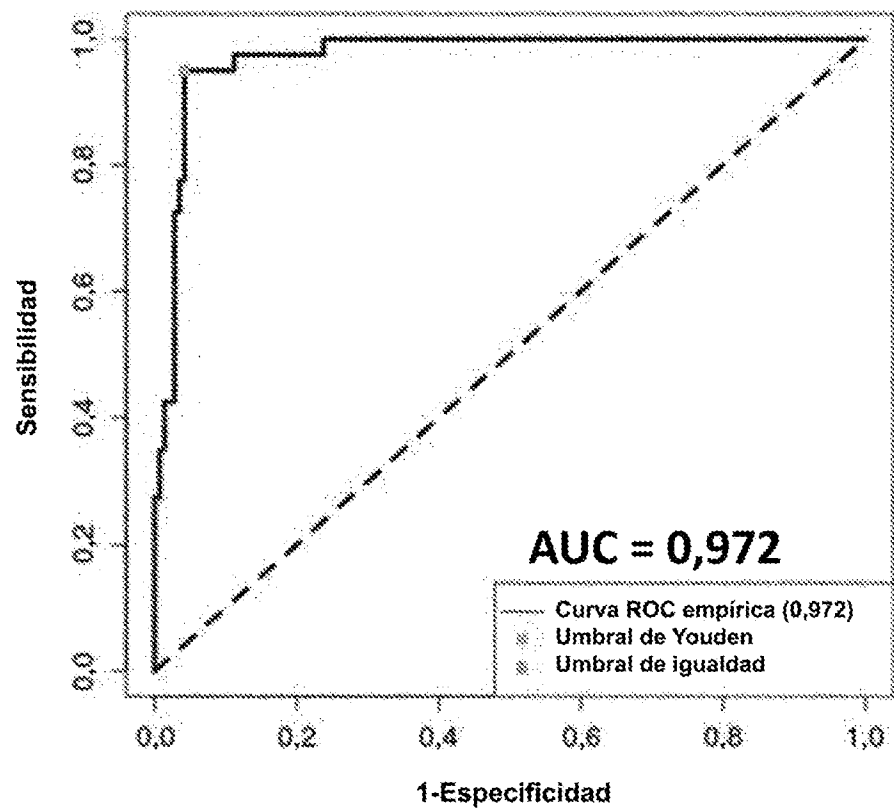


Figura 12B

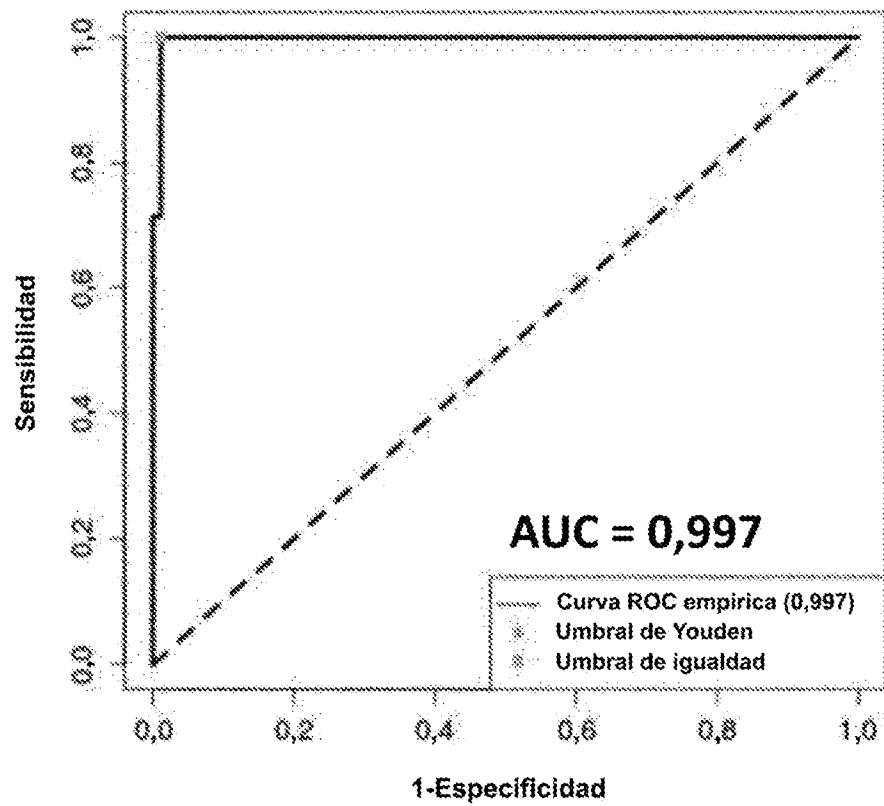


Figura 12C

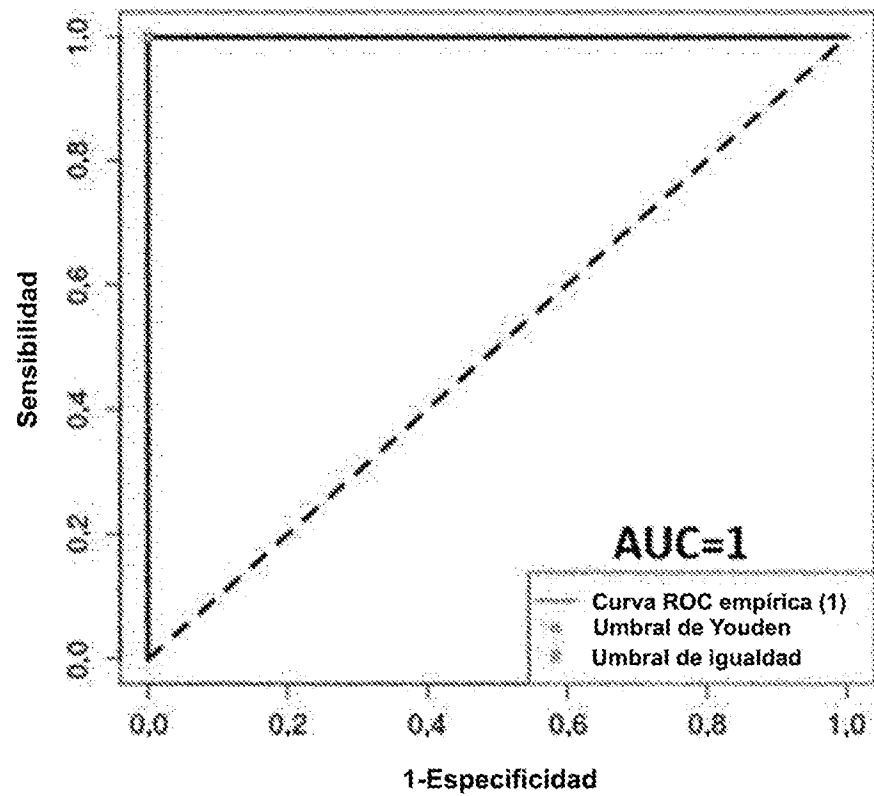


Figura 13A

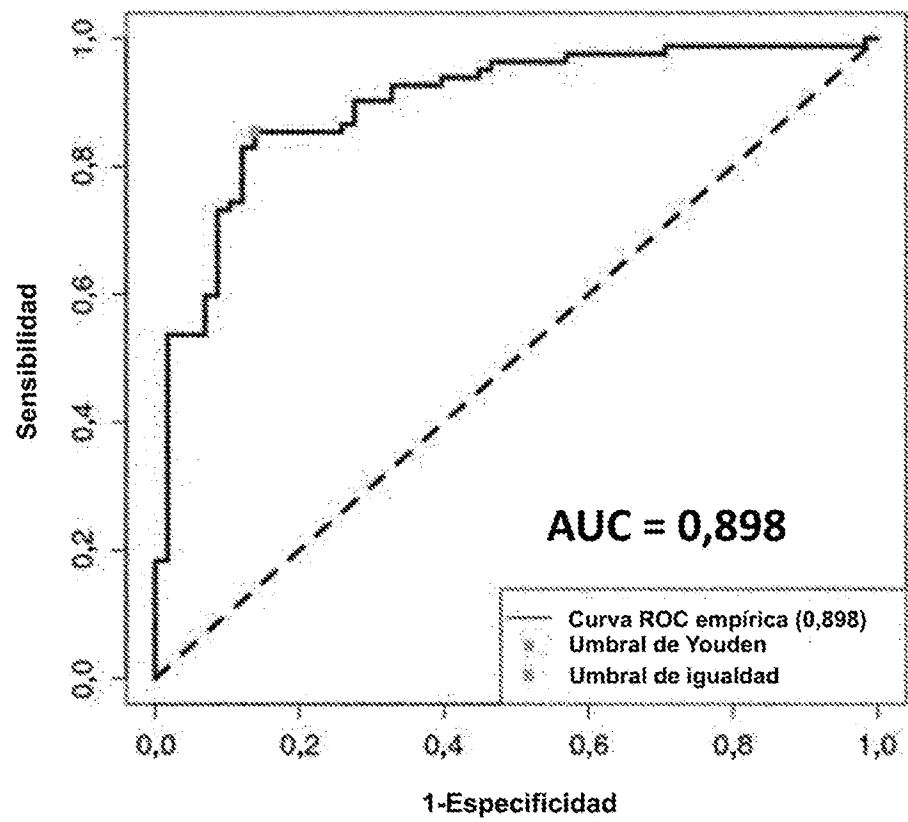


Figura 13B

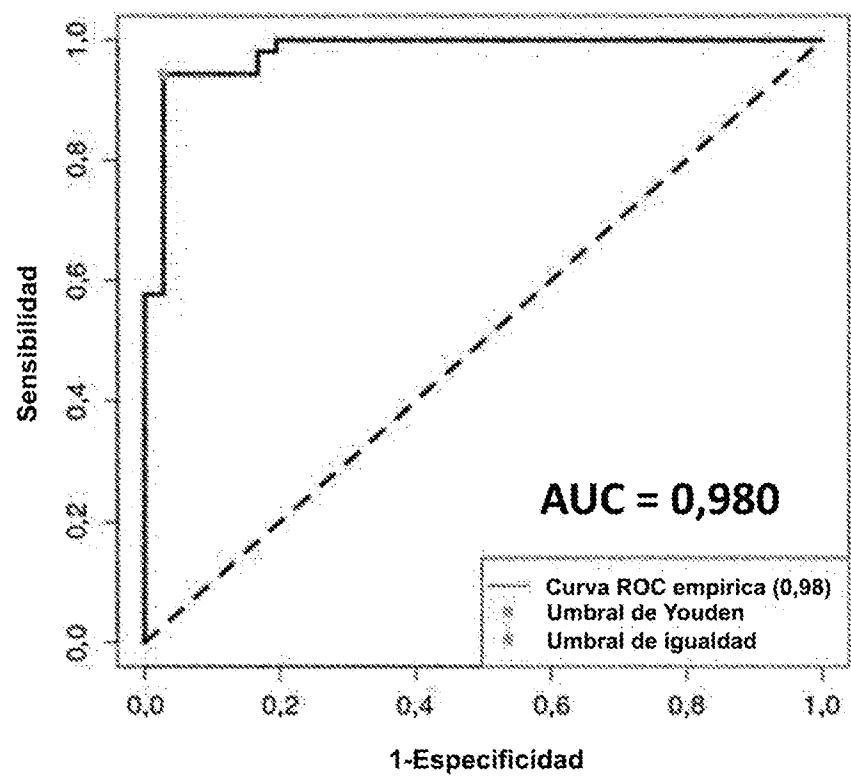


Figura 13C

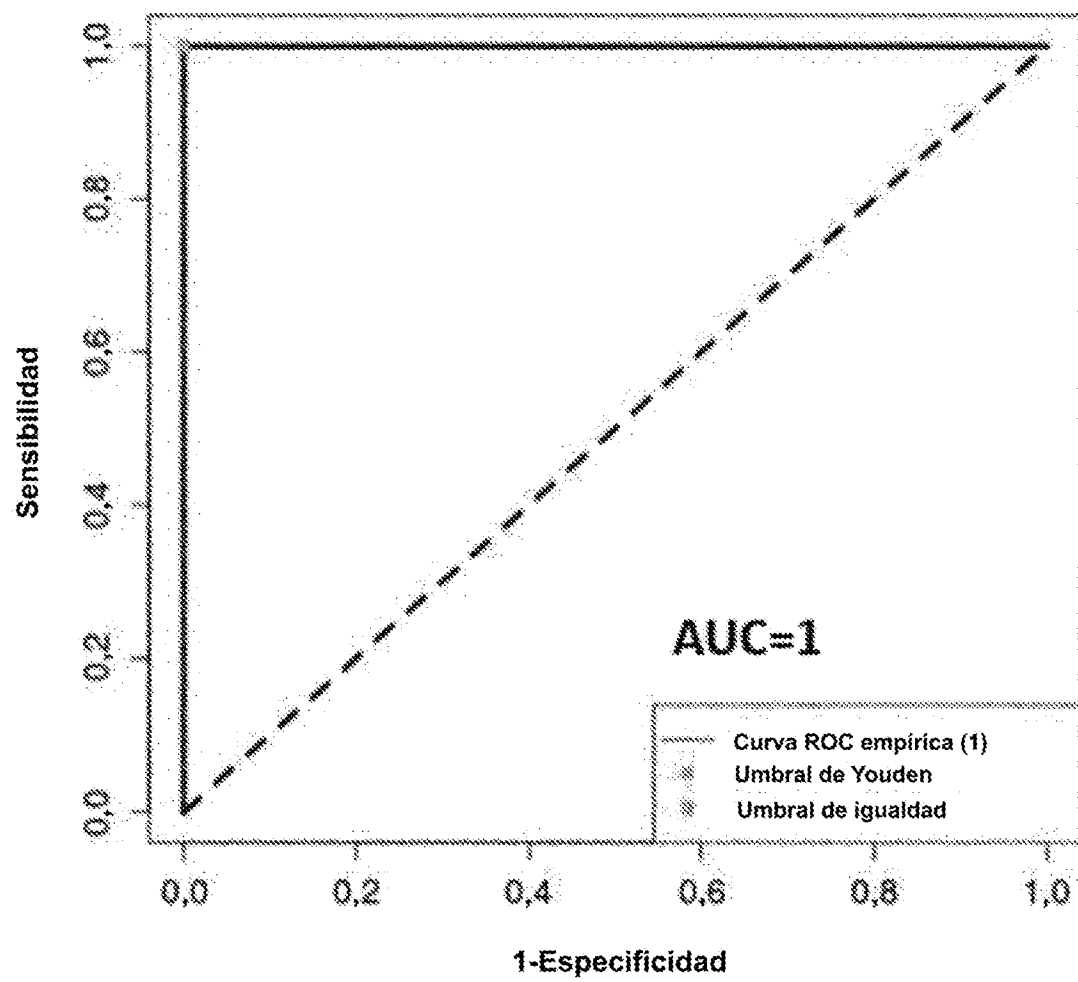


Figura 14

	Muestra total	CTRL	BD	Uni
Datos demográficos				
	n	n	n	n
Número	38	31	14	13
Edad (mín.-máx.)	24-59	24-59	26-55	26-55
Edad (media $\pm$ DE)	41,2 ($\pm 9,5$)	41,9 ($\pm 9,7$)	41,0 ($\pm 9,5$)	40,0 ($\pm 9,8$)
Valor de p (edad, frente a Ctrl)			0,63	0,45
Valor de p (edad, frente a BD)				0,79
Género				
Masculino (n (%))	31 (81,5%)	16 (51,6%)	5 (35,7%)	10 (81,25%)
Femenino (n (%))	7 (18,5%)	15 (48,4%)	9 (64,3%)	3 (18,75%)
IMC (kg/m²)		25,3	23,9	23,7
Valor de p (IMC, frente a Ctrl)			0,35	0,3
Valor de p (IMC frente a BD)				0,89
Características clínicas				
Puntuación MADRS promedio (media $\pm$ EEM),		0,80 ($\pm 0,2$)	21,7 ($\pm 2,9$)	25,6 ($\pm 4,7$)
Valor de p (MADRS, frente a Ctrl)			1,3E-13	3,60E-11
Valor de p (MADRS, frente a BD)				0,47
Puntuación de IDSC30 promedio (media $\pm$ EEM)		2,65 ($\pm 0,5$)	29,4 ($\pm 3,9$)	29,2 ($\pm 5,3$)
Valor de p (IDSC30, frente a Ctrl)			1,10E-12	2,50E-10
Valor de p (IDSC30, frente a BD)				0,98
Puntuación de YMRS promedio (media $\pm$ EEM)		0,06 ($\pm 0,06$)	1,5 ($\pm 0,6$)	1,25 ($\pm 0,5$)
Valor de p (YMRS, frente a BD)				0,8

Figura 15

Categoría	ID de GO	Término de GO	Relación	p(TDF)
Proceso biológico	GO:0002682	Proceso de regulación del sistema inmunitario	66/1391	2,37E-12
Proceso biológico	GO:0050776	Regulación de la respuesta inmunitaria	47/873	5,37E-10
Proceso biológico	GO:0002376	Proceso del sistema inmunitario	83/2370	1,09E-09
Proceso biológico	GO:0050778	Regulación positiva de la respuesta inmunitaria	36/589	7,68E-09
Proceso biológico	GO:0002768	Ruta de señalización del receptor de superficie celular de regulación de la respuesta inmunitaria	24/266	1,62E-08
Proceso biológico	GO:0002757	Transducción de señales que activan la respuesta inmunitaria	26/332	3,53E-08
Proceso biológico	GO:0002252	Proceso efector inmunitario	44/927	3,83E-08
Proceso biológico	GO:0002253	Activación de la respuesta inmunitaria	28/393	3,83E-08
Proceso biológico	GO:0002429	Ruta de señalización del receptor de superficie celular que activa la respuesta inmunitaria	22/234	3,83E-08
Proceso biológico	GO:0002684	Regulación positiva del proceso del sistema inmunitario	43/882	3,83E-08
Proceso biológico	GO:0002764	Ruta de señalización que regula la respuesta inmunitaria	27/365	3,83E-08
Proceso biológico	GO:0045321	Activación de leucocitos	42/894	1,13E-07
Proceso biológico	GO:0001775	Activación celular	45/1024	1,67E-07
Proceso biológico	GO:0000090	Regulación del proceso metabólico primario	144/5982	1,67E-07
Proceso biológico	GO:0044093	Regulación positiva de la función molecular	61/1713	2,90E-07
Proceso biológico	GO:0006464	Proceso de modificación de proteínas celulares	88/2999	3,36E-07
Proceso biológico	GO:0000255	Regulación del proceso metabólico de macromolecular	144/6072	3,63E-07
Proceso biológico	GO:0048584	Regulación positiva de la respuesta al estímulo	68/2054	3,89E-07
Proceso biológico	GO:0051171	Regulación del proceso metabólico de compuestos nitrogenados	139/5827	5,79E-07
Proceso biológico	GO:0006955	Respuesta inmunitaria	56/1560	8,88E-07

Figura 16

ID de ruta	Nombre de ruta	Jerarquía de eventos	Relación de entidades	p(TDF)
R-HSA-202427	Fosforilación de las cadenas zeta de CD3 y TCR	Sistema inmunitario adaptativo	16/45	8,99E-10
R-HSA-202433	Generación de moléculas de segundo mensajero	Sistema inmunitario adaptativo	16/58	1,79E-08
R-HSA-202430	Translocación de ZAP-70 a sinapsis inmunitaria	Sistema inmunitario adaptativo	14/42	1,79E-08
R-HSA-389948	Señalización de PD-1	Sistema inmunitario adaptativo	14/45	3,27E-08
R-HSA-202403	Señalización de TCR	Sistema inmunitario adaptativo	21/146	8,91E-07
R-HSA-388841	Coestimulación mediante la familia CD28	Sistema inmunitario adaptativo	19/97	1,30E-06
R-HSA-202424	Señalización de TCR corriente abajo	Sistema inmunitario adaptativo	17/124	3,53E-05
R-HSA-877300	Señalización del interferón gamma	Señalización de citocinas en el sistema inmunitario	21/250	0,00273264
R-HSA-2132295	Presentación del antígeno de clase MHC	Sistema inmunitario adaptativo	15/148	0,00452889
R-HSA-9616222	Regulación transcripcional de la granulopoyesis	Biología del desarrollo	9/71	0,02720614

Figura 17

ID de gen	Nombre de gen	Región	Cr.	Posición (GRCh38)	Cobertura	Múltiplo de variación	Valor de p	AUC
ENSG00000177663	IL17RA	3UTR	22	17110591	107	0,74	5,53E-03	0,929
ENSG00000183049	CAMK1D	intrón	10	12387673	34	0,66	6,32E-03	0,912
ENSG00000142166	IFNAR1	3UTR	21	33355807	32	1,42	1,31E-02	0,910
ENSG00000177663	IL17RA	intrón	22	17089708	48	1,25	6,94E-03	0,906
ENSG00000033327	GAB2	intrón	11	78330944	37	1,43	3,71E-03	0,896
ENSG00000166501	LYN	intrón	8	55890893	130	1,20	4,20E-02	0,880
ENSG00000106546	AHR	3UTR	7	17345159	61	1,36	1,47E-02	0,859
ENSG00000033800	PIAS1	intrón	15	68138039	47	1,32	1,52E-02	0,857
ENSG00000166501	PRKCB	intrón	16	23920896	78	0,74	3,43E-03	0,853
ENSG00000135679	MDM2	intrón	12	68821612	38	1,31	4,45E-02	0,850
ENSG00000081237	PTPRC	intrón	1	198680332	74	0,77	4,31E-03	0,846
ENSG00000166501	LYN	3UTR	8	56012553	44	1,48	2,11E-03	0,846
ENSG00000159110	IFNAR2	intrón	21	33231766	37	0,73	6,82E-03	0,840
ENSG00000068028	RASSF1	intrón	3	50332838	43	0,84	3,76E-02	0,825
ENSG00000157551	KCNJ15	intrón	21	38288302	37	1,47	1,69E-02	0,819

Figura 18

Categoría	ID de término	Descripción del término	p(TDF)	proteínas coincidentes
Proceso biológico	GO:0033556	Transducción de señales intracelulares	7,64E-06	AHR, CAMK1D, GAB2, IFNAR1, IFNAR2, LYN, MDM2, PIAS1, PRKCB, RASSF1
Proceso biológico	GO:0007253	Ruta de señalización del receptor a través de JAK-STAT	1,41E-05	IFNAR1, IFNAR2, LYN, PIAS1
Proceso biológico	GO:0007165	Transducción de señales	3,19E-05	AHR, CAMK1D, GAB2, IFNAR1, IFNAR2, IL17RA, LYN, MDM2, PIAS1, PRKCB, RASSF1
Proceso biológico	GO:0050857	Regulación positiva de la ruta de señalización mediada por el receptor de antígenos	9,82E-05	LYN, PRKCB, PTPRC
Proceso biológico	GO:0002682	Proceso de regulación del sistema inmunitario	0,0002	AHR, CAMK1D, GAB2, IFNAR2, LYN, PIAS1, PRKCB, PTPRC
Proceso biológico	GO:0050853	Ruta de señalización del receptor de células B	0,00029	LYN, PRKCB, PTPRC
Proceso biológico	GO:0071310	Respuesta celular a sustancia orgánica	0,00039	PIAS1
Proceso biológico	GO:0030288	Regulación de la proliferación de células B	0,0011	AHR, LYN, PTPRC
Proceso biológico	GO:0050776	Regulación de la respuesta inmunitaria	0,0014	GAB2, IFNAR2, LYN, PIAS1, PRKCB, PTPRC
Proceso biológico	GO:0050861	Regulación positiva de la ruta de señalización del receptor de células B	0,0014	LYN, PRKCB
Proceso biológico	GO:0002768	Ruta de señalización del receptor de superficie celular de regulación de la respuesta inmunitaria	0,0021	GAB2, LYN, PRKCB, PTPRC
Proceso biológico	GO:0007166	Ruta de señalización del receptor de superficie celular	0,0025	GAB2, IFNAR1, IFNAR2, IL17RA, LYN, PIAS1, PRKCB, PTPRC
Proceso biológico	GO:0048522	Regulación positiva del proceso celular	0,0025	AHR, CAMK1D, GAB2, IL17RA, LYN, MDM2, PIAS1, PRKCB, PTPRC, RASSF1
Proceso biológico	GO:0048583	Regulación de la respuesta al estímulo	0,0025	CAMK1D, GAB2, IFNAR2, IL17RA, LYN, MDM2, PIAS1, PRKCB, PTPRC
Proceso biológico	GO:0006950	Respuesta al estrés	0,0041	CAMK1D, IFNAR1, IFNAR2, IL17RA, LYN, MDM2, PRKCB, PTPRC, RASSF1
Proceso biológico	GO:0006693	Regulación positiva del proceso metabólico	0,0041	AHR, CAMK1D, LYN, MDM2, PIAS1, PRKCB, PTPRC, RASSF1
Proceso biológico	GO:0051049	Regulación del transporte	0,0041	CAMK1D, GAB2, IL17RA, KCM15, LYN, MDM2, PRKCB
Proceso biológico	GO:0032879	Regulación de la localización	0,0046	CAMK1D, GAB2, IL17RA, KCM15, LYN, MDM2, PRKCB, PTPRC
Proceso biológico	GO:0006952	Respuesta de defensa	0,0047	CAMK1D, IFNAR1, IFNAR2, IL17RA, LYN, PTPRC
Proceso biológico	GO:0007049	Ciclo celular	0,0048	AHR, MDM2, PIAS1, PRKCB, PTPRC, RASSF1

Figura 19

ID de ruta	Nombre de ruta	p(TDF)	Entidades coincidentes
R-HSA-8939246	RUNX1 regula la transcripción de genes implicados en la diferenciación de células mieloides	0,01235604	PRKCB
R-HSA-3232118	SUMOilación de factores de transcripción	0,0203032	MDM2;PIAS1
R-HSA-912694	Regulación de la señalización de IFNA	0,02527928	IFNAR2;IFNAR1
R-HSA-399719	Tráfico de receptores AMPA	0,02527928	PRKCB;MDM2
R-HSA-399721	Unión de glutamato, activación de receptores AMPA y plasticidad sináptica	0,02527928	PRKCB;MDM2
R-HSA-6804757	Regulación de la degradación de TP53	0,02527928	MDM2
R-HSA-3232142	SUMOilación de proteínas de ubiquitinilación	0,02527928	MDM2;PIAS1
R-HSA-6806003	Regulación de la expresión y degradación de TP53	0,02527928	MDM2
R-HSA-512988	Señalización de interleucina-3, interleucina-5 y GM-CSF	0,02527928	LYN;GAB2
R-HSA-1433557	Señalización por SCF-KIT	0,02527928	LYN;GAB2
R-HSA-1280215	Señalización de citocinas en el sistema inmunitario	0,02640054	LYN;IFNAR2;GAB2;IL17RA;PIAS1;IFNAR1
R-HSA-112314	Receptores de neurotransmisores y transmisión de señales postsinápticas	0,02887316	PRKCB;MDM2;KCNJ15

Figura 20

Muestra total			Unipolar	Bipolar
			Depresivo	Depresivo
Datos demográficos				
Número	n	n	n	n
	35	16	19	19
Edad (mín.-máx.)	20-60	19-59	27-60	27-60
Edad (media $\pm$ DE)	42,5 ($\pm$ 10,6)	40,1 ($\pm$ 12,4)	44,6 ($\pm$ 8,7)	44,6 ($\pm$ 8,7)
Valor de p (frente a Unipolar)			0,22	
Género				
Masculino (n(%))	18 (51,4 %)	10 (62,5 %)	8 (42,1 %)	8 (42,1 %)
Femenino (n(%))	17 (48,6 %)	6 (37,5 %)	11 (57,9 %)	11 (57,9 %)
IMC (kg/m²)		22,7	23,8	23,8
Valor de p (frente a Unipolar)			0,50	
Características clínicas				
Puntuación MADRS promedio (media $\pm$ EEM)		27,3 ($\pm$ 2,0)	22,2 ($\pm$ 2,1)	22,2 ($\pm$ 2,1)
Valor de p (frente a Unipolar)			0,10	
Puntuación de IDSC30 promedio (media $\pm$ EEM)		32,2 ($\pm$ 2,1)	29,5 ($\pm$ 2,8)	29,5 ($\pm$ 2,8)
Valor de p (frente a Unipolar)			0,46	
Puntuación de YMRS promedio (media $\pm$ EEM)		0,55 ($\pm$ 0,5)	2,1 ($\pm$ 0,7)	2,1 ($\pm$ 0,7)
Valor de p (frente a Unipolar)			0,11	

Figura 21

	Muestra total	Unipolar	Bipolar
		Depresivo	Depresivo
Datos demográficos			
	n	n	n
Número	58	29	29
Edad (min.-máx.)	18-62	18-62	21-62
Edad (media $\pm$ DE)	41,9 ($\pm$ 11,1)	40,8 ($\pm$ 13,0)	43,1 ($\pm$ 8,9)
Valor de <i>p</i> (frente a Unipolar)			0,43
Género			
Masculino (n (%))	27 (46,6 %)	14 (48,3 %)	13 (44,8 %)
Femenino (n (%))	31 (53,4 %)	15 (51,7 %)	16 (55,2 %)
IMC (kg/m²)		22,3	24,7
Valor de <i>p</i> (frente a Unipolar)			0,03
Características clínicas			
Puntuación MADRS promedio (media $\pm$ EEM)		34,6 ($\pm$ 1,2)	31,7 ($\pm$ 1,2)
Valor de <i>p</i> (frente a Unipolar)			0,09
Puntuación de IDSC30 promedio (media $\pm$ EEM)		40,1 ($\pm$ 1,4)	37,2 ($\pm$ 1,9)
Valor de <i>p</i> (frente a Unipolar)			0,23
Puntuación de YMRS promedio (media $\pm$ EEM)		1,29 ($\pm$ 0,4)	3,1 ($\pm$ 1,0)
Valor de <i>p</i> (frente a Unipolar)			0,10

Figura 22

	Muestra total	Unipolar		Bipolar	
		Depresivo	Eutímico	Depresivo	Eutímico
Datos demográficos					
Número	n	n	n	n	n
	297	160	96	41	
Edad (min.-máx.)	18-67	18-64	19-67	31-65	
Edad (media $\pm$ DE)	40,9 ($\pm$ 13,2)	36,3 ($\pm$ 13,4)	44,6 ($\pm$ 11,1)	49,9 ($\pm$ 9,3)	
Valor de p (frente a Unipolar)			<0,00001	<0,00001	
Género					
Masculino (n (%))	97 (32,7 %)	50 (31,2 %)	27 (28,1 %)	20 (48,8 %)	
Femenino (n (%))	200 (67,3 %)	110 (68,8 %)	69 (71,9 %)	21 (51,2 %)	
IMC (kg/m ²)	28,7	23,1	25,0	25,1	
Valor de p (frente a Unipolar)			0,007	0,032	
Características clínicas					
Puntuación MADRS promedio (media $\pm$ EEM)	28,7	30,7 ($\pm$ 0,6)	28,2 ($\pm$ 0,7)	2,6 ($\pm$ 0,3)	
Valor de p (frente a Unipolar)			0,011	<0,00001	
Puntuación de IDSC30 promedio (media $\pm$ EEM)	29,3	37,4 ($\pm$ 0,7)	35,3 ($\pm$ 0,8)	5,4 ($\pm$ 0,5)	
Valor de p (frente a Unipolar)			0,052	<0,00001	
Puntuación de YMRS promedio (media $\pm$ EEM)	23,3	1,4 ($\pm$ 0,5)	2,6 ($\pm$ 0,4)	1,2 ($\pm$ 0,5)	
Valor de p (frente a Unipolar)			0,005	0,59	

Figura 23

Muestra total		CTRL		Bipolar	
				Depresivo	Eutímico
Datos demográficos					
Número	n	n	n	n	n
	280	143	96	41	
Edad (mín.-máx.)	18-67	18-65	19-67	31-65	
Edad (media $\pm$ DE)	39,4 ($\pm$ 13,4)	39,4 ($\pm$ 14,1)	44,5 ($\pm$ 11,1)	49,9 ($\pm$ 9,3)	
Valor de p (frente a Ctrl)			<0,00001	<0,00001	
Género					
Masculino (n(%))	100 (35,71 %)	53 (37,1%)	27 (28,1%)	20 (48,8%)	
Femenino (n(%))	180 (64,29 %)	90 (62,9%)	69 (71,9%)	21 (51,2%)	
IMC (kg/m ²)		24,6	25,0	25,1	
Valor de p (frente a Ctrl)			0,007	0,032	
Características clínicas					
Puntuación MADRS promedio (media $\pm$ EEM)	-	0,8 ($\pm$ 0,1)	28,2 ($\pm$ 0,7)	2,6 ($\pm$ 0,3)	
Valor de p (frente a Ctrl)	-		0,011	<0,00001	
Puntuación de IDSC30 promedio (media $\pm$ EEM)	-	1,97 ($\pm$ 0,2)	35,3 ($\pm$ 0,8)	5,4 ($\pm$ 0,5)	
Valor de p (frente a Ctrl)	-		0,052	<0,00001	

Figura 24

Muestra total		Bipolar Tipo 1		Bipolar Tipo 2	
Datos demográficos					
Número	n	n	n	n	n
	140	58		82	
Edad (mín.-máx.)	19-67	21-67		19-66	
Edad (media $\pm$ DE)	45,4 ($\pm$ 10,8)	45,4 ($\pm$ 10,4)		45,5 ($\pm$ 11,1)	
Valor de <i>p</i> (frente a Bipolar de Tipo 1)				0,933	
Género					
Masculino (n(%))	52 (37,1 %)	22 (37,9 %)		30 (36,6 %)	
Femenino (n(%))	88 (62,9 %)	36 (62,1 %)		52 (63,4 %)	
IMC (kg/m ²)	138	26,6		24,4	
Valor de <i>p</i> (frente a Bipolar de Tipo 1)				0,027	
Características clínicas					
Puntuación MADRS promedio (media $\pm$ EEM)	132	15,9 ($\pm$ 1,6)		18,0 ($\pm$ 1,5)	
Valor de <i>p</i> (frente a Bipolar de Tipo 1)				0,363	
Puntuación de IDSC30 promedio (media $\pm$ EEM)	125	21,4 ($\pm$ 1,9)		23,3 ($\pm$ 1,8)	
Valor de <i>p</i> (frente a Bipolar de Tipo 1)				0,453	
Puntuación de YMRS promedio (media $\pm$ EEM)	127	1,93 ($\pm$ 0,4)		1,89 ($\pm$ 0,4)	
Valor de <i>p</i> (frente a Bipolar de Tipo 1)				0,94	

Figura 25

Categoría	ID de GO	Término de GO	TDF
Proceso biológico	GO:0002376	proceso del sistema inmunitario	1,77E-10
Proceso biológico	GO:0002682	proceso de regulación del sistema inmunitario	7,45E-10
Proceso biológico	GO:0002252	proceso efector inmunitario	1,52E-08
Proceso biológico	GO:0002253	activación de la respuesta inmunitaria	7,50E-08
Proceso biológico	GO:0050776	regulación de la respuesta inmunitaria	1,19E-07
Proceso biológico	GO:0006955	respuesta inmunitaria	1,51E-07
Proceso biológico	GO:0002757	transducción de señales que activan la respuesta inmunitaria	1,72E-07
Proceso biológico	GO:0002764	ruta de señalización que regula la respuesta inmunitaria	1,74E-07
Proceso biológico	GO:0050778	regulación positiva de la respuesta inmunitaria	2,22E-07
Proceso biológico	GO:0002684	regulación positiva del proceso del sistema inmunitario	4,15E-07
Proceso biológico	GO:0048584	regulación positiva de la respuesta al estímulo	6,90E-07
Proceso biológico	GO:0002444	inmunidad mediada por leucocitos mieloides	1,0526E-06
Proceso biológico	GO:0002274	activación de leucocitos mieloides	4,8148E-06
Proceso biológico	GO:0002446	inmunidad mediada por neutrófilos	8,1445E-06
Proceso biológico	GO:0002366	activación de leucocitos implicada en la respuesta inmunitaria	8,4827E-06
Proceso biológico	GO:0035556	transducción de señales intracelulares	8,6505E-06
Proceso biológico	GO:0043299	desgranulación leucocitaria	8,8488E-06
Proceso biológico	GO:0045321	activación de leucocitos	9,2368E-06
Proceso biológico	GO:0002263	activación celular implicada en la respuesta inmunitaria	9,7805E-06
Proceso biológico	GO:0002768	ruta de señalización del receptor de superficie celular que regula la respuesta inmunitaria	1,059E-05

Figura 26

Categoría	ID de GO	Término de GO	TDF	N.º de genes
Proceso biológico	GO:0002682	Proceso de regulación del sistema inmunitario	1,00E-10	67
Proceso biológico	GO:0002376	Proceso del sistema inmunitario	1,51E-07	84
Proceso biológico	GO:0050776	Regulación de la respuesta inmunitaria	5,98E-09	50
Proceso biológico	GO:0050778	Regulación positiva de la respuesta inmunitaria	2,68E-07	38
Proceso biológico	GO:0045321	Activación de leucocitos	3,61E-07	42
Proceso biológico	GO:0002684	Regulación positiva del proceso del sistema inmunitario	5,45E-07	45
Proceso biológico	GO:0048584	Regulación positiva de la respuesta al estímulo	5,99E-07	73
Proceso biológico	GO:0001775	Activación celular	6,94E-07	45
Proceso biológico	GO:0036211	Proceso de modificación de proteínas	7,43E-07	86
Proceso biológico	GO:0006464	Proceso de modificación de proteínas celulares	7,43E-07	86
Proceso biológico	GO:0060255	Regulación del proceso metabólico de macromolecular	9,07E-07	139
Proceso biológico	GO:0002757	Transducción de señales que activan la respuesta inmunitaria	1,06E-06	28
Proceso biológico	GO:0002253	Activación de la respuesta inmunitaria	1,07E-06	30
Proceso biológico	GO:0002252	Proceso efector inmunitario	1,07E-06	43
Proceso biológico	GO:0002764	Ruta de señalización que regula la respuesta inmunitaria	1,12E-06	29
Proceso biológico	GO:0043412	Modificación de macromoléculas	1,73E-06	88
Proceso biológico	GO:0019222	Regulación del proceso metabólico	4,11E-06	145
Proceso biológico	GO:0002366	Activación de leucocitos implicada en la respuesta inmunitaria	4,11E-06	31
Proceso biológico	GO:0002263	Activación celular implicada en la respuesta inmunitaria	4,55E-06	31
Proceso biológico	GO:0002274	Activación de leucocitos mieloides	5,48E-06	30

Figura 27A

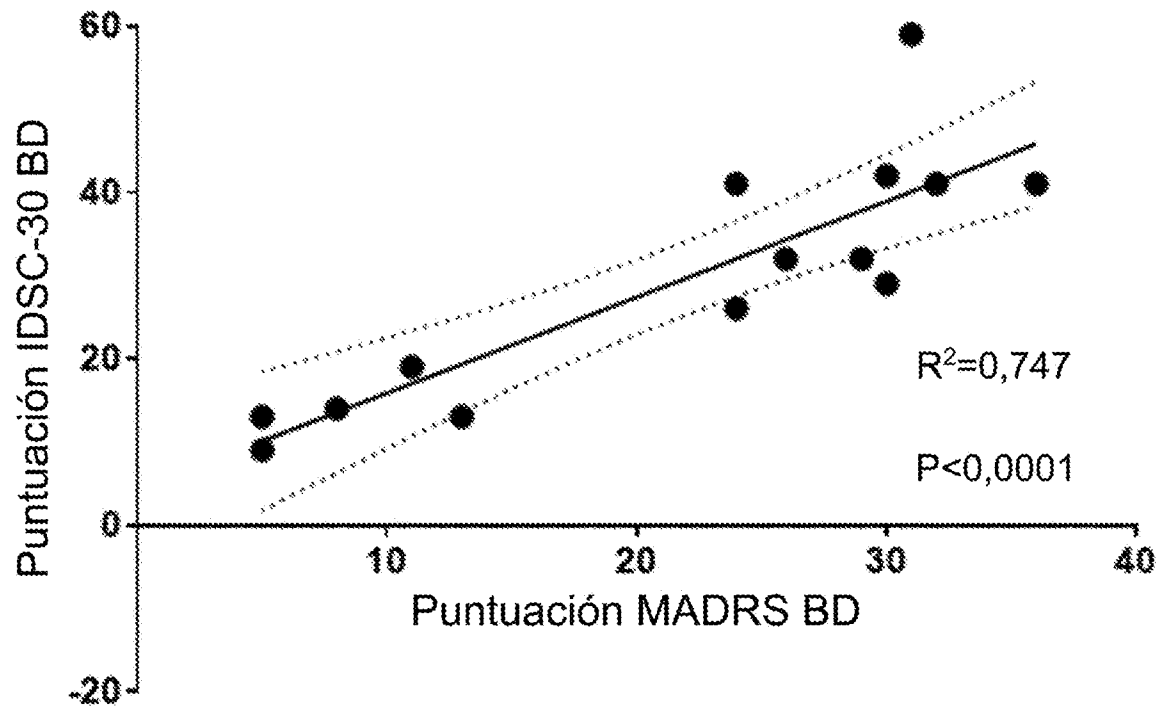


Figura 27B

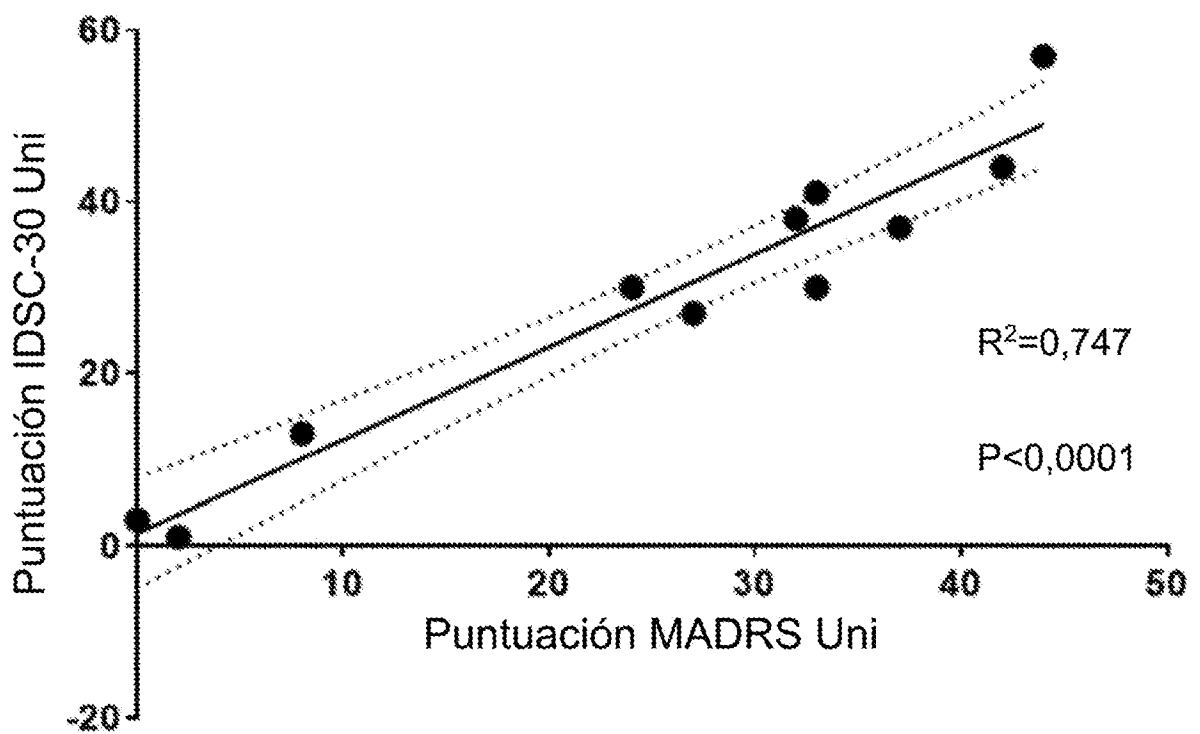


Figura 28A

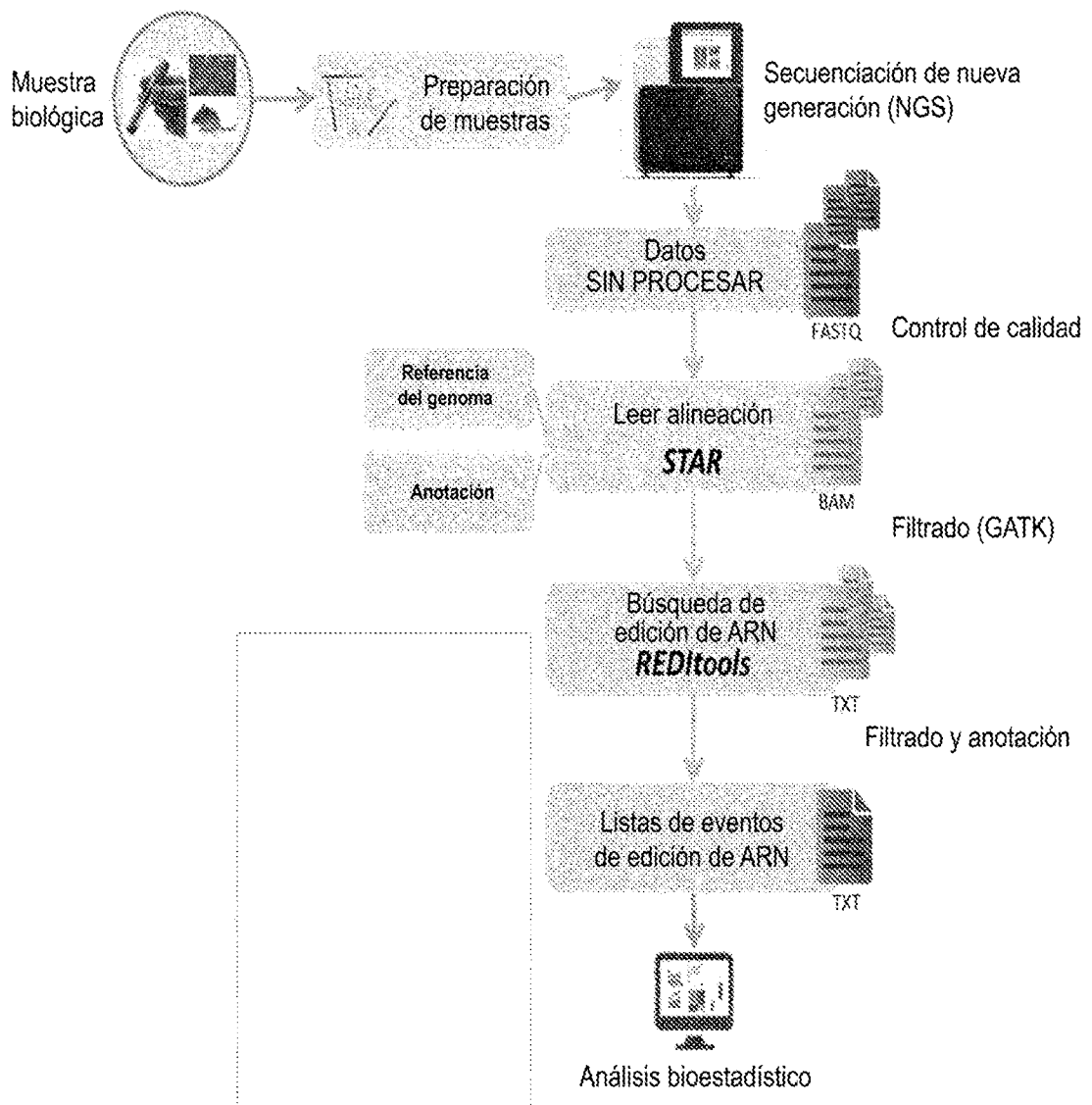


Figura 28B

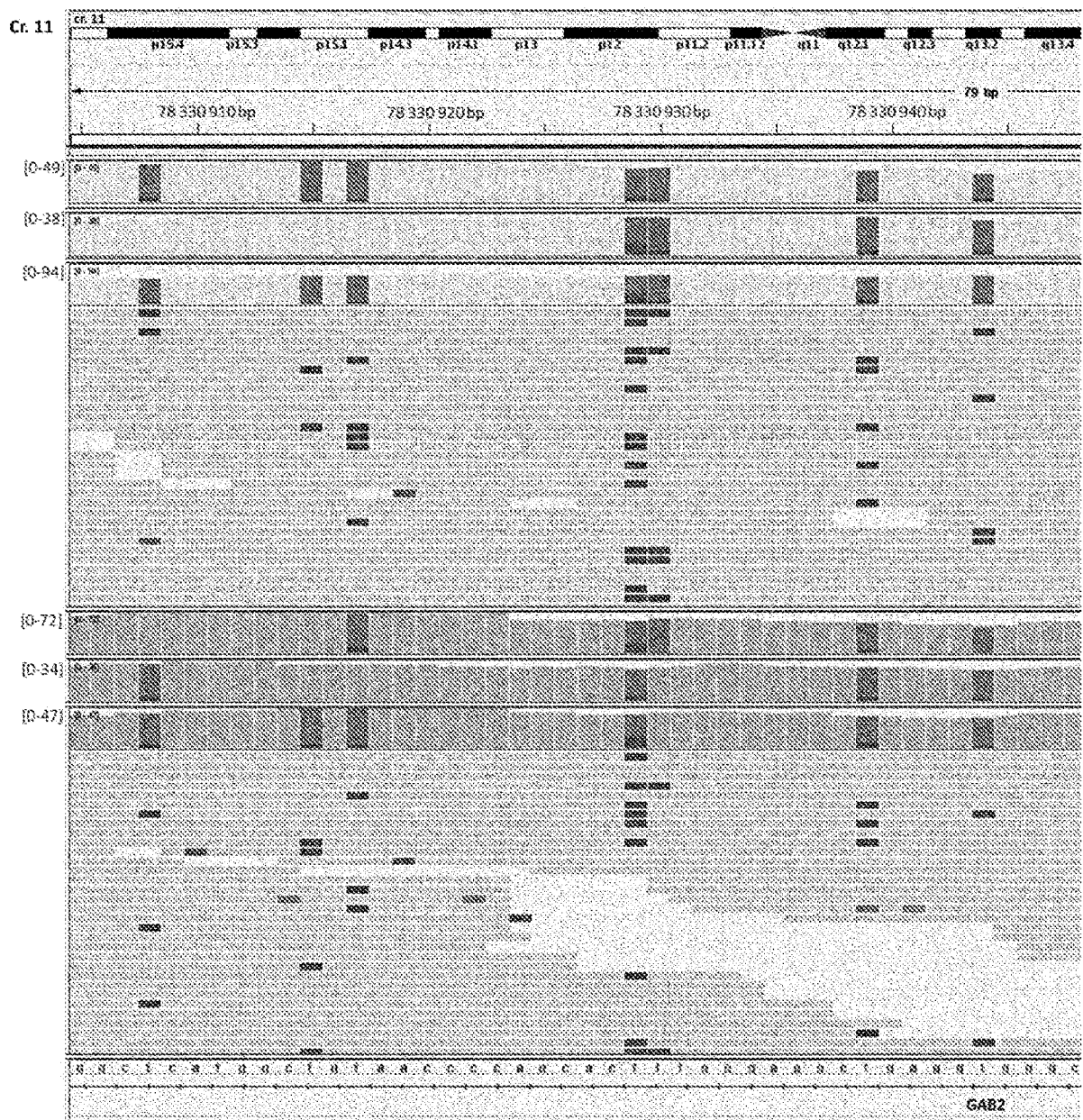


Figura 29A

Modelo de bosques aleatorios 1

Ajustado por edad, sexo, tratamientos y adicciones

	Rendimiento
AUC	0,934
IC 95 %	[0,880 ; 0,987]
Se	91,2 %
Sp	84,6 %
PPV	83,8 %
NPV	91,7 %
Prec	87,7 %
Corte	0,5

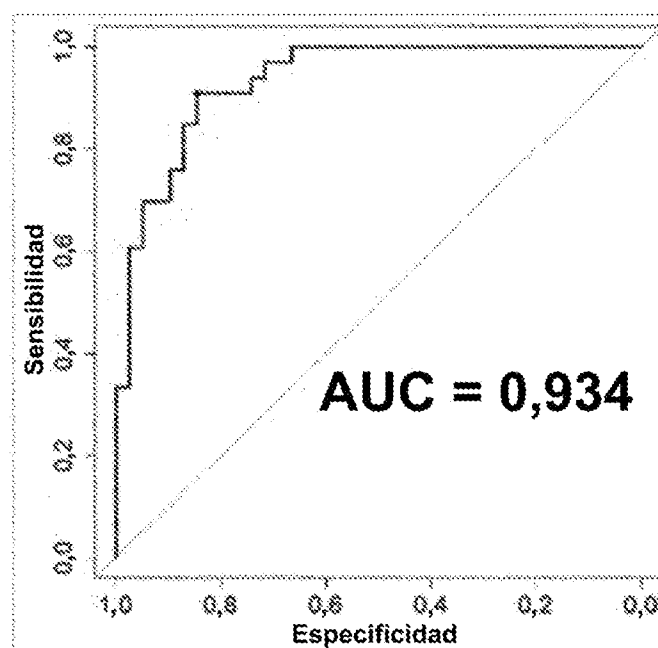


Figura 29B

Modelo de bosques aleatorios 2

Ajustado por edad, sexo

	Rendimiento
AUC	0,899
IC 95 %	[0,826 ; 0,971]
Se	84,8 %
Sp	83,7 %
PPV	80,0 %
NPV	87,8 %
Prec	84,2 %
Corte	0,5

