



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 336 946**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06765356 .8**

(96) Fecha de presentación : **14.07.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1902319**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2008**

(54) Título: **Método de diagnóstico para trastornos relacionados con daño cerebral.**

(30) Prioridad: **14.07.2005 GB 0514435**

(73) Titular/es: **Université de Genève
rue Général-Dufour 24, Case Postale
1211 Genève 4, CH**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.04.2010

(72) Inventor/es: **Hochstrasser, Denis Francois y
Sanchez, Jean-Charles**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.04.2010

(74) Agente: **Zuazo Araluce, Alexander**

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

Método de diagnóstico para trastornos relacionados con daño cerebral.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

Esta invención se refiere a un método de diagnóstico para accidente cerebrovascular.

10 No está disponible actualmente ningún marcador biológico para el diagnóstico de rutina de trastornos relacionados con daño cerebral incluyendo enfermedades cerebrovasculares, demencia y enfermedades neurodegenerativas. Esta invención se refiere al uso de líquido cefalorraquídeo de pacientes fallecidos como un modelo para el descubrimiento de marcadores de trastornos relacionados con daño cerebral, y al uso de tales marcadores en el diagnóstico de trastornos 15 relacionados con daño cerebral en seres humanos y animales.

Descripción de la técnica relacionada

20 A lo largo de las últimas dos décadas, se han estudiado varios marcadores biológicos (biomarcadores) en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y suero de pacientes con trastornos relacionados con daño cerebral, incluyendo creatina cinasa-BB [1], lactato deshidrogenasa [2], proteína básica de la mielina [3], proteína S100 [4], enolasa específica de neuronas (NSE) [5], proteína ácida fibrilar de la glía [6] y tau [7]. La mayoría de ellas no han demostrado ser indicadores útiles de la extensión del daño cerebral ni factores pronóstico precisos del estado clínico y el desenlace funcional. De hecho, el valor de diagnóstico de los biomarcadores para trastornos relacionados con daño cerebral se ha visto dificultado por 25 su aparición tardía y un máximo retrasado tras el acontecimiento del daño, su escasa sensibilidad y especificidad, y el entendimiento limitado de los mecanismos que gobiernan la liberación de estas moléculas en el LCR y, en última instancia, en la sangre. Como resultado de estas limitaciones, el uso de biomarcadores de trastornos relacionados con daño cerebral actualmente está limitado al entorno de investigación y no se ha recomendado ninguno para la evaluación de rutina [8].

30 El documento WO 01/42793 se refiere a un ensayo de diagnóstico para accidente cerebrovascular en el que la concentración de proteína de unión a ácidos grasos cardíaca o cerebral (H-FABP o B-FABP) se determina en una muestra de líquido corporal.

35 Sumario de la invención

De manera ideal, un biomarcador para el diagnóstico, la monitorización y el pronóstico de trastornos relacionados con daño cerebral debe incluir al menos las siguientes características: (1) debe ser específico de cerebro; (2) debido a 40 las dificultades obvias de obtener muestras de LCR en pacientes, la detección en líquidos corporales más fácilmente disponibles tales como sangre, suero, plasma, orina, saliva o lágrimas es sumamente deseable; (3) debe aparecer muy temprano; (4) su nivel máximo, alternativamente el área bajo la curva de concentraciones secuenciales, deben reflejar la extensión del daño cerebral; finalmente (5) debe ser indicativo del desenlace funcional. Se muestran en el presente documento nuevos biomarcadores de trastornos relacionados con daño cerebral.

45 Se describe cómo se han identificado proteínas como nuevos biomarcadores de diagnóstico para trastornos relacionados con daño cerebral usando un análisis basado en proteómica del LCR de pacientes fallecidos como un modelo de daño cerebral masivo. Se han descrito ensayos de diagnóstico para accidente cerebrovascular basados en tales marcadores que usan FABP en el documento WO 01/42793 y se han descrito ensayos que usan RNA-BP, UFD1 y NDKA en el documento WO2005/029088. Se han descrito ensayos de diagnóstico para la enfermedad de Huntington que usan 50 clusterina en el documento WO 2006/061610. Se han descrito ensayos de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer que usan apolipoproteína A-IV, factor H del complemento, factor 3a del complemento y alfa-2-macroglobulina en el documento WO 2006/035237. Se han descrito ensayos de diagnóstico para la enfermedad de Creutzfeld-Jakob (ECJ) y su forma variante vECJ que usan FABP en el documento WO 01/67108, y se han descrito ensayos similares basados en isoformas de hemoglobina y cistatina C en el documento WO 2004/040316. Se ha descrito un ensayo de 55 diagnóstico adicional para ECJ y vECJ basado en hemoglobina beta en el documento WO 2006/061609. Se dan a conocer métodos y composiciones referentes a la enfermedad de Alzheimer en el documento WO 2006/021810. El uso de los polipéptidos según la presente invención puede validarse de una manera similar.

La presente invención proporciona lo siguiente:

- 60 1. Un método para el diagnóstico de accidente cerebrovascular en un sujeto que se sospecha que padece el mismo, que comprende detectar glutatión-S-transferasa P (GSTP-1), o una variante, un mutante o una isoforma de la misma, en una muestra de sangre, plasma o suero extraído de un sujeto, en el que un nivel elevado de GSTP-1, en comparación con un control, es indicativo de accidente cerebrovascular.
- 65 2. Método de seguimiento de la progresión de un accidente cerebrovascular en un sujeto al que se le diagnosticó previamente que padecía el mismo, que comprende medir los niveles de GSTP-1, o una variante, un mutante o una isoforma de la misma, en múltiples muestras de sangre, plasma o suero extraídas de un

ES 2 336 946 T3

sujeto en momentos diferentes y determinar el cambio en los niveles de la GSTP-1 en la muestra sometida a prueba más recientemente en comparación con los niveles en muestras sometidas a prueba previamente y correlacionar tal cambio con la progresión, regresión o estabilización de dicho accidente cerebrovascular.

- 5 3. Método según 1 ó 2, en el que se usa un anticuerpo frente a GSTP-1 en la detección o la determinación de la concentración.
- 10 4. Método según 1 ó 2, en el que la GSTP-1 se detecta mediante la determinación de al menos un autoanticuerpo frente a la misma.
- 15 5. Método según cualquiera de 1 a 3, en el que se usan dos o más marcadores seleccionados de anticuerpos frente a GSTP-1 en un pocillo individual de una placa de microtitulación de ELISA.
- 20 6. Método según cualquiera de 1 a 5, en el que GSTP-1 y al menos otro polipéptido se someten a ensayo por separado, y se usa un algoritmo de predicción para el diagnóstico, en el que dicho al menos otro polipéptido es uno para el cual el nivel está o bien aumentado o bien disminuido en el líquido cefalorraquídeo de pacientes fallecidos en comparación con el líquido cefalorraquídeo de donantes sanos.

20 Los polipéptidos (también denominados proteínas) útiles en la presente invención son aquéllos para los cuales se encontró el nivel o bien aumentado o bien disminuido en el líquido cefalorraquídeo de pacientes fallecidos en comparación con el líquido cefalorraquídeo de donantes sanos. En este contexto, el término "aumentado" significa que el polipéptido se produce exclusivamente en LCR de paciente fallecido en oposición a LCR de paciente sano, o que se produce en LCR de paciente fallecido a un nivel superior que en LCR de paciente sano, tal como al menos 1,2 veces superior, preferiblemente al menos 1,5 veces superior, o incluso al menos 8-10 veces superior. El término "disminuido" significa que el polipéptido está ausente en LCR de paciente fallecido en oposición a LCR de paciente sano, o que se produce en LCR de paciente fallecido a un nivel inferior que en LCR de paciente sano, tal como inferior en un factor de 0,8 o menos, preferiblemente de 0,7 o menos.

30 Es una predicción razonable que todos estos polipéptidos serán útiles como marcadores para trastornos relacionados con daño cerebral. Esto se ha validado para ciertos polipéptidos, tal como se describe en los ejemplos a continuación. El uso de otros polipéptidos se ha validado mediante los datos en los documentos WO 01/42793; WO 01/67108; WO2004/040316; WO 2005/029088; WO 2006/035237; WO 2006/061609 y WO 2006/061610; todos los cuales se incorporan al presente documento como referencia.

35 Los polipéptidos (también denominados proteínas) útiles en la presente invención no se limitan a las secuencias correspondientes a los números de registro en las tablas 1, 2, 3 y 4, e incluyen variantes, mutantes e isoformas de las mismas. Una variante se define como una variación que se produce de manera natural en la secuencia de un polipéptido que tiene un alto grado de homología con la secuencia dada, y que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales e inmunológicas. Un mutante se define como una variante creada artificialmente. Un alto grado de homología se define como una homología de al menos el 90%, preferiblemente de al menos el 95% y lo más preferiblemente de al menos el 99%. Las variantes pueden producirse dentro de una única especie o entre especies diferentes. Una isoforma de un polipéptido tiene la misma función que el polipéptido pero está codificada por un gen diferente y puede tener pequeñas diferencias en su secuencia. Las proteínas anteriores son de origen humano, pero la invención engloba el uso de los correspondientes polipéptidos de otras especies de mamíferos, por ejemplo animales bovinos.

40 Los trastornos relacionados con daño cerebral en el contexto de la presente invención incluyen los siguientes: traumatismo craneal, accidente cerebrovascular isquémico, accidente cerebrovascular hemorrágico, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intracraneal, ataque isquémico transitorio, demencia vascular, degeneración corticobasal ganglionar, encefalitis, epilepsia, síndrome de Landau-Kleffner, hidrocefalia, pseudotumor cerebral, enfermedades talámicas, meningitis, mielitis, trastornos del movimiento, temblor esencial, enfermedades de la médula espinal, siringomielia, enfermedad de Alzheimer (de aparición temprana), enfermedad de Alzheimer (de aparición tardía), demencia por infartos múltiples, enfermedad de Pick, enfermedad de Huntington, Parkinson, síndromes parkinsonianos, demencia frontotemporal, degeneración corticobasal, atrofia multisistémica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad con cuerpos de Lewy, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, síndrome de Dandy-Walker, ataxia de Friedreich, enfermedad de Machado-Joseph, migraña, esquizofrenia, trastornos del estado de ánimo y depresión. También están incluidos los trastornos correspondientes en mamíferos no humanos, tales como encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), por ejemplo encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en el ganado o tembladera en las ovejas. Por consiguiente, el término "paciente" engloba tanto seres humanos como mamíferos no humanos.

45 En una realización, el trastorno relacionado con daño cerebral es el accidente cerebrovascular y el polipéptido es un homólogo de una de las proteínas enumeradas en la tabla 1, 2, 3 ó 4.

50 65 El término "diagnóstico", tal como se usa en el presente documento, incluye determinar si está presente o ausente un trastorno relacionado con daño cerebral, y también puede incluir determinar el estado hasta el que ha progresado. El diagnóstico puede servir como base de un pronóstico en cuanto al futuro desenlace para el paciente y para monitorizar la eficacia del tratamiento.

El término “control” se refiere a un sujeto normal (ser humano o mamífero no humano), es decir uno que padece un trastorno relacionado con daño cerebral (también denominado un “donante sano”), y también a una muestra extraída del mismo sujeto que proporcionó la muestra de diagnóstico, pero en un momento anterior.

5 Las referencias a una concentración aumentada o disminuida en comparación con una muestra de un control no implican que se emprenda realmente un etapa de comparación, puesto que en muchos casos será obvio para el médico experto que la concentración es anómalamente alta o baja. Además, cuando están monitorizándose progresivamente los estadios de un trastorno relacionado con daño cerebral, la comparación realizada puede ser con la concentración observada previamente en el mismo sujeto en una progresión anterior del trastorno.

10 Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1-4 muestran partes de mapas de 1-DE tras la electroforesis de desplazamiento de gel (*Off-gel*) para LCR *ante y post mórtem*, indicando las flechas las bandas correspondientes a las proteínas enumeradas en la tabla 1. 15 Se cargaron 5-10 µg de proteína en un gel plano de SDS-PAGE (12,5% de T/2,6% de C). Se tiñó el gel con plata.

Las figuras 5-7 muestran los resultados de un ensayo para UFD1 para dos grupos de pacientes: un grupo control y un grupo con accidente cerebrovascular agudo.

20 La figura 8 muestra inmunotransferencias de tipo Western de cuatro proteínas que se identificaron únicamente en fracciones de LCR *post mórtem*.

La figura 9 muestra los resultados de un ensayo para GSTP-1 para grupos de pacientes con accidente cerebrovascular y controles, tal como se describe en el ejemplo 5.

25 La figura 10 muestra la validación mediante inmunotransferencia de tipo Western de apolipoproteína A-IV en la enfermedad de Alzheimer, tal como se describe en el ejemplo 6.

La figura 11 es un diagrama de dispersión de los valores para el factor 3a del complemento en plasma de pacientes 30 con enfermedad de Alzheimer y controles, tal como se describe en el ejemplo 8.

La figura 12 muestra una correlación de los niveles del factor H del complemento determinados mediante inmunotransferencia de tipo Western con la Escala Global de Demencia en pacientes con presunta enfermedad de Alzheimer.

35 La figura 13 es una curva operativa del receptor (ROC, *Receiver Operating Curve*) para el factor H del complemento y la alfa-2-macroglobulina como biomarcadores plasmáticos candidatos de la enfermedad de Alzheimer.

Descripción de realizaciones preferidas

40 La invención presentada en el presente documento se refiere a métodos para detectar niveles crecientes o decrecientes de polipéptidos en líquidos corporales incluyendo los componentes sanguíneos (por ejemplo plasma o suero) o el líquido cefalorraquídeo de sujetos afectados por un trastorno relacionado con daño cerebral incluyendo enfermedades cerebrovasculares, demencia y enfermedades neurodegenerativas, en comparación con sujetos control (no afectados). Para este fin, puede hacerse uso de anticuerpos o de cualquier método específico de detección de polipéptidos.

45 La invención también incluye realizaciones en las que los polipéptidos, en particular los de la tabla 1, 2, 3 ó 4, se determinan indirectamente. Por ejemplo, puede determinarse al menos un autoanticuerpo frente a uno o más de los polipéptidos, en particular los de la tabla 1, 2, 3 ó 4.

50 Los anticuerpos contra marcadores proteicos del daño cerebral, en particular sus dominios de unión a proteína, son adecuados como herramientas de detección. Pueden usarse métodos de biología molecular y biotecnológicos para alterar y optimizar las propiedades como anticuerpo de dichas moléculas de manera específica. Además de esto, los anticuerpos pueden modificarse químicamente, por ejemplo por medio de acetilación, carbamoilación, formilación, biotinilación, acilación, o derivatización con polietilenenglicol o polímeros hidrófilos, con el fin de aumentar su 55 estabilidad.

Un marcador de polipéptido específico seleccionado de cualquiera de las proteínas enumeradas en la tabla 1, 2, 3 ó 4 se determina en una muestra de líquido corporal, por ejemplo usando un anticuerpo frente al mismo. El marcador puede detectarse simplemente y/o puede medirse su concentración. El marcador se mide preferiblemente mediante un inmunoensayo, usando un anticuerpo específico frente al polipéptido y midiendo la extensión de la interacción antígeno (polipéptido)/anticuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo modificado por ingeniería genética (químérico). Se conocen anticuerpos frente a polipéptidos y están disponibles comercialmente. También, puede usarse el método habitual de Köhler-Milstein para producir anticuerpos. Menos preferiblemente, el anticuerpo puede ser policlonal. En el contexto de la presente invención, el término “anticuerpos” incluye fragmentos de unión de anticuerpos, tales como fragmentos Fab o de cadena sencilla.

Puede usarse cualquier método de inmunoensayo conocido. En un ensayo de intercalación (*sándwich*), se une un anticuerpo (por ejemplo policlonal) frente al polipéptido a la fase sólida, tal como un pocillo de una placa de microtí-

ES 2 336 946 T3

tulación de plástico, y se incuba con la muestra y con un segundo anticuerpo marcado específico frente al polipéptido que va a detectarse. Alternativamente, puede usarse un ensayo de captura de anticuerpos (también denominado “inmunoensayo indirecto”). En este caso, se deja que la muestra de prueba se una a una fase sólida, y entonces se añade el anticuerpo anti-polipéptido (policlonal o monoclonal) y se deja que se una. Si se usa un anticuerpo policlonal en este contexto, debe ser de manera deseable uno que muestre una baja reactividad cruzada con otras formas del polipéptido. Tras eliminar por lavado el material no unido, se determina la cantidad de anticuerpo unido a la fase sólida usando un segundo anticuerpo marcado, contra el primero.

Puede realizarse un ensayo directo usando un anticuerpo anti-polipéptido marcado. Se deja que la muestra de prueba se una a la fase sólida y se añade el anticuerpo anti-polipéptido. Tras eliminar por lavado el material no unido, se determina la cantidad de anticuerpo unido a la fase sólida. El anticuerpo puede marcarse directamente en lugar de a través de un segundo anticuerpo.

En otra realización, puede realizarse un ensayo de competencia entre la muestra y un polipéptido marcado o un péptido derivado del mismo, estando compitiendo estos dos antígenos por una cantidad limitada de anticuerpo anti-polipéptido unido a un soporte sólido. El polipéptido o péptido marcado puede preincubarse con el anticuerpo sobre la fase sólida, mediante lo cual el polipéptido en la muestra desplaza parte del polipéptido o péptido del mismo unido al anticuerpo.

Aún en otra realización, se permite que los dos antígenos compitan en una única incubación conjunta con el anticuerpo. Tras la eliminación del antígeno no unido del soporte por lavado, se determina la cantidad de marcador unido al soporte y se mide la cantidad de proteína en la muestra mediante referencia a curvas de valoración patrón establecidas previamente.

De manera global, el marcador es preferiblemente una enzima. El sustrato para la enzima puede dar lugar a la formación de color, ser fluorescente, quimioluminiscente o electroquímico, y puede ser soluble o precipitar. Alternativamente, el marcador puede ser un radioisótopo o fluorescente, por ejemplo usar fluoresceína conjugada.

La enzima puede ser, por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa del rábano y puede usarse convenientemente de manera colorimétrica, por ejemplo usando fosfato de p-nitrofenilo como sustrato con formación de color amarillo con fosfatasa alcalina.

Para un ensayo quimioluminiscente, el anticuerpo puede marcarse con un éster de acridinio o peroxidasa del rábano. Esta última se usa en el ensayo de quimioluminiscencia potenciada (ECL). En este caso, el anticuerpo, marcado con peroxidasa del rábano, participa en una reacción quimioluminiscente con luminol, un sustrato de peróxido y un compuesto, que potencia la intensidad y la duración de la luz emitida, normalmente, 4-yodofenol o ácido 4-hidroxicinámico.

Puede usarse un inmunoensayo amplificado tal como inmuno-PCR. En esta técnica, el anticuerpo se une covalentemente a una molécula de ADN arbitrario que comprende cebadores de PCR, mediante lo cual se amplifica el ADN con el anticuerpo unido al mismo mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Véase E. R. Hendrickson *et al.*, Nucleic Acids Research 1995; 23, 522-529 (1995) o T. Sano *et al.*, en “Molecular Biology and Biotechnology” ed. Robert A. Meyers, VCH Publishers, Inc. (1995), páginas 458 - 460. Se lee la señal como anteriormente.

En un procedimiento, puede usarse un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para detectar el polipéptido.

Es posible la automatización completa en un analizador para química clínica usando ampliamente tal como el sistema COBASTM MIRA Plus de Hoffmann-La Roche, descrito por M. Robers *et al.* Clin Chem. julio de 1998;44 (7):1564-7 o el sistema AxSYMTM de Abbott Laboratories, y puede aplicarse para el diagnóstico clínico de rutina de trastornos relacionados con daño cerebral.

Pueden medirse las concentraciones de polipéptido mediante otros medios distintos al inmunoensayo. Por ejemplo, la muestra puede someterse a electroforesis en gel 2D y estimarse la cantidad del polipéptido mediante barrido densitométrico del gel o de una immunotransferencia del mismo. Sin embargo, es deseable llevar a cabo el ensayo de manera rápida, de modo que pueda tratarse al paciente con prontitud.

En principio, puede usarse cualquier líquido corporal para proporcionar una muestra para diagnóstico, pero preferiblemente el líquido corporal es líquido cefalorraquídeo (LCR), plasma, suero, sangre, orina, lágrimas o saliva.

Según la invención, puede realizarse un diagnóstico de trastornos relacionados con daño cerebral a partir de la determinación de un único polipéptido o cualquier combinación de dos o más de los polipéptidos.

Uno o más de los polipéptidos especificados que está contenido de manera diferencial en un líquido corporal de sujetos afectados por daño cerebral y sujetos no afectados por daño cerebral pueden usarse para aplicaciones de diagnóstico, pronóstico y terapéuticas, incluyendo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno relacionado con daño cerebral. Esto puede suponer la preparación y/o el uso de un material que reconoce, se une a o tiene cierta afinidad por el polipéptido mencionado anteriormente. Ejemplos de tales materiales son anti-

cuerpos y chips de anticuerpo. El término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento incluye antisuero políclonal, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos tales como Fab y anticuerpos modificados por ingeniería genética. Los anticuerpos pueden ser químicos o de una única especie. La referencia anterior a aplicaciones de "pronóstico" incluye realizar una determinación del transcurso probable de un trastorno relacionado con daño cerebral midiendo, por ejemplo, la cantidad del polipéptido mencionado anteriormente en una muestra de líquido corporal. La referencia anterior a aplicaciones de "seguimiento terapéutico" incluye realizar una determinación del transcurso probable de un trastorno relacionado con daño cerebral midiendo, por ejemplo, la cantidad del polipéptido mencionado anteriormente en una muestra de líquido corporal (y evaluando su nivel como una función del tratamiento, la recuperación de la discapacidad o no, el tamaño de las lesiones, etc.). La referencia anterior a aplicaciones "terapéuticas" incluye, por ejemplo, preparar materiales que reconocen, se unen a o tienen afinidad por los polipéptidos mencionados anteriormente, y usar tales materiales en terapia. En este caso, pueden modificarse los materiales, por ejemplo combinando un anticuerpo con un fármaco, para de ese modo dirigir el fármaco hasta una región específica del paciente. En otra realización, se administra a un sujeto una vacuna dirigida contra un polipéptido, o una variante o un mutante del mismo, seleccionado de la tabla 1, 2, 3 ó 4, o un determinante antigenético (epítopo) del mismo.

Debe entenderse que la referencia anterior a "presencia" o "ausencia" de un polipéptido, y las expresiones equivalentes "presente" y "no presente", significan simplemente que existe una diferencia significativa en la cantidad de un polipéptido que se detecta en la muestra de sujeto afectado o no afectado (o control). Por tanto, la "ausencia" de un polipéptido en una muestra de prueba puede incluir la posibilidad de que el polipéptido esté realmente presente, pero en una cantidad significativamente menor que en una muestra de prueba comparativa. Según la invención, puede realizarse un diagnóstico basándose en la presencia o ausencia de un polipéptido, y esto incluye la presencia de un polipéptido en una cantidad significativamente menor o significativamente mayor con referencia a una muestra de prueba comparativa (o control).

Debe entenderse que las referencias anteriores a "detectar" un polipéptido incluyen una referencia a composiciones y métodos para detectar modificaciones postraduccionales de los polipéptidos además de variaciones cuantitativas. Por tanto, la invención engloba la detección de modificaciones postraduccionales en general, y determinar si tales modificaciones de un polipéptido concuerdan con un diagnóstico de un trastorno relacionado con daño cerebral. Un ejemplo de una modificación postraduccional de este tipo es la N-glicosilación.

Pueden usarse kits y dispositivos de ensayo en el diagnóstico de trastornos relacionados con daño cerebral. Estos pueden incluir uno o más anticuerpos frente a un polipéptido seleccionado de cualquiera de las proteínas enumeradas en la tabla 1, 2, 3 ó 4. Los anticuerpos se unirán a los polipéptidos adecuados en una muestra de líquido extraído de un paciente. Los anticuerpos pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido. Preferiblemente, se coloca cada anticuerpo en una ubicación direccional única, para permitir de ese modo una lectura del ensayo separada para cada polipéptido individual en la muestra, así como lecturas para cualquier combinación seleccionada de polipéptidos. Tales kits y dispositivos de ensayo también pueden incluir anticuerpos frente a otros polipéptidos marcadores además de uno o más de los de la tabla 1, 2, 3 ó 4. Tales otros polipéptidos marcadores incluyen los descritos en los documentos WO01/42793 y WO2005/029088. En una realización particular, el otro polipéptido marcador es glutatión-S-transferasa P.

Un dispositivo de ensayo puede comprender un sustrato sólido que tiene una o más ubicaciones que contienen un material que reconoce, se une a o tiene afinidad por un polipéptido, o una variante o un mutante del mismo, tal como se definió anteriormente, en particular seleccionado de la tabla 1, 2, 3 ó 4. Polipéptidos preferidos que pueden detectarse mediante un dispositivo de este tipo son proteínas de unión a ácidos grasos, glutatión-S-transferasa P, RNA-BP, UFD1, NDKA, clusterina, apolipoproteína A-IV, factor H del complemento, factor 3a del complemento, alfa-2-macroglobulina, isoformas de la hemoglobina, cistatina C, hemoglobina beta, apolipoproteína E, glutatión-S-transferasa Mu 1, cadena de tubulina beta-4, isozima L1 de hidrolasa carboxi-terminal de ubiquitina, transgelina 3, proteína neuronal Np25, inhibidor 1 de la disociación de Rab GDP, dihidropirimidinasa de tipo 2 (DRP-2), aspartato aminotransferasa citoplasmática, fructosa-bisfosfato aldolasa C, y subunidad alfa de tipo 6 del proteasoma. El dispositivo de ensayo puede incluir anticuerpos frente a dos o más de estos polipéptidos, frente a tres o más, cuatro o más, cinco o más, o en algunos casos diez o veinte o más.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

55 Abreviaturas

LCR: líquido cefalorraquídeo; H-FABP: proteína de unión a ácidos grasos cardiaca; NDKA: nucleósido difosfato cinasa A; ECJ: enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; OGE: electroforesis de desplazamiento de gel; UPD1: proteína de degradación por fusión de ubiquitina 1; GST-P: glutatión-S-transferasa P; SBP: productos de descomposición de espectrina.

Ejemplo 1

Usando técnicas de electroforesis en gel unidimensional (1-DE), separación de proteínas de líquido cefalorraquídeo (LCR) y espectrometría de masas, se encontraron los 58 polipéptidos nombrados en la tabla 1 con niveles elevados o disminuidos en el LCR de pacientes fallecidos, usado como modelo de daño cerebral masivo.

ES 2 336 946 T3

Manejo de muestras y población del estudio

Se usaron veinte muestras de LCR para el enfoque basado en proteómica que tiene como objetivo descubrir marcadores de trastornos relacionados con daño cerebral. Cinco de estas muestras se obtuvieron en la autopsia de pacientes fallecidos 6 horas tras su fallecimiento sin patología del sistema nervioso central. Otras quince se recogieron mediante punción lumbar de pacientes vivos a los que se les realizó un examen neurológico para determinar estados benignos no relacionados con daño cerebral (cefalea atípica y parálisis nerviosa facial periférica idiopática). Se centrifugaron las muestras de LCR inmediatamente tras su recogida, se tomaron alícuotas, se congelaron a -80°C y se almacenaron hasta su análisis.

10

Fraccionamiento por depleción de LCR

Se realizó la inmunodepleción de albúmina sérica humana, transferrina, haptoglobina, IgG, IgA y antitripsina usando un sistema Multiple Affinity Removal (Agilent Technologies, Wilmington, EE.UU.). Se concentraron 3 ml de LCR hasta aproximadamente 300 µl usando ultrafiltración (MWCO de 10 kDa, Vivascience). Se dividió el LCR en alícuotas de 200 µl para la inmunodepleción según las instrucciones del fabricante. Se concentraron las fracciones combinadas tras la deplección usando ultrafiltración. Se midieron concentraciones finales de proteínas en LCR de entre 600 y 900 µg/µl usando un ensayo Bradford. Todos los reactivos y aparatos para electroforesis de desplazamiento de gel (OGE) se han descrito en detalle en otra parte (Ros, A., et al., Protein purification by Off-Gel electrophoresis. Proteomics, 2002. 2(2): págs. 151-6). Se cargaron 750 µl de las muestras de LCR sometidas a inmunodepleción sobre la tira para OGE usando la carga de todos los pocillos (50 µl por pocillo). Se enfocaron las muestras para un total de 31,6 kWh (1 h a 100 V, 1 h a 500 V, 1 h a 1000 V, 15 h a 2000 V). Se limitó la corriente a 50 µA y se controló la temperatura a 20°C. Se recogieron fracciones (20-100 µl) de cada pocillo y se almacenaron a -20°C antes de la SDS-PAGE.

1-DE de proteínas de LCR fraccionadas mediante OGE

Se mezclaron las fracciones procedentes de la OGE con una disolución concentrada 5X de tampón de Laemmli (Tris-HCl 0,125 M, SDS al 4%, glicerol al 40%, azul de bromofenol al 0,1%, pH 6,8) hasta 70 µl y se calentaron a 95°C durante 5 min. Se centrifugaron las muestras a 14000 g y se cargó el sobrenadante sobre el gel de SDS-poliacrilamida al 12,5%. Se realizó la migración en un tampón Tris-glicina-SDS pH 8,3. Entonces se tiñó el gel usando tinción de plata compatible con EM procedente de Blum [Blum, H., Beier, H. y Gross, H. J., Electrophoresis 1987, 8, 93-99]. En primer lugar se fijó el gel durante un mínimo de 30 min. en metanol al 50% (v/v), ácido acético al 10% (v/v) y luego 15 min. en metanol al 5% (v/v). Entonces se lavó el gel 3 veces durante 5 min. con H₂O milli-Q y se incubó durante 2 min. en tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃, 5 H₂O) 0,2 g/l (p/v) recién preparado. Se lavó adicionalmente el gel 3 veces durante 30 s con H₂O milli-Q, y se incubó en la disolución de tinción, es decir 25 min. en disolución de nitrato de plata (AgNO₃) 2 g/l. Se lavó el gel 3 veces durante 1 min. con H₂O milli-Q, y se incubó en la disolución de revelado (carbonato de sodio Na₂CO₃ 30g/L (p/v), 0,05% de HCOH al 37% (v/v), 2% (v/v) de un tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃, 5 H₂O) 0,2 g/l (p/v) recién preparado) durante 10 min. como máximo. Se detuvo el revelado del gel usando una disolución de Na₂-EDTA 14 g/l (p/v) durante 10 min. antes de lavar con H₂O milli-Q. Se determinaron las masas moleculares aparentes haciendo correr 2 µg de patrones de peso molecular de amplio intervalo (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Se barrió el gel en un escáner Arcus II Agfa, con software Agfa Fotolook versión 3.6. Se cortaron las bandas que iban a identificarse, se pusieron en tubos Eppendorf y se eliminó la tinción. Se incubó cada trozo de gel en 30 µl de disolución de eliminación de tinción (K₃FeCN₆ 30 mM, Na₂S₂O₃ 100 mM) con agitación en vórtex ocasional hasta que se eliminó por completo la tinción de los geles (5-10 min.). Entonces se lavaron los trozos de gel dos veces durante 10 min. con un mínimo de 100 µl de H₂O milli-Q durante 10 y luego se almacenaron a 4°C en etanol al 10% (v/v).

50

Identificación de las proteínas mediante nanoCL-ESI-EM/EM

Se lavaron los trozos de gel con 200 µl de bicarbonato de amonio 50 mM, durante 10 min. Entonces se deshidrataron los trozos de gel con 100 µl de CH₃CN al 100% y se secaron en una centrífuga de vacío (HETO, Allerod, Dinamarca). Se realizó la digestión con tripsina tal como se describió previamente [Scherl, A., Coute, Y., Deon, C., Calle, A., Kindbeiter, K., et al., Mol Biol Cell 2002, 13, 4100-9]. Se realizó NanoCL-ESI-EM/EM en una trampa iónica LCQ DecaXP (ThermoFinnigan, San Jose, CA) acoplada a un inyector automático LC-PAL (CTC Analytics, Zwingen, Suiza) y una microbomba de HPLC Rheos 2000 (Flux Instruments, Basilea, Suiza). Para cada experimento, se inyectaron 5 µl de muestra en CH₃CN al 5%, ácido fórmico al 0,1%, en una columna de fase inversa C18 (diámetro interno de 75 µm) rellena de manera interna con Zorbax 300Extend-C18 de 5 µm (Agilent Technologies, Wilmington, EE.UU.). Se eluyeron los péptidos de la columna usando un gradiente de CH₃CN en presencia de ácido fórmico al 0,1%. Para la elución de los péptidos, se aumentó la concentración de acetonitrilo desde el 8 hasta el 47% en 15 min. Se usó un divisor de flujo para reducir la velocidad de flujo desde 40 µl/min. hasta aproximadamente 0,2 µl/min. Se aplicó un potencial de 1,8 kV sobre el capilar de nanoelectropulverización (New Objective, Woburn, MA). Se usó helio como gas de colisión. Se fijó la energía de colisión al 35% con respecto al máximo. Se adquirieron los espectros de EM/EM mediante el cambio automático entre el modo EM y EM/EM. Se eligieron los dos picos mayores de cada barrido de EM para EM/EM. Se aplicó exclusión dinámica con un recuento de repeticiones de 2 y una duración de repeticiones de

ES 2 336 946 T3

0,5 min. Tras estas dos adquisiciones de EMEM con el mismo precursor, se excluyó el precursor del análisis mediante EMEM durante 1,0 min. Se convirtieron los espectros en archivos DTA, se reagruparon usando software interno y se realizó la búsqueda en la base de datos con MASCOT 1.8 (<http://www.matrixscience.co.uk/>). Se eligió una tolerancia de 2,0 Da para el precursor y de 1,0 Da para los fragmentos. Se seleccionó ESI-TRAP como el instrumento. Se realizó 5 una búsqueda en la base de datos Swiss-Prot de UniProt sin restricción de especies. En estas condiciones, el umbral de significación vino dado por una puntuación de 42 o superior mediante Mascot. También se hizo una búsqueda de los datos frente a la base de datos Swiss-Prot de UniProt usando el programa Phenyx (<http://www.phenyx-ms.com/>). Se validaron manualmente los resultados positivos para proteínas con menos de tres péptidos por encima del umbral. Se 10 hizo una búsqueda adicional de los datos frente a la base de datos Trembl, lo que dio como resultado la identificación de otras 22 proteínas. Los resultados se muestran en la tabla 1.

TABLA 1

LCR post mórtem	
Número de registro	Nombre de la proteína
20 000241	Proteína reguladora de señal beta-1
043396	Proteína similar a tiorredoxina 1
25 043488	Miembro 2 de aflatoxina B1 aldehído reductasa
043707	Alfa-actinina 4
30 075223	Proteína C7orf24
095336	6-fosfogluconolactonasa
35 095861	3' (2'),5'-bisfosfato nucleotidasa 1
P00352	Retinal deshidrogenasa 1
P00390	Glutatión reductasa, mitocondrial
40 P00491	Purina nucleósido fosforilasa
P00915	Anhidrasa carbónica I
P01859	Región C de la cadena gamma-2 de Ig*
45 P01876, P01877	Región C de la cadena alfa-1 ó 2 de Ig
P02024	Cadena beta de hemoglobina
P02545	Lamina A/C (lamina de 70 kDa)

50

55

60

65

ES 2 336 946 T3

	P02741	Proteína C reactiva
5	P02760	Proteína AMBP
	P04642	Cadena A de L-lactato deshidrogenasa
10	P04746, P04745,	Alfa-amilasa (pancreática, salival o 2B)
	P19961	
15	P05089	Arginasa 1
	P05209, Q9BQE3	Cadena alfa-1 o alfa-6 de tubulina
20	P05413	Proteína de unión a ácidos grasos, cardiaca (H-FABP)
	P05976 o P06741	Cadena ligera de miosina 1 ó 3, isoforma de músculo esquelético
25	P06576	Cadena beta de ATP sintasa, mitocondrial
	P06753	Cadena alfa 3 de tropomiosina
30	P07148	Proteína de unión a ácidos grasos, hepática (L-FABP)
35	P07203	Glutatión peroxidasa 1
	P07225	Proteína S dependiente de vitamina K
	P07226	Cadena alfa 4 de tropomiosina
40	P07237	Proteína disulfuro-isomerasa
	P07357	Cadena alfa del componente C8 del complemento
45	P07738	Bisfosfoglicerato mutasa
	P07900	Proteína de choque térmico HSP 90-alfa (HSP 86)
50	P07996	Trombospondina 1
	P08059	Glucosa-6-fosfato isomerasa
55	P08133	Anexina A6
	P08758	Anexina A5
	P09417	Dihidropteridina reductasa
60	P09488	Glutatión-S-transferasa Mu 1
	P09493 o P06753	Cadena 1 alfa o cadena alfa 3 de tropomiosina
65	P09525	Anexina A4

ES 2 336 946 T3

	P09668	Catepsina H
5	P10586	Proteína tirosina fosfatasa F de tipo receptor
	P10599	Tiorredoxina
10	P10768	Esterasa D
	P11021	Proteína regulada por glucosa de 78 kDa
15	P12833	Cadena pesada de miosina, isoforma beta de músculo cardiaco
20	P12882	Cadena pesada de miosina, músculo esquelético, adulto 1
	P13489	Inhibidor de ribonucleasa placentaria
25	P13535	Cadena pesada de miosina, músculo esquelético, perinatal
	P13611	Proteína del núcleo de versicano
30	P13693	Proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP)
	P13716	Ácido delta-aminolevunílico deshidratasa
35	P13929	Beta-enolasa
	P14136	Proteína ácida fibrilar de la glía, astrocito (GFAP)
40	P14550	Alcohol deshidrogenasa [NADP+]
	P14923	Placoglobina de las uniones
45	P15103	Glutamina sintetasa
	P15121	Aldosa reductasa
	P15259	Fosfoglicerato mutasa 2
50	P15289	Arilsulfatasa A
	P15924	Desmoplaquina
55	P16930	Fumarilacetoadetasa
	P17066	Proteína de choque térmico 6 de 70 kDa
60	P18206	Vinculina
	P21266	Glutatió-S-transferasa Mu 3

ES 2 336 946 T3

	P21333	Filamina A
5	P21695	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [NAD ⁺], citoplasmática
10	P22061	Proteína-L-isoaspartato (D-aspartato) O-metiltransferasa
	P22314	Enzima activadora de ubiquitina E1
15	P23141	Carboxilesterasa 1 hepática
	P24534	Factor de elongación 1-beta
20	P25788	Subunidad alfa de tipo 3 del proteasoma
	P26038	Moesina
25	P26641	Factor de elongación 1-gamma
	P27169	Paraoxonasa/arilesterasa 1 sérica
30	P27348	Proteína 14-3-3 tau
35	P28072	Subunidad beta de tipo 6 del proteasoma
	P28161	Glutatión-S-transferasa Mu 2
40	P28827	Proteína tirosina fosfatasa mu de tipo receptor
	P29218	Inositol-1 [ò 4]-monofosfato
45	P29401	Transcetolasa
	P30040	Proteína ERp29 de retículo endoplasmático
50	P30041	Peroxirredoxina 6
	P30101	Proteína disulfuro-isomerasa A3
55	P30626	Sorcina (proteína de 22 kDa)
	P31946	Proteína 14-3-3 beta/alfa
	P31948	Fosfoproteína inducida por estrés 1
60	P34932	Proteína de choque térmico 4 de 70 kDa
	P35080	Profilina 2
65	P35237	Inhibidor de trombina placentaria

ES 2 336 946 T3

	P36980	Proteína relacionada con el factor H del complemento 2
5	P37837	Transaldolasa
	P40121	Proteína de bloqueo de extremos de macrófagos
10	P42126	3,2-trans-enoil-CoA isomerasa, mitocondrial
15	P42655	Proteína 14-3-3 epsilon
	P45381	Aspartoacilasa
20	P46940	Proteína IQGAP1 de tipo activadora de Ras GTPasa
25	P47756	Subunidad beta de la proteína de bloqueo de extremos de actina F
	P48637	Glutatión sintetasa
30	P49419	Miembro A1 de la familia 7 de aldehido deshidrogenasa
	P50135	Histamina N-metiltransferasa
35	P50395	Inhibidor beta de la disociación de Rab GDP
	P52565	Inhibidor 1 de la disociación de Rho GDP
40	P52566	Inhibidor 2 de la disociación de Rho GDP
45	P52907	Subunidad alfa-1 de la proteína de bloqueo de extremos de actina F
50	P54289	Subunidades alfa-2/delta de los canales de calcio, tipo L sensibles a dihidropiridina
55	P54652	Proteína relacionada con choque térmico 2 de 70 kDa
	P54922	ADP-ribosilarginina hidrolasa
60	P55287	Cadherina 11
	P55854, P61956	Proteína SMT 3A o 3B similar a ubiquitina
65	P57087	Molécula de adhesión de unión 2

ES 2 336 946 T3

	P60900	Subunidad alfa de tipo 6 del proteasoma
5	P61088	Enzima E2 N de conjugación con ubiquitina
10	P62258	Proteína 14-3-3 épsilon
	P62993	Proteína de unión a receptor de los factores de crecimiento 2
15	P63104	Proteína 14-3-3 zeta/delta
	P68133	Actina, alfa, músculo esquelético
20	Q00169	Isoforma alfa de la proteína de transferencia de fosfatidilinositol
	Q01082	Cadena beta de espectrina, cerebro 1
25	Q01995	Transgelina
	Q04917	Proteína 14-3-3 eta
30	Q06033	Cadena pesada H3 del inhibidor de inter-alfa-tripsina
35	Q12765	Secernina 1
	Q13332	Proteína tirosina fosfatasa S de tipo receptor
40	Q13509	Tubulina beta-4
	Q13740	Antígeno CD166
45	Q13813	Cadena alfa de espectrina, cerebro
	Q13938	Calcifosina
50	Q14126	Desmogleína 2
	Q15149	Plectina 1
55	Q15181	Pirofosfatasa inorgánica
	Q16620	Receptor de los factores de crecimiento BDNF/NT-3
60		
65	Q16881	Tiorredoxina reductasa 1, citoplasmática

ES 2 336 946 T3

	Q86UP2	Quinectina
5	Q86YZ3	Hornerina
	Q8N0Y7	Supuesta fosfoglicerato mutasa 3
10	Q8TAG5	Proteína MGC33530 de dominio de tipo inmunoglobulina
	Q8TD26	Proteína de unión al cromodominio de ADN helicasa 6
15	Q92598	Proteína de choque térmico de 105 kDa
	Q92890	Homólogo de la proteína de degradación por fusión de ubiquitina 1
20	Q969H8	Precursor de la proteína C19 o F10
	Q96IU4	Factor B de interacción con CCG1
25	Q9BX68	Proteína de unión a nucleótidos con triada de histidina 2
	Q9H477	Ribocinasa
30	Q9NVS9	Piridoxina-5'-fosfato oxidasa
	Q9NZT1	Proteína similar a calmodulina 5
35	Q9P0L0	Proteína A asociada a proteínas de membrana asociadas a vesículas
	Q9P121	Neurotrimina
40	Q9UBQ7	Glioxilato reductasa/hidroxipiruvato reductasa
	Q9UKK9	ADP-azúcar pirofosfatasa
45	Q9UKX2	Cadena pesada de miosina, músculo esquelético, adulto 2
	Q9UN36	Proteína NDRG2
50	Q9Y617	Fosfoserina aminotransferasa
	Q9Y623	Cadena pesada de miosina, músculo esquelético, LCR fetal
55		
60		

LCR Ante mórtem

ES 2 336 946 T3

	P00748	Factor de coagulación XII
5	P01833	Receptor de inmunoglobulinas poliméricas
	P04083	Anexina A 1
10	P04121	Proteína de bloqueo de extremos de macrófagos
	P05109	Calgranulina A (MRP-8)
15	P12109	Cadena alfa 1 (VI) de colágeno
	P22352	Glutatión peroxidasa plasmática
20	P35247	Proteína D asociada a surfactante pulmonar
	P43121	Glicoproteína MUC18 de la superficie celular
25	P58876 + otros	Histona H2B (diferentes formas)
	P78509	Reelina
30		

	N.º de registro Trembl	Descripción
35	O95784	Proteína de unión a Fc de IgG (fragmento)
	Q07898, Q07899,	Antígeno M130; variante 1 de antígeno M130
	Q07900, Q07901,	citoplasmático; variante 2; variante de
40	Q86VB7	antígeno M130 extracelular; similar al antígeno CD163
		Proteína hipotética DKFZp779N0926
45	Q7Z664	(Fragmento)
	Q7Z623	proteína hipotética
		proteína asociada a carcinoma hepatocelular
50	Q8IZY7	TB6
	Q8N240	Proteína hipotética FLJ34957
		Proteína hipotética con 1 péptido extra en
55	Q8N466	entrada SP (contactina Q12860)
	Q8NCW5	Precursor de la proteína de unión a ApoA-I
60	Q8NFZ8 o Q9Y4A4	TSLC1 de tipo 2 o F221621 (fragmento)
	Q969J9	Proteína hipotética (similar a distroglicano 1)
65	Q96AC3, Q96FV2,	Proteína hipotética, proteína Ses2, similar

ES 2 336 946 T3

Q9BU04 al producto génico de KIAA0193 (fragmento)
5 Q96B89, Q9H3J8, Proteína hipotética, proteína My027,
Q9HC37, Q9HC38, Proteína hipotética, Proteína hipotética,
Q9Y3E8 Proteína CGI-150
10 Q96B89, Q9H3J8,
Q9HC37, Q9HC38,
Q9Y3E8 diversos nombres
15 Q96B89, Q9H3J8, Proteína hipotética, proteína My027,
Q9HC38, Q9Y3E8 Proteína hipotética, proteína CGI-150
Q96EI3, Q9H0W9 Proteína hipotética
20 Q96NV4, Q9H0R4 Proteína hipotética FLJ30028, Proteína
hipotética
Fosfolisina fosfohistidina inorgánica
25 Q9H008 pirofosfato fosfatasa
Q9H2Y2, Q9NPH2, Inositol 1-fosfato sintasa, Mio-inositol 1-
Fosfato sintasa A1, Proteína hipotética
30 Q9NVW7 FLJ10463
Q9NQ56, Q9NQ48 Factor de transcripción de cremallera de
leucina de tipo 1
35 DJ665N4.2 (similar a la proteína hipotética
Q9NX46 FLJ20446) (precursor de ADP-ribosil-
hidrolasa)
40 Proteína de unión a hemo, Proteína de unión
a hemo
45 Q9Y5Z5, Q9NRV9 (Proteína hipotética)
Q9Y6R7 BP a Fc gamma humano (fragmento)

50 Ejemplo 2

Introducción

Se evaluó una de las proteínas que se identificó que estaba regulada por incremento en LCR de paciente fallecido como posible biomarcador de la enfermedad cerebrovascular, un ejemplo de un trastorno relacionado con daño cerebral. Se llevó a cabo un estudio de pacientes con accidente cerebrovascular y los resultados se muestran en las figuras 5 a 7. Se obtuvo una señal de intensidad de ELISA para el homólogo de la proteína de degradación por fusión de ubiquitina 1 (UFD1) en muestras de plasma de los pacientes y de pacientes de control negativo. Se extrajeron muestras de plasma de pacientes entre 0-24 horas y/o tras 72 horas de su llegada al hospital de urgencias, y se hicieron coincidir en edad/sexo con muestras de pacientes control.

60 Se realizó un ELISA usando placas negras Reacti-Bind™ recubiertas con NeutrAvidin™ de 96 pocillos (Pierce, Rockford, IL). En primer lugar se aclararon las placas con solución salina tamponada con borato, pH 8,4, (BBS) (H_3BO_3 100 mM, $Na_2B_4O_7$ 25 mM (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.), NaCl 75 mM (Merck, Darmstadt, Alemania)) en un lavador NOVAPATH™ (Bio-Rad, Hercules, CA). Luego, se añadieron 50 μ l de anticuerpo conjugado con biotina (2 μ g/ml) preparado en el tampón de dilución A a pH 7 (DB, poli(alcohol vinílico), hidrolizado al 80%, peso mol. 9000-10.000 (Aldrich, Milwaukee, WI, EE.UU.), MOPS (ácido 3-[N-morfolina]propanosulfónico) (Sigma), NaCl, $MgCl_2$ (Sigma), $ZnCl_2$ (Aldrich), pH 6,90, disolución de BSA al 30%, de calidad para fabricación (Serological Proteins Inc.,

ES 2 336 946 T3

Kankakee, IL)), y se incubó durante una hora a 37°C. Entonces se lavaron las placas 3 veces con BBS en el lavador de placas. Entonces se añadieron 50 µl de antígeno y se incubó durante una hora a 37°C. Se diluyeron las proteínas recombinantes a 100, 50, 25, 12,5, 6,25 ng/ml con el tampón de dilución A para establecer una curva de calibración. Se diluyeron las muestras de plasma hasta la concentración apropiada con el tampón de dilución A. Tras la etapa de lavado, se añadieron 50 µl de anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina a la dilución apropiada con tampón A y se incubó durante una hora a 37°C. Entonces se lavó la placa de 96 pocillos 3 veces con BBS en el lavador de placas y se añadieron 50 µl de sustrato fluorescente Attophos® AP (Promega, Madison, WI). Se leyeron inmediatamente las placas en un lector de placas de microtitulación del fluorímetro SpectraMax GEMINI-XS, (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EE.UU.) ($\lambda_{\text{excitación}} = 444 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 555 \text{ nm}$). Se expresan los resultados en UFR y pueden obtenerse en modo de punto final (sólo una lectura) o en modo cinético durante 10 minutos. En modo cinético, se fijó el lector de placas para el registro usando 6 destellos (por pocillo) que luego se integraron en un promedio. De esta manera, se analizó cada pocillo 6 veces usando un intervalo de tiempo mínimo entre cada lectura. Esto se tradujo en un retardo de 2 minutos entre lecturas. Se calculó la pendiente y se usó para determinar el valor final para cada pocillo. Se determinó el mejor valor de corte para discriminar entre los grupos control y con accidente cerebrovascular (isquémico más hemorrágico o isquémico frente a hemorrágico) usando curvas ROC generadas en el software GraphPad Prism 4.

Conclusión

Queda claro a partir de la figura 5 que UFD1 se sobreexpresa en el plasma de pacientes con accidente cerebrovascular en comparación con pacientes control. Se realizó un análisis estadístico y se trazaron curvas ROC (software GraphPad Prism 4) que indican la sensibilidad de la prueba como una función de la especificidad (figuras 6). Se dedujeron los mejores valores de corte para distinguir entre pacientes con accidente cerebrovascular y control a partir de estas curvas ROC. Se obtuvieron una sensibilidad y una especificidad del 94,4% y 77,8%, respectivamente, usando los mejores valores de corte. Se realizó una prueba de Mann-Whitney no paramétrica para comparar los grupos con accidente cerebrovascular y control. Se obtuvieron valores de p muy bajos (<0,0001), lo que indica que la diferencia entre el accidente cerebrovascular y los controles fue sumamente significativa.

Este resultado demuestra que el homólogo de la proteína de degradación por fusión de ubiquitina 1 (UFD1) es un marcador plasmático útil para el diagnóstico temprano del accidente cerebrovascular, solo, o en combinación con otros biomarcadores.

Como UFD1 se ha hallado en LCR de paciente fallecido, es una predicción razonable que otros polipéptidos y proteínas expresados de manera diferencial en LCR de paciente fallecido también serán útiles como marcadores para trastornos relacionados con daño cerebral.

Ejemplo 3

Este ejemplo proporciona datos adicionales que muestran los niveles plasmáticos de UFD1 en pacientes con accidente cerebrovascular y control. Los datos adicionales se han obtenido a partir de dos cohortes de pacientes y controles, la más pequeña de Ginebra y un panel más exhaustivo de los EE.UU.

Se realizó un ELISA usando placas negras Reacti-Bind™ recubiertas con NeutrAvidin™ de 96 pocillos (Pierce, Rockford, IL). En primer lugar se aclararon las placas en solución salina tamponada con borato, pH 8,4, (BBS) (H_3BO_3 100 mM, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 25 mM (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.), NaCl 75 mM (Merck, Darmstadt, Alemania)) en un lavador NOVAPATH™ (Bio-Rad, Hercules, CA). Luego, se añadieron 50 µl de anticuerpo conjugado con biotina específico frente al marcador relevante (2 µg/ml) preparado en el tampón de dilución A a pH 7 y se incubó durante una hora a 37°C. Entonces se lavaron las placas 3 veces con BBS en el lavador de placas. Entonces se añadieron 50 µl de antígeno o plasma y se incubó durante una hora a 37°C. Se diluyeron los antígenos de proteínas recombinantes a 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 ng/ml con tampón de dilución A para generar una curva de calibración. Se diluyeron las muestras de plasma hasta la concentración apropiada con tampón de dilución A. Tras una etapa de lavado adicional, se añadieron 50 µl de anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina específicos frente al biomarcador relevante a la concentración apropiada en tampón de dilución A y se incubó durante una hora a 37°C. Entonces se lavó la placa de 96 pocillos 3 veces con BBS en el lavador de placas y se añadieron 50 µl de sustrato fluorescente Attophos® AP (Promega, Madison, WI). Se leyeron inmediatamente las placas en un lector de placas de microtitulación del fluorímetro SpectraMax GEMINI-XS (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EE.UU.) ($\lambda_{\text{excitación}} = 444 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 555 \text{ nm}$).

Se expresan los resultados en UFR y pueden obtenerse en modo de punto final (sólo una lectura) o en modo cinético durante 10 minutos. En modo cinético, para cada pocillo se promediaron 6 destellos y se analizó cada pocillo 6 veces usando un intervalo de tiempo mínimo entre cada lectura (2 minutos). Se calculó la pendiente y se usó para determinar el valor final para cada pocillo. Se determinó el mejor valor de corte para discriminar entre los grupos control y con accidente cerebrovascular (isquémico más hemorrágico o isquémico frente a hemorrágico) usando curvas ROC generadas en el software GraphPad Prism 4.

Los resultados se muestran en la figura 7. Este resultado demuestra además que el homólogo de la proteína de degradación por fusión de ubiquitina 1 (UFD1) es un marcador útil para el diagnóstico temprano del accidente cerebrovascular, solo, o en combinación con otros biomarcadores.

ES 2 336 946 T3

Como UFD1 se ha hallado en LCR de paciente fallecido, es una predicción razonable que otros polipéptidos y proteínas que se expresan de manera diferencial en LCR de paciente fallecido también serán útiles como marcadores para trastornos relacionados con daño cerebral.

5 Ejemplo 4

En el trabajo actual, se ha usado un método alternativo a la 2-DE con el fin de caracterizar adicionalmente el proteoma de LCR *post mórtем* humano. Se analizó un conjunto de muestras de LCR *post mórtем* ($n = 5$) usando un protocolo de cuatro etapas: (i) inmunodepleción de proteínas abundantes en LCR (albúmina, IgG, IgA, transferrina, antitripsina y haptoglobina), (ii) fraccionamiento de proteínas del LCR según su pI usando electroforesis de desplazamiento de gel (OGE) (24), (iii) análisis de las fracciones procedentes de la OGE mediante SDS-PAGE, (iv) identificación de proteínas mediante CL-EM/EM. Se validaron proteínas seleccionadas que se identificaron en el LCR *post mórtем* usando inmunotransferencias de tipo Western de muestras individuales y LCR *post mórtем* y *ante mórtем*. Se tratará el posible interés de las proteínas identificadas en LCR *post mórtем* como biomarcadores de daño cerebral.

15

Procedimientos experimentales

Materiales

20 Todos los productos químicos, a menos que se establezca lo contrario, se adquirieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MI, EE.UU.) y eran de la mayor pureza disponible. El CH₃CN se adquirió de Biosolve (Westford, MA, EE.UU.).

Recogida del LCR

25 Se recogieron muestras de LCR *post mórtем* de cinco pacientes diferentes mediante punción ventricular en la autopsia, 6 horas tras el fallecimiento en promedio. Los pacientes fallecidos no tenían ningún historial, síntomas ni signos de ningún estado psiquiátrico o neurológico. La causa del fallecimiento no estuvo relacionada con ninguna disfunción del sistema nervioso central o periférico y los datos neuropatológicos del cerebro concordaron con cambios relacionados con la edad sin patología relevante. Se usaron muestras de LCR *ante mórtем* control para la validación mediante inmunotransferencia de tipo Western. Se recogieron mediante punción lumbar de diagnóstico de cinco pacientes vivos que tenían a los que se les realizó un examen neurológico para determinar estados benignos no relacionados con daño cerebral (cefalea atípica y parálisis nerviosa facial periférica idiopática). Cada paciente o los familiares del paciente dieron el consentimiento informado antes de su inclusión. Se centrifugaron muestras de LCR atraumáticas inmediatamente tras la recogida, se tomaron alícuotas, se congelaron a -80°C y se almacenaron hasta su análisis.

Recogida de muestras de sangre

40 Se usaron muestras de plasma obtenidas del Hospital Universitario de Ginebra para la evaluación del nivel de GST-P1. La junta del comité ético institucional local aprobó el protocolo clínico. Se incluyeron en este estudio siete pacientes con accidente cerebrovascular y control consecutivos ingresados en el servicio de urgencias del Hospital Universitario de Ginebra. De los 7 pacientes consecutivos incluidos, a 3 se les diagnosticó estados no neurológicos y se clasificaron como muestras control (2 hombres y 1 mujer, con una edad promedio de 70,26 años) y a 4 se les diagnosticó accidente cerebrovascular (3 hombres y 1 mujer, edad promedio de 71,81 años) incluyendo 2 accidentes cerebrovasculares isquémicos y 1 hemorrágico intracerebral. El diagnóstico de accidente cerebrovascular lo estableció un neurólogo experimentado y se basó en la aparición repentina de un déficit neurológico focal y el posterior reconocimiento de una lesión que concuerda con los síntomas en las imágenes de cerebro obtenidas mediante TAC o IRM. El grupo control incluía pacientes con cáncer ($n = 2$) y uno con trastorno gastrointestinal ($n = 1$). Para cada paciente, se recogió una muestra de sangre en el momento del ingreso en tubos que contenían heparina seca en el plazo de un intervalo de tres horas tras la aparición de los síntomas. Tras su centrifugación a 1500 g durante 15 min. a 4°C, se tomaron alícuotas de las muestras y se almacenaron a -80°C hasta el análisis. Se realizaron análisis con las muestras congeladas.

Depleción de proteínas abundantes

55 Se concentraron muestras reunidas de LCR *post mórtем* hasta 300 μ l usando dispositivos de ultrafiltración de MWCO de 10 kDa (Vivaspin UF 4, Vivascience, Alemania). La carga proteica fue de aproximadamente 1,6 mg. Entonces se diluyó la muestra 1:5 con tampón A de MARS (Agilent, Palo Alto, CA, EE.UU.) y se hizo pasar a través de un filtro de 0,22 μ m. Se inyectaron alícuotas de 200 μ l en una columna MARS de 4,6 x 100 mm (Agilent). Se recogieron las fracciones no retenidas, se reunieron y se concentraron hasta aproximadamente 1 ml usando ultrafiltración. 60 Se lavaron estas fracciones concentradas dos veces con NH₄HCO₃ 10 mM. Se realizó un ensayo de concentración de proteínas usando el método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

Electroforesis de desplazamiento de gel

65 Se realizó el fraccionamiento mediante OGE como en Heller, M., Michel, P.E., Morier, P., Crettaz, D., Wenz, C., Tissot, J.D., Reymond, F., y Rossier, J.S. (2005) Two-stage Off-Gel isoelectric focusing: protein followed by peptide fractionation and application to proteome analysis of human plasma. Electrophoresis 26, 1174-1188. Se preparó el LCR sometido a depleción para OGE añadiendo urea, tiourea y DTT hasta concentraciones finales de 7 M, 2 M y 65

ES 2 336 946 T3

mM, respectivamente. Se rehidrataron tiras de IPG (13 cm, pH 4,0-7,0) con una disolución que contenía urea 7 M, tiourea 2 M, DTT 65 mM, anfolitos al 0,5% (v/v) (pH 4,0-7,0) y glicerol al 5%. Entonces se puso un dispositivo de 15 pocillos en el IPG rehidratado y se cargaron 50 µl de muestra en cada pocillo a lo largo de toda la tira. Se usaron varios dispositivos multipocillo en paralelo para permitir el fraccionamiento de la totalidad de la muestra en un único experimento. Se inició el voltaje a 100 V (1 hora) luego se aumentó hasta 500 V (durante 1 hora), 1000 V (durante 1 hora) y finalmente hasta 2000 V en el que se mantuvo durante 15 horas. Se realizó el enfoque a 20°C con un límite de corriente de 50 mA. Se recuperaron fracciones de cada uno de los pocillos.

SDS-PAGE y digestión en gel

Se separaron las proteínas de las fracciones de OGE mediante SDS-PAGE en geles de Tris-glicina al 12% de T preparados de manera interna (8 x 5 x 0,15 cm). Se cargaron aproximadamente 60 µl de cada fracción en el gel. Tras la migración, se tiñeron los geles con una tinción de plata compatible con EM (Blum, H., Beier, H., y Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8, 93-99.). Se eliminó la tinción de las bandas cortadas de los geles teñidos con plata, con K₃Fe(CN)₆ 15 mM, Na₂S₂O₃ 50 mM, y se lavaron con agua MilliQ (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) (26). Entonces se deshidrataron los trozos de gel en CH₃CN al 100% y se secaron en una centrífuga de vacío. Se digirieron las proteínas en gel usando protocolos habituales (Scherl, A., Coute, Y., Deon, C., Calle, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J.C., Greco, A., Hochstrasser, D., y Diaz, J.J. (2002) Functional proteomic analysis of human nucleolus. Mol. Biol. Cell 13, 4100-4109). Se extrajeron los péptidos con TFA al 1% seguido por CH₃CN al 50%, TFA al 1%. Se concentraron los extractos combinados mediante centrifugación a vacío.

CL-EM/EM

Se disolvieron los péptidos extraídos tras la digestión en gel, en 9 µl de CH₃CN al 5%, ácido fórmico al 0,1% y se cargaron 5 µl para el análisis mediante CL-EM/EM. Se conectó una precolumna (diámetro interno de 100 µm, 2-3,5 cm de largo) directamente a una columna analítica (diámetro interno de 75 µm, 9-10 cm de largo). Se llenaron ambas columnas de manera interna con Zorbax Extend C-18 de 5 µm, 3 Å (Agilent). Se desarrolló un gradiente desde el 4 hasta el 56% de disolvente B en disolvente A (disolvente A: CH₃CN al 5%, ácido fórmico al 0,1%, disolvente B: CH₃CN al 80%, ácido fórmico al 0,1%) durante 15 minutos a una velocidad de flujo de aproximadamente 300 nl/min. Se aumentó la concentración de disolvente B hasta el 95% antes de volver a las condiciones iniciales para la reequilibración de la columna. Se pulverizó directamente el eluato en la fuente de nano-ESI de un espectrómetro de masas con trampa iónica LCQ DecaXP (Thermo Finnigan, San Jose, CA) con un voltaje de pulverización de 1,8 - 2,2 kV. Se usó la adquisición dependiente de datos para seleccionar automáticamente 2 precursores para EM/EM de cada espectro de EM (intervalo de m/z de 400-1600). Se adquirieron espectros de EM/EM con una energía de colisión normalizada del 35%, una activación Q de 0,25 y una anchura de aislamiento de 4 m/z. El tiempo de activación fue de 30 milisegundos. Se aplicó exclusión dinámica con un recuento de repeticiones de 2, un tiempo de exclusión de 30 segundos y una anchura de pico de exclusión de ± 1,5 Da. También se aplicó activación de ancho de banda. Se usaron tiempos de inyección máximos de 50 milisegundos y 200 milisegundos para las adquisiciones de EM y EM/EM, respectivamente, y se fijaron los correspondientes objetivos de control automático de ganancia en 10⁸.

Extracción de datos y exploración de bases de datos

Se generaron listas de picos usando el software Bioworks 3.1 (Thermo Finnigan, San Jose, CA). Se combinaron automáticamente los archivos de datos resultantes de cada análisis en un único archivo de texto. Se hizo una búsqueda de las listas de picos resultantes frente a la base de datos UniProt/Swiss-Prot sin restricción de especies usando Mascot operando en un servidor local (versión 1.8, Matrix Sciences, R.U.) y el escritorio virtual Phenyx (Gene Bio, Suiza). Se usó Mascot con la masa promedio seleccionada, un error de la masa del precursor de 2,0 Da y un error de la masa del péptido de 1,0 Da. Se seleccionó la tripsina como la enzima, con una sola posible escisión que falte. Se seleccionó la trampa iónica de ESI como el tipo de instrumento y metionina oxidada como modificación variable. Para Phenyx, se seleccionó la trampa iónica para el tipo de instrumento y LCQ para el algoritmo. Se usaron dos tandas de búsqueda, ambas con tripsina seleccionada como la enzima y metionina oxidada como modificación variable. En la primera tanda, se permitió que faltara una escisión y se usó el modo de escisión normal. Se seleccionó esta tanda en el modo de búsqueda “turbo”. En la segunda tanda, se permitió que faltaran 2 escisiones y se fijó el modo de escisión en semiescindido. La longitud mínima de péptido permitida fue de 6 aminoácidos y la tolerancia del ion original fue de 2,0 Da en ambas tandas de búsqueda. Se redujeron ligeramente los criterios de aceptación en la búsqueda de la segunda tanda (tanda 1: puntuación AC de 7,0, puntuación Z del péptido de 7,0, valor de p del péptido de 1 E-6; tanda 2: puntuación AC de 7,0, puntuación Z del péptido de 6,0, valor de p del péptido de 1 E-5). Se aceptó que las proteínas que se identificaron como proteínas humanas con 3 o más péptidos de alta puntuación tanto para Mascot como para Phenyx eran verdaderas coincidencias. Los “péptidos de alta puntuación” correspondían a péptidos que estaban por encima del umbral en las búsquedas con Mascot (probabilidad del 5% de falsa coincidencia para cada péptido por encima de esta puntuación) y por encima de una puntuación de péptido de 8,5 para las búsquedas con Phenyx usando el algoritmo de puntuación de LCQ. Se validaron manualmente las coincidencias con menos de 3 péptidos. Sólo se incluyeron las coincidencias de un único péptido si eran péptidos de alta puntuación en los resultados de ambos programas y si se consideró que los datos coincidían bien con la secuencia del péptido.

También se hizo una búsqueda de las listas de picos frente a la base de datos Swiss-Prot y TrEMBL combinadas de UniProt restringida a entradas humanas usando el escritorio virtual Phenyx (Gene Bio, Suiza). Los criterios de

ES 2 336 946 T3

aceptación fueron más rigurosos que para la búsqueda de la base de datos Swiss Prot sola (tanda 1: puntuación AC de 16,0, puntuación Z del péptido de 8,0, valor de p del péptido de 1 E-7; tanda 2: puntuación AC de 10,0, puntuación Z del péptido de 7,0, valor de p del péptido de 1 E-6).

5 *Electroforesis en gel bidimensional*

Se mezcló un volumen de 30 μl de LCR en bruto o sometido a depleción con 120 μl de una disolución de rehidratación. La disolución final contenía urea 8 M, CHAPS al 4% (p/v), DTT 65 mM, Resolytes 3,5-10 al 2% (v/v) y una cantidad traza de azul de bromofenol. Se usó la totalidad de la muestra correspondiente a aproximadamente 6 μg de proteínas para la rehidratación de una tira de IPG de pH 3-10, no lineal de 7 cm comercial (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Se llevó a cabo el IEF. Se realizó una separación bidimensional en geles de SDS-PAGE fabricados de manera interna (9 x 8 x 0,15 cm, 12% de T, 2,6% de C). Se tiñeron los geles con plata amoniacial.

15 *Análisis de inmunotransferencia de muestras de LCR ante y post mórtем*

15 Se cargaron muestras de LCR *ante y post mórtем* (20 μl) en gel de Tris-glicina al 12% de T preparados de manera interna (8 x 7 x 0,1 cm). Se usaron los siguientes controles positivos: 100 ng de calcifosina recombinante (Scientific Proteins, Suiza), 100 ng de proteína de degradación por fusión de ubiquitina 1 (UFD1) recombinante (Biosite, San Diego, CA, EE.UU.), 1 μl de extracto de línea celular U373 para la isoforma beta de la proteína 14-3-3, y 5 μl de extracto de línea celular HeLa para glutatión-S-transferasa P (GST-P). Se sometieron a electrotransferencia las proteínas separadas mediante SDS-PAGE sobre una membrana de PVDF tal como describen Towbin *et al.* (Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354). Se tiñeron las membranas con negro de amido, se eliminó la tinción con agua y se secaron. Se realizó la inmunodetección usando anticuerpos específicos y el kit por quimioluminiscencia de inmunotransferencia de tipo Western de BM (Roche, Basilea, Suiza). Se usaron los siguientes anticuerpos: anticuerpo políclonal de conejo anti-calcifosina humana (Scientific Proteins, Witterswil, Suiza) diluido 1/1000, anticuerpo Omniclonal® de ratón anti-UFD1 humana (Biosite, San Diego, CA, EE.UU.) diluido 1/1000, anticuerpo políclonal de conejo anti-14-3-3 β humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.) diluido 1/500, anticuerpo monoclonal de ratón anti-GST-P humana (Transduction Laboratories, Lexington, KY, EE.UU.) diluido 1/1000.

Detección mediante inmunotransferencia de la proteína 14-3-3 en fracciones de OGE

35 Se cargaron cinco μl de fracciones de OGE obtenidas de conjuntos de LCR *post mórtem y ante mórtem* sobre geles de Tris-glicina al 12% de T preparados de manera interna (8 x 7 x 0,1 cm). Se usaron cinco μl de conjuntos de LCR en bruto *post mórtem y ante mórtem* como controles positivos y negativos, respectivamente. Se sometieron a electrotransferencia las proteínas separadas mediante 1-DE sobre una membrana de PVDF tal como describen Towbin *et al.* (30). Se tiñeron las membranas con negro de amido, se eliminó la tinción con agua y se secaron. Se realizó la inmunodetección usando anticuerpo políclonal de conejo anti-14-3-3 humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.) diluido 1/500 y el kit por quimioluminiscencia de inmunotransferencia de tipo Western de BM (Roche, Basilea, Suiza).

Detección mediante ELISA de tipo sándwich de GST-P1

45 Como no había disponible ningún kit comercial para la detección de GST-P1, se desarrolló una prueba de ELISA preparada de manera interna. Un técnico de laboratorio experimentado llevó a cabo los ensayos (de manera ciega) con un coeficiente de variación inferior al 15%. Se realizó un ELISA tipo *sándwich* usando placas negras Reacti-Bind™ recubiertas con NeutrAvidin™ de 96 pocillos (Pierce, Rockford, IL). En primer lugar se aclararon las placas con solución salina tamponada con borato, pH 8,4, (BBS) (H_3BO_3 100 mM, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 25 mM (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.) NaCl 75 mM (Merck, Darmstadt, Alemania)) en un lavador NOVAPATH™ (Bio-Rad, Hercules, CA). Luego, se añadieron 50 μl de anticuerpo monoclonal frente a GST-P1 conjugado con biotina (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) preparado en el tampón de dilución A a pH 7 (DB, poli(alcohol vinílico), hidrolizado al 80%, peso mol. 9000-10.000 (Aldrich, Milwaukee, WI, EE.UU.), MOPS (Sigma), NaCl, MgCl_2 (Sigma), ZnCl_2 (Aldrich), pH 6,90, disolución de BSA al 30%, de calidad para fabricación (Serological Proteins Inc., Kankakee, IL)), y se incubó durante una hora a 37°C. Entonces se lavaron las placas 3 veces con BBS en el lavador de placas. Se usaron cincuenta μl de muestras de LCR o sangre diluidas dos veces y se incubó durante una hora a 37°C. Se sometió a ensayo cada muestra por duplicado y se distribuyeron aleatoriamente sobre la placa. Se diluyó proteína GST-P1 recombinante (Invitrogen) a 100 ng/ml con el tampón de dilución A. Se obtuvo la curva de calibración en la misma placa a concentraciones de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 y 0 $\mu\text{g}/\text{l}$. Tras la etapa de lavado, se añadieron 50 μl de anticuerpos monoclonales frente a GST-P1 conjugados con fosfatasa alcalina a la dilución apropiada con el tampón de dilución A y se incubó durante una hora a 37°C. Entonces se lavó la placa de 96 pocillos 3 veces con BBS en el lavador de placas y se añadieron 50 μl de sustrato fluorescente Attophos® AP para fluorescencia (Promega, Madison, WI). Se leyeron inmediatamente las placas en un lector de placas de microtitulación del fluorímetro SpectraMax GEMINI-XS, (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EE.UU.) usando unidades de fluorescencia relativas (UFR) para el modo de punto final ($\lambda_{\text{excitación}} = 444 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 555 \text{ nm}$). Se obtuvo una curva de calibración usando una regresión lineal en el intervalo lineal de la curva. Inicialmente se expresaron los niveles de proteína en unidades de fluorescencia relativas (UFR) y se calcularon las concentraciones mediante la curva de calibración.

*Resultados**Depleción de proteínas abundantes*

5 El análisis de líquidos corporales, tales como LCR, plantea un reto en cuanto al alto intervalo dinámico de concentraciones de proteína. El predominio de proteínas particulares, tales como albúmina e inmunoglobulinas, da como resultado que muchas proteínas de menor abundancia quedan sin detectar mediante técnicas convencionales, tales como 2-DE y espectrometría de masas. Por tanto, se realizó la inmunodepleción de algunas de las proteínas más abundantes en el LCR (albúmina, serotransferrina, IgG, IgA, haptoglobina y -1-antitripsina) con el fin de mejorar la 10 cobertura de las proteínas de baja abundancia. Para acceder a los resultados de la depleción de las proteínas abundantes, se realizó 2-DE de las muestras de LCR antes y después de la sustracción de inmunoafinidad. Los geles muestran importantes similitudes antes y después de la depleción y confirman que la retirada de algunas proteínas abundantes permitió la detección de manchas de menor abundancia. Este resultado obtenido para la muestra de LCR *post mórtем* reproduce perfectamente los presentados por Maccarrone *et al.* (Maccarrone, G., Milfay, D., Birg, I., Rosenhagen, 15 M., Holsboer, F., Grimm, R., Bailey, J., Zolotarjova, N., y Turck, C.W. (2004) Mining the human cerebrospinal fluid proteome by inmunodepletion and shotgun mass spectrometry. Electrophoresis 25, 2402-12) para LCR *ante mórtем* con reproducibilidad de depleción similar de serie en serie (datos no mostrados).

Electroforesis de desplazamiento de gel

20 Tras la depleción de proteínas abundantes, se fraccionó la muestra de LCR *post mórtем* mediante OGE según su pI. Se realizó la OGE usando un gradiente de pH que oscilaba desde 4,0 hasta 7,0. Entonces se separaron las fracciones obtenidas de la OGE mediante SDS-PAGE. La figura 2 muestra un gel de SDS-PAGE teñido con plata de una muestra de LCR *post mórtем*. Como resultado del fraccionamiento mediante OGE, algunas bandas se representaron 25 en múltiples fracciones y otras se concentraron en una o dos fracciones. También se usaron inmunotransferencias de tipo Western para verificar la calidad del fraccionamiento mediante OGE. Se separó una muestra del LCR *post mórtем* reunido, mediante SDS-PAGE junto con cada una de las fracciones procedentes de la OGE de la muestra. Por ejemplo, fue evidente la proteína 14-3-3 gamma en la muestra de LCR *post mórtем* no fraccionada y en una única fracción tras la OGE de la muestra de LCR *post mórtем* (fracción 3). Estos resultados se correspondían con las identificaciones 30 obtenidas mediante EM y la búsqueda en bases de datos. Se identificó la proteína 14-3-3 gamma en una banda de la fracción 3 procedente del fraccionamiento de LCR *post mórtем* (véase la tabla 2). La muestra de LCR *ante mórtем* no mostró ninguna banda para la proteína 14-3-3 gamma.

Identificación mediante espectrometría de masas

35 Se identificaron las proteínas a partir de bandas cortadas de los geles. Se cortaron bandas de regiones equivalentes tanto de los geles de LCR *post mórtем* como de los geles de LCR *ante mórtем*. Las únicas partes de los carriles que no se escindieron fueron aquellas en las que no mostraron bandas ni las muestras *post mórtем* ni las *ante mórtем*. Se identificó un total de 316 proteínas en este estudio y se enumeran estos resultados en las tablas 2 y 3, en las que la 40 tabla 2 contiene proteínas de la base de datos UniProt/Swiss-Prot (se hizo la búsqueda con todas las especies) y la tabla 3 contiene las proteínas identificadas a partir de la base de datos TrEMBL de UniProt (se hizo la búsqueda con la taxonomía restringida al ser humano) (véanse los datos complementarios). De todas las proteínas identificadas, se identificaron 294 de la base de datos Swiss Prot y otras 22 de las búsquedas en TrEMBL sobre ser humano. De las 299 45 proteínas que se identificaron a partir de las fracciones de LCR *post mórtем*, 201 se identificaron de manera única en LCR *post mórtем*. Se identificó un total de 115 proteínas en las fracciones de LCR *ante mórtем* y 17 de estas proteínas eran únicas para estas fracciones. De todas las proteínas identificadas, 98 estaban presentes tanto en fracciones de LCR *post mórtем* como *ante mórtем*.

TABLA 2

50	000241	Proteína reguladora de señal beta-1
	000584	Ribonucleasa T2
55	014745	Fosfoproteína de unión a ezrina-radixina-moesina 50
	015394	Molécula de adhesión a células neuronales 2
60	043396	Proteína similar a tiorredoxina
	043488	Miembro 2 de aflatoxina B1 aldehído reductasa
65	043505	N-acetyl-lactosaminida beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferasa

ES 2 336 946 T3

	O43707	Alfa-actinina 4
5	075223	Proteína C7orf24
	094760	NG,NG-dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1
10	094919	Probable exonucleasa KIAA0830
	094985	Calsintenina 1
15	095336	6-Fosfogluconolactonasa
	095502	Receptor de pentraxina neuronal
	095861	3' (2'),5'-bisfosfato nucleotidasa 1
20	095865	NG,NG-dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2
	P00352	Retinal deshidrogenasa 1
25	P00390	Glutatión reductasa, mitocondrial
	P00441	Superóxido dismutasa [Cu-Zn]
	P00450	Ceruloplasmina
30	P00491	Purina nucleósido fosforilasa
	P00734	Protrombina
35	P00738	Haptoglobina
	P00751	Factor B del complemento
	P00915	Anhidrasa carbónica I
40	P00918	Anhidrasa carbónica 2
	P01008	Antitrombina III 130
	P01009	Alfa-1-antitripsina
45	P01011	Alfa-1-antiquimotripsina
	P01019	Angiotensinógeno
	P01023	Alfa-2-macroglobulina 1
50	P01024	Componente C3 del complemento
	P01028	Componente C4 del complemento
55	P01034	Cistatina C
	P01042	Quininógeno
	P01834	Región C de la cadena kappa de Ig
60	P01857	Región C de la cadena gamma-1 de Ig
	P01859	Región C de la cadena gamma-2 de Ig
	P01876, P01877	Región C de la cadena alfa-1 ó 2 de Ig
65	P02545	Lamina A/C (lamina de 70 Kda)

ES 2 336 946 T3

	P02647	Apolipoproteína A-I
5	P02649	Apolipoproteína E
	P02675	Cadena beta del fibrinógeno
	P02679	Cadena gamma del fibrinógeno
10	P02741	Proteína C reactiva
	P02743	Compartimento P amiloide del suero
	P02748	Compartimento C9 del complemento
15	P02751	Beta-2-glicoproteína I
	P02751	Fibronectina
20	P02753	Proteína plasmática de unión a retinol
	P02760	Proteína AMBP
	P02765	Alfa-2-HS-glicoproteína
25	P02766	Transtiretina
	P02768	Albúmina sérica
	P02774	Proteína de unión a vitamina D
30	P02787	Serotransferrina
	P02790	Hemopexina
	P02792	Cadena ligera de ferritina
35	P02794	Cadena pesada de ferritina
	P04217	Alfa-1B-glicoproteína
40	P04406	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
	P04746, P04745, P19961	Alfa-amilasa (pancreática, salival o 2B)
45	P05089	Arginasa-1
	P05090	Apolipoproteína D
	P05156	Factor I del complemento
50	P05216	Cadena alfa-6 de tubulina
	P05413	Proteína de unión a ácidos grasos (H-FABP)
55	P05452	Tetranectina
	P05543	Globulina de unión a tiroxina
	P05976	Cadena ligera de miosina 1
60	P06396	Gelsolina
	P06576	Cadena beta de ATP sintasa
	P06702	Calgranulina B (MRP-14)
65	P06727	Apolipoproteína A-IV

ES 2 336 946 T3

	P06733	Alfa enolasa
5	P06753	Cadena alfa 3 de tropomiosina
	P07148	Proteína de unión a ácidos grasos
	P07195	Cadena B de L-lactato deshidrogenasa
10	P07203	Glutatión peroxidasa 1
	P07225	Proteína S dependiente de vitamina K
	P07237	Proteína disulfuro-isomerasa
15	P07339	Catepsina D
	P07357	Cadena alfa del componente C8 del complemento
20	P07738	Bisfosfoglicerato mutasa
	P07900	Proteína de choque térmico HSP 90-alfa (HSP 86)
25	P07996	Trombospondina 1
	P08107	Proteína de choque térmico 1 de 70 kDa
30	P08133	Anexina A6
	P08238	Proteína de choque térmico HSP 90-beta (HSP 84)
35	P08294	Superóxido dismutasa [Cu-Zn] extracelular
	P08571	Antígeno CD14 de diferenciación de monocitos
40	P08603	Factor H del complemento
	P08670	Vimentina
45	P08758	Anexina A5
	P09211	Glutatión-S-transferasa P
50	P09417	Dihidropteridina reductasa
	P09486	SPARC
	P09488	Glutatión-S-transferasa Mu 1
55	P09493, P06753	Cadena 1 alfa o alfa 3 de tropomiosina
	P09525	Anexina A4
	P09668	Catepsina H
60	P09871	Componente C1s del complemento
	P09936	Isozima L1 de hidrolasa carboxi-terminal de ubiquitina
65	P09972	Fructosa-bisfosfato aldolasa C

ES 2 336 946 T3

	P10451	Osteopontina
5	P10586	Proteína tirosina fosfatasa F de tipo receptor
10	P10599	Tiorredoxina
15	P10643	Componente C7 del complemento
20	P10768	Esterasa D
25	P10909	Clusterina
30	P11021	Proteína regulada por glucosa de 78 kDa
35	P11142	Proteína de choque térmico relacionada de 71 kDa
40	P12277	Creatina cinasa, B cadena
45	P12882	Cadena pesada de miosina, músculo esquelético, adulto 1
50	P12883	Cadena pesada de miosina, isoforma beta de músculo cardiaco
55	P13489	Inhibidor de ribonucleasa placentaria
60	P13535	Cadena pesada de miosina, músculo esquelético, perinatal
65	P13592	Molécula de adhesión a células neuronales 1, isoforma de 120 kDa
70	P13611	Proteína del núcleo de versicano
75	P13693	Proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP)
80	P13716	Ácido delta-aminolevunílico deshidratasa
85	P13929	Beta-enolasa
90	P14136	Proteína ácida fibrilar de la glia, astrocito (GFAP)
95	550	Alcohol deshidrogenasa [NADP+]
100	P14618	Piruvato cinasa, isozima M1
105	P14923	Placoglobina de las uniones
110	P15090	Proteína de unión a ácidos grasos, adipocito (AFABP)
115	P15121	Aldosa reductasa
120	P15259	Fosfoglicerato mutasa 2
125	P15289	Arilsulfatasa A

ES 2 336 946 T3

	P15311	Ezrina
5	P15924	Desmoplaquina
	P16035	Inhibidor 2 de metaloproteinasa
	P16083	NRH deshidrogenasa [quinona] 2
10	P16870	Carboxipeptidasa H
	P16930	Fumarilacetoadacetasa
	O4967	Proteína de choque térmico 6 de 70 kDa
15	P17174	Aspartato aminotransferasa, citoplasmática
	P18206	Vinculina (metavinculina)
	P18669	Fosfoglicerato mutasa 1
20	P19022	Cadherina neuronal
	P21266	Glutatión-S-transferasa Mu 3
25	P21333	Filamina A
	P21695	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [NAD ⁺]
	P22061	Proteína-L-isoaspartato(D-aspartato)
30		O-metiltransferasa
	P22314	Enzima activadora de ubiquitina E1
35	P23141	Carboxilesterasa 1 hepática
	P23142	Fibulina 1
	P23528	Cofilina, isoforma no muscular
40	P24534	Factor de elongación 1-beta
	P24592	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 6
45	P25786	Subunidad alfa de tipo 1 del proteasoma
	P25788	Subunidad alfa de tipo 3 del proteasoma
50	P26041	Moesina
	P26641	Factor de elongación 1-gamma
	P27169	Paraoxonasa/arilesterasa 1 sérica
55	P27348	Proteína 14-3-3 tau
	P28072	Subunidad beta de tipo 6 del proteasoma
	P28161	Glutatión-S-transferasa Mu 2
60	P28827	Proteína tirosina fosfatasa mu de tipo receptor
	P29218	Inositol-1 (o 4)-monofosfatasa
65	P29401	Transcetolasa

ES 2 336 946 T3

P30040	Proteína ERp29 de retículo endoplasmático
P30041	Peroxirredoxina 6
5 P30044	Peroxirredoxina 5, mitocondrial
10 P30086	Proteína de unión a fosfatidiletanolamina (PEBP)
P30101	Proteína disulfuro-isomerasa A3
P30626	Sorcina
15 P30740	Inhibidor de elastasa leucocitaria (LEI)
P31150	Inhibidor alfa de la disociación de Rab GDP
P31947	Proteína 14-3-3 beta/alfa
20 P31948	Fosfoproteína inducida por estrés 1
P32119	Peroxirredoxina 2
25 P34932	Proteína de choque térmico 4 de 70 kDa
P35080	Profilina 2
P35237	Inhibidor de trombina placentaria
30 P36955	Factor derivado del epitelio pigmentario
P36980	Proteína relacionada con el factor H del complemento 2
35 P37837	Transaldolasa
P40121	Proteína de bloqueo de extremos de macrófagos
40 P40925	Malato deshidrogenasa, citoplasmática
P41222	Prostaglandina-H2 D-isomerasa
45 P42126	3,2-trans-enoil-CoA isomerasa, mitocondrial
P43652	Afamina
P45381	Aspartoacilasa
50 P46940	Proteína IQGAP1 de tipo activadora de Ras GTPasa
P47756	Subunidad beta de la proteína de bloqueo de extremos de actina F
P48637	Glutatión sintetasa
60 P49419	Miembro A1 de la familia 7 de aldehido deshidrogenasa
P50135	Histamina N-metiltransferasa
65 P50395	Inhibidor beta de la disociación de Rab GDP

ES 2 336 946 T3

	P51693	Proteína de tipo amiloide 1
5	P51884	Lumicano
	P52565	Inhibidor 1 de la disociación de Rho GDP
	P52566	Inhibidor 2 de la disociación de Rho GDP
10	P52907	Subunidad alfa-1 de la proteína de bloqueo de extremos de actina F
	P54289	Subunidades alfa-2/delta de los canales de calcio, tipo L, sensibles a dihidropiridina
15	P54652	Proteína de choque térmico 2 de 70 kDa
	P54764	Receptor 4 de efrina de tipo A
20	P54922	<i>ADP-ribosilarginina hidrolasa</i>
	P55287	Cadherina 11
25	P55855	Proteína SMT 3A o 3B similar a ubiquitina
	P57087	Molécula de adhesión de unión 2
	P60174	Triosafosfato isomerasa
30	P60709	Actina, citoplasmática 1
	P60900	Subunidad alfa de tipo 6 del proteasoma
	P61088	Enzima E2 N de conjugación con ubiquitina
35	P61917	Proteína secretora del epidídimo E1
	P61981	Proteína 14-3-3 gamma
40	P62258	Proteína 14-3-3 épsilon
	P62941	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A
	P62988	Ubiquitina
45	P87379	Proteína de unión a receptor de los factores de crecimiento 2
	P63103	Proteína 14-3-3 zeta/delta
50	P63261	Actina, citoplasmática 2
	P67936	Cadena alfa 4 de tropomiosina
	P68136	Actina, alfa músculo esquelético
55	P68224	Cadena beta de hemoglobina
	P78324	Sustrato 1 de tipo no receptor de proteína tirosina fosfatasa
60	P78417	Glutatión transferasa omega 1
	P81605	Dermcidina
65	P98160	Proteína del núcleo de proteoglicano tipo

		heparán sulfato específica de la membrana basal
5	Q00169	Isoforma alfa de la proteína de transferencia de fosfatidilinositol
10	Q01082	Cadena beta de espectrina, cerebro 1
	Q01469	Proteína de unión a ácidos grasos, epidérmica (E-FABP)
15	Q01995	Transgelina
	Q03591	Proteína relacionada con el factor H del complemento 1
20	Q02246	Contactina 2
	Q04917	Proteína 14-3-3 eta
25	Q06033	Cadena pesada H3 del inhibidor de inter-alfa-tripsina
	Q06830	Peroxirredoxina 1
30	Q12765	Secernina 1
	Q12860	Contactina 1
35	Q13228	Proteína de unión a selenio 1
	Q13332	Proteína tirosina fosfatasa S de tipo receptor
40	Q13449	Proteína de membrana asociada al sistema límbico
	Q13509	Tubulina beta-4
45	Q13740	Antígeno CD166
	Q13813	Cadena alfa de espectrina, cerebro
50	Q14118	Distroglicano
	Q14126	Desmogleína 2
	Q14515	Proteína similar a SPARC 1
55	Q14624	Cadena pesada H4 del inhibidor de inter-alfa-tripsina
	Q15818	Pentraxina neuronal I
60	Q15149	Plectina 1
	Q15181	Pirofosfatasa inorgánica
65	Q16270	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7

ES 2 336 946 T3

	Q16555	Proteína relacionada con dihidropirimidinasa 2
5	Q16620	Receptor de los factores de crecimiento BDNF/NT-3
10	Q16881	Tiorredoxina reductasa 1, citoplasmática
	Q86UP2	Quinectina
15	Q86YZ3	Hornerina
	Q8N0Y7	Supuesta fosfoglicerato mutasa 3
20	Q8TAG5	Proteína MGC33530 de dominio de tipo inmunoglobulina
	Q8TD26	Proteína de unión al cromodominio de ADN helicasa 6
25	Q92520	Proteína FAM3C
	Q92598	Proteína de choque térmico de 105 kDa
30	Q92823	Molécula de adhesión de células neuronales
	Q92876	Calicreína 6
35	Q92890	Homólogo de la proteína de degradación por fusión de ubiquitina 1
	Q969H8	Proteína C 19 o f10
40	Q96IU4	Factor B de interacción con CCG1
	Q96KN2	Proteína similar a glutamato carboxipeptidasa 2
45	Q96NY7	Canal intercelular de cloruro 6
	Q99497	Proteína DJ-1
	Q9BX68	Proteína de unión a nucleótidos con triada de histidina 2
50	Q9H477	Ribocinasa
	Q9NVS9	Piridoxina-5'-fosfato oxidasa
55	Q9NZT 1	Proteína similar a calmodulina 5
	Q9P0L0	Proteína A asociada a proteínas de membrana asociadas a vesículas
60	Q9P121	Neurotrimina
	Q9P1W8	Proteína reguladora de señal beta-2
65	Q9P2S2	Neurexina 2-alfa
	Q9UBP4	Proteína relacionada con Dickkopf 3

ES 2 336 946 T3

5	Q9UBQ7	Glioxilato reductasa	reductasa/hidroxipiruvato
10	Q9UKK9	ADP-azúcar pirofosfatasa	
15	Q9UKX2	Cadena pesada de miosina, músculo esquelético, adulto 2	
20	Q9UN36	Proteína NDRG2	
25	Q9Y617	Fosfoserina aminotransferasa	
30	Q9Y623	Cadena pesada de miosina, músculo esquelético, fetal	

Entradas de TrEMBL

000533	Molécula de adhesión de células neuronales
043598	RCL (similar a la supuestamente sensible a C-MYC)
095784	Proteína de unión a Fc de IgG (fragmento)
Q07898,	
Q07899,	Antígeno M130; antígeno M130
Q07900,	variante 1 citoplasmática; variante 2;
Q07901,	variante extracelular del antígeno M130;
Q86VB7	Similar al antígeno CD163
Q7Z664	Proteína hipotética DKFz779N0926 (fragmento)
Q7Z7P9	Proteína hipotética
Q8IZY7	Proteína TB6 asociada a carcinoma hepatocelular
Q8N240	Proteína hipotética FLJ34957
Q8NCW5	Proteína de unión a ApoA-I
Q8NFZ8	TSLC1 de tipo 2
Q96AC3,	Proteína hipotética, proteína Ses2,
Q96FV2,	Similar al producto génico de KIAA0193
Q9BU04	(Fragmento)
Q96B89,	Proteína hipotética, proteína
Q9H3J8,	My027, Proteína hipotética,
Q9HC37,	Proteína hipotética, proteína
Q9HC38,	CGI-150
Q9Y3E8	
Q96EI3, Q9H0W9	Proteína hipotética
Q96NV4, Q9H0R4	Proteína hipotética

ES 2 336 946 T3

FLJ30028

Q9H008 Fosfolisina fosfohistidina
5 pirofosfato fosfatasa inorgánica

Inositol 1-fosfato sintasa;

10 Q9H2Y2, Mio-inositol 1-fosfato sintasa

Q9NPH2, A1; Proteína hipotética

Q9NVW7 FLJ10463

15 Q9NQ56, Q9NQ48 Factor de transcripción de cremallera de leucina de tipo 1

20 Q9NX46 DJ665N4,2 (Similar a la proteína hipotética FLJ20446)
(precursor de ADP-ribosil-hidrolasa)

25 Q9Y5Z5, Q9NRV9 Proteína de unión a hemo (proteína hipotética)

Q9Y6R7 BP a Fc gamma humano (fragmento)

30 Las entradas con letras normales indican resultados con el software Phenyx

35 Estas proteínas se identificaron con ambos con softwares Phenyx y MASCOT

40 *Las entradas con letras en cursiva indican resultados con el software Phenyx*

Estas proteínas se identificaron sólo con el software Phenyx

45 ***Las entradas con letras en cursiva y negrita indican resultados con el software MASCOT***

Estas proteínas se identificaron sólo con el software MASCOT

50 TABLA 3

Número de registro UniProt	Nombre de la proteína	Identificado en las siguientes fracciones post mórtém ^a	Identificado previamente en CSF en las siguientes referencias
000241	Proteína reguladora de señal beta-1	14	
000533	Molécula de adhesión a	4, 5, 7, 9	14, 13, 15

ES 2 336 946 T3

	células neuronales		
5	O00584 Ribonucleasa T2	5	15
10	O14745 Fosfoproteína de unión a e兹rina-radixina-moesina 50	5, 6, 7, 8	13
15	O15394 Molécula de adhesión a células neuronales 2	8	
20	O43396 Proteína similar a tiorredoxina 1	5	
25	O43488 Miembro 2 de aflatoxina B1 aldehido reductasa	12, 14, 15	
30	O43505 N-acetil-lactosaminida beta-1,3-N-acetylglucosaminil-transferasa	3, 5, 6, 7, 8, 10	7, 9, 14, 13, 15
35	O43598 RCL (similar a supuestamente sensible a C-MYC)	5	
40	O43707 Alfa-actinina 4	3, 5, 7, 8	
45	O75223 Proteína C7orf24	5	
50	O94760 NG,NG-dimetilarginina dimetilaninohidrolasa 1	6, 7, 8, 9	13
55	O94919 Probable exonucleasa KIAA0830	3	
60	O94985 Calsintenina 1	3	15
65	O95336 6-fosfogluconolactonasa	6, 8, 10, 11	
	O95502 Receptor de pentraxina neuronal	6,	14, 13, 15
	O95784 Proteína de unión a Fc de IgG (fragmento)	7	
	O95861 3' (2'),5'-bisfosfato nucleotidasa 1	8	
	O95865 NG,NG-dimetilarginina dimetilaninohidrolasa 2	10	13
	P00352 Retinal deshidrogenasa 1	14, 15	
	P00390 Glutatión reductasa, mitocondrial	3	
	P00441 Superóxido dismutasa [Cu-Zn]	8, 9, 10, 12	7, 9, 14

ES 2 336 946 T3

	P00450	Ceruloplasmina	5, 6, 7, 8, 9	4, 7, 9, 14, 13, 15
5	P00491	Purina nucleósido fosforilasa	14, 15	
10	P00734	Protrombina	5	9, 14, 13, 5, 15
15	P00738	Haptoglobina	8	7, 9, 13, 15
20	P00751	Factor B del complemento	12, 14	9, 15
25	P00915	Anhidrasa carbónica I	14, 15	10
30	P00918	Anhidrasa carbónica II	11, 12, 13, 14, 15	13
35	P01008	Antitrombina III	4, 5, 6, 7	9, 13, 15
40	P01009	Alfa-1-antitripsina	8	4, 7, 9, 14, 13
45	P01011	Alfa-1-antiquimotripsina	1, 2, 3, 4, 5	4, 7, 9, 14
50	P01019	Angiotensinógeno	5, 6, 7, 8, 9, 10	9, 14, 13, 15
55	P01023	Alfa-2-macroglobulina	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11 , 12, 13 , 14	4, 7, 14, 15
60	P01024	Componente C3 del complemento	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	7, 9, 14, 13, 15
65	P01028	Componente C4 del complemento	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12 , 13 , 14 , 15	7, 9, 14, 13, 5, 15
	P01034	Cistatina C	12, 15	4 , 7, 9, 13, 5, 15
	P01042	Quininógeno	3	9, 15
	P01834	Región C de la cadena kappa de Ig	5, 8, 11	7, 5, 15
	P01857	Región C de la cadena gamma-1 de Ig	8, 11	4, 7, 9, 5, 15
	P01859	Región C de la cadena gamma-2 de Ig*	8	7

ES 2 336 946 T3

	P01876, P01877	Región C de la cadena alfa-1 ó 2 de Ig	5, 8, 11	
5	P02545	Lamina A/C (lamina de 70 kDa)	14	
10	P02647	Apolipoproteína A-I	5, 6, 7, 8	4, 7, 9, 14, 13, 15
15	P02649	Apolipoproteína E	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14	4, 7, 9, 13, 5, 15
20	P02675	Cadena beta de fibrinógeno	8, 10, 11, 12, 13, 14	7, 9, 15
25	P02679	Cadena gamma de fibrinógeno	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12	7, 9, 14, 15
30	P02741	Proteína C reactiva	6	
35	P02743	Componente P amiloide del suero	9	9
40	P02748	Componente C9 del complemento	5, 6	
45	P02749	Beta-2-glicoproteína I (Apolipoproteína H)	12, 14, 15	9, 15
50	P02751	Fibronectina	5, 7, 8, 9	9, 14, 13, 15
55	P02753	Proteína plasmática de unión a retinol	6, 7	7, 9, 13, 15
60	P02760	Proteína AMBP	3, 5	4, 9, 5
65	P02765	Alfa-2-HS-glicoproteína	2, 3	9, 14, 15
	P02766	Transtiretina	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	4, 7, 9, 14, 13, 5, 15
	P02768	Albúmina sérica	5, 8, 9	4, 7, 9, 5, 15
	P02774	Proteína de unión a vitamina D	5, 6, 7	7, 9, 14, 13, 5, 15
	P02787	Serotransferrina	8	4, 7, 9, 13, 15
	P02790	Hemopexina	3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14	4, 9, 14, 13, 15

ES 2 336 946 T3

	P02792	Cadena ligera de ferritina	5, 6, 7, 8, 9	13
5	P02794	Cadena pesada de ferritina	5, 6, 7	13
	P04217	Alfa-1B-glicoproteína	5, 6, 7	9, 14, 15
10	P04406	Gliceralfidó-3-fosfato deshidrogenasa, hepática	9	7, 13, 10
	P04746, P04745, P19961	Alfa-amilasa (pancreática, salival o 2B)	5	
15	P05089	Arginasa 1	15	
	P05090	Apolipoproteína D	3	4, 7, 15
20	P05156	Factor I del complemento	5, 8, 9	7, 15
	P05209, Q9BQE3	Cadena alfa-1 o alfa-6 de tubulina	5, 6	
25	P05413	Proteína de unión a ácidos grasos, cardiaca (H-FABP)	12	
	P05452	Tetranectina	6, 8, 9	7, 9, 15
30	P05543	Globulina de unión a tiroxina	5, 6	
	P05976 o P06741	Cadena ligera 1 ó 3 de miosina, isoforma de músculo esquelético	9	
35	P06396	Gelsolina	2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15	4, 7, 9, 14, 13, 5, 15
	P06576	Cadena beta de ATP sintasa, mitocondrial	5	
40	P06702	Calgranulina B (MRP-14)	9	
	P06727	Apolipoproteína A-IV	5, 6	4, 7, 9, 13, 5, 15
45	P06733	Alfa enolasa	10, 11, 12, 13, 14, 15	13, 10
	P06753	Cadena alfa 3 de tropomiosina	3	
50	P07148	Proteína de unión a ácidos grasos, (L-FABP) hepática	12	
	P07195	Cadena B de L-lactato	1, 2, 3, 5, 7,	7, 13
55				
60				
65				

ES 2 336 946 T3

	deshidrogenasa	8, 9, 10, 11, 12	
5	P07203 Glutatión peroxidasa 1	10, 12	
10	P07225 Proteína S dependiente de vitamina K	5	
15	P07237 Proteína disulfuro-isomerasa	3	
20	P07339 Catepsina D	6, 7, 8, 9, 10	9, 13
25	P07357 Cadena alfa del componente C8 del complemento	10	
30	P07738 Bisfosfoglicerato mutasa	10	
35	P07900 Proteína de choque térmico HSP 90-alfa (HSP 86)	3, 4, 5, 6	
40	P07996 Trombospondina 1	14	
45	P08107 Proteína de choque térmico de 70 kDa 1	7, 8, 9, 10	13
50	P08133 Anexina A6	8, 9	
55	P08238 Proteína de choque térmico HSP 90-beta (HSP 84) (HSP 90)	5	13
60	P08294 Superóxido dismutasa [Cu-Zn] extracelular	5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	7, 13, 15
65	P08571 Antígeno CD14 de diferenciación de monocitos	5, 6, 7, 8	9, 13, 15
	P08603 Factor H del complemento	8, 9, 12	9, 15
	P08670 Vimentina	3	13
	P08758 Anexina A5	5	
	P09211 Glutatión S-transferasa P	5, 6, 7, 8, 9, 11	13
	P09417 Dihidropteridina reductasa	14	
	P09486 SPARC	3	13, 15
	P09488 Glutatión S-transferasa Mu 1	13, 14	
	P09493 o Cadena 1 alfa o cadena alfa P06753 3 de tropomiosina	9	
	P09525 Anexina A4	10	
	P09668 Catepsina H	9, 11	

ES 2 336 946 T3

	P09871	Subcomponente Cls del complemento	3	
5	P09936	Isozima L1 de hidrolasa carboxi-terminal de ubiquitina	6, 7, 8	15
10	P09972	Fructosa-bisfosfato aldolasa C	12, 13, 14, 15	13
15	P10451	Osteopontina	5	14, 13, 15
20	P10586	Proteína tirosina fosfatasa F de tipo receptor	8	
25	P10599	Tiorredoxina	5	
30	P10643	Componente C7 del complemento	12	15
35	P 10768	Esterasa D	14	
40	P10909	Clusterina	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12	4, 7, 9, 13, 15
45	P11021	Proteína regulada por glucosa de 78 kDa	5	
50	P11142	Proteína de choque térmico relacionada de 71 kDa	3, 6, 7, 8, 9, 14	15
55	P12277	Creatina cinasa, cadena B	6, 7, 8, 9	13
60	P12882	Cadena pesada de miosina, músculo esquelético, adulto 1	9	7
65	P12883	Cadena pesada de miosina, isoforma beta de músculo cardiaco	8	
	P13489	Inhibidor de ribonucleasa placentaria	3	
	P13535	Cadena pesada de miosina, músculo esquelético, perinatal	9	
	P13591, P13592	Molécula de adhesión de células neuronales 1, isoforma de 120 kDa	2, 3	
	P13611	Proteína del núcleo de	3	

ES 2 336 946 T3

	versicano		
5	P13693 Proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP)	4	
10	P13716 Ácido delta-aminolevunílico deshidratasa	14, 15	
15	P13929 Beta-enolasa	14	
20	P14136 Proteína ácida fibrilar de la glía, astrocito (GFAP)	3, 4, 5	4
25	P14550 Alcohol deshidrogenasa [NADP+]	14, 15	
30	P14618 Piruvato cinasa, isozimas M1/M2	5	13, 15
35	P14923 Placoglobina de las uniones	15	
40	P15090 Proteína de unión a ácidos grasos, adipocito (AFABP)	12	
45	P15121 Aldosa reductasa	14, 15	10
50	P15259 Fosfoglicerato mutasa 2	10	
55	P15289 Arilsulfatasa A	9	
60	P15311 Ezrina	3, 5, 12	13
65	P15924 Desmoplaquina	15	
	P16035 Inhibidor 2 de metaloproteinasa	14	15
	P16083 NRH deshidrogenasa [quinona] 2	11	13
	P16870 Carboxipeptidasa E	3, 5, 6	13, 15
	P16930 Fumarilacetooacetasa	14	
	P17066 Proteína de choque térmico 6 de 70 kDa	5, 8, 9, 10, 13	
	P17174 Aspartato aminotransferasa, citoplasmática	14, 15	13, 10
	P18206 Vinculina (metavinculina)	8	
	P18669 Fosfoglicerato mutasa 1	10, 11, 12, 13, 14, 15	13
	P19022 Cadherina neuronal	2, 5	13, 15
	P21266 Glutatió-S-transferasa Mu 3	6, 7	9
	P21333 Filamina A	6	

ES 2 336 946 T3

	P21695	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [NAD+], citoplasmática	11	
5	P22061	Proteína-L-isoaspartato (D- aspartato) O-metiltransferasa	13, 14	
10	P22314	Enzima activadora de ubiquitina E1	8, 9	
15	P23141	Carboxilesterasa 1 hepática	14, 15	
20	P23142	Fibulina 1	5	14, 13, 15
25	P23528	Cofilina, isoforma no muscular	12, 13, 14	13
30	P24534	Factor de elongación 1-beta	3	
35	P24592	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 6	14	14, 13, 15
40	P25786	Subunidad alfa de tipo 1 del proteasoma	14	13
45	P25788	Subunidad alfa de tipo 3 del proteasoma	6	
50	P26038	Moesina	3, 5, 7, 12, 13, 14	
55	P26641	Factor de elongación 1- gamma	11	
60	P27169	Paraoxonasa/arilesterasa 1 sérica	3	
65	P27348	Proteína 14-3-3 tau	3, 6	
	P28072	Subunidad alfa de tipo 6 del proteasoma	4	
	P28161	Glutatión-S-transferasa Mu 2	6, 11, 13, 14	
	P28827	Proteína tirosina fosfatasa mu de tipo receptor	5	
	P29218	Inositol-1 [α 4]- monofosfato	5, 6	
	P29401	Transcetolasa	7	
	P30040	Proteína ERp29 de retículo	10	

ES 2 336 946 T3

	endoplasmático		
5	P30041 Peroxirredoxina 6	5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14	
10	P30044 Peroxirredoxina 5, mitocondrial	14	13
15	P30086 Proteína de unión a fosfatidiletanolamina (PEBP)	13, 14, 15	7, 14, 13
20	P30101 Proteína disulfuro- isomerasa A3	10	
25	P30626 Sorcina (proteína de 22 kDa)	6	
30	P30740 Inhibidor de elastasa leucocitaria (LEI)	8, 10, 11, 12	
35	P31150 Inhibidor alfa de la disociación de Rab GDP	5, 7	
40	P31946 Proteína 14-3-3 beta/alfa	3, 8	
45	P31947 Proteína 14-3-3 sigma	3	
50	P31948 Fosfoproteína inducida por estrés 1	11, 12, 14, 15	
55	P32119 Peroxirredoxina 2	5, 6, 7, 8, 9, 10	9, 13
60	P34932 Proteína de choque térmico 4 de 70 kDa	3	
65	P35080 Profilina 2	11	
	P35237 Inhibidor de trombina placentaria	3, 4, 5, 7	
	P36955 Factor derivado del epitelio pigmentario	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12	7, 9, 13, 5, 15
	P36980 Proteína relacionada con el factor H del complemento 2	14	
	P37837 Transaldolasa	7, 8, 9, 11, 12, 14	
	P40121 Proteína de bloqueo de extremos de macrófagos	10, 12, 13, 14	
	P40925 Malato deshidrogenasa,	1, 2, 3, 7, 8,	13, 10

ES 2 336 946 T3

	citoplasmática	11, 12, 13, 14, 15	
5	P41222 Prostaglandina-H2 D-isomerasa	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	4, 7, 9, 14 , 13, 15
10	P42126 3,2-trans-enoil-CoA isomerasa, mitocondrial	13	
15	P43652 Afamina	5	15
20	P45381 Aspartoacilasa	14	
25	P46940 Proteína IQGAP1 de tipo activadora de Ras GTPasa	5	
30	P47756 Subunidad beta de la proteína de bloqueo de extremos de actina F	6 , 7	
35	P48637 Glutatión sintetasa	9, 10	
40	P49419 Miembro A1 de la familia 7 de aldehído deshidrogenasa	14	
45	P50135 Histamina N-metiltransferasa	6	
50	P50395 Inhibidor beta de la disociación de Rab GDP	5, 10, 11, 12, 13, 14	
55	P51693 Proteína de tipo amiloide 1	3, 5	4, 14, 13, 15
60	P51884 Lumicano	3, 5, 7	13, 15
65	P52565 Inhibidor 1 de la disociación de Rho GDP	5, 9, 10, 14, 15	
	P52566 Inhibidor 2 de la disociación de Rho GDP	6	
	P52907 Subunidad alfa-1 de la proteína de bloqueo de extremos de actina F	7, 8	
	P54289 Subunidades alfa-2/delta de los canales de calcio, tipo L sensibles a dihidropiridina	5	

ES 2 336 946 T3

	P54652	Proteína de choque térmico 2 de 70 kDa	5	
5	P54764	Receptor 4 de efrina de tipo A	7	
10	P54922	ADP-ribosilarginina hidrolasa	12	
15	P55287	Cadherina 11	3	
20	P55854, P61956	Proteína SMT 3A o 3B similar a ubiquitina	5	
25	P57087	Molécula de adhesión de unión 2	14	
30	P60174	Triosafosfato isomerasa	10, 11, 12 , 13, 14, 15	13
35	P60709	Actina, citoplasmática 1	5, 6, 7, 8	7, 9
40	P60900	Subunidad alfa de tipo 6 del proteasoma	12 , 14	
45	P61088	Enzima E2 N de conjugación con ubiquitina	11	
50	P61916	Proteína secretora del epidídimo E1	8	7, 14, 15
55	P61981	Proteína 14-3-3 gamma	3, 8	13
60	P62258	Proteína 14-3-3 epsilon	2, 3	
65	P62937	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A	12, 14, 15	13, 15
	P62988	Ubiquitina	14	4, 9, 13
	P62993	Proteína de unión a receptor de los factores de crecimiento 2	11 , 14	
	P63104	Proteína 14-3-3 zeta/delta	3, 6, 8	
	P63261	Actina, citoplasmática 2 (gamma-actina)	7	13
	P67936	Cadena alfa 4 de tropomiosina	3	
	P68133	Actina, alfa músculo esquelético	9	

ES 2 336 946 T3

	P68871	Cadena beta de hemoglobina	12, 13, 14	7, 9, 13, 5
5	P78324	Sustrato 1 de tipo no receptor de proteína tirosina fosfatasa	12, 14	14, 13, 15
10	P78417	Glutatión transferasa omega 1	10, 12	13
15	P81605	Dermcidina	5	7, 15
20	P98160	Proteína del núcleo de proteoglicano tipo heparán sulfato específica de la membrana basal	8, 10	9, 13, 15
25	Q00169	Isoforma alfa de la proteína de transferencia de fosfatidilinositol	14	
30	Q01082	Cadena beta de espectrina, cerebro 1	5	
35	Q01469	Proteína de unión a ácidos grasos, epidérmica (E-FABP)	12, 13	13
40	Q01995	Transgelina	12, 14	
45	Q03591	Proteína relacionada con el factor H del complemento 1	9, 12	
50	Q02246	Contactina 2	14	10, 15
55	Q04917	Proteína 14-3-3 eta	3	
60	Q06033	Cadena pesada H3 del inhibidor de inter-alfa-tripsina	5	
65	Q06830	Peroxirredoxina 1	12, 13, 14, 15	13
	Q07898	Antígeno M130, CD163	4, 5	15
	Q12765	Secernina 1	3	
	Q12860	Contactina 1	5, 6, 7, 8, 9, 10	9, 13
	Q13228	Proteína de unión a selenio 1	5, 10, 12	13
	Q13332	Proteína tirosina fosfatasa	10	

ES 2 336 946 T3

	S de tipo receptor		
5	Q13449 Proteína de membrana asociada al sistema límbico	3	13, 15
10	Q13509 Tubulina beta-4	5	
15	Q13740 Antígeno CD166	5	
20	Q13813 Cadena alfa de espectrina, cerebro	5	
25	Q13938 Calcifosina	3	
30	Q14118 Distroglicano	5	13, 15
35	Q14126 Desmogleína 2	3	
40	Q14515 Proteína similar a SPARC 1	3, 12	14, 13, 15
45	Q14624 Cadena pesada H4 del inhibidor de inter-alfa-tripsina	3, 4, 5, 6, 7, 8	14, 13
50	Q15149 Plectina 1	8	
55	Q15181 Pirofosfatasa inorgánica	8	
60	Q15818 Pentraxina neuronal I	12	15
65	Q16270 Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7	11, 14, 15	13, 15
	Q16555 Proteína relacionadas con dihidropirimidinasa 2	8, 9	13
	Q16620 Receptor de los factores de crecimiento BDNF/NT-3	3	
	Q16881 Tiorredoxina reductasa 1, citoplasmática	12	
	Q7Z664 Proteína hipotética DKFZp779N0926 (fragmento)	8	
	Q7Z7P9 Proteína PHYHD1	11	
	Q86UP2 Quinectina	7	
	Q8N0Y7 Supuesta fosfoglicerato mutasa 3	14	
	Q8N240 Proteína hipotética FLJ34957	12	

ES 2 336 946 T3

	Q8NCW 5	Precursor de la proteína de unión a ApoA-I	7	
5	Q8NFZ8	TSLC1 de tipo 2	3, 5, 6, 7, 8, 9	
10	Q8TAG5	Proteína MGC33530 de dominio de tipo inmunoglobulina	8	
15	Q8TD26	Proteína de unión al cromodominio de ADN helicasa 6	5, 6	
20	Q92520	Proteína FAM3C	7, 14	7, 13, 15
25	Q92598	Proteína de choque térmico de 105 kDa	3	
30	Q92823	Molécula de adhesión de células neuronales	4, 5, 7, 8, 10, 12, 14	15
35	Q92876	Calicreína 6	14, 15	7, 9, 13, 5, 15
40	Q92890	Homólogo de la proteína de degradación por fusión de ubiquitina 1	5	
45	Q96AC3	Secernina 2	9	
50	Q96EI3	Proteína PTD012	14	
55	Q969H8	Precursor de la proteína C19 o F10	15	
60	Q96IU4	Factor B de interacción con CCG1	11	
65	Q96KN2	Proteína similar a glutamato carboxipeptidasa 2	5	14, 13, 15
	Q96NV4	Proteína hipotética FLJ30028	12	
	Q96NY7	Canal intercelular de cloruro 6	3, 5	13
	Q99497	Proteína DJ-1	8, 9, 11, 13	13, 15
	Q9BX68	Proteína de unión a nucleótidos con triada de	14	

ES 2 336 946 T3

	histidina 2		
5	Q9H008	Fosfolisina fosfohistidina inorgánica pirofosfato fosfatasa	15
10	Q9H2Y2	Inositol-1-fosfato sintasa	7, 8, 9
15	Q9H3J8	Proteína My027	7, 8
20	Q9H477	Ribocinasa	4
25	Q9NQ56	Factor de transcripción de cremallera de leucina de tipo 1	7
30	Q9NVS9	Piridoxina-5'-fosfato oxidasa	11, 12
35	Q9NX46	Proteína hipotética FLJ20446	5
40	Q9P0L0	Proteína A asociada a proteínas de membrana asociadas a vesículas	14
45	Q9P121	Neurotrimina	3
50	Q9P1W8	Proteína reguladora de señal beta-2	14
55	Q9P2S2	Neurexina 2-alfa	12
60	Q9UBP4	Proteína relacionada con Dickkopf 3	1
65	Q9UBQ7	Glioxilato reductasa/hidroxipiruvato reductasa	14
	Q9UKK9	ADP-azúcar pirofosfatasa	3
	Q9UKX2	Cadena pesada de miosina, músculo esquelético, adulto 2	9
	Q9UN36	Proteína NDRG2	5, 6
	Q9Y5Z5	Proteína de unión a hemo	8
	Q9Y617	Fosfoserina aminotransferasa	12, 14, 15
	Q9Y623	Cadena pesada de miosina,	9

	músculo esquelético, fetal		
5	Q9Y6R7 BP a Fc gamma humano (fragmento)	14	

10 ^a Los números en negrita indican las fracciones en las que se identificó la proteína a partir de un único péptido

15 *Validación de identificación mediante inmunotransferencia*

20 Se investigaron adicionalmente proteínas de interés específico, tales como las proteínas que sólo se identificaron en fracciones de LCR *post mórtем* o las que se sabe que están asociadas con trastornos cerebrales, usando inmunotransferencias. La figura 8 muestra inmunotransferencias de tipo Western de cuatro proteínas que se identificaron sólo en fracciones *post mórtем*. Como se describe en la sección de métodos, se separaron muestras de LCR no fraccionadas sobre un gel de SDS-PAGE y luego se sometieron a electrotransferencia sobre una membrana de PVDF. Entonces se sondó la membrana para detectar proteínas de interés usando anticuerpos específicos. Los resultados para la proteína 14-3-3 beta, calcifosina, GST-P y UFD1 se muestran en la figura 8. Para las tres primeras proteínas, la evidencia de su concentración aumentada en LCR *post mórtем* en comparación con LCR *ante mórtем* es clara a partir de la fuerte señal evidente en cada una de las muestras de LCR *post mórtем* pero no en las muestras *ante mórtем*. El resultado es menos claro para UFD1, pero todavía es evidente una concentración aumentada de esta proteína en las muestras de LCR *post mórtем*. También se sometieron a prueba otras isoformas de la proteína 14-3-3 (épsilon, gamma, teta, zeta) y proporcionaron resultados idénticos a los de la isoforma beta (datos no mostrados).

30 *Ubicación y clasificación funcional*

35 Las búsquedas bibliográficas de las proteínas identificadas a partir de la base de datos Swiss-Prot permitieron su clasificación mediante su supuesta ubicación y función. Las proteínas circulantes (51%) y las proteínas secretadas (9%) clásicas representaban juntas la mayoría de las proteínas identificadas en las fracciones de LCR *ante mórtем*. En contraposición, la mayoría de las proteínas identificadas en la muestra de LCR *post mórtем* tenían una supuesta ubicación intracelular (57,5%) y hubo una proporción menor de proteínas circulantes (21%) y proteínas secretadas (3%) clásicas. Considerando las proteínas identificadas únicamente en las fracciones de LCR *post mórtем*, se encontró que más del 75% tenían una supuesta ubicación intracelular. Estos datos sugieren fuertemente que la mayoría de esas proteínas aparecen en LCR *post mórtем* por escape tisular. También se observaron diferencias en las funciones representadas por las proteínas identificadas en LCR *ante mórtем* en comparación con LCR *post mórtем*. En LCR *ante mórtем*, se encontró que numerosas proteínas estaban implicadas en la unión y el transporte de proteínas, la coagulación, la inmunidad o la inflamación. En LCR *post mórtем*, la proporción de esas clases funcionales fue mucho menor, mientras que la proporción de clases funcionales tales como enzimas, proteínas estructurales y proteínas de transducción de señales fue superior. La mayoría de las proteínas identificadas únicamente en el conjunto de LCR *post mórtем* estaban asociadas con funciones intracelulares incluyendo enzimas metabólicas, proteínas estructurales y proteínas implicadas en las rutas de transducción de señales y en el metabolismo de proteínas.

50 *Discusión*

55 Un estudio de 2-DE anterior identificó varias proteínas con niveles aumentados en LCR *post mórtем* en comparación con LCR *ante mórtем*. Estudios de validación adicionales mostraron el posible interés de algunas de estas proteínas como marcadores bioquímicos de diversos trastornos neurológicos. El objetivo del presente estudio fue caracterizar adicionalmente el proteoma del LCR *post mórtем* con el fin de identificar nuevos posibles marcadores de daño cerebral.

60 Se realizó un análisis paralelo de muestras de LCR *ante mórtем* y *post mórtем* reunidas usando un protocolo que combinaba varias etapas de fraccionamiento de proteínas antes de la identificación de las proteínas mediante EM. Se identificó un total de 115 proteínas en el conjunto *ante mórtем* y de 299 en el conjunto *post mórtем*, dando como resultado un total de 316 identificaciones de proteínas distintas. La comparación entre las listas de proteínas *ante mórtем* y *post mórtем* indicó que 201 proteínas se identificaron de manera única en las fracciones de LCR *post mórtем*. Con el fin de reducir el riesgo de introducir diferencias entre las muestras debido a sesgo técnico, se controló cuidadosamente cada etapa del análisis. Para la depleción de proteínas, se usó un método sumamente específico basado en cromatografía de sustracción por inmunoafinidad. Este sistema minimiza el riesgo de eliminación de proteínas no específicas. Las proteínas del LCR proteínas se fraccionaron adicionalmente según su pI usando OGE. Se ha demostrado que la técnica de OGE separa de manera fiable proteínas con una resolución de hasta 0,15 unidades de pH. La inmunodetección de la isoforma gamma de la proteína 14-3-3 sólo en una única fracción de las fracciones

- post mórtем* seguido por OGE confirmó el poder de resolución de la técnica. El análisis en gel de 2-DE y SDS-PAGE de fraccionamientos por duplicado de muestras de LCR *ante mórtем* y *post mórtем* también confirmó la alta reproducibilidad de OGE (datos no mostrados). En el estudio actual, el fraccionamiento por OGE de las muestras *ante mórtем* y *post mórtем* se realizó en la misma serie usando un dispositivo de múltiples pocillos con el fin de evitar las variaciones entre ensayos. Las fracciones obtenidas de la OGE se separaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones de proteínas *ante* y *post mórtем* correspondientes se cargaron siempre en el mismo gel. Tras la tinción con plata, se cortaron los carriles de gel usando un patrón idéntico para las fracciones *ante* y *post mórtем* correspondientes. Se realizó la digestión de proteínas en gel y la extracción de péptidos en paralelo para las fracciones *ante* y *post mórtем* correspondientes. En la etapa final del protocolo, se identificaron las proteínas mediante análisis por CL-ESI-EM/EM usando un espectrómetro de masas con trampa iónica. A menudo se considera que el análisis por CL-ESI-EM/EM dependiente de los datos es escasamente reproducible entre adquisiciones de datos por duplicado. Éste es generalmente el caso para los estudios de proteoma a gran escala que investigan muestras de proteínas muy complejas. En el estudio presentado aquí, el análisis por CL-ESI-EM/EM se realizó en péptidos extraídos de pequeñas bandas de gel de SDS-PAGE. Este enfoque redujo la complejidad de la mezcla de péptidos analizada y disminuyó el riesgo de pérdida en las identificaciones de proteínas. Se realizaron experimentos de inmunotransferencia con el fin de comprobar que las diferencias entre las listas de proteínas *ante* y *post mórtем* realmente correspondían a diferencias en la concentración de proteínas. Los resultados obtenidos tanto de las muestras de LCR no fraccionadas como de las fracciones de OGE confirmaron los resultados del análisis por CL-ESI-EM/EM.
- El uso de LCR *post mórtем* como una fuente de posibles marcadores proteicos de daño cerebral se basó en la suposición de que la necrosis cerebral global tras el fallecimiento da como resultado el escape de proteínas desde los tejidos dañados hacia el LCR, imitando de ese modo acontecimientos asociados con lesiones del tejido cerebral en diversos trastornos neurológicos. Por consiguiente, el 75% de las 201 proteínas identificadas de manera única en la muestra de LCR *post mórtем* tenía una supuesta ubicación intracelular, debido lo más probablemente a su escape de las células cerebrales dañadas. Además, se encontró que la mayoría de las proteínas identificadas a partir de LCR *post mórtем* estaban asociadas con funciones intracelulares (enzimas metabólicas, proteínas estructurales, proteínas de transducción de señales y proteínas implicadas en síntesis y degradación). Un respaldo adicional para el argumento de que la mayoría de las proteínas identificadas específicamente en el LCR *post mórtем* aparecen por escape tisular procedió de la comparación de estos resultados con estudios previos de LCR de sujetos sanos. Aproximadamente el 70% de las proteínas identificadas en el conjunto de LCR *ante mórtем* ya se ha descrito en al menos uno de estos estudios. En contraposición, sólo se notificó el 15% de las proteínas detectadas de manera única en el conjunto de LCR *post mórtем* en estos estudios previos. Dado que las muestras *ante* y *post mórtем* se analizaron en idénticas condiciones, esta discrepancia sugiere que la mayoría de las proteínas identificadas de manera única en la muestra *post mórtем* o bien están ausentes en LCR *ante mórtем* sano o bien están presentes a niveles muy bajos. Su detección se vio facilitada presumiblemente en LCR *post mórtем* tras su liberación de las células dañadas.
- Las búsquedas bibliográficas de las 201 proteínas identificadas específicamente en LCR *post mórtем* también reveló que varias de ellas se habían descrito previamente como posibles marcadores de trastornos cerebrales. Por ejemplo, H-FABP y DJ-1, que se identificaron anteriormente en el estudio de 2-DE de LCR *post mórtем*, se han validado como posibles marcadores plasmáticos tempranos de accidente cerebrovascular. También se demostró que H-FABP era un posible marcador de ECJ y otras demencias neurodegenerativas. Se han descrito la proteína ácida fibrilar de la glía y la creatina cinasa BB como posibles marcadores de diversos trastornos relacionados con daño cerebral, aunque se ha cuestionado su utilidad clínica. También se identificaron varias isoformas de la proteína 14-3-3, que es un marcador de ECJ en LCR conocido. Otro hallazgo interesante fue la identificación en LCR *post mórtем* de un fragmento de la cadena alfa de espectrina de cerebro. Los fragmentos de espectrina, denominados productos de descomposición de espectrina (SBP), se producen en una variedad de estados neurodegenerativos mediante proteólisis mediada por caspasa 3 y calpaína. Son particularmente estables y se propusieron como posibles marcadores en LCR de lesión cerebral por traumatismo. El fragmento identificado en este estudio tenía un peso molecular de aproximadamente 120 kDa, correspondiente a un SBP específico producido por la proteólisis de caspasa 3.
- Muchas identificaciones de proteínas adicionales a partir de este estudio son de interés como posibles marcadores de trastornos cerebrales debido a sus niveles elevados en LCR *post mórtем* en comparación con LCR *ante mórtем*. A partir de la lista de 201 proteínas identificadas de manera única en LCR *post mórtем*, se han destacado varias puesto que se ha notificado que son específicas del cerebro, que tienen altos niveles de expresión en el cerebro y/o que se han asociado con lesión o patología del sistema nervioso. Se ha seleccionado un total de 22 proteínas usando estos criterios (tabla 4).

ES 2 336 946 T3

TABLA 4

	Específica del cerebro	Sumamente expresada en cerebro	Possible relación con trastornos	Otros
5				
10	Glutatió-n-S-transferasa Mu2	25.613/ 6,02	*	1
15	Glutatió-n-S-transferasa Mu 3	26.428/ 5,37	*	1
20	Miembro 2 de aflatoxina B1 aldehido reductasa	39.589/ 6,70	*	*
25	Aspartoacilasa	35.735/ 6,06	*	*
30	Fructosa-bisfosfato aldolasa C	39.325/ 6,46	*	*
	NG,NG-dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1	30.991/ 5,53	*	*
	Fosfoserina aminotransferasa	40.423/ 7,56	*	

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 336 946 T3

	Piruvato cinasa, isozimas M1/M2	57.931/ 7,59	*	*	
5	Cadherina 11	81.986/ 4,50	*		3
10	Antígeno CD166	62.293/ 5,71	*		3
15	Contactina 2	107.467 /	*		3
20	Neurotrimina	31.738/ 5,80	*		3
25	Proteína similar a SPARC 1	73.577/ 4,66	*		3
30	Receptor de los factores de crecimiento BDNF/NT-3	88.319/ 5,86	*	*	4
35	Subunidades alfa- 2/delta de los canales de calcio, tipo L, sensibles a dihidropiridina	104.304 /5,30 -	*		5
40	Inositol-1 [o 4]- monofosfato	16.466/ 4,47			
45	Proteína tirosina fosfatasa mu de tipo receptor	30.189/ 5,16	*	*	
50	Proteína tirosina fosfatasa F de tipo receptor	161.704 /6,13	*		3
55	Cadena alfa de espectrina, cerebro	210.283 /5,94	*		6
60	Cadena beta de espectrina, cerebro 1	284.527 /5,22	*	*	
65	Alcohol deshidrogenasa [NADP+]	274.631 /5,41	*	*	
	Proteína de unión al cromodominio de ADN helicasa 6	36.442/ 6,35	*		
	Proteína relacionada con dihidropirimidinasa 2	305.153 /5,89	?		
	Proteína de unión a	62.294/ 5,95	*	*	7
		17.162/	?		

ES 2 336 946 T3

	nucleótidos con triada de histidina 2	9,20			
5	Proteína MGC33530 con dominio similar a inmunoglobulina	24.453/		?	
		7,77			
10	Proteína NDRG2	40.798/	*	*	
		5,08			
15	Neurexina 2-alfa	182.042	*		8
		/5,55			
	Pentraxina neuronal 1	45.393/	*		8
		5,84			
20	1 Proteína antioxidante				
	2 Disfunción endotelial				
	3 Crecimiento axonal				
	4 Desarrollo y supervivencia neuronal				
25	5 Función sináptica				
	6 Desarrollo neuronal				
	7 Polaridad neuronal				
	8 Sinaptogénesis				

Estas proteínas tienen todas una supuesta ubicación intracelular o en la membrana y, con la excepción de dos proteínas, se identificaron a partir de bandas de gel de SDS-PAGE con Mr correspondientes al PM teórico de la proteína de longitud completa. Se detectaron las proteína fosfato de tipo receptor F y Mu en bandas de gel con Mr de aproximadamente 120 kDa mientras que los PM teóricos de las proteínas de longitud completa son de 210.282 kDa y 161.704 kDa, respectivamente. Varias de las proteínas mostradas en la tabla 4 también se han detectado en estudios anteriores de LCR *ante mórtum* (véase la tabla 2). Esto no es sorprendente, puesto que los productos de escape tisular también se liberan a bajos niveles desde tejidos sanos hacia líquidos corporales (1). Dado que los métodos para la identificación de proteínas a partir de mezclas complejas continúan logrando menores límites de detección, se prevé que se encontrarán productos de escape tisular adicionales en LCR *ante mórtum*. En el estudio actual, sin embargo, estas proteínas se identificaron de manera única en las fracciones *post mórtum*, lo que sugiere que su concentración en LCR estaba aumentada en el modelo de lesión cerebral masiva.

Tomados juntos, estos datos sugieren fuertemente que las 22 proteínas seleccionadas representan posibles marcadores de daño cerebral sumamente interesantes. Según este modelo, se liberaron de células dañadas hacia el LCR tras la necrosis del tejido cerebral.

Además, se ha notificado que son específicas del cerebro o que tienen altos niveles de expresión en el cerebro, aumentando de ese modo la posibilidad de ser marcadores específicos de lesión cerebral. Además, se han encontrado niveles de expresión alterados de varias de estas proteínas en trastornos neurológicos o tras lesión del sistema nervioso. Estudios de validación usando tanto muestras de suero como de LCR de pacientes determinarán la utilidad de estas proteínas como marcadores de daño cerebral.

Ejemplo 5

Se realizó la validación mediante ELISA para evaluar la concentración en sangre de la glutatión-S-transferasa P (GSTP-1) en dos cohortes independientes de pacientes que englobaban pacientes con accidente cerebrovascular con diferentes subtipos (isquemia, hemorragia y ataque isquémico transitorio (AIT)) y pacientes control. Detalles de las cohortes son los siguientes:

60

Población suiza

Las muestras de plasma correspondían a diez controles y diez pacientes con accidente cerebrovascular con edad (nacimiento desde 1911 hasta 1935) y sexo (7 mujeres y 3 hombres) coincidentes, recogidas y sometidas a prueba en Ginebra. Los pacientes con accidente cerebrovascular y control ingresaron en el servicio de urgencias del Hospital Universitario de Ginebra y se incluyeron en este estudio desde agosto de 1996 hasta enero de 1997. Para cada paciente, se recogió una muestra de sangre en tubos que contenían heparina seca en el momento del ingreso. Tras

ES 2 336 946 T3

la centrifugación a 1500 g durante 15 min. a 4°C, se tomaron alícuotas de las muestras de plasma y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. El grupo control (7 mujeres y 3 hombres; edad media: 78,3 años; intervalo: 66-89 años) está compuesto por pacientes que presentan diversos estados médicos o quirúrgicos, incluyendo cáncer, trastornos gastrointestinales, patologías ortopédicas y oftalmológicas. Ninguno de ellos tiene un historial previo o reciente de 5 acontecimiento cerebrovascular.

El grupo con accidente cerebrovascular está compuesto por pacientes a los que se les diagnosticó accidente cerebrovascular (7 mujeres y 3 hombres; edad media: 74,1 años; intervalo: 62-85 años) incluyendo 9 accidentes cerebrovasculares isquémicos y 1 hemorrágico. El intervalo de tiempo entre el acontecimiento neurológico y la primera 10 extracción de sangre osciló desde inferior a 12 horas ($n = 6$) y hasta 2 días ($n = 2$ para 24 horas y $n = 2$ para 2 días). El diagnóstico de accidente cerebrovascular lo estableció un neurólogo experimentado y se basó en una aparición 15 repentina de un déficit neurológico focal y el posterior reconocimiento de una lesión que concuerda con los síntomas de las imágenes de cerebro obtenidas mediante TAC o IRM. El grupo con accidente cerebrovascular se separó según el tipo de accidente cerebrovascular (isquemia o hemorragia), la ubicación de la lesión (tronco encefálico o hemisferio) 20 y la evolución clínica a lo largo del tiempo (AIT cuando se producía recuperación completa en el plazo de 24 horas o accidente cerebrovascular establecido cuando el acontecimiento neurológico todavía estaba presente tras 24 horas).

Cohorte española

20 Se incluyeron en este estudio veintinueve pacientes control y 39 con accidente cerebrovascular (tabla 5). Las pruebas se realizaron en muestras de sueros. El subgrupo con accidente cerebrovascular incluyó 10 pacientes hemorrágicos y 29 isquémicos. La población isquémica se dividió en (i) cardioembólicos, entre ellos infarto de circulación anterior parcial ($n = 5$) y total ($n = 4$), (ii) aterotrombóticos, entre ellos infarto de circulación anterior parcial ($n = 5$) y total 25 ($n = 5$) y (iii) infarto lacunar ($n = 5$) y AIT ($n = 5$). Los 39 pacientes con accidente cerebrovascular se incluyeron en el plazo de 24 horas tras la aparición de los síntomas, y se obtuvo el tiempo exacto para 18 pacientes. El intervalo de tiempo promedio entre el acontecimiento neurológico y la primera extracción de sangre para estos pacientes fue de 10,0 horas (intervalo de 30 min. a 6,25 días).

30

TABLA 5

		Cohorte	Accidente	Control
		española	cerebrovascular	
35	n		39	29
40	Media de		$70,2 \pm 12,1$	$69,3 \pm 9,5$
45	edad \pm DE		(44-95)	(54-87)
50	(mín-máx)			
55	Mujeres n		17 (43,6) /	14 (48,3)
60	(%) /Hombres		22 (56,4)	/15 (51,7)
65	n (%)			
70	Momento de			-
75	aparición de			
80	los síntomas			
85	(h)			
90	Media \pm DE		$10,03 \pm 29,96$	
95	(mín-máx)		(0,5-150)	
100	Mediana		3,05 (1,92-	
105	(percentiles		7,27)	
110	25-75)			
115	Hemorrágicos		10 (25,6)	-
120	n (%)			
125	Isquémicos n		29 (74,4)	-

	(%)		
5		Cardioembólicos, 5 (12,8)	-
		IPCA n (%)	
10		Cardioembólicos 4 (10,4)	
		ITCA n (%)	
15		Lacunar n (%) 5 (12,8)	
		Aterotrombóticos 5 (12,8)	-
20		IPCA n (%)	
		Aterotrombóticos 5 (12,8)	-
		ITCA n (%)	
		AIT n (%) 5 (12,8)	-

Los resultados se muestran en la figura 9. El nivel de GSTP-1 fue significativamente superior en la sangre de los pacientes con accidente cerebrovascular en las cohortes suiza y española ($p<0,0001$, pruebas de Mann-Whitney) con un 100% de sensibilidad y especificidad en la cohorte suiza y con un 72% de sensibilidad y un 93% de especificidad en la cohorte española.

Este resultado demuestra que GSTP-1 es un marcador útil para el diagnóstico temprano del accidente cerebrovascular, solo, o en combinación con otros biomarcadores.

Dado que GSTP-1 se ha encontrado sobreexpresada en el LCR de paciente fallecido, es una predicción razonable que otros polipéptidos y proteínas expresadas de manera diferencial en el LCR de paciente fallecido también serán útiles como marcadores para trastornos relacionados con daño cerebral.

35

Ejemplo 6

40 *Validación de fragmentos de APO-AIV como marcadores de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer usando inmunotransferencia de tipo Western*

La apolipoproteína A-IV (ApoA-IV) se identificó por primera vez en el análisis proteómico del LCR descrito en el ejemplo 4 anterior. Para evaluar su utilidad en el diagnóstico de trastornos relacionados con daño cerebral, se estudió su presencia en el plasma de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) usando inmunotransferencia de tipo Western.

45

Las muestras de plasma se diluyeron 1:10 con agua doblemente destilada y se sometieron a ensayo usando un método de unión a colorante de Bradford (las muestras diluidas permiten el manejo de volúmenes de alícuotas de tamaño adecuado).

50

Se llevó a cabo SDS-PAGE usando muestras de $20\ \mu\text{g}$ por carril ($2\ \mu\text{g}$ si la muestra es un anticuerpo primario o secundario desnaturalizado) en geles de acrilamida al 16%, de 1,5 mm de espesor, en 10 pocillos (NOVEX) durante 1 h a 80 V; 1,5 h a 125 V. A esto le siguió una inmunotransferencia de tipo Western sobre membrana de nitrocelulosa a 50 V durante 1,5 h. Las inmunotransferencias se sondaron con los siguientes anticuerpos:

55

Anti-ApoA-IV (específico del extremo N-terminal), Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Anti-ApoA-IV (específico del extremo C-terminal), Santa Cruz Biotechnology, Inc.

60

Ambos anticuerpos son anticuerpos policlonales de cabra purificados por afinidad producidos frente a un mapeo de péptidos cerca del extremo terminal amino (N-terminal) o carboxilo (C-terminal) de ApoA-IV de origen humano. Se eligieron estos anticuerpos puesto que el sondaje para determinar los extremos N y C-terminal debe aumentar la posibilidad de detección de la proteína y/o fragmentos de ApoA-IV. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 10.

65

Se encontraron varias bandas que parecían ser específicas para ApoA-IV y también discriminatorias para la EA. Estas bandas no aparecen en la inmunotransferencia control sólo con anticuerpos secundarios para las muestras control o de EA.

ES 2 336 946 T3

Las bandas 3-6 que se observan en la región de 10-16 kDa son discriminatorias para la EA, pero también parecen alinearse con bandas en los carriles de anticuerpo desnaturalizado anti-ApoA-IV. También se ha observado que las bandas 3-6 son mucho más intensas en las inmunotransferencias en las que se han usado anticuerpos anti-ApoA-IV específicos del extremo N-terminal.

5

Se observaron otras dos bandas clave. La banda 1 se observó a aproximadamente 45 kDa y parece corresponder a la proteína APO-AIV madura de longitud completa. La banda 2 se observa a aproximadamente 28 kDa y parece ser un fragmento N-terminal de APO-AIV.

10

Ejemplo 7

Validación del factor H del complemento como marcadores de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer usando inmunotransferencia de tipo Western

15

El factor H del complemento (FHC) se identificó por primera vez en el análisis proteómico del LCR descrito en el ejemplo 4 anterior. Para evaluar su utilidad en el diagnóstico de trastornos relacionados con daño cerebral, se estudió su presencia en el plasma de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) usando inmunotransferencia de tipo Western.

20

Se diluyeron muestras de plasma hasta 1 en 8 en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se añadió un volumen igual de tampón de muestra Laemmli 2x y luego se llevó a ebullición durante 10 min. hasta su uso.

25

Inmunotransferencia de tipo Western

Se realizó electroforesis en gel de SDS usando geles de 1,5 mm, de 36 pocillos Fisher Scientific (todas las disoluciones se adquirieron de National Diagnostics). Se separaron las muestras en un gel de resolución al 10% con un gel de apilamiento al 4% (todas las disoluciones se adquirieron de National Diagnostics). Se separaron las muestras (20 µl) inicialmente durante 30 min. a 110 V y después durante 60 min. a 150 V hasta que el frente de colorante comenzó a entrar en el tampón de desplazamiento.

30

El gel se transfirió a PVDF (Amersham Biosciences) usando un dispositivo de transferencia semiseca (Bio-Rad) durante 45 min. a 15 V. Entonces se bloqueó la membrana en leche al 5% preparada en PBS-Tween y se sondó con el anticuerpo primario frente al factor H del complemento (Abcam, R.U.) durante la noche a 4°C. Las bandas se detectaron con un kit de detección por quimioluminiscencia de inmunotransferencia de tipo Western (ECL+, Amersham Biosciences) y las membranas se barrieron usando un escáner de fluorescencia Storm (Amersham Biosciences).

35

Se observó una banda inmunorreactiva a 139 kDa (FHC) y se cuantificó la densidad óptica usando el software Image Quant (Amersham Biosciences). El análisis se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney no paramétrica usando el paquete SPSS.

Resultados

40

Los datos de la inmunotransferencia de tipo Western se adquirieron de plasma de 128 personas con EA probable NINCDS-ADRDA y 78 controles ancianos sanos normales. Los casos con EA tenían un aumento del 32% en FHC (Mann-Whitney; tabla 6).

TABLA 6

45

Diagnóstico	Número	Media del FHC	DE	EEM
Controles	128	65,6	65,5	5,8
EA probable	78	96,0	96,8	11,0

50

55 Hubo una diferencia en cuanto al sexo con un valor de FHC relativamente alto en familiares globales femeninos con respecto a masculinos ($p=0,05$). Sin embargo, el FHC fue más alto en los casos con EA en relación con los controles incluso cuando se consideraron los sexos por separado ($p<0,01$; tabla 7).

60

65

TABLA 7

Mujeres únicamente	Número	Media del FHC	EEM
Controles	78	73,0	8,9
EA probable	64	102,7	13,0
Total	142	86,4	7,7

Un análisis de curva operativa del receptor (ROC) mostró que el FHC tiene un rendimiento mejor que el azar como prueba de diagnóstico.

Para evaluar adicionalmente el rendimiento del FHC como marcador de diagnóstico en plasma para la EA, se determinaron los niveles de FHC usando la misma metodología de inmunotransferencia de tipo Western en varias demencias clínicamente similares. Se mostró que los niveles de FHC sólo eran significativamente elevados con respecto a los controles en la cohorte de EA no en ninguna otra demencia.

Ejemplo 8

Validación del factor 3a del complemento como marcador de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

1. Sumario

En este estudio, fue posible mostrar para muestras de plasma que la concentración del péptido C3a de individuos con enfermedad de Alzheimer (EA) cambia.

2. Introducción

C3 es un glicoproteína de 180 kDa que actúa como componente del sistema del complemento. Activa el sistema del complemento, procesándose mediante la eliminación de cuatro residuos de arginina para formar dos cadenas, α y β , unidas mediante un puente disulfuro. En un acontecimiento proteolítico, el péptido C3a de 77 residuos de aminoácidos de largo (anafilatoxina) de 4 kDa se libera posteriormente de la cadena α . Se ha demostrado que C3a es un mediador pro-inflamatorio y anti-inflamatorio que se une a C3aR, un receptor acoplado a proteínas G.

El objetivo de este estudio era la determinación cuantitativa del péptido C3a en muestras de plasma humano de un grupo control y uno del caso (EA).

3. Procedimiento experimental

En estos experimentos, se analizaron muestras de plasma humano usando un ensayo de ELISA de C3a comercial (BD OptEIA N.º de cat. 550499) de BD Biosciences (San Diego, CA 92121 (EE.UU.)). Las placas se lavaron en el instrumento Powerwisher384 de Tecan GmbH (Crailsheim, Alemania) y, posteriormente, se midieron en un lector de absorbancia GeniosPro de Tecan GmbH (Crailsheim, Alemania) a 450/620 nm con 10 lecturas por pocillo. Todos los procedimientos se llevaron a cabo según las instrucciones de los fabricantes. Las muestras de plasma humano se diluyeron 1:500 antes del análisis.

En este método, se añadieron en primer lugar muestras de pacientes o patrones de C3a de o bien un grupo del caso (EA) o bien un grupo control a pocillos que se habían recubierto antes con anticuerpos monoclonales frente a C3a-desArg. Tras lavar los pocillos, se añade una mezcla de anticuerpo polyclonal biotilinado anti-C3a humano y estreptavidina-peroxidasa del rábano, produciendo una intercalación anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Se cuantificó la actividad de la enzima presente en la superficie del pocillo mediante la reacción con un sustrato adecuado (TMB) para producir color. Como controles, el ensayo incluye soluciones patrón de C3a con un intervalo de concentraciones de desde 0 hasta 5 ng/ml.

Se realizaron dos experimentos: el experimento 1 con 20 muestras de pacientes por grupo y el experimento 2 con 30 muestras de pacientes por grupo (el experimento 2 fue una repetición del experimento 1 con otras 10 muestras de pacientes por grupo). Se analizó por duplicado cada muestra de paciente y control.

ES 2 336 946 T3

Con el fin de que los resultados del ensayo se consideraran válidos, las concentraciones de los controles deben cumplir ciertos criterios como los facilitados por el fabricante. Para las curvas patrón del experimento 1 y el 2, se han determinado coeficientes de determinación de 0,995 y 0,998, respectivamente. Además, los valores de absorbancia medidos se analizaron estadísticamente mediante una prueba de la *t* de dos colas (paquete de programa *statistiXL* 1,5).

5

4. Resultados y discusión

Entre los valores de absorbancia individuales, se observó una variación biológica significativa tanto para el grupo control como para el del caso (coeficiente de variación en el experimento VL050802: 26 y 27%; coeficiente de variación en el experimento VL051012: 37 y 30%). El diagrama de dispersión en la figura 11 muestra los valores medidos durante los primeros experimentos de ELISA. En ambos experimentos se encontró que la diferencia entre los dos grupos era estadísticamente significativa, tal como se indicaba por los valores de probabilidad de 0,005 y 0,003. Las razones calculadas (control/EA) para la abundancia de C3a fueron de 0,77 y 0,76 en los dos experimentos de ELISA (véase la tabla 8). Estas razones indican una débil modulación de la expresión de C3a en muestras de plasma de pacientes con EA.

20

TABLA 8

Modulaciones de C3a a partir de los experimentos de ELISA

25

Fuente de datos	Grupo del caso, Abs. media a 450 nm	Grupo control, Abs. media a 450 nm	Control/caso
1 ^{er} experimento de ELISA (VL050802)	2,428 ± 0,626	1,881 ± 0,515	0,77
2º experimento de ELISA (VL051012)	2,310 ± 0,687	1,769 ± 0,654	0,76

30

35

40

45

Este resultado demuestra que el factor 3a del complemento es un marcador útil para la enfermedad de Alzheimer, solo, o en combinación con otros biomarcadores.

50

Dado que el factor 3a del complemento se ha encontrado sobreexpresado en el LCR de paciente fallecido, es una predicción razonable que otros polipéptidos y proteínas expresadas de manera diferencial en el LCR de paciente fallecido también serán útiles como marcadores para trastornos relacionados con daño cerebral.

55

Ejemplo 9

60

Resultados

65

La tabla 9 indica el subconjunto de proteínas observadas en LCR *post mórtum* humano que también muestra la expresión diferencial en el material del hipocampo aislado de los ratones transgénicos estudiados dentro del proyecto PRO-TAMAD. A este respecto, se hace referencia al documento WO 2006/021810.

ES 2 336 946 T3

TABLA 9

El solapamiento de biomarcadores tisulares candidatos de EA (ratones) con proteínas observadas en el análisis de LCR post mórtем humano

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Nombre de la proteína	Ratón	Ser humano	Función	Comportamiento en el estudio PRO-TAMAD
Apolipoproteína E ***	P08226	P02649	Factor de riesgo para la EA y está implicada en otros estados neurológicos. Implicada en el procesamiento de partículas de lipoproteína y se secreta en el plasma.	Regulada por incremento en todos las condiciones transgénicas (ROH)
Glutatió-S-transferasa Mu 1 ***	P10649	P09488	Conjugación de glutatió reducido a muchos sustratos	Mancha en 2DE ausente de todas las condiciones transgénicas
Cadena de tubulina beta-4 ***	Q9D6F9	Q13509	La tubulina es el principal constituyente de los microtúbulos. Se une a dos moles de GTP	Mancha en 2DE ausente en el doble transgénico
Isozima L1 de hidrolasa carboxiterminal de ubiquitina	Q9R0P9	P09936	Proteína hidrolasa de ubiquitina implicada en el procesamiento de precursores de ubiquitina y de proteínas ubiqüinadas.	Regulada por disminución en ambas condiciones transgénicas individuales
Transgelina 3 Proteína neuronal	Q9R1Q8	Q01995	Unión a actina	Regulada por disminución en

65

ES 2 336 946 T3

	Np25 ***				condiciones transgénicas
5	Inhibidor 1 de la disociación de Rab GDP ***	P50396	P31150	Regula la reacción de intercambio de GDP/GTP. Sumamente expresada en el cerebro	Regulada por incremento en condiciones transgénicas
10	Dihidropirimidinasa de tipo 2 (DRP-2)	P47942	Q16555	Implicada en la formación de neuronas	Se observa que cambia en numerosos estudios y generalmente se considera que es un artefacto post mórtем
15					
20					
25	Aspartato aminotransferasa citoplasmática	P05201	P17174	Actividad catalítica: L-aspartato + 2-oxoglutarato = oxaloacetato + L-glutamato	Varias manchas en 2DE, regulada por disminución en condiciones transgénicas múltiples
30					
35	Fructosa-bisfosfato aldolasa C	P05063	P09972	Glicolisis de aldolasa de tipo cerebral; sexta etapa	Regulada por disminución en las condiciones transgénicas individuales
40					
45	Subunidad alfa de tipo 6 del proteasoma ***	Q9QUM9	P60900	Proteasa implicada en la ruta proteolítica no lisosómica	Muestra una disminución de 2 veces en el hipocampo de ratones dobles transgénicos
50					

Notas:

- *** Indica aquellas proteínas que no se ha citado previamente que estén presentes en el LCR humano
- ROH = Resto del hemisferio

Conclusiones

El conocimiento de las proteínas que circulan en LCR como consecuencia de daño cerebral, en este caso *post mórtum*, es un recurso extremadamente útil. La tarea de asociar diversos subconjuntos de estas proteínas con otros estados neurológicos puede emprenderse fácilmente y este ejemplo demuestra cómo una simple revisión de los datos del legado puede proporcionar evidencia adicional para respaldar las proteínas candidatas clave como biomarcadores de una enfermedad particular.

Al considerar los datos históricos de PRO-TAMAD, parece haber un solapamiento considerable con las proteínas que se ha observado que cambian en el hipocampo y en el tejido del resto del hemisferio (ROH) del modelo de ratones transgénicos de la enfermedad de Alzheimer. Ahora se ha demostrado que diez de las diecisiete proteínas originales notificadas en el estudio PRO-TAMAD están presentes en el LCR *post mórtum* humano y particularmente cinco de ellas nunca se habían citado anteriormente en el LCR. Tomados juntos, estos hallazgos sugieren la importancia adicional de estas proteínas en enfermedades neurológicas, la enfermedad de Alzheimer particularmente. No sólo se han mostrado cambios que están correlacionados con la respuesta a la enfermedad dentro del tejido cerebral, aunque es el caso en el ratón, sino que ahora también se ha observado la aparición de estas proteínas en el LCR como consecuencia del daño tisular.

La comparación de los cambios en las proteínas a través de diferentes paradigmas experimentales es, por tanto, útil y representa un ejercicio valioso que puede usarse para establecer la utilidad de entidades de proteína particulares, como biomarcadores que actúan como un puente entre especies, tejidos y líquidos corporales. En consecuencia, un ejercicio de este tipo debe ser una consideración de rutina cuando los experimentos de descubrimiento de biomarcadores producen nuevos candidatos.

Ejemplo 10

Se realizó un estudio de caso-control usando análisis de electroforesis en gel bidimensional de plasma seguido por espectrometría de masas para identificar las proteínas que difieren entre un grupo con enfermedad de Alzheimer y un grupo control. Éstas se validaron entonces mediante inmunotransferencia de tipo Western. Para el análisis de proteómica, se incluyeron 50 personas con EA a través de servicios secundarios y 50 controles ancianos normales a través de la atención primaria. Para los fines de validación, se examinó a un total de 511 sujetos con EA y otra enfermedad neurodegenerativa y controles ancianos normales.

El análisis mediante imágenes de la distribución de las proteínas de los geles identifica sólo casos con EA con un 56% de sensibilidad y un 80% de especificidad. En análisis mediante espectrometría de masas de los cambios observados en la electroforesis bidimensional identificó varias proteínas implicadas previamente en la patología de la EA, incluyendo el precursor del factor H del complemento (FHC) y α_2 -macroglobulina (α_2 M). La elevación del FHC y de α_2 M se validó mediante inmunotransferencia de tipo Western y se demostró que el FHC era específico para la EA y que estaba correlacionado con la gravedad de la enfermedad.

Los resultados se muestran en las figuras 12 y 13. La figura 12 muestra una correlación de los niveles del factor H del complemento determinados mediante inmunotransferencia de tipo Western con la Escala Global de Demencia en pacientes con presunta enfermedad de Alzheimer. La figura 13 es una curva operativa del receptor (ROC) para el factor H del complemento y alfa-2-macroglobulina como biomarcadores plasmáticos candidatos de la enfermedad de Alzheimer.

Bibliografía

- [1] **Vaagenes P, Urdal P, Melvoll R, Valnes K:** Enzyme level changes in the cerebrospinal fluid of patients with acute stroke. *Arch Neurol* 1986; 43:357-362.
- [2] **Lampl Y, Paniri Y, Eshel Y, Sarova-Pinhas I:** Cerebrospinal fluid lactate dehydrogenase levels in early stroke and transient ischemic attacks. *Stroke* 1990; 21:854-857.
- [3] **Matias-Guiu J, Martinez-Vazquez J, Ruibal A, Colomer R, Boada M, Codina A:** Myelin basic protein and creatine kinase BB isoenzyme as CSF markers of intracranial tumors and stroke. *Acta Neurol Scand* 1986; 73:461-465.
- [4] **Persson L, Hardemark HG, Gustafsson J, Rundstrom G, Mendel-Hartwig I, Esscher T, Pahlman S:** S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke* 1987; 18:911-918.
- [5] **Cunningham RT, Young IS, Winder J, O'Kane MJ, McKinstry S, Johnston CF, Dolan OM, Hawkins SA, Buchanan KD:** Serum neurone specific enolase (NSE) levels as an indicator of neuronal damage in patients with cerebral infarction. *Eur J Clin Invest* 1991; 21:497-500.

ES 2 336 946 T3

- [6] **Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, de Brujin CH, Lamers KJ:** Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke* 2000; 31:2670-2677.
- 5 [7] **Bitsch A, Horn C, Kemmling Y, Seipelt M, Hellenbrand U, Stiefel M, Ciesielczyk B, Cepek L, Bahn E, Ratzka P, Prange H, Otto M:** Serum tau protein level as a marker of axonal damage in acute ischemic stroke. *Eur Neurol* 2002; 47:45-51.
- 10 [8] **Watson MAScott MG:** Clinical utility of biochemical analysis of cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1995; 41:343-360.
- 15 [9] **Hochstrasser DF, Frutiger S, Paquet N, Bairoch A, Ravier F, Pasquali C, Sanchez JC, Tissot JD, Bjellqvist B, Vargas R, et al.:** Human liver protein map: a reference database established by microsequencing and gel comparison. *Electrophoresis* 1992; 13:992-1001.
- 20 [10] **Sanchez J-C, Chiappe D, Converset V, Hoogland C, Binz P-A, Paesano S, Appel RD, Wang S, Sennitt M, Nolan A, Cawthorne MA, Hochstrasser DF:** The mouse SWISS-2D PAGE database: a tool for proteomics study of diabetes and obesity. *Proteomics* 2001; 1:136-163.
- 25 [11] **Hochstrasser DF, Merril CR:** "Catalysts" for polyacrylamide gel polymerization and detection of proteins by silver staining. *Appl Theor Electrophor* 1988; 1:35-40.
- 30 [12] **Appel RD, Palagi PM, Walther D, Vargas JR, Sanchez JC, Ravier F, Pasquali C, Hochstrasser DF:** Melanie II-a third-generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images: I. Features and user interface. *Electrophoresis* 1997; 18:2724-2734.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para el diagnóstico de accidente cerebrovascular en un sujeto que se sospecha que padece el mismo, que comprende detectar glutatión-S-transferasa P (GSTP-1), o una variante, un mutante o una isoforma de la misma, en una muestra de sangre, plasma o suero extraída de un sujeto, en el que un nivel elevado de GSTP-1, en comparación con un control, es indicativo de accidente cerebrovascular.
- 10 2. Método de seguimiento de la progresión de un accidente cerebrovascular en un sujeto al que se le diagnosticó previamente que padecía el mismo, que comprende medir los niveles de GSTP-1, o una variante, un mutante o una isoforma de la misma, en múltiples muestras de sangre, plasma o suero extraídas de un sujeto en momentos diferentes y determinar el cambio en los niveles de la GSTP-1 en la muestra sometida a prueba más recientemente en comparación con los niveles en muestras sometidas a prueba previamente y correlacionar tal cambio con la progresión, regresión o estabilización de dicho accidente cerebrovascular.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que se usa un anticuerpo frente a GSTP-1 en la detección o la determinación de la concentración.
- 20 4. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la GSTP-1 se detecta mediante la determinación de al menos un autoanticuerpo frente a la misma.
- 25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se usan dos o más marcadores seleccionados de anticuerpos frente a GSTP-1 en un pocillo individual de una placa de microtitulación de ELISA.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que GSTP-1 y al menos otro polipéptido se someten a ensayo por separado, y se usa un algoritmo de predicción para el diagnóstico, en el que dicho al menos otro polipéptido es uno para el cual el nivel está o bien aumentado o bien disminuido en el líquido cefalorraquídeo de pacientes fallecidos en comparación con el líquido cefalorraquídeo de donantes sanos.

30

35

40

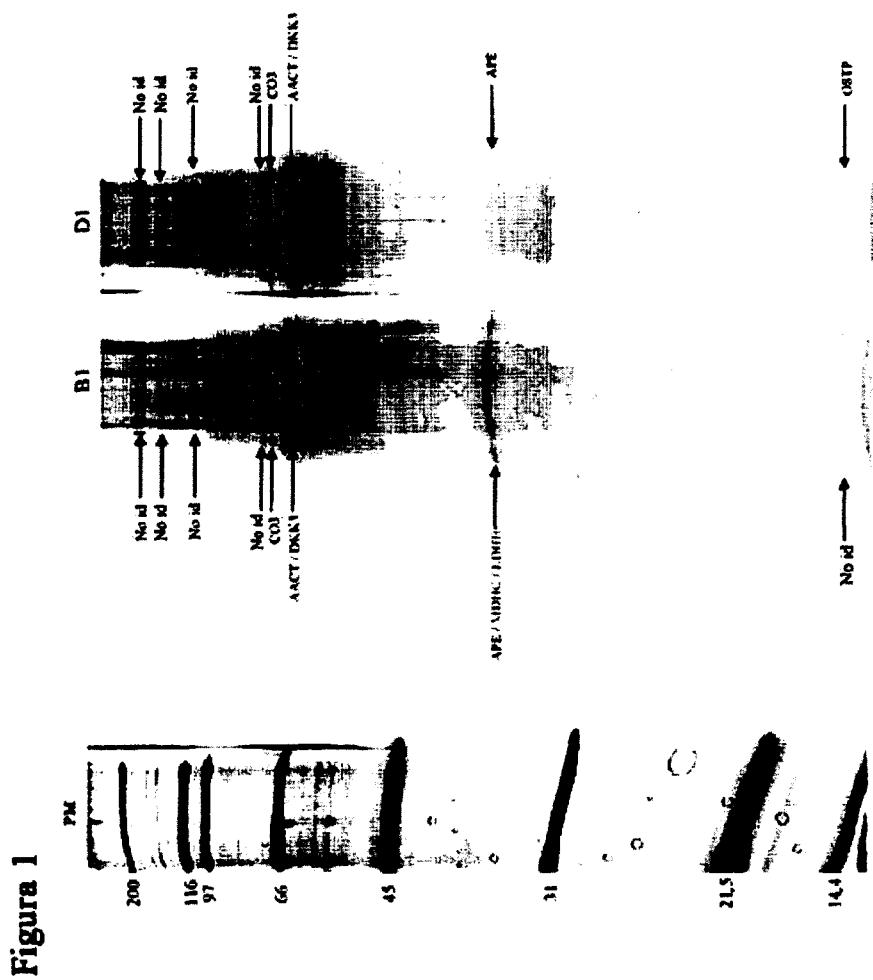
45

50

55

60

65



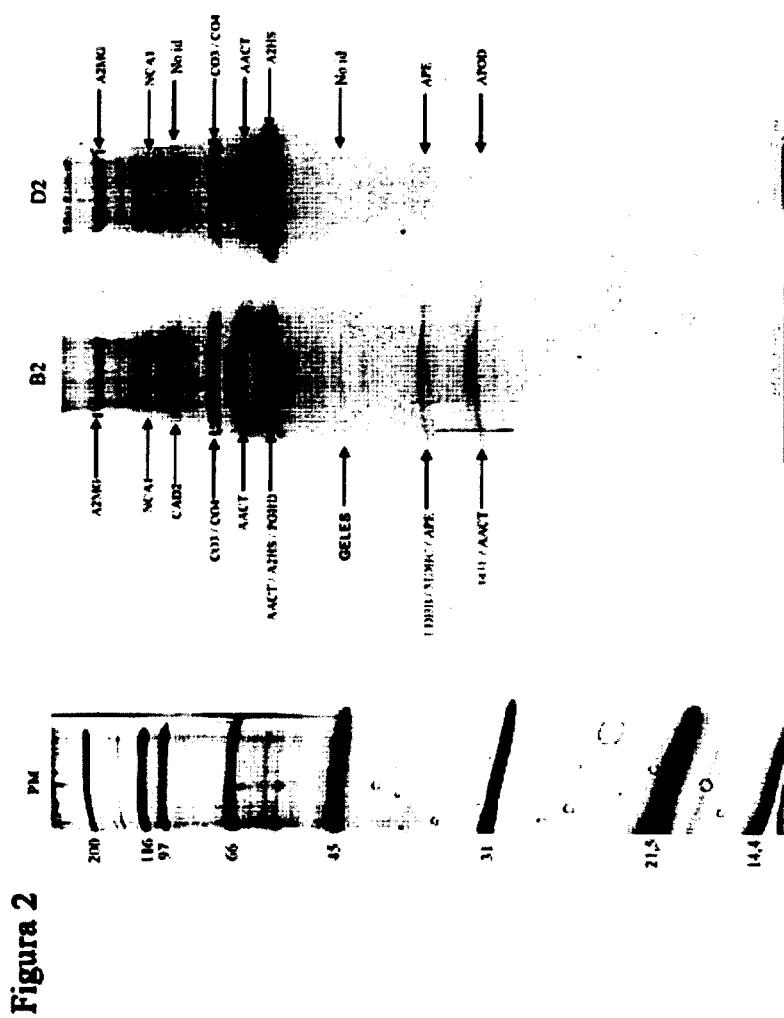


Figura 2

ES 2 336 946 T3

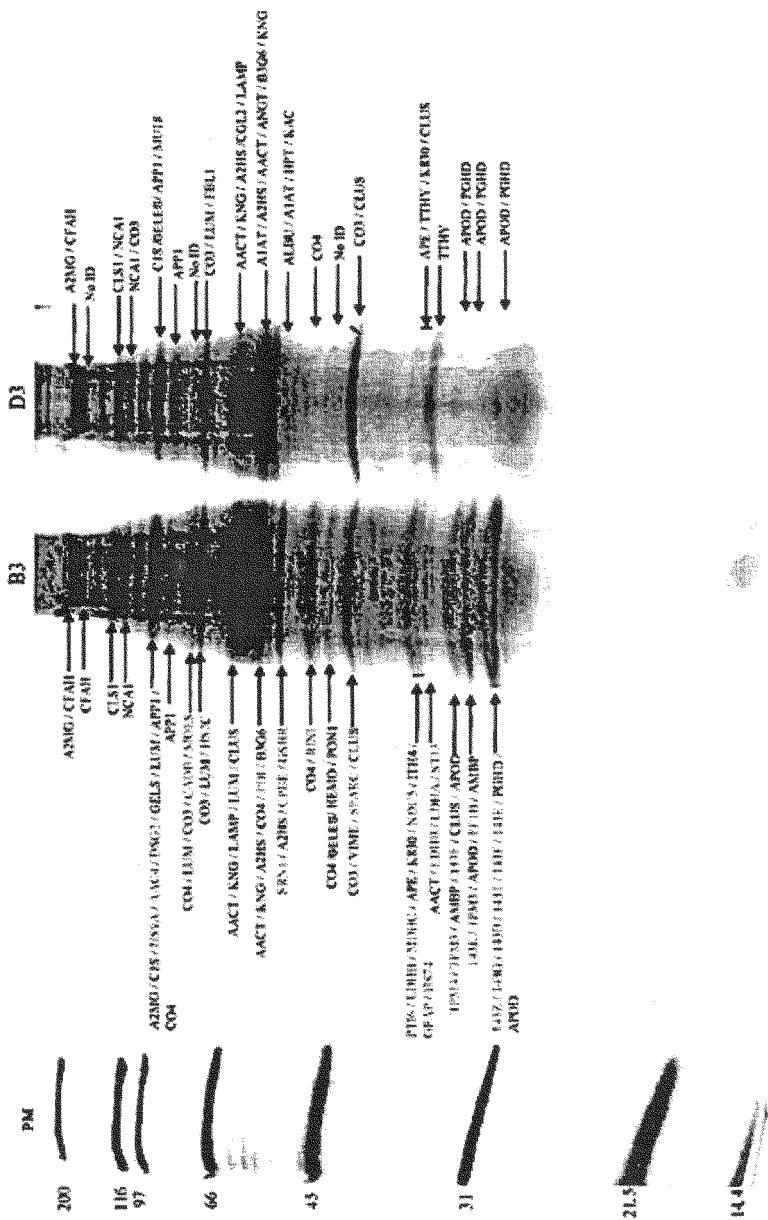


Figura 3

ES 2 336 946 T3

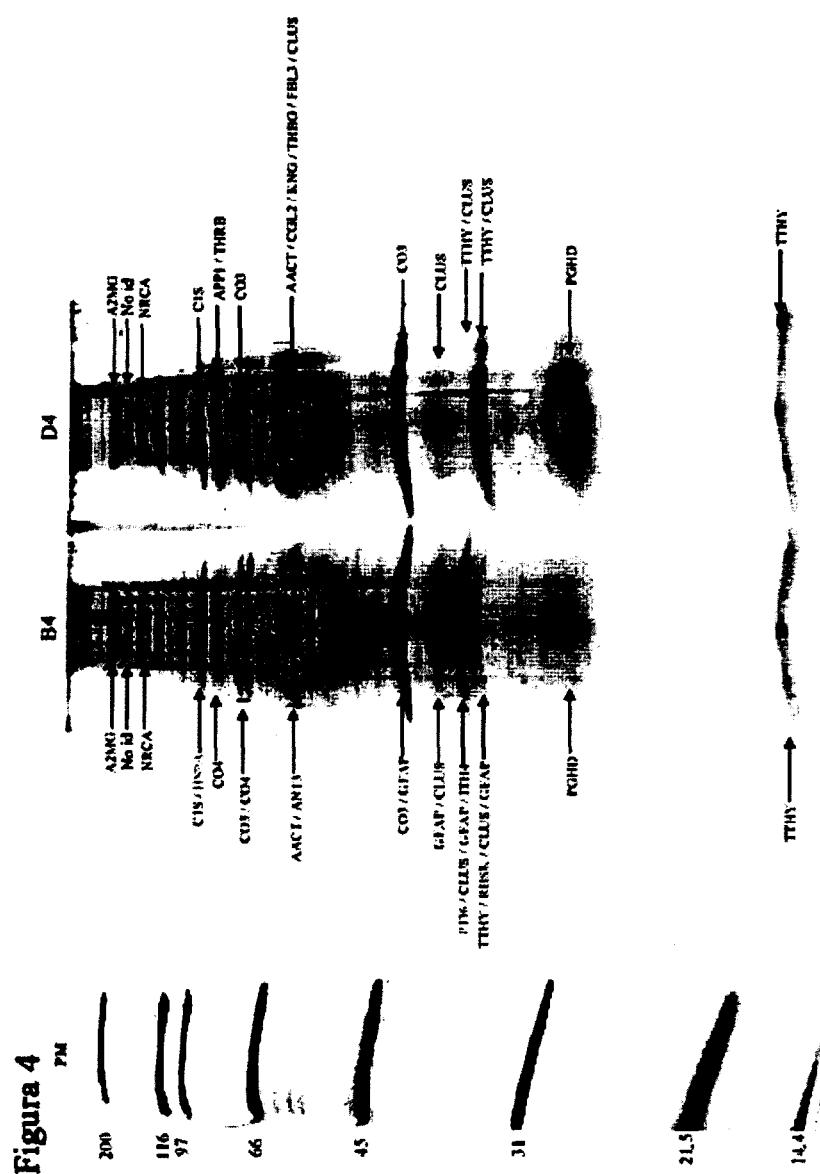


Figura 4

Figura 5. Detección de UFD1 en nuevas muestras de plasma diluidas 2 veces. ELISA de inmunofluorescencia tipo sandwich para anticuerpos. Modo cinético de valores en bruto. Controles/accidente cerebrovascular con edad/sexo coincidentes

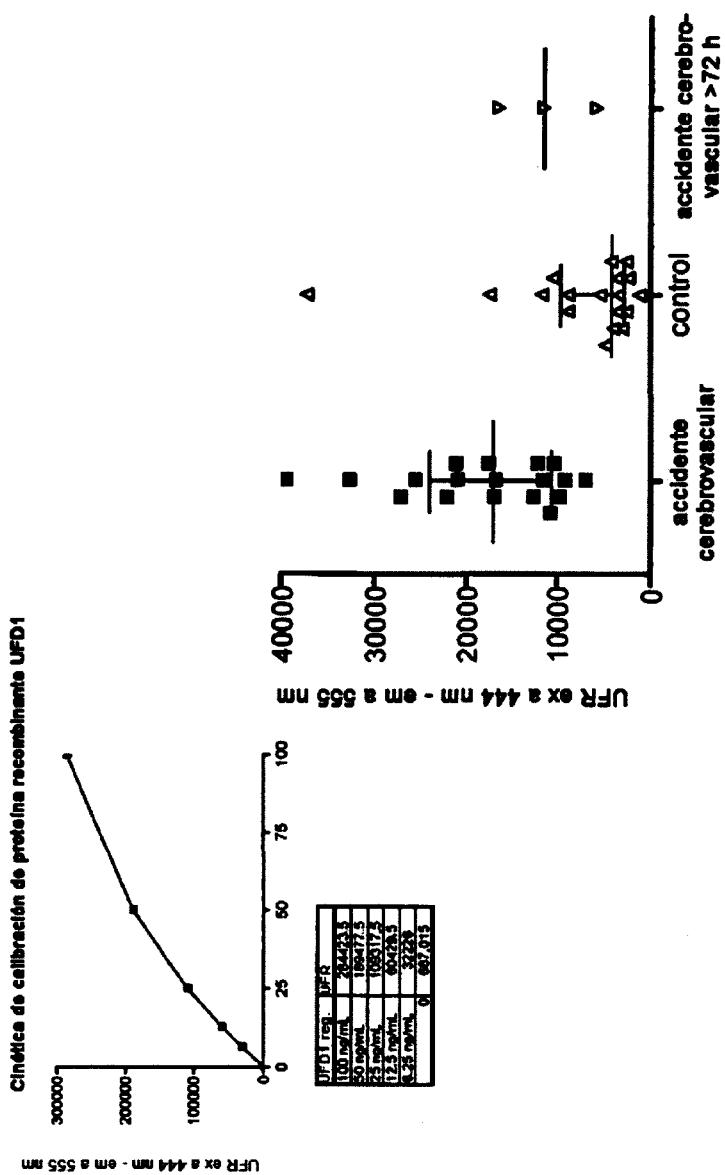
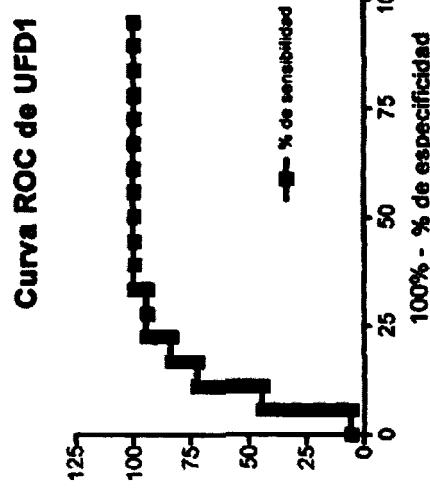


Figura 6. Curva ROC de UFD1



Mejor valor de corte de UFD1 para diferenciar el accidente cerebrovascular frente al control.
Determinación de la sensibilidad y la especificidad

	Punto de corte	P (Mann et Whitney)	SEN	ESP
S vs. C	9047	<0,0001	94.4%	77.8%

Figura 7 - Concentración plasmática de UFDP1: ELISA

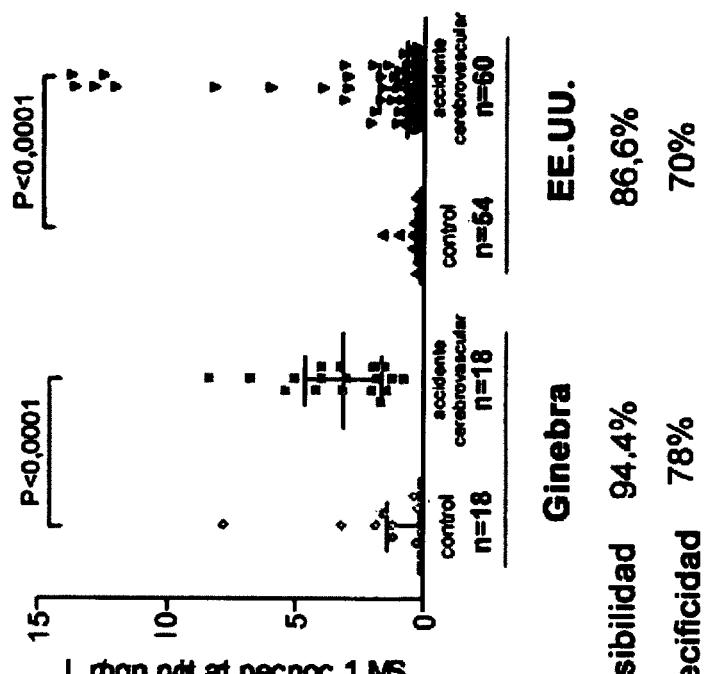


FIGURA 8

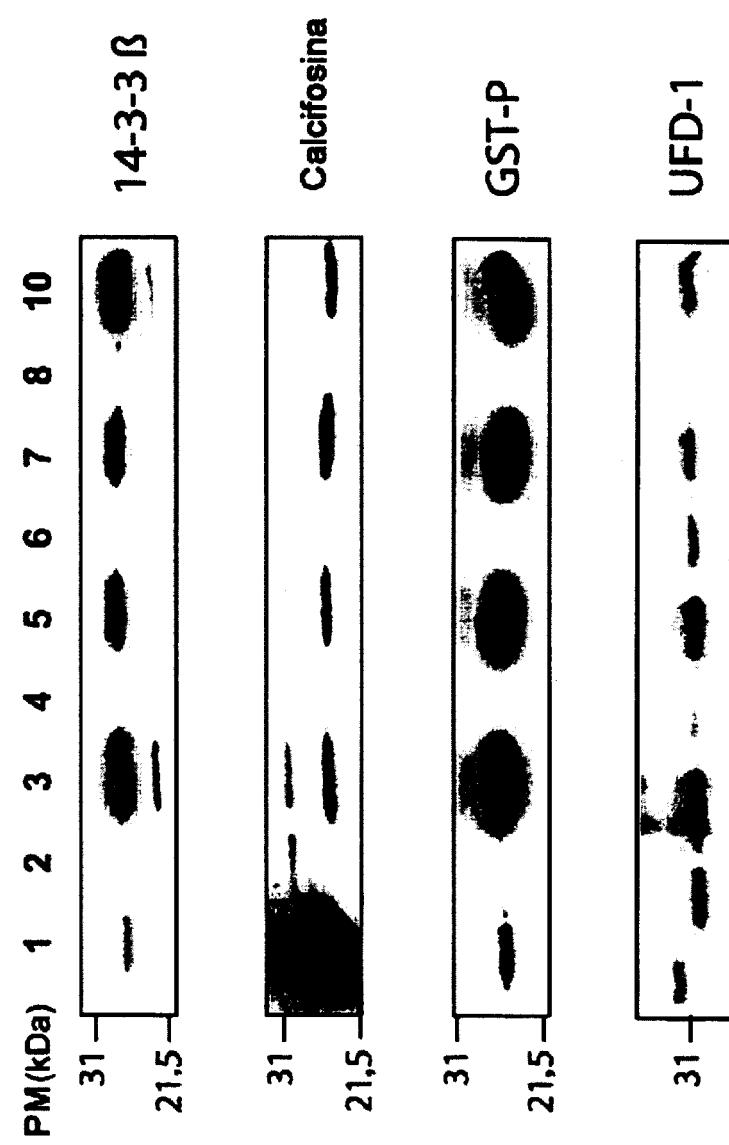


FIGURA 9

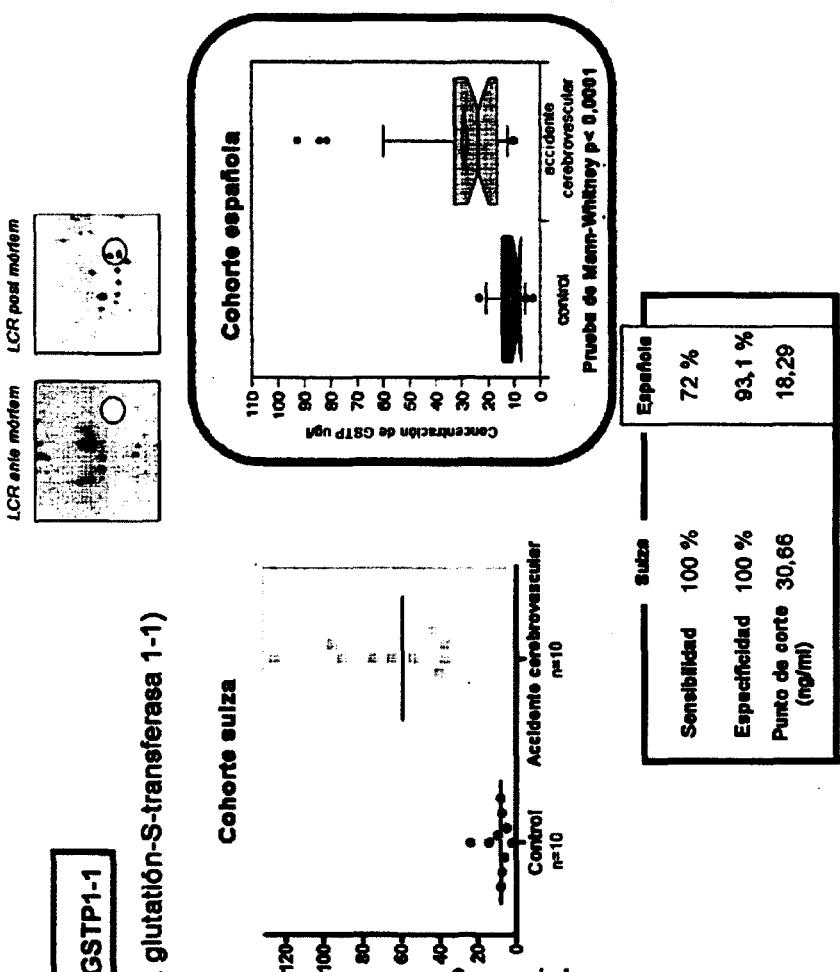
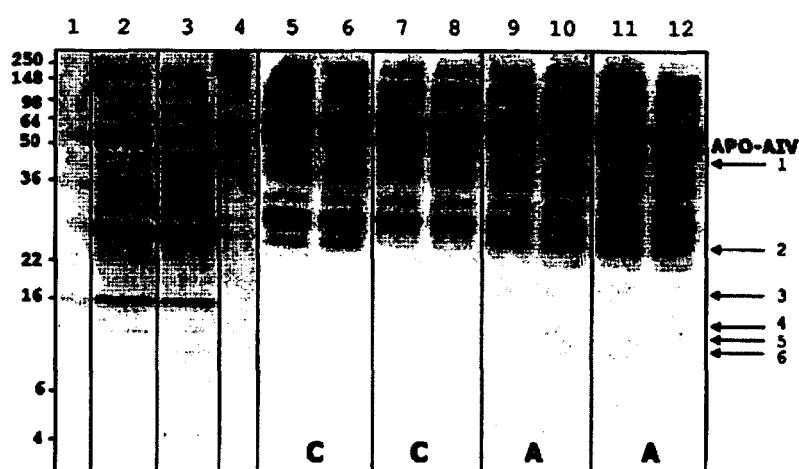


FIGURA 10



Validación mediante inmunotransferencia de tipo Western de apolipoproteína A-IV en la enfermedad de Alzheimer.

Leyenda:

C - plasma de paciente control; A - plasma de paciente con Alzheimer

FIGURA 11

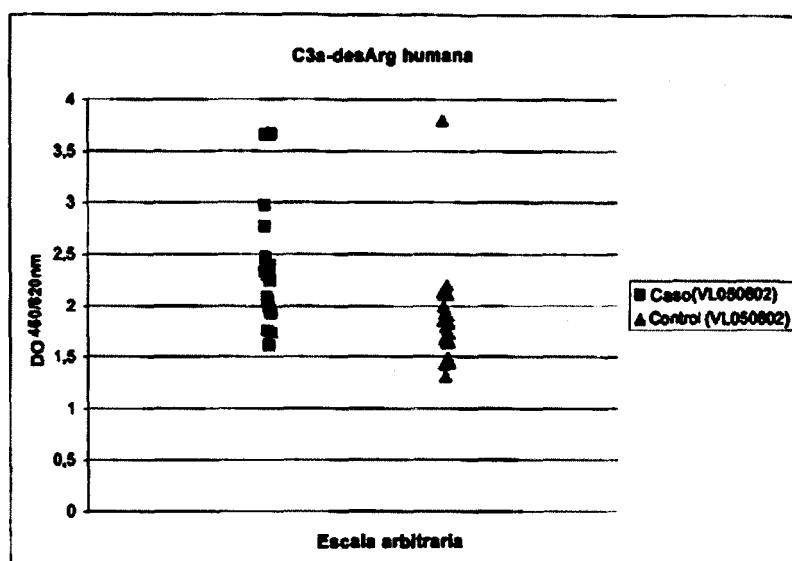
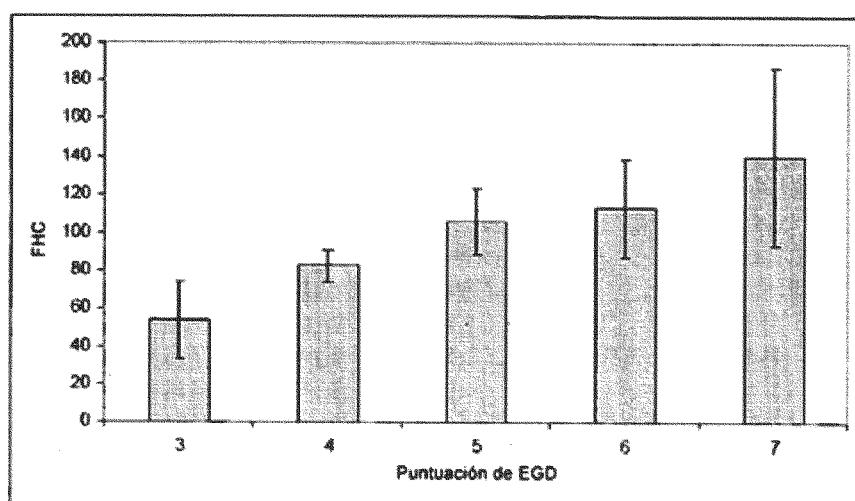


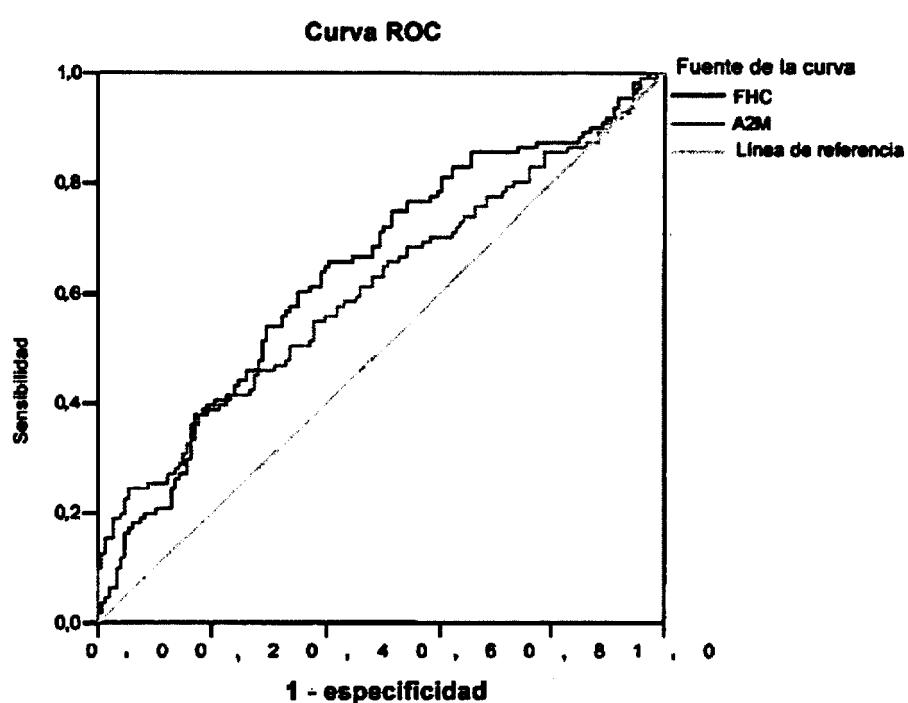
Diagrama de dispersión con los valores medidos de 20 muestras de plasma humano de caso y 20 control del experimento VL050802.

FIGURA 12



Correlación de los niveles del factor H del complemento determinados mediante inmunotransferencia de tipo Western con la Escala Global de Demencia en pacientes con supuesta enfermedad de Alzheimer.
Las barras de error representan la desviación estándar. Los niveles de FHC están en unidades arbitrarias.

FIGURA 13



Curva operativa del receptor (ROC) para el factor H del complemento y alfa-2-macroglobulina como biomarcadores plasmáticos candidatos de la enfermedad de Alzheimer.