



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 372 842**

② Número de solicitud: 201000899

⑤ Int. Cl.:  
**G01N 33/48** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **12.07.2010**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **27.01.2012**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**27.01.2012**

① Solicitante/s: **Fundación de la Comunidad Valenciana Centro de Investigación Príncipe Felipe**  
c/ E.P. Avda. Autopista del Saler, 16-3  
46012 Valencia, ES  
Fundación para la Investigación Biomédica, la Docencia y la Cooperación Internacional y el Desarrollo del Hospital Clínico Universitario de Valencia

⑦ Inventor/es: **Felipo Orts, Vicente;**  
**Caulí, Omar y**  
**Montoliu Félix, María del Carmen**

⑦ Agente: **Arizti Acha, Mónica**

⑤ Título: **Método *ex-vivo* para el diagnóstico temprano de la encefalopatía hepática mínima mediante la determinación de 3-nitrotirosina en suero.**

⑦ Resumen:

Método *ex-vivo* para el diagnóstico temprano de la encefalopatía hepática mínima mediante la determinación de 3-nitrotirosina en suero se refiere a un método *ex-vivo* para la detección y diagnóstico temprano de la encefalopatía hepática mínima (EHM) en pacientes con enfermedades hepáticas, incluida la cirrosis, basado en la presencia en suero de biomarcadores específicos, concretamente mediante la determinación de 3-nitrotirosina (3-NT) que comprende, la obtención de suero o plasma obtenido de la sangre de los paciente y de los controles, y determinación de si la medida de la concentración de 3-nitrotirosina obtenida es superior o no a un nivel determinado.

ES 2 372 842 A1

## DESCRIPCIÓN

Método *ex-vivo* para el diagnóstico temprano de la encefalopatía hepática mínima mediante la determinación de 3-nitrotirosina en suero.

## Sector técnico de la invención

La presente invención se incluye en el campo de la Farmacología y Química Médica y se refiere a un método *ex-vivo* para la detección y diagnóstico temprano de la encefalopatía hepática mínima (EHM) en pacientes con enfermedades hepáticas, incluida la cirrosis, basado en la presencia en suero de biomarcadores específicos, concretamente mediante la determinación de 3-nitrotirosina (3-NT).

## Antecedentes de la invención

La encefalopatía hepática (EH) es un término médico asignado para describir una anormalidad neuropsiquiátrica causada por una alteración previa en la función del hígado. Puede ser un trastorno progresivo y crónico ó de aparición aguda y es en algunos casos reversible. La EH es especialmente frecuente en los cirróticos. El término encefalopatía hepática mínima (EHM) se refiere a los cambios sutiles en la función cognitiva y patrones electroencefalográficos en pacientes con enfermedades hepáticas (incluida la cirrosis), que no muestran una evidencia clínica de encefalopatía hepática.

Esta complicación de las enfermedades hepáticas generalmente no es perceptible por el médico. Entre 30% y 50% de los pacientes con cirrosis hepática que no muestran síntomas evidentes de encefalopatía hepática (EH) presentan EHM con deterioro cognitivo leve. La EHM no se detecta en un análisis rutinario pero se puede detectar utilizando pruebas psicométricas o realizando estudios neurofisiológicos (1-4).

La EHM es la primera fase del espectro de la EH (5, 6) y lleva asociada una disminución de la calidad de vida de los pacientes y de su habilidad para realizar tareas de la vida diaria, incluyendo la conducción de vehículos (7, 8). La EHM aumenta el riesgo de padecer accidentes laborales y de tráfico (9), predice la aparición de EH clínica (10) y se asocia con una menor supervivencia (11).

La detección temprana de la EHM permitiría su tratamiento y mejoraría su calidad de vida, prevendría o retrasaría la aparición de la EH clínica y aumentaría la supervivencia de los pacientes. Es por tanto necesario disponer de procedimientos sencillos para el diagnóstico de la EHM en pacientes con enfermedades hepáticas.

En el estado de la técnica, Hernández-Ávila *et al.* 2001, (12) revisan los distintos marcadores diagnósticos y mecanismos neuroquímicos de la encefalopatía secundaria a la insuficiencia hepática. El documento indica como la génesis de la encefalopatía hepática (EH) es multifactorial, y que es el resultado de la incapacidad del hígado para eliminar del plasma las sustancias con propiedades neuromoduladoras. Concretamente, en el apartado dedicado a la hipótesis del amonio, el documento señala cómo es conocido que un aumento en los niveles de amonio en sangre tiene como consecuencia una mayor captación del mismo por parte del cerebro generando el efecto neurotóxico.

Marco Sezolo *et al.* 2004, (13) diagnostican la EHM por medio de pruebas neuropsicológicas y neurofisiológicas en pacientes con cirrosis hepática y comparan los distintos métodos de diagnóstico (PSE, presión parcial de NH<sub>3</sub> [pNH<sub>3</sub>] y pruebas neurofisiológicas) para evaluar su eficiencia frente al diagnóstico de encefalopatías hepáticas.

Keiding *et al.* 2006, (14) estudian mediante la tomografía por emisión de positrones (TEP) el metabolismo del amonio (<sup>15</sup>N-Ammonia) cerebral en pacientes con cirrosis y encefalopatía hepática (EH) aguda, en pacientes con cirrosis sin encefalopatía hepática y en pacientes sanos. De los estudios realizados se concluye que los pacientes con cirrosis y encefalopatía hepática aguda muestran un aumento en la captación de amonio por parte del cerebro debido principalmente a un aumento de los niveles de amoniaco en sangre y no tanto a un cambio en la cinética cerebral del amoniaco.

Suarez *et al.* 2006, (15) intentan determinar si las alteraciones en la astrogliá y las neuronas está mediada por el óxido nítrico (NO) en modelos experimentales de HE (provocado por una anastomosis porta-cava [PCA]). Concretamente, se estudió la expresión de las NO sintasas (nNOS e iNOS) y la nitrosilación de proteínas en tirosina en el cuerpo estriado de ratas expuestas a PCA durante 1 y 6 meses. Y los resultados de la investigación muestran como en el modelo animal de encefalopatía hepática los niveles de iNOS y la nitrosilación de proteínas en tirosina se ven aumentados en los astrocitos a medida que la exposición a PCA aumenta.

Görg *et al.* 2006, (16) estudian los efectos de las citoquinas inflamatorias sobre la nitración de la tirosina en astrocitos cultivados de rata y en cerebros de ratas vivas y concluye que puede ser importante para estos y para la patogénesis de EH y otras enfermedades que impliquen la exposición del cerebro a las citoquinas.

Rabbani, N. y Thornalley, P.J. 2008, (17) describen un ensayo para determinar la 3-NT libre en tejidos y fluidos biológicos por medio de cromatografía líquida conjuntamente con la detección por espectrometría de masas. Se com-

paran los resultados obtenidos de 3-NT en pacientes con diabetes, cirrosis, fallo renal crónico y agudo, y enfermedades neurológicas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, obtenidos por su método y otras mediciones independientes.

5 Y más recientemente, Bragagnolo Jr M A *et al.* 2009 (18) expone que la EHM consiste en un conjunto de alteraciones neuropsiquiátricas en individuos con insuficiencia hepática y/o hipertensión portal. Su fisiopatología es compleja y muy posiblemente multifactorial, aunque los niveles de amonio parecen ser los que mejor explican las alteraciones neuropatológicas y clínicas observadas. De la lectura del documento se concluye que la concentración arterial de amonio no juega un papel importante en el diagnóstico de la EHM.

10 En la actualidad el diagnóstico de la EHM sólo puede ser establecido mediante pruebas neuropsicológicas y neurofisiológicas (electroencefalograma). El diagnóstico temprano de la EHM puede tener implicaciones de pronóstico y terapéuticas en pacientes cirróticos. Por lo tanto sería muy conveniente y útil en la práctica clínica disponer de un biomarcador periférico, que pudiera ser medido *ex-vivo* en sangre de los pacientes y que refleje la presencia de EHM en pacientes con enfermedades hepáticas, tales como la cirrosis hepática.

15

### Objeto de la invención

20 La presente invención se refiere a un método de diagnóstico realizado *ex-vivo* en pacientes con cirrosis que permite, a través de la detección de un biomarcador concreto como es la 3-NT, determinar la presencia de EHM, contribuyendo de esta forma a su tratamiento precoz y mejorando la calidad de vida de estos pacientes.

25 Actualmente el procedimiento de referencia para la detección de la EHM es una batería de 5 pruebas psicométricas denominada en inglés "Psychometric hepatic encephalopathy score" (PHES) (2). Sin embargo, este procedimiento no se utiliza rutinariamente en la práctica clínica porque consume tiempo y requiere ajustes en función de la edad y el nivel educativo de los individuos.

30 Los autores de la presente solicitud han demostrado que la presencia de EHM se correlaciona con un aumento de la activación de la guanilato ciclasa soluble por óxido nítrico en linfocitos (3) y que los niveles de las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-18 en suero también se correlacionan con la EHM (4). Sin embargo, estos parámetros no se están utilizando en el diagnóstico de la EHM. Por ese motivo, han continuado buscando otros biomarcadores en suero que pudieran detectar la EHM con un mejor valor predictivo.

35 Estudios en modelos animales de EH han mostrado que algunos factores que contribuyen al deterioro cognitivo son las alteraciones en el óxido nítrico y GMP cíclico en cerebro (19, 20) y la neuroinflamación (21).

### Descripción detallada de la invención

40 El procedimiento *ex-vivo* para el diagnóstico temprano de la encefalopatía hepática mínima (EHM) en pacientes con cirrosis hepática, según la presente invención, comprende las siguientes etapas:

- a) obtención de suero ó plasma obtenido de la sangre de los pacientes y de los controles, y
- 45 b) determinación de si la medida de la concentración de 3-nitrotirosina obtenida en (a) es superior o no a un nivel determinado.

50 Para ello, se ha analizado en el suero de 43 sujetos control sin enfermedad hepática; 44 pacientes cirróticos sin EHM y 47 pacientes con EHM una serie de parámetros, incluyendo los niveles de GMP cíclico, nitritos/nitrosos (metabolitos estables del óxido nítrico), y 3-NT (que se forma a partir de peroxinitrito, un metabolito más tóxico que el óxido nítrico). Como el fallo hepático altera el metabolismo de aminoácidos, también se han determinado los niveles de algunos aminoácidos. Se ha analizado si alguno de los parámetros determinados es útil para diagnosticar la presencia de EHM. Para cada parámetro se ha analizado la sensibilidad, especificidad y los valores predictivos positivo y negativo como indicador de la presencia de EHM evaluada mediante la batería de pruebas psicométricas PHES.

### Sujetos y Métodos

#### 60 *Pacientes y controles*

Se han considerado "pacientes" a los sujetos diagnosticados de cirrosis hepática tras un estudio histológico y "controles" a los sujetos en los que se ha descartado la presencia de enfermedad hepática. Se ha realizado un estudio con pacientes y con sujetos control, es decir, se ha realizado un estudio con pacientes diagnosticados de cirrosis hepática tras un estudio histológico y con sujetos control en los que se ha descartado la presencia de enfermedad hepática. Ninguno de los pacientes estaba en tratamiento con antibióticos ni había sufrido anteriormente peritonitis bacteriana ni TIPS ("transjugular intrahepatic portosystemic shunt").

## ES 2 372 842 A1

Tras un examen físico se les tomó sangre para la determinación de los parámetros bioquímicos rutinarios y para las determinaciones descritas más adelante. El protocolo del estudio se ajusta a las normas éticas de la Declaración de Helsinki de 1975 (22) y fue aprobado por los Comités Ético y Científico del Hospital.

5 Tras realizar la batería de pruebas psicométricas, los pacientes se clasificaron en pacientes sin y con EHM (ver mas adelante). Por tanto el estudio incluye tres grupos: 1) sujetos control; 2) pacientes sin EHM; y 3) pacientes con EHM.

La composición de los grupos, edad y etiología de la enfermedad hepática se indican en la Tabla 1.

10 Se tomó suero, para determinar las sustancias seleccionadas (ver mas adelante), de 43 controles, 44 pacientes sin EHM y 47 pacientes con EHM. El número de muestras analizadas para cada compuesto se da en la Tabla 2.

15 *Detección de la presencia de EHM utilizando la batería de pruebas psicométricas PHES.* La presencia de EHM se determinó utilizando la batería PHES, recomendada como procedimiento de referencia para la detección de EHM (2, 16, 17). La puntuación se calculó ajustándola en función de la edad y el nivel educativo utilizando las Tablas de normalidad para la población española, disponibles en [www.redeh.org](http://www.redeh.org).

Se consideró que tenían EHM aquellos pacientes con una puntuación de -4 ó inferior (23, 24).

20 *Obtención de suero.* Se tomaron 5 ml de sangre en tubos BD Vacutainer y se centrifugaron a 500 g, 10 min. Se recogió el sobrenadante y se guardó a -80°C en alícuotas de 500 µl.

25 *Activación de la guanilato ciclasa soluble por el agente generados de óxido nítrico S-nitroso-N-acetil penicilamina (SNAP) en linfocitos intactos.* Los linfocitos se prepararon como describen Kimura *et al* (25) y la activación de la guanilato ciclasa se analizó como se describe en (26). El GMP cíclico (GMPC) se determinó utilizando el BIOTRAK cGMP kit de inmunoensayo enzimático de Amersham (GE Healthcare, Life Sciences, UK).

30 *Determinación de aminoácidos y de 3-nitrotirosina en suero.* 100 µL de una mezcla de metanol/cloroformo (1:2) fría se mezclaron con 50 µL de suero y se centrifugaron a 4°C, 10 minutos. Se recogieron los sobrenadantes y se congelaron a -80°C.

Las concentraciones de aminoácidos y de 3-nitrotirosina se midieron en 50 µl de sobrenadante por HPLC utilizando un sistema de HPLC en fase reversa con derivatización pre-columna con *o*-ftalaldehído y detección por fluorescencia como se describe en (27).

35 *Análisis estadístico.* Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA), seguidos de *post-hoc* Newman-Keuls-test, utilizando el software GraphPad PRISM Versión 3.0. El nivel de probabilidad aceptado como significativo es  $p < 0.05$ .

40 El límite superior de normalidad de cada variable se calculó de acuerdo con el criterio habitual, considerando la media  $\pm$  2 veces la desviación estándar de los valores de los controles. Este valor se consideró como el punto de corte en los análisis de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo de los diferentes parámetros. Para estos cálculos, los datos se procesaron con el software SPSS versión 17.0 (SPSS Inc, Chicago, USA).

### 45 **Resultados**

Como ya se sabía, los pacientes presentaron un patrón alterado de aminoácidos en sangre (Tabla 2), con un aumento significativo de los aminoácidos aromáticos tirosina y fenilalanina, un aumento notable (mas de 2 veces) de metionina, homocisteína y homoserina, y ligeros aumentos de asparagina, citrulina, isoleucina y alanina.

Los niveles de los aminoácidos ramificados leucina y valina y de glutamato están significativamente disminuidos (Tabla 2).

55 Cuando se comparan los niveles de aminoácidos en pacientes sin y con EHM, se observan ligeras diferencias en glutamina, homocisteína e isoleucina. Las diferencias son mas notables para citrulina y, especialmente, para metionina.

60 La citrulina aumenta en pacientes cirróticos sin EHM al 161 $\pm$ 17% de los sujetos control, alcanzando 29 $\pm$ 3 µM (Tabla 2). En pacientes con EHM, la citrulina está significativamente aumentada ( $p=0.002$ ) comparada con pacientes sin EHM, alcanzando 50 $\pm$ 5 µM (172 $\pm$ 17% de los pacientes sin EHM y 278 $\pm$ 28% de los controles). La metionina aumenta en pacientes sin EHM al 232 $\pm$ 19% de los controles, alcanzando 44 $\pm$ 3 µM (Tabla 2). En pacientes con EHM, la metionina está significativamente aumentada ( $p<0.0002$ ) comparada con pacientes sin EHM, alcanzando 73 $\pm$ 7µM (166 $\pm$ 16% de los pacientes sin EHM y 384 $\pm$ 36% de los controles).

65 Es especialmente notable el aumento en 3-nitrotirosina. La concentración en suero de este derivado de tirosina es muy bajo en sujetos control (3.3 $\pm$ 2.2 nM), aumenta significativamente ( $p<0.01$ ) en pacientes sin EHM a 6.0 $\pm$ 4.2 nM y está muy aumentado en pacientes con EHM, alcanzando 48 $\pm$ 24 nM. Esto representa un aumento de 8 veces respecto a los pacientes sin EHM y de 15 veces respecto a los controles (Tabla 2).

Se determinaron también, en los mismos individuos, parámetros relacionados con la homeostasis del GMPc. Los niveles se dan en la Tabla 3.

#### 5 *Análisis de la utilidad diagnóstica de los parámetros determinados*

Se ha analizado la utilidad diagnóstica de cada uno de los parámetros determinados para discriminar que pacientes tienen EHM y cuales no. Se han utilizado los resultados de la batería de pruebas psicométricas PHES como criterio para definir qué pacientes tienen EHM y cuales no. Se consideró que tienen EHM los pacientes que obtienen un resultado igual o inferior a -4.

Se determinaron los siguientes parámetros:

15 *Sensibilidad*: la proporción de pacientes con EHM que se identifican correctamente como tales.

*Especificidad*. La proporción de pacientes sin EHM que se identifican correctamente.

20 *Valor predictivo positivo*: la proporción de pacientes con resultado positivo en la prueba que se diagnostican correctamente.

*Valor predictivo negativo*: la proporción de pacientes con resultado negativo en la prueba que se diagnostican correctamente.

25 Los valores de dichos parámetros se dan para cada sustancia analizada en la Tabla 4.

Los resultados muestran que la 3-nitrotirosina es un buen indicador de la presencia de EHM en los pacientes, con buena sensibilidad (82%) y especificidad (71%) y valores predictivos positivos y negativos del 75 y 79%, respectivamente (Tabla 4).

30 La metionina también tiene buena sensibilidad (82%), pero menor especificidad (56%) y valores predictivos positivos y negativos del 65 y 75%, respectivamente (Tabla 4).

35 Cuando realizamos los análisis combinando dos sustancias, la especificidad y el valor predictivo positivo aumentan, pero la sensibilidad disminuye (Tabla 4).

#### **Discusión**

40 La 3-NT se forma a partir de peroxinitrito, un metabolito del óxido nítrico. Es bien conocido que el óxido nítrico está aumentado en sangre de pacientes con cirrosis hepática. Sin embargo, este aumento es similar en los pacientes con EHM y sin EHM (3, 4). Esto mismo se confirma en el presente estudio. Los niveles de nitritos+nitratos, metabolitos estables del óxido nítrico, no son estadísticamente diferentes en pacientes con y sin EHM (Tabla 3).

45 Por tanto resulta imposible predecir, a partir de los datos en la literatura, que la 3-nitrotirosina (o cualquier otro metabolito del óxido nítrico) podría ser un buen indicador de la presencia de EHM.

Se ha encontrado que los niveles de 3-NT están aumentados de modo significativo en sangre de los pacientes cirróticos con EHM comparados con los niveles de los pacientes sin EHM y que los niveles de 3-NT en suero tienen valor predictivo de la presencia de EHM en los pacientes (Tabla 4).

50 Los mecanismos que conducen a esta alteración en los niveles de 3-NT en pacientes con EHM no se conocen por el momento.

55 Hasta el momento no se ha descrito ningún biomarcador, medible *ex-vivo* en muestras de sangre, de la presencia de EHM. Esta se detecta únicamente mediante pruebas psicométricas o neurofisiológicas.

60 Aunque nuestro grupo ha encontrado correlaciones entre la activación de la guanilato ciclasa soluble por óxido nítrico (3) y los niveles de IL-6 e IL-18 (4) con el grado de EHM, estos parámetros no se utilizan para el diagnóstico de la EHM por no tener valores predictivos, de sensibilidad y especificidad adecuados. Los datos de la presente solicitud muestran que la 3-NT tiene un mayor valor predictivo para el diagnóstico de la presencia de EHM (Tabla 4).

Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede diagnosticar *ex-vivo* el diagnóstico temprano de la encefalopatía hepática mínima mediante la determinación de 3-nitrotirosina en suero.

65 Para la obtención del suero de los pacientes y controles se puede seguir el mismo protocolo que se ha seguido en la presente solicitud, y una vez obtenido el suero a partir de la sangre de los mismos, determinar la concentración de 3-nitrotirosina.

## ES 2 372 842 A1

En el ejemplo, para determinar la 3-NT se ha utilizado la técnica de cromatografía líquida en fase reversa (HPLC) para separarla, y se ha detectado posteriormente por fluorescencia como se incida arriba. Igualmente se podría detectar con un detector electroquímico después de su separación por HPLC, ó mediante otros procedimientos, como por ejemplo identificando la 3-NT por cromatografía de gases y espectrometría de masas, o incluso por medio un ensayo de ELISA utilizando anticuerpos específicos contra 3-nitrotirosina. Utilizando anticuerpos específicos contra la 3-NT, esta se puede determinar mediante dot-blot.

Aquellos pacientes cuyo nivel de 3-nitrotirosina sea superior a la media de los sujetos controles más dos desviaciones estándares serán considerados como pacientes con EHM.

En el estudio realizado los niveles de 3-nitrotirosina en suero de sujetos control alcanzaron una media de 3.3 nM con una desviación estándar de 2.2 nM. Por esta razón, el punto de corte para diagnosticar la presencia de EHM sería 7.7 nM. Aquellos pacientes con concentración de 3-nitrotirosina mayor de 7.7 nM se considerarían como pacientes con EHM y aquellos con 7.7 nM o menor, sin EHM.

Este punto de corte podría modificarse ligeramente al aumentar el número de individuos estudiados, si se modificara la media y/o la desviación estándar de los valores de los controles.

TABLA 1

*Etiología de la enfermedad hepática y datos analíticos*

	Rango Normal	Controles	Pacientes sin EHM	Pacientes con EHM
Nº Total individuos		43	44	47
Edad		51 ± 16	54 ± 10	63 ± 10
Alcohol		----	44	47
Ascitis		----	6	10
Child Pugh A/B/C		----	36/ 8/ 0	33/ 14/ 0
MELD		----	8.4 ± 3.0	9.3 ± 2.5
GOT (mU/ml)	(1 - 37)	20 ± 4	73 ± 56 <sup>c</sup>	83 ± 58 <sup>c</sup>
GPT (mU/ml)	(1 - 41)	18 ± 6	77 ± 24 <sup>c</sup>	90 ± 24 <sup>c</sup>
GGT (mU/ml)	(10 - 49)	27 ± 5	87 ± 60 <sup>c</sup>	106 ± 64 <sup>c</sup>
Ácido urico (mg/dl)	(2.5 - 7)	4.0 ± 1.0	6.2 ± 2.0	5.7 ± 2.3
Creatinina (mg/dl)	(0.5 - 1.3)	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.2
Colesterol (mg/dl)	(140 - 200)	172 ± 22	175 ± 44	167 ± 55
Trigliceridos (mg/dl)	(40 - 160)	95 ± 32	111 ± 64	119 ± 64
Bilirubina (mg/dl)	(0.1 - 1)	0.6 ± 0.2	1.7 ± 0.7 <sup>c</sup>	2.3 ± 0.6 <sup>c</sup>
Albumina (g/dl)	(3.5 - 5)	4.4 ± 0.2	3.7 ± 0.6 <sup>c</sup>	2.9 ± 0.6 <sup>c§</sup>
Protrombina time (sec)		13 ± 1.3	24 ± 4 <sup>c</sup>	30 ± 4 <sup>c</sup>
Fibrinogeno (g/l)	(2 - 4)	3.1 ± 1.0	3.3 ± 1.3	3.6 ± 1.2
Alc. fosfatasa (mU/ml)	(50 - 250)	147 ± 53	216 ± 77 <sup>b</sup>	314 ± 96 <sup>c§</sup>
Eritrocitos	(4.2 - 6.1)	4.6 ± 0.4	4.3 ± 0.7	3.4 ± 0.6
Leucocitos	(4.8 - 10.8)	6.5 ± 1.3	6.0 ± 2.6	5.5 ± 2.0
Neutrofilos (%)	(55 - 75)	55 ± 7	54 ± 6	59 ± 9
Linfocitos (%)	(17 - 45)	35 ± 6	29 ± 10	27 ± 9
Monocitos (%)	(2 - 8)	6.0 ± 1.3	8.4 ± 3.0 <sup>b</sup>	10 ± 2.6 <sup>c</sup>
Eosinofilos (%)	(1 - 4)	3.3 ± 2.0	2.4 ± 1.2	1.7 ± 1.0
Basofilos (%)	(0.05 - 0.5)	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.1

Los valores se dan como media ± SD. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con superíndices: <sup>a</sup>p < =.05; <sup>b</sup>p < 0.01; <sup>c</sup>p < 0.001. Los valores significativamente diferentes en pacientes sin y con EHM se indican como §, p < 0.05.

TABLA 2

*Concentraciones de aminoácidos en suero*

COMPUESTO	Controles	Pacientes sin EHM p vs. Control	Pacientes con EHM P vs. control	Pacientes con EHM P vs. sin EHM
<b>3-Nitrotirosina (nM)</b>	<b>3.3 ± 0.35</b> (n=41)	<b>6.0 ± 0.7**</b> (n=42)	<b>48 ± 6***</b> (n=43)	<b>p&lt;0.0001</b>
<b>Tirosina (µM)</b>	65 ± 6 (n=42)	96 ± 6** (n=43)	104 ± 8** (n=29)	NS
<b>Fenilalanina (µM)</b>	50 ± 4 (n=43)	103 ± 8*** (n=43)	91 ± 7*** (n=43)	NS
<b>Glutamato (µM)</b>	79 ± 7 (n=43)	60 ± 5* (n=40)	48 ± 4** (n=42)	NS
<b>Glutamina (µM)</b>	406 ± 28 (n=41)	409 ± 33 (n=43)	516 ± 35* (n=43)	p= 0.027
<b>Aspartato (µM)</b>	4.4 ± 0.5 (n=43)	3.6 ± 0.4 (n=43)	4.7 ± 0.6 (n=43)	NS
<b>Asparagina (µM)</b>	36 ± 3 (n=43)	54 ± 5** (n=43)	66 ± 6*** (n=43)	NS
<b>Citrulina (µM)</b>	<b>18 ± 2</b> (n=41)	<b>29 ± 3*</b> (n=43)	<b>50 ± 5***</b> (n=43)	<b>p= 0.002</b>
<b>Alanina (µM)</b>	238 ± 20 (n=41)	336 ± 44* (n=43)	269 ± 26 (n=43)	NS
<b>Leucina (µM)</b>	72 ± 4 (n=43)	51 ± 4*** (n=43)	48 ± 4*** (n=43)	NS
<b>Isoleucina (µM)</b>	37 ± 4 (n=43)	49 ± 4* (n=43)	30 ± 3 (n=43)	p=0.002
<b>Valina (µM)</b>	76 ± 5 (n=41)	53 ± 3*** (n=43)	46 ± 4*** (n=43)	NS
<b>Metionina (µM)</b>	<b>19 ± 2</b> (n=43)	<b>44 ± 3***</b> (n=43)	<b>73 ± 7***</b> (n=43)	<b>p&lt;0.0002</b>
<b>Homocisteina (µM)</b>	4.6 ± 0.5 (n=33)	13 ± 2*** (n=43)	19 ± 2*** (n=42)	p= 0.017
<b>Homoserina (nM)</b>	2.3 ± 0.3 (n=43)	4.6 ± 0.8** (n=43)	4.2 ± 0.5** (n=43)	NS

Los valores se dan como media ± SEM. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos: \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.

ES 2 372 842 A1

TABLA 3

Valores de diferentes parámetros en controles y pacientes sin o con EHM

PARAMETRO	Controles	Pacientes sin EHM	Pacientes con EHM	Pacientes con EHM
		p vs. Control	P vs. control	P vs. sin EHM
<b>GMPc basal en linfocitos (pmol/mg prot)</b>	0.23 ±0.03 (n=43)	0.12 ±0.01** (n=44)	0.06 ±0.01*** (n=44)	p<0.001
<b>Activación de la guanilato ciclasa por óxido nítrico en linfocitos (veces)</b>	14±1 (n=43)	24±2*** (n=44)	33±3*** (n=44)	p=0.05
<b>GMPc em plasma cGMP (nM)</b>	5.9±0.9 (n=43)	15±2*** (n=44)	21±2*** (n=44)	p=0.05
<b>Nitratos + Nitritos (µM)</b>	19±4 (n=43)	25±5* (n=36)	31±7** (n=34)	NS

Los valores se dan como media ± SD. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos: \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.



TABLA 4

*Sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo de diferentes compuestos o combinaciones, para la detección de la EHM*

PARAMETRO	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)	VALOR PREDICTIVO POSITIVO (%)	VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (%)
3-Nitrotirosina	82	71	75	79
Metionina	82	56	65	75
Citrulina	59	72	68	63
Activación de la guanilato ciclasa	46	66	56	56
3-Nitrotirosina + Metionina	68	88	86	72
3-Nitrotirosina + Citrulina	45	88	80	61
Citrulina+ Metionina	48	91	84	63
3-Nitrotirosina + Metionina+ Citrulina	38	98	94	60

### Referencias

1. **Amodio P, Montagnese S, Gatta A, et al.** Characteristics of minimal hepatic 3 encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 2004; 19:253-267.
2. **Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, et al.** Hepatic encephalopathy. Definition, Nomenclature, Diagnosis and Quantification: Final report of the working party at the 11 Word Congress of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 2002; 35: 716-721.
3. **Montoliu, C., Piedrafita, B., Serra, M.A., del Olmo, J.A., Ferrandez, A., Rodrigo, J.M. and Felipo, V., (2007)** Activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in lymphocytes correlates with minimal hepatic encephalopathy in cirrhotic patients. *J Mol Med.* 85(3):233-241
4. **Montoliu, C., Piedrafita, B., Serra, M.A., del Olmo, JA, Urios, A., Rodrigo, J.M. and Felipo, V. (2009)** IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *J Clin Gastroenterol* 43 (3): 272-279
5. **Romero-Gómez M, Boza F, García Valdecasas MS, et al.** Subclinical hepatic encephalopathy predicts the development of overt hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:2718-2723.
6. **Das A, Dhiman RK, Saraswat VA, et al.** Prevalence and natural history of subclinical hepatic encephalopathy in cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16:531-535.
7. **Groeneweg M, Quero JC, De Bruijn I, et al.** Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology* 1998; 28:45-49.
8. **Wein C, Koch H, Popp B, et al.** Minimal hepatic encephalopathy impairs fitness to drive. *Hepatology* 2004; 39:739-745.
9. **Bajaj JS, Saeian K, Schubert CM, et al** Minimal hepatic encephalopathy is associated with motor vehicle crashes: the reality beyond the driving test. *Hepatology.* 2009; 50(4) :1175-1183.

10. **Romero-Gómez M, Boza F, García Valdecasas MS, et al.** Subclinical hepatic encephalopathy predicts the development of overt hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:2718-2723.
11. **Romero-Gómez M, Grande L, Camacho I.** Prognostic value of altered oral glutamine challenge in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 2004; 39(4):939-943.
12. **Hernández-Ávila, Carlos A. y Ortega-Soto, Héctor A.** “Marcadores diagnósticos y mecanismos neuroquímicos de la encefalopatía secundaria a la insuficiencia hepática”. *Salud mental*, 2001 vol. 24, NS1, p.48-59.
13. **Marco Senzolo et al.** “Minimal hepatic encephalopathy diagnosed by neuropsychological and neurophysiological tools in patients with liver cirrhosis”. Digestive Disease Week/105th Annual Meeting of the American-Gastroenterological-association, USA, May 16-20, 2004. Pub: *Gastroenterology*, Apr 2004, Nr.4, Suppl. 2, vol. 126, p.A729. ISSN 0016-5085.
14. **Keiding, Susanne et al.** “Brain Metabolism of 13N-Ammonia During Acute Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis Measured by Positron Emission Tomography”. *Hepatology*, Jan. 2006, vol.43, p.42-50.
15. **Suarez, I. et al.** “Induction of NOS and nitrotyrosine expression in the rat striatum following experimental hepatic encephalopathy”. *Metab Brain Dis*. 2009, Sep. 24(3):395-408.
16. **Boris Görg et al.** “Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes”. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2006. Vol.449, p.104-114. ISSN 0003-9861. Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) 9 March 2006.
17. **Rabbani, Naila and Thornalley, Paul J.** “Assay of 3-Nitrotyrosine in Tissues and Body Fluids by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometric Detection”. *Methods in enzymology*. Vol.440, 2008 Elsevier Inc. p. 337-359. ISSN 0076-6879.
18. **Mauricio Augusto Bragagnolo Jr. et al.** “Minimal hepatic encephalopathy detection by neuropsychological and neurophysiological methods and the role of ammonia for its diagnosis”. *Arquivos de Gastroenterologia*, vol. 46, Jan/march 2009, p.43-49.
19. **Erceg, S., Monfort, P., Hernández-Viadel, M., Rodrigo, R., Montoliu, C. and Felipo, V.** Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunt. *Hepatology*. 2005; 45, 2-10
20. **Erceg, S., Monfort, P., Hernández-Viadel, M., Llansola, M., Montoliu, C., and Felipo, V.** Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain Res*. 2005; 1036, 115-121
21. **Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Boix, J. and Felipo, V.** Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with porto-caval shunts. *Hepatology* 2007; 46, 514-519.
22. World Medical Organization. Declaration of Helsinki. *BMJ* 1996; 313:1448-1449.
23. **Weissenborn K, Ennen JC, Schomerus H, Rückert N, Hecker H.** Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2001; 34:768-773.
24. **Schomerus H, Weissenborn K, Hamster W, Rückert N, Hecker H** PSE syndrome test manual. SwetsTest Services, Frankfurt, 1999.
25. **Kimura M.** Metallothioneins of monocytes and lymphocytes. *Methods Enzymol* 1989; 205:291-302.
26. **Corbalán, R., Miñana, MD, Del Olmo, JA, Serra, MA, Rodrigo JM and Felipo, V.** Altered modulation of soluble guanylate cyclase in lymphocytes from patients with liverdisease *J. Mol Med* 2002; 80:117-123
27. **Hubbard WC, Bickel C, Schleimer RP.** Simultaneous quantitation of endogenous levels of cortisone and cortisol in human nasal and bronchoalveolar lavage fluids and plasma via gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Anal Biochem*. 1994; 221 (1):109-17.

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento *ex-vivo* para el diagnóstico temprano de la encefalopatía hepática mínima (EHM) en pacientes con enfermedades hepáticas, incluida la cirrosis, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

a) Obtención de suero ó plasma obtenido de la sangre de los pacientes y de los controles, y

10 b) Determinación de si la medida de la concentración de 3-nitrotirosina obtenida en (a) es superior o no a un nivel determinado.

15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque los pacientes que poseen una concentración de 3-nitrotirosina igual o superior al valor de la concentración de 3-nitrotirosina de los sujetos control más 2 veces el valor de la desviación estándar se consideran como pacientes con EHM.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque los pacientes que poseen una concentración de 3-nitrotirosina Inferior al valor de la concentración de 3-nitrotirosina de los sujetos control más el doble del valor de la desviación estándar se consideran como pacientes sin EHM.

20 4. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque la 3-nitrotirosina se determina por cromatografía líquida en fase reversa HPLC y se detecta por fluorescencia.

25 5. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque los pacientes con concentración de 3-nitrotirosina igual o superior a 7.7 nM se consideran como pacientes con EHM.

6. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque los pacientes con concentración de 3-nitrotirosina Inferior a 7.7 nM se consideran como pacientes sin EHM.

30 7. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque la 3-nitrotirosina se determina por cromatografía líquida en fase reversa HPLC y se detecta con un detector electroquímico.

8. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque la 3-nitrotirosina se determina por cromatografía de gases y espectrometría de masas.

35 9. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque la 3-nitrotirosina se determina por medio de un ensayo ELISA.

40 10. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque la 3-nitrotirosina se determina mediante dot-blot utilizando anticuerpos específicos contra la 3-nitrotirosina.

45 11. Utilización de la 3-nitrotirosina según las reivindicaciones 1-10 como marcador de diagnóstico específico para la determinación de la presencia de EHM en pacientes con cirrosis hepática.



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201000899

②② Fecha de presentación de la solicitud: 12.07.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/48** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SUAREZ, I., BODEGA, G., RUBIO, M. et al. Induction of NOS and nitrotyrosine expression in the rat striatum following experimental hepatic encephalopathy. <i>Metabolic brain disease</i> . 18 de Septiembre 2009. Vol 24.Nº 3. Páginas 395-408. ISSN 1573-7365.	1-11
A	MARTIN, D., BALESSTRASSE, K., COLL, C, et al. Oxidative stress and hippocampus in a low-grade hepatic encephalopathy model: protective effects of curcumine. <i>Hepatology research: the official journal of the Japan Society of Hepatology</i> . 2008. Vol 38, nº 11. Páginas 1148-1153. ISSN 1386-6346.	1-11
A	GÖRG, B., BIDMON, H.J., KEITEL, V. et al. Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes. <i>Archives of biochemistry and biophysics</i> . 9 de Marzo 2006. Vol 449. Nº 1-2. Páginas 104-114. ISSN 0003-9861.	1-11
A	ODEH, M, SABO, E. SRUGO, I. et al. Serum levels of tumor necrosis factor-α correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. <i>Liver international</i> . Abril 2004. Vol 24, Nº 2. Páginas 110-116. ISSN 1478-3223.	1-11
A	MONTOLIU, C., PIEDRAFITA, B., SERRA, M.A. et al. IL-6 and IL-18 in Blood May Discriminate Cirrhotic Patients With and Without Minimal Hepatic Encephalopathy. <i>Journal of Clinical Gastroenterology</i> . Marzo 2009. Vol 43, Nº 3. Páginas 272-279. ISSN 1539-2031.	1-11
A	BEMEUR C., DESJARDINS, P., BUTTERWORTH, F. Evidence for oxidative/nitrosative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. <i>Metabolic brain disease</i> . Marzo 2010. Vol 25, Nº 1, páginas 3-9. ISSN 1573-7365.	1-11
A	CALABRESE, V., SULTANA, R. SCAPAGNINI, G. et al. Nitrosative Stress, Cellular Stress Response, and Thiol Homeostasis in Patients with Alzheimer's Disease. <i>Antioxidants and Redox Signaling</i> . Noviembre 2006. Vol 8, Nº 11-12. Páginas 1975-1986. ISSN 1523-0864.	1-11
A	RABBANNI, N. y THORNALLEY, P. Assay of 3-Nitrotirosin in Tissues and Body Fluids by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometric Detection. <i>Methods in enzymology</i> . 2008. Vol 440. Páginas 337-359. ISSN 0076-6879.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
10.05.2011

Examinador  
A. Barrios de la Fuente

Página  
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, MEDLINE, BIOSIS, EMBL, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.05.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-11	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-11	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SUAREZ, I., BODEGA, G., RUBIO, M. et al. Induction of NOS and nitrotyrosine expression in the rat striatum following experimental hepatic encephalopathy. <i>Metabolic brain disease</i> . 18 de Septiembre 2009. Vol 24. Nº 3. Páginas 395-408. ISSN 1573-7365.	18.09.2009
D02	MARTIN, D., BALESTRASSE, K., COLL, C, et al. Oxidative stress and hippocampus in a low-grade hepatic encephalopathy model: protective effects of curcumine. <i>Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology</i> . 2008. Vol 38, nº 11. Páginas 1148-1153. ISSN 1386-6346.	2008
D03	GÖRG, B., BIDMON, H.J., KEITEL, V. et al. Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes. <i>Archives of biochemistry and biophysics</i> . 9 de Marzo 2006. Vol 449. N1 1-2. Páginas 104-114. ISSN 0003-9861	09.03.2006
D04	ODEH, M, SABO, E. SRUGO, I. et al. Serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. <i>Liver international</i> . Abril 2004. Vol 24. Nº 2. Páginas 110-116. ISSN 1478-3223.	Abril-2004
D05	MONTOLIU, C., PIEDRAFITA, B., SERRA, M.A. et al. IL-6 and IL-18 in Blood May Discriminate Cirrhotic Patients With and Without Minimal Hepatic Encephalopathy. <i>Journal of Clinical Gastroenterology</i> . Marzo 2009. Vol 43, Nº 3. Páginas 272-279. ISSN 1539-2031.	Mar-2009
D06	BEMEUR C., DESJARDINS, P., BUTTERWORTH. F. Evidence for oxidative/nitrosative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. <i>Metabolic brain disease</i> . Marzo 2010. Vol 25, Nº 1, páginas 3-9. ISSN 1573-7365.	Mar-2010
D07	CALABRESE, V., SULTANA, R., SCAPAGNINI, G. et al. Nitrosative Stress, Cellular Stress Response, and Thiol Homeostasis in Patients with Alzheimer's Disease. <i>Antioxidants and Redox Signaling</i> . Noviembre 2006. Vol 8, Nº 11-12. Páginas 1975-1986. ISSN 1523-0864.	Nov-2006
D08	RABBANNI, N. y THORNALLEY, P. Assay of 3-Nitrotirosin in Tissues and Body Fluids by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometric Detection. <i>Methods in enzymology</i> . 2008. Vol 440. Páginas 337-359. ISSN 0076-6879.	2008

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud tiene por objeto un procedimiento ex-vivo para el diagnóstico de la encefalopatía hepática mínima (EHM) en pacientes con enfermedades hepáticas, en el que se obtiene una muestra de suero o plasma de pacientes y se determina si la concentración de 3-Nitrotirosina (3-NT) es superior o no a un nivel determinado. Es objeto también de la presente solicitud la utilización de la 3-NT como marcador diagnóstico para determinar la presencia de EHM en pacientes con cirrosis hepática.

El documento D01 divulga un estudio cuyo objetivo es averiguar si las alteraciones neuronales y de la astrogliosis descritas en la encefalopatía hepática (EH) están mediados por óxido nítrico. El estudio se lleva a cabo en el estriatum de ratas en las que se ha provocado una encefalopatía hepática experimental mediante una anastomosis portacava (PCA). Se estudia la expresión de la nitrotirosina y la inducción de las isoformas de la óxido nítrico sintasa neuronal e inducible (nNOS e iNOS) al mes y a los 6 meses de exposición a PCA, observándose que la expresión de 3-NT, iNOS e nNOS es tiempo dependiente y aumenta con el tiempo de exposición a PCA. Los resultados muestran un aumento significativo de la 3-NT a los 6 meses, así como un aumento en la expresión de nNOS e iNOS. Se concluye que el aumento en la expresión de nNOS e iNOS podría indicar un papel crítico del óxido nítrico en la EH.

El documento D02 divulga un estudio donde se evalúa si el estrés oxidativo está relacionado con las alteraciones morfológicas y funcionales del hipocampo en encefalopatía hepática mínima. Dicho estudio se lleva a cabo en un modelo experimental de EHM (Hipertensión portal prehepática-PPH) en ratas. Se analizan los niveles de enzimas antioxidantes en tres grupos; grupo I (control), grupo II (PPH) y grupo III (PPH tratado con un antioxidante, concretamente curcumina). Se analiza los niveles de las enzimas antioxidantes en los tres grupos y se observa una disminución de estas en el grupo II, mientras que el grupo III la actividad de estas enzimas es significativamente mayor que en el grupo II y comparable a la del grupo I. Se concluye que existe estrés oxidativo en el hipocampo y que este podría actuar como un factor patogénico del daño histopatológico en EHM.

El documento D03 divulga un estudio relativo al efecto de las citoquinas inflamatorias sobre la nitración de las proteínas en tirosina en astrocitos cultivados de ratas y en ratas vivas. Para llevar a cabo el estudio, se induce la inflamación en ratas mediante la administración de lipopolisacárido. Este estudio concluye que las citoquinas inflamatorias, concretamente TNF $\alpha$ , induce la nitración de proteínas en tirosina en astrocitos, y que este proceso es consecuencia de un aumento del calcio intracelular dependiente del receptor NMDA y de la producción de óxido nítrico por la nNOS. Este documento señala que este proceso podría ser relevante en la patogénesis de la EH.

El documento D04 tiene por objeto un estudio sobre la relación de los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  con la severidad de la encefalopatía hepática. Se comparan los niveles de TNF- $\alpha$  en pacientes con fallo hepático crónico sin EH con pacientes con fallo hepático crónico con signos clínicos de EH que se distribuyen a su vez en cuatro grupos en función de la severidad de la enfermedad. Se concluye que existe una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  y la severidad de la encefalopatía hepática.

El Documento D05 divulga un estudio que analiza la relación de la hiperamonemia, la inflamación y la EHM en pacientes con cirrosis hepática. En este estudio se analizan los niveles de varias citoquinas (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 y TNF- $\alpha$ ), de amonio y de óxido nítrico en sangre y se comparan los niveles detectados entre un grupo control, un grupo de pacientes cirróticos sin EHM y un tercer grupo de pacientes cirróticos con EHM. Se observa que los niveles de IL-6 y IL-18 se encuentran aumentados de manera significativa en pacientes cirróticos con EHM versus pacientes cirróticos sin EHM, mientras que no se observa un aumento significativo del resto de las citoquinas ni del óxido nítrico entre estos dos grupos. El estudio concluye que los niveles plasmáticos de IL-6 y IL-18 podrían ser útiles para distinguir pacientes con EHM de pacientes sin EHM.

El documento D06 hace una revisión de estudios recientes, de donde se concluye que existen evidencias del de estrés oxidativo en el cerebro de modelos experimentales de animales con encefalopatía hepática causada por fallo hepático agudo o crónico y se sugiere que el estrés oxidativo podría estar implicado en la cascada fisiopatológica responsable de la encefalopatía hepática.

El documento D07 divulga un estudio en el que se analiza el papel del estrés nitrosativo en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Se comparan los niveles de algunos marcadores de estrés oxidativo en pacientes con enfermedad de Alzheimer y controles, y se observa que existe un aumento significativo de nitrotirosina en sangre.

El documento D08 tiene por objeto un ensayo en el que se analizan los niveles en tejidos y en fluidos corporales de la 3-NT. Este ensayo se lleva a cabo mediante cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas.

#### **NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA. (Art 6.1 y 8.1 Ley 11/1986)**

Ninguno de los documentos citados anticipa un procedimiento para diagnosticar la EHM basado en la detección de la 3-NT en sangre. De la misma forma, ninguno de estos documentos anticipa el uso de la 3-NT en sangre como marcador de la encefalopatía hepática con signos clínicos.

D01, D02 y D03 se consideran los documentos del estado de la técnica más próximos al objeto de la presente solicitud. Las diferencias principales entre el objeto de la solicitud y los estudios divulgados en estos documentos, radican principalmente en que estos estudios tienen lugar a nivel cerebral y no a nivel sanguíneo, por lo que no se puede asegurar que los hallazgos encontrados sean directamente extrapolables a la sangre periférica. Además, los estudios divulgados en D01 y D03 no se llevan a cabo en pacientes con encefalopatía hepática mínima o subclínica, en D01 el estudio se lleva a cabo en un modelo experimental en ratas con EH y en D03 en ratas sin EH a las que se les induce inflamación.

Ninguno de los documentos citados en el estado de la técnica, solos o en combinación, evidencian un aumento significativo en sangre de la 3-NT en enfermos hepáticos con EHM, que hagan evidente su uso como marcador diagnóstico para distinguir entre enfermos hepáticos con y sin EHM. Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-11 es nuevo e implica actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/86.