

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 704**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09013088 .1**
96 Fecha de presentación: **30.03.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **2146209**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.01.2010**

54 Título: **Marcadores neurodegenerativos para la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:
06.04.2005 EP 05007558

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.03.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITY OF ANTWERP
UNIVERSITEITSPLEIN 1
2610 WILRIJK, BE;
UNIVERSITY OF MAASTRICHT;
KLINIK UND POLIKLINIK FÜR PSYCHIATRIE UND
PSYCHOTHERAPIE y
VERSTAPPEN, LEOPOLD**

72 Inventor/es:
**Myint, Aye Mu;
Schawaller, Manfred;
Schwarz, Markus J. y
Hampel, Harald**

74 Agente/Representante:
Aznárez Urbieta, Pablo

ES 2 377 704 T3

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

DESCRIPCIÓN

Marcadores neurodegenerativos para la enfermedad de alzheimer.

5 La presente invención se refiere a métodos para detectar la enfermedad de Alzheimer, los cuales comprenden la etapa de medir la concentración de 3-hidroxiquinurenina. Además, la presente invención se refiere a la utilización de dicho valor como marcador predictivo para la detección de la enfermedad de Alzheimer.

10 La depresión es un trastorno psiquiátrico mayor con una incidencia global del 12,3%, un 14,1% para las mujeres y un 8,6% para los hombres, en Europa (Copeland JR, Beekman AT, Dewey ME, Hooijer C, 1999, Depression in Europe. Geographical distribution among older people, Br. J. Psychiatry; 174:312-321). En la sociedad y entre los trabajadores existen casos de depresión no diagnosticada. En América, en cualquier momento, 1 de cada 20 empleados puede sufrir una depresión y, si no se trata, ésta conduce a una disminución de la productividad y a un aumento de bajas por enfermedad. Según la National Mental Health Association, los empleados americanos no trabajan durante tres millones de días al año debido a depresiones no tratadas, lo cual representa más días utilizados por los empleados en ello que para otras enfermedades físicas tales como diabetes, hipertensión sanguínea y artritis (Burns H, Charleston Regional Business Journal, abril, 2004).

15 Para resolver estos problemas de depresión no diagnosticada o subdiagnosticada en la sociedad, se encarga a enfermeras domiciliarias que realicen entrevistas utilizando un formato estructurado, tal como el test PRIME-MD o PDI-29, ambos con el objetivo de evaluar el estado psicológico de una persona. La sensibilidad al PRIME-MD es del 41,7% y la especificidad es del 83%, mientras que la prueba PDI-29, que se considera mejor, alcanza una sensibilidad del 73,6% y una especificidad del 59% (Preville M, Cote G, Boyer R, Hebert R (2004), Detection of depression and anxiety disorders by home care nurses, Aging Ment. Health; 8(5):400-409).

20 Existen diversas teorías al respecto del papel de los productos neuroquímicos en la depresión. Un grupo de productos neuroquímicos que reveló ser importante en la patofisiología de la depresión fue el de las monoaminas, propuesto a partir de los años 60 (Coppen A, 1969, Defects in monoamine metabolism and their possible importance in the pathogenesis of depressive syndrome, Psychiatr. Neural Neurochir; 72(2): 173-180). Además, se descubrió que el triptófano producía un efecto añadido a los inhibidores de la monoamina-oxidasa, los antidepressivos (Coppen A y Noguera R, 1970, L-tryptophan in depression, Lancet; 1(7656):1111). Unos años más tarde, se propuso el papel de la serotonina (5HT) en la patogénesis de trastornos afectivos (Coppen A y Wook K, 1982, 5-Hydroxytryptamine in the pathogenesis of effective disorders, Adv. Biochem. Psychopharmacol. 34:249-258).

30 La enfermedad de Alzheimer (AD) es el trastorno neurodegenerativo más frecuente del cerebro humano. Especialmente en etapas tempranas del AD, es importante pero difícil diferenciar entre la depresión acompañada de deterioro cognitivo subjetivo (denominada pseudodemencia o síndrome de demencia depresiva) y la AD (Tekin, S. y Cummings, J.L. (2001), Depression in dementia, Neurologist 7, 252-259). La prevalencia de la depresión oscila entre el 15 y el 50% en pacientes con AD (Rovner, B.W., Broadhead, J., Spencer, M., Carson, K., y Folstein, M.F. (1989), Depression and Alzheimer's disease, Am. J. Psychiatry 146, 350-353; Migliorelli, R., Teson, A., Sabe, L., Petracchi, M., Leiguarda, R., y Starkstein, S.E. (1995), Prevalence and correlates of dysthymia and major depression among patients with Alzheimer's disease, Am. J. Psychiatry 152, 37-44) y varios autores sugirieron que los síntomas depresivos forman parte de la fase preclínica del AD (Berger, A.K., Fratiglioni, L., Forsell, Y., Winblad, B., y Backman, L. (1999), The occurrence of depressive symptoms in the preclinical phase of AD: a population-based study, Neurology 53, 1998-2002; Visser, P.J., Verhey, F.R., Ponds, R.W., Kester, A., y Jolles, J. (2000), Distinction between preclinical Alzheimer's disease and depression, J. Am. Geriatr. Soc. 48, 479-484).

45 La serotonina es un neuroquímico necesario para el cerebro para conseguir un adecuado estado de ánimo y los factores de crecimiento cerebrales, y se sintetiza a partir del triptófano. El triptófano es un aminoácido procedente de los alimentos y del conjunto de aminoácidos del cuerpo. El triptófano está parcialmente degradado por una enzima, la indolamina-2,3-dioxigenasa, que está presente en los pulmones, glóbulos blancos, placenta y cerebro (Heyes MP, Satio K, Markey SP, 1992, Human macrophages convert L-tryptophan into the neuroxin quinolinic acid, Biochem. J.; 283(3):633-635; Mellor AL y Munn DH, 1999, Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation, Immunol. Today; 20(10): 469-473) y parcialmente degradado por la triptófano-dioxigenasa en el hígado. La vía catabólica del triptófano o la vía de la quinurenina a través de la indolamina-2,3-dioxigenasa existen ambas en la sangre y en el cerebro y un 60% de las quinureninas del cerebro proceden de la sangre periférica (Gal Em, Sherman AD, 1980, L-Kynurenine: synthesis and possible regulatory function in brain, Neurochem Res; 5(3): 223-239).

50 Cuando el triptófano es degradado a través de la vía de la quinurenina, el producto siguiente es quinurenina, que es el primer metabolito del triptófano (Bender DA, 1989, The kynurenine pathway of tryptophan metabolism: In TW Stone (ed.), Quinolinic Acid and kynurenines. Boca Raton FL: CRC Press: 3-38). Esta quinurenina se divide de nuevo en dos vías: (1) ácido quinurénico, neuroprotector y (2) 3-hidroxiquinurenina, neurodegenerativa (3-HK), ácido hidroxiantránilico y ácido quinolínico (Chiarugi A, Calvani M, Meli E, Traggiai E, Moroni F, 2001, Synthesis and release of neurotoxic kynurenine metabolites by human monocyte derived macrophages, J. Neuroimmunol; 120(1-2):190-198). Normalmente, la formación de ácido quinolínico es más rápida y el ácido quinurénico tiene un papel protector contractivo contra el ácido quinolínico (Perkins MN y Stone TW, 1982, An iontophoretic investigation of the action of convulsant kynurenines

and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid, *Brain Res.*; 247(1):184-187). En base a estas evidencias, se propuso la hipótesis de que el desequilibrio en las vías neuroprotectoras neurodegenerativas llevan a una persona a un estado de depresión crónica (Myint AM y Kim YK, 2003, Cytokine-serotonin interaction throughIDO: a neurodegeneration hypothesis of depression, *Medical Hypothesis*; 61(5-6): 519-525).

- 5 Aunque los científicos del campo de la neurociencia han intentado descubrir los factores etiológicos de la depresión mayor, no se descubrió ningún factor único y la depresión se considera como una enfermedad causada por factores tanto genéticos o congénitos como ambientales, tales como estrés psicológico y ciertas enfermedades crónicas como el cáncer. Además, se han investigado los marcadores bioquímicos de diagnóstico, pero no se ha descubierto ningún biomarcador eficaz.
- 10 En este contexto Wada y col. (Wada, H. y col., Concentrations of multiple neurochemicals in the cerebrospinal fluid of patients with senile dementia and the relationship to alpha 1-antichymotrypsin], *Japanese Journal of Geriatrics*, 30(1), 1993, pp. 46-53) describen las concentraciones de diversos neuroquímicos en el fluido cerebroespinal de pacientes con demencia senil, así como su relación con los niveles de alfa 1-antiquimotripsina. Además, Amirkhani y col. (Amirkhani, A. y col., Quantitation of tryptophan, kynurenine and kynurenic acid in human plasma by capillary liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 780(2), 2002, pp. 381-387) describen la cuantificación de los niveles de triptófano, quinurenina y ácido quinurénico para la valoración de enfermedades
- 15 neurológicas. Además, Zhou y col. (Zhou, J.-N. y col., Early neuropathological Alzheimer's changes in aged individuals are accompanied by decreased cerebrospinal fluid melatonin levels, *Journal of Pineal Research*, 35(2), 2003, pp. 125-130) describen una correlación entre los niveles de melatonina en el fluido cerebroespinal y la ocurrencia de la enfermedad de Alzheimer. Además, Widner y col. (Widner, B. y col., Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease, *Journal of Neural Transmission*, 107(3), pp. 343-353) describen una correlación entre la activación inmune, la degradación del triptófano y la ocurrencia de la enfermedad de Alzheimer. También, Heyes y col. (Heyes, M.P. y col., Quinolinic Acid and Kynurenine Pathway Metabolism in Inflammatory and Non-Inflammatory Neurological Disease, *Brain* 115(5), 1992, pp. 1249-1273) describen el comportamiento metabólico de las vías de ácido quinolínico y de la quinurenina en diversas enfermedades neurológicas. Finalmente, la EP 1 050 758 A1 describe un método para diagnosticar una enfermedad neurodegenerativa o neuropsiquiátrica que comprende la determinación de los niveles de neurotrofina-3.

Por tanto, el problema que subyace en la presente invención consiste en proporcionar un nuevo método para detectar la enfermedad de Alzheimer empleando marcadores bioquímicos de bajo peso molecular.

- 30 La solución al problema técnico anterior se obtiene de acuerdo con las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

En particular, la presente invención se refiere a un método para detectar la enfermedad de Alzheimer que comprende la etapa de medir la concentración de 3-hidroxiquinurenina en una muestra de plasma sanguíneo obtenido del individuo que se está examinando y valorar la enfermedad de Alzheimer.

- 35 El término "producto de degradación del triptófano" tal como se emplea aquí incluye también al triptófano. La muestra de plasma sanguíneo se puede obtener por cualquier método conocido en la técnica. En una realización preferente de la presente invención, se recoge una muestra de sangre de un paciente pronto por la mañana, en ayunas, en un tubo heparinizado. El plasma sanguíneo se obtiene centrifugando dicho tubo heparinizado, lo que resulta en una separación de la fracción plasmática que forma el sobrenadante. En una realización especialmente preferente, se congela el
- 40 plasma, en particular a -70°C, antes de medir la concentración de al menos un producto de degradación del triptófano *in vivo*. En lugar de plasma sanguíneo, se puede utilizar también en la presente invención cualquier otra fuente de fluidos corporales, tales como sangre total, suero y orina. Estos fluidos corporales se pueden obtener aplicando los métodos conocidos en la técnica.

- 45 La medida de la concentración de triptófano y/o de 3-hidroxiquinurenina en un fluido corporal, por ejemplo en una muestra de plasma sanguíneo, se puede llevar a cabo por cualquier método conocido en la técnica. En una realización preferente, la medida de la concentración de analitos, especialmente de los productos de degradación del triptófano, se lleva a cabo mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución, en una realización especialmente preferente mediante un detector UV y/o un detector fluorescente, y/o mediante un inmunoensayo y/o un ensayo de unión al ligando. En una realización preferente, los analitos se determinan mediante un ensayo de unión al ligando, por ejemplo un
- 50 inmunoensayo basado en anticuerpos o un ensayo de unión al receptor o un ensayo de unión a la enzima o versiones competitivas de uno o más de estos ensayos.

En otra realización de la presente invención, las muestras por ejemplo son sustancialmente desproteinadas (se eliminan todas las proteínas) antes de medir la concentración de 3-hidroxiquinurenina.

- 55 En otra realización de la presente invención, después de medir las concentraciones de 3-hidroxiquinurenina en una muestra de sangre, se puede determinar el ratio ("ratio neurodegenerativo") dividiendo el valor de la concentración de 3-hidroxiquinurenina entre el valor de la concentración de triptófano (valor 3-hidroxiquinurenina/valor triptófano).

En otra realización preferente de la presente invención, un individuo que padece la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por un ratio determinado por la división entre el valor de la concentración de 3-hidroxiquinurenina entre el

valor de la concentración de triptófano en el plasma sanguíneo. Por ejemplo, si el ratio es de aproximadamente dos o más, siempre que los analitos se den en la misma unidad, se considera éste como indicativo de la enfermedad de Alzheimer. Lo mismo se aplica al ratio determinado por la división del valor de la concentración de 3-hidroxiquinurenina multiplicado por el factor 1.000 entre el valor de la concentración de triptófano en el plasma sanguíneo; es decir, 3-HK se multiplica por el factor 1.000, siempre que los analitos se den en la misma unidad (3-HK x 1.000/TRP).

De acuerdo con la presente invención, se puede utilizar cualquier fórmula matemática conocida en la técnica que utilice por ejemplo triptófano, 3-hidroxiquinurenina como valores de entrada y que dé el mismo resultado de interpretación.

Además, la presente invención se refiere a la utilización del ratio determinado por la división entre el valor de la concentración de 3-hidroxiquinurenina entre el valor de la concentración de triptófano en una muestra de plasma sanguíneo como marcador predictivo para la detección de la enfermedad de Alzheimer.

Los términos “marcador predictivo” o “marcador biológico” tal como se emplean aquí significan que el factor utilizado como marcador biológico o predictivo, preferentemente el ratio determinado por la división del valor de la concentración de 3-hidroxiquinurenina entre el valor de la concentración de triptófano, es indicativo de cuándo un individuo padece o no la enfermedad de Alzheimer.

15 Las figuras muestran:

- Figura 1: frecuencia de las concentraciones de ácido quinurénico en nanomoles/litro tal como se obtiene en el Ejemplo 1.
- Figura 2: frecuencia de la relación neuroprotectora (KAKYN) tal como se obtiene en el Ejemplo 1.
- Figura 3: frecuencia del índice de neuroprotección (PROi) tal como se obtiene en el Ejemplo 1.
- 20 Figura 4: curva Característica de Operación del Receptor (ROC) para el ácido quinurénico (KA) tal como se obtiene en el Ejemplo 1.
- Figura 5: curva ROC para la relación neuroprotectora (KAKYN) tal como se obtiene en el Ejemplo 1.
- Figura 6: curva ROC para el índice de neuroprotección (PROi) tal como se obtiene en el Ejemplo 1.
- 25 Figura 7: relaciones entre los niveles en suero de 3-HK y TRP en pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD), pacientes con depresión mayor (MD) y personas sanas con deterioro cognitivo subjetivo (SCI). La prueba de Kruskal-Wallis reveló una diferencia significativa entre los tres grupos investigados y la prueba de Mann-Whitney confirmó la diferencia significativa entre pacientes con AD y los dos grupos de comparación.

30 La Tabla 1 muestra los resultados del Ejemplo 1 (Género; M = Masculino, F = Femenino; Edad (años); TYR (tirosina en micromol/litro); VAL (valina en micromol/litro); TRP (triptófano en micromol/litro); PHE (fenilalanina en micromol/ litro); ILE (isoleucina en micromol/litro); LEU (leucina en micromol/litro); Kyn (Quinurenina en micromol/litro); KA (ácido quinurénico en nanomol/litro); TRPi (índice de triptófano = $100 \times \text{triptófano} / \{\text{TYR} + \text{VAL} + \text{PHE} + \text{ILE} + \text{LEU}\}$); KYN/TRP (índice de degradación del triptófano = valor de quinurenina / valor de triptófano); KAKYN (relación neuroprotectora = $1.000 \times \text{valor del ácido quinurénico (micromol/litro) / valor de la quinurenina (micromol/litro)}$); PROi (Índice de neuroprotección = $1.000.000 \text{ valor del ácido quinurénico (micromol/litro)} \times \text{valor del ácido quinurénico (micromol/litro) / valor de la quinurenina (micromol/litro)}$).

35 La Tabla 2 muestra las características del grupo de pacientes y de los sujetos de control. AD = Pacientes con enfermedad de Alzheimer; MD = Pacientes con depresión mayor; SCI = Personas sanas con deterioro cognitivo subjetivo; MMSE = Examen del Estado Mini-Mental.

40 La Tabla 3 muestra las fases móviles y las condiciones de gradiente. Disolvente A: acetato de sodio 50 mM, pH 4,8; disolvente B: acetato de sodio 50 mM, pH 3,56; disolvente C: acetonitrilo al 100%; disolvente D: metanol al 100%.

45 La Tabla 4 muestra los niveles en suero de triptófano (TRP), quinurenina (KYN), ácido quinurénico (KYNA) y 3-hidroxiquinurenina (3-HK) en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (AD), en pacientes con depresión mayor (MD), y en personas sanas con deterioro cognitivo subjetivo (SCI). La prueba no-paramétrica de Kruskal-Wallis se utilizó para buscar las diferencias entre los tres grupos investigados. Las diferencias significativas con respecto a los niveles de 3-HK y la relación 3-HK/TRP fueron confirmadas por la prueba de Mann-Whitney.

A continuación se ilustra además la presente invención mediante los siguientes ejemplos, sin que esté limitada por los mismos.

Ejemplos

Ejemplo de Referencia 1:

Medida del índice de neuroprotección, del ratio neuroprotector y de las concentraciones de quinurenina plasmática en plasma sanguíneo humano

5 Sujetos

Se reclutó un total de 48 pacientes con depresión (edad de $44,277 \pm 11,42$ años) que no habían sido tratados con medicamentos anteriormente en el momento de su ingreso en el servicio psiquiátrico del hospital general. Se reclutaron como controles un total de 95 personas sanas normales (edad de $31,63 \pm 8,5$ años) que acudieron al mismo hospital general para un chequeo habitual en el mismo período de tiempo. Todos los sujetos dieron su consentimiento informado.

10

Todos los pacientes fueron entrevistados por un psiquiatra cualificado y su diagnóstico fue de depresión mayor según los criterios DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Fourth Edition (DSM-IV), Am. Psy. Asso. Washington DC). Se excluyeron todos aquellos pacientes con comorbidez de otros trastornos psiquiátricos, incluyendo alcoholismo y otras enfermedades agudas o crónicas. La presencia de otras enfermedades se comprobó tanto clínica como bioquímicamente.

15

Se comprobó en todos los controles que no tenían enfermedades crónicas y agudas de la misma forma que con los pacientes. La entrevista fue realizada por un psiquiatra cualificado para confirmar que no tenían trastornos psiquiátricos ni asociados.

Recogida de muestras

20

Se recogió un total de 10 ml de muestras de sangre pronto por la mañana en ayunas en tubos heparinizados y las muestras de plasma se recogieron y almacenaron a -70°C para su análisis en una fecha posterior. Para los pacientes se realizaron otros muestreos en el momento de la descarga.

Análisis de muestras y de datos

25

Las muestras se analizaron para (1) triptófano ($\mu\text{mol/l}$), (2) aminoácidos competidores: tirosina, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina, taurina, ácido α -amino-n-butírico y metionina ($\mu\text{mol/l}$), (3) quinurenina ($\mu\text{mol/l}$), ácido hidroxiantranílico (nmol/l) y (4) ácido quirénico (nmol/l), por Cromatografía Líquida de Alta Resolución utilizando un detector UV y detectores fluorescentes (Herve C, Beyne P, Jamault h, Delacoux E, 1996, Determination of tryptophan and its kynurenine pathway metabolites in human serum by high-performance liquid chromatography, J. Chromatography B: Biomedical applications; (675):157-161).

30

Se calcularon: el índice de triptófano (TRPi), que representa la disponibilidad de triptófano en la sangre ($100 \times$ valor de triptófano/suma de los valores de los aminoácidos competidores), el índice de degradación del triptófano (KYN/TRP), que representa la degradación del triptófano (valor de la quinurenina/valor del triptófano), la relación neuroprotectora (KAKYN) (valor del ácido quinurénico/valor de la quinurenina) y el índice de neuroprotección (PROi) (valor del ácido quinurénico²/valor de la quinurenina), que representa la resistencia de la neuroprotección contra el efecto excitotóxico del ácido quinolínico (Tabla 1).

35

Se realizó el análisis estadístico por medio de SPSS, versión 11.0.

Resultados

- (1) A su ingreso, los índices de triptófano en los pacientes fueron significativamente pero no mucho más bajos ($p < 0,05$) que los controles sanos ($9,99 \pm 0,26$ frente a $10,88 \pm 0,14$).
- 40 (2) A su ingreso, los índices de degradación del triptófano en los pacientes fueron significativamente pero no mucho más bajos ($p < 0,04$) que los controles sanos ($0,03 \pm 0,002$ frente a $0,05 \pm 0,02$).
- (3) A su ingreso, el ácido hidroxiantranílico (una etapa antes de la formación del ácido quinolínico en el catabolismo) que indica el efecto tóxico sobre las neuronas no mostró ninguna diferencia ($p = 0,1$) entre los pacientes ($25,265 \pm 2,437$) y los controles sanos ($25,182 \pm 0,768$).
- 45 (4) A su ingreso, las concentraciones de ácido quinurénico en plasma de los pacientes fueron significativamente y mucho más bajas ($p < 0,0001$) que en los controles sanos ($24,29 \pm 1,18$ frente a $35,96 \pm 1,37$) (Figura 1).
- (5) El análisis de la curva ROC mostró que el valor del ácido quinurénico de $29,3 \text{ nmol/l}$ es el punto de corte entre personas deprimidas y personas sanas con una sensibilidad del 80,9% y una especificidad del 75% (Figura 4).
- (6) A su ingreso, la relación neuroprotectora en los pacientes fue significativamente y mucho más baja ($p < 0,0001$) que en los controles sanos ($14,08 \pm 0,64$ frente a $19,36 \pm 0,61$) (Figura 2).

50

(7) El análisis de la curva ROC mostró que el índice de neuroprotección 16,3 es el punto de corte entre personas deprimidas y personas sanas con una sensibilidad del 75,5% y una especificidad del 65% (Figura 5).

(8) A su ingreso, el índice de neuroprotección en los pacientes fue significativamente más bajo ($p < 0,04$) que los controles sanos ($358,77 \pm 52,93$ frente a $757,7 \pm 86,22$) (Figura 3).

5 (9) El análisis de la curva ROC mostró que el índice de neuroprotección 473 es el punto de corte entre personas deprimidas y personas sanas con una sensibilidad del 78,7% y una especificidad del 77,6% (Figura 6).

(10) El análisis univariado demostró que la edad o el género no influía en los tres marcadores anteriores.

Conclusión

10 El índice de neuroprotección, el ratio neuroprotector y las concentraciones de ácido quinurénico en plasma son marcadores biológicos a utilizar para diferenciar entre personas sanas y personas deprimidas.

Ejemplo de referencia 2:

Determinación de la quinurenina y del ácido quinurénico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

1. Introducción

15 Medición combinada de la quinurenina y del ácido quinurénico por HPLC con estandarización externa. La quinurenina es detectada por UV y el ácido quinurénico por su fluorescencia intensificada en un disolvente de elución que contiene Zn.

2. Preparación de las muestras

Hace falta desproteinar las muestras (suero, sangre total, plasma).

Se añaden 20 µl de ácido perclórico a 180 µl de muestra.

20 Se deja en reposo durante 10 minutos, luego se centrifuga durante 5 minutos a 14.000 g. Se trasladan 100 µl de sobrenadante a un vial de inyección Gilson, se tapa y se centrifuga durante 5 minutos a 6.000 g.

3. Instrumentación: sistema de configuración 2

3.1. Bomba de HPLC Gilson 305

3.2. Autoinyector Gilson 231

25 Comprobar el depósito del diluidor: 20% ACN/AD

Fichero de programa 1

TIEMPO ANAL. = 4 minutos

NÚMERO DE MUESTRA = número de inyecciones

VOLUMEN DE INYECCIÓN = 40 µl

30 3.3. Detector de fluorescencia Shimadzu 10A(xl)

Excitación: 334 nm

Emisión: 388 nm

SENS: 1

AUMENTO: 3

35 3.4. Detector Gilson 117

Longitud de onda: 365 nm

Sensibilidad 1: 0,01

Sensibilidad 2: 0,1

Ancho mín. del pico: 8 segundos

40 3.5. Software Gilson Unipoint

Fichero de método: KYNS2.GCT.

Fichero de parada: STOPKA2.GCT

Fichero de análisis: KAS2.GAN y KYNS2.G

4. Cromatografía

5 Columna: Chromolith Performance 4,6 x 100 mm con un cartucho de seguridad Chromolith.

Tampón: 250 mM acetato de Zn en AD (27,4 g en 500 ml). El pH se lleva a 5,8 con ácido acético y se elabora a un volumen de 455 ml con agua en un cilindro medidor. Se añaden 45 ml de ACN (para gradiente de cromatografía). Se desgasifica el disolvente por ultrasonificación durante 20 minutos.

5. Preparación de los estándares

10 5.1. Se prepara el estándar stock de quinurenina pesando 20 mg de quinurenina (MW 208,2) y disolviendo en agua en un matraz medidor de 100 ml. El estándar se almacena en partes alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf a -20°C.

5.2. Se prepara el estándar stock de ácido quinurénico pesando 20 mg de ácido quinurénico (MW 189,2) y disolviendo en EtOH con 1 ml de HCl 12N en un matraz medidor de 100 ml. Se almacena el estándar a -20°C.

5.3. Estándar de trabajo

15 Estándares stock de diluto hasta concentraciones 5 µM para la quinurenina (500 µl) y 100 nM para el ácido quinurénico (10,0 µl) en AD (hasta 100 ml). Estable durante un día a temperatura ambiente.

6. Reactivos

Ácido perclórico (2,4M): 7 ml de ácido perclórico + 13 ml de AD.

7. Control de calidad

20 Plasma comercial exento de medicamento (TRP, KYN, KA).

8. Procedimiento

- Preparar disolventes, reactivos, Estándar de Trabajo descongelado.

- Solución y Plasma de Control.

- Estabilizar la columna

25 - Comprobar la instalación de redes de tuberías

- Detector de fluorescencia

- Preparación de muestras

- Adaptar el Archivo de Operación al número de inyecciones de estándar, muestras y controles.

- Autoinyector del programa – Arrancar

30 - Parada del sistema

9. Valores normales

9.1. Clin Chem 44:4, 858-62 (1992):

KYN: 1,98 rango (media) 1,86 - 2,10 µM n = 72

9.2. J Chrom B, 675 (1996), 157-61:

35 KYN: 1,35 0,7 - 3,0 µM n = 35

KA. 23 6 - 54 nM

9.3. Anal Bioch 172, 518-25 (1988):

KYN: 2,21 1,30 - 3,32 µM n = 20M + 20F

- 9.4. Roseneck studie (proyecto 11/01)
 KYN: 1,66 1,04 - 2,28 µM n = 36

Ejemplo 3:

5 Determinación del triptófano y de los aminoácidos competidores por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

1. Introducción

Medición simultánea de: Tirosina (TYR), Valina (VAL), Triptófano (TRY), Fenilalanina (PHE), Isoleucina (ILE), Leucina (LEU).

Otros aminoácidos que se eluyen: Taurina (TAU), Ácido α-amino-n-butírico (ABA), Etanolamina, Metionina (MET).

10 2. Preparación de las muestras

Se diluyen 25 µl de la muestra con 25 µl de la solución Estándar Interna (IS) en un matraz de Muestras Gilson.

3. Instrumentación

3.1. Sistema 1 Gilson

3.2. ASTED

15 Instalar el bucle de inyección de 20 µl y el bloque de diálisis. Utilizar la solución Prime para el Diluidor 0 y la Solución Dializadora para el Diluidor 1. Colocar el Tampón de Borato en el vial en las posiciones A y B de Rack 50. Colocar el reactivo de derivatización OPA en la posición C.

3.3. Detector de fluorescencia Shimadzu RF-A

Excitación: 330

20 Emisión: 450

SENS: 1

AUMENTO: 2

3.4. Software Gilson Unipoint

Método de control: AZP

25 Método de análisis: AZP

4. Cromatografía

Columna: Econospher C18, 3 µm, 4,7 x 50 mm.

30 Disolvente A: 57,2 g de Na₂HPO₄·12H₂O ó 22,69 de Na₂HPO₄.anh. Se disuelve en 400 ml de agua con agitación y calentamiento suave. El pH se lleva a 6,5 con ácido fosfórico y se elabora a un volumen de 1.840 ml con agua en un cilindro medidor. Se añaden 160 ml de acetonitrilo para la cromatografía.

Disolvente B: 420 de agua/280 de ACN/320 de MeOH (todo de Spectrograde). Ambos disolventes se desgasifican por ultrasonificación durante 20 minutos.

5. Preparación de los estándares

35 - Se preparan por separado estándares de aminoácidos pesando 100 mg de cada compuesto y disolviendo en agua en un matraz medidor de 100 ml.

- Solución Estándar de trabajo: se disuelven 5 ml de los siguientes estándares de aminoácidos individuales en 250 ml de agua en un matraz medidor: TYR, VAL, TRY, PHE, ILE, LEU.

40 - Comprobar la Solución Estándar: lo mismo que con la Solución Estándar de Trabajo pero con estos compuestos adicionales: TAU, ABA, MET. Esta solución no se utiliza para la estandarización sino para comprobar el cromatograma.

- Ambos estándares se almacenan en partes alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf a -20°C.

- Concentraciones reales de la solución de trabajo (en microM): véase la Tabla de Picos.
6. Reactivos
- 6.1. Disolvente Prime (1 semana): se disuelven 8,6 g de NaCl en 1 l de agua. Se añaden 500 µl de Triton X 100. Se mezcla bien y se somete a ultrasonificación durante 10 minutos.
- 5 6.2. Solución de diálisis (1 semana): 0,2M KH₂PO₄ con NaN₃ (una punta de cuchara).
- 6.3. Solución Stock Estándar Interna: se disuelven 100 mg de Norvalina en 100 ml de agua. Se almacenan partes alícuotas de 1,5 ml en tubos Eppendorf a -20°C (2 años).
- 6.4. Estándar Interno (IS): Se diluye 1 ml de Solución Stock Estándar Interna con 20 ml de N₂-EDTA 2 g/l de (Kestranal 2S) en un vial de escintilación (1 mes).
- 10 6.5. Tampón borato: se disuelven 3,1 g de ácido bórico en 400 ml de agua, se lleva a un pH de 9,5 con NaOH conc. y se diluye hasta 500 ml (1 mes).
- 6.6. OPA: se disuelven 500 mg de dialdehído orto-ftálico (OPA) por ultrasonificación corta en 10 ml de metanol Spectrograde en un matraz Erlenmeyer de 100 ml. Se añaden 90 ml de Tampón Borato y 500 µl de mercaptoetanol. Este reactivo es estable durante 1 mes pero, se añaden cada dos días 50 µl de mercaptoetanol.
- 15 7. Control de calidad
- Se almacena un pool de EDTA en tubos Eppendorf a -20°C.
8. Parada del sistema
- Enjuagar la columna con disolvente B
 - ASTED Prime con agua
- 20 9. Procedimiento
- Preparar disolventes, reactivos, IS, Solución Estándar de Trabajo descongelada y Plasma de Control.
 - Estabilizar la columna accionando el gradiente 3 veces: primero accionar la bomba 1, bomba 2, (eventualmente las bombas Prime con la columna desconectada), Qata Master, Diluidores, ASTED, impresora, pantalla del ordenador, ordenador. Seleccionar el método AZP2 y accionar tres veces (clicar "Continuar"). Comprobar el gradiente al menos una vez con y sin la preparación de muestreo.
- 25
- Preparar ASTED para la diálisis (si se cambia la configuración, primero accionar FILE 181): colocar los reactivos y disolventes, Prime, accionar File 150 (TIEMPO DE ELUC. = 50).
 - Detector de fluorescencia
 - Empezar la estabilización de la columna
- 30
- Comprobar la instalación de redes de tuberías
 - Programar ASTED para la muestra de comprobación (Estándar de Trabajo)
 - Si la muestra de comprobación no está OK, intentar remediarlo y volver a empezar. En caso de duda, accionar Estándar de Control y/o Plasma de Control de Calidad.
 - Preparación de muestras
- 35
- Adaptar el Programa Gilson al número de inyecciones de estándar, muestras y controles.
 - Programar ASTED
 - Poner en marcha
 - Parada del sistema

Ejemplo de referencia 4:

Determinación del Ácido Hidroxiantranílico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

1. Introducción

Se puede detectar KYN por UV y HAA por su fluorescencia.

5 2. Preparación de muestras

En primer lugar se centrifugan muestras (suero, sangre total con EDTA, plasma con EDTA, plasma heparinizado o citrado) a 4.000g para eliminar los particulados. Hace falta desproteinarlas.

Se añaden 20 µl de ácido perclórico (6,3) a 180 µl de muestra.

10 Se deja en reposo durante 5 minutos, luego se centrifuga durante 5 minutos a 14.000 g. Después, se trasladan 100 µl de sobrenadante a un vial de inyección Gilson, se tapa y se centrifuga durante 5 minutos a 6.000 g.

3. Instrumentación:

Sistema de Configuración 2

3.1. Bomba de HPLC Gilson 305

3.2. Autoinyector Gilson 234

15 Comprobar el depósito del diluidor: 20% ACN/AD

Fichero de programa 3

TIEMPO ANAL. = 12 minutos

Número de muestra = número de inyecciones

VOLUMEN DE INYECCIÓN = 45 µl

20

3.3. Detector de fluorescencia Shimadzu 10A(xl)

Excitación: 316 nm

Emisión: 420 nm

SENS: 1

25 AUMENTO: 3

3.4. Software Gilson Unipoint

Fichero del método: HAAS2.GCT,

Fichero de parada: STOPSYS2.GCT,

Fichero de análisis: HAAS2.GAN y HAAS2.GAN

30

4. Cromatografía

Columna: Prevalece seleccionar C18 3µ 4,6 x 100 mm (Alltech 99302).

35 Tampón: 20 mM ácido acético (1,2 ml en 900 ml) se llevan a un pH de 5,8 con KOH y se elaboran a un volumen de 1.000 ml con agua en un cilindro medidor. Se añaden 20 ml de MeOH (para gradiente de cromatografía). Se desgasifica el disolvente por ultrasonificación durante 10 minutos.

5. Preparación de los estándares

5.1. Se prepara el estándar stock de ácido hidroxiantranílico pesando 20 mg de ácido antranílico (MW) y disolviendo con 40 mM citrato-acetato, pH 4,5, en un matraz medidor de 100 ml. Se almacena el estándar a -80°C.

sujetos con SCI ($Z = -3,998$, $p < 0,001$) y los pacientes con MD son mayores que los sujetos con SCI ($Z = -2,072$, $p = 0,038$).

- 5 Se recogen muestras de suero en contenedores de vacío sin más aditivos. Después de 0,5 horas de coagulación, se centrifugan las muestras y se separa el sobrenadante en partes alícuotas en tubos Eppendorf (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se congelan inmediatamente a -80°C .

Análisis de laboratorio

Establecimos un método de cromatografía líquida con gradiente de alta resolución (HPLC) con detección ultravioleta (UV) y fluorescencia.

Productos químicos

- 10 Se compran a Merck (Darmstadt, Alemania) los reactivos para la extracción en fase sólida y la cromatografía en un grado gradiente de pureza para la cromatografía líquida. El agua ultra pura es producida por un sistema Millipore Milli-Q (Millipore, Miford, MS). Se utilizan cápsulas de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma, St. Louis, MO) para generar un PBS 0,05M. Se compran triptófano, quinurenina, ácido quinurénico y 3-hidroxiquinurenina de alta pureza a Sigma (St. Louis, MO).
- 15 Se establecen los calibradores y controles mediante la adición de concentraciones definidas de analitos a una solución de PBS 0,05M. Se utilizan las siguientes concentraciones para la calibración en cinco puntos: TRP: 0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 $\mu\text{g/ml}$; KYN: 12,5; 25,0; 50,0; 100, 200, 400, 800 ng/ml ; KYNA: 4,688; 9,375; 18,75; 37,5; 75,0; 150, 300 ng/ml ; 3-HK: 1,563; 3,125; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100 ng/ml .

Extracción de muestras

- 20 Se extraen los analitos de muestras y calibradores/controles por medio de cartuchos de extracción Waters Oasis MCX 1 cc (30 mg) como sigue (todas las extracciones se realizan con un sistema colector al vacío manual): (1) el cartucho se preconditiona mediante enjuague con 1 ml de metanol seguido de 1 ml de agua; (2) la muestra de 1 ml y 100 μl de H_3PO_4 1M se aplican al cartucho y se llevan bajo ligero vacío (2 minutos); (3) se lava el cartucho con 1 ml de HCl 0,1M seguido de 1 ml de metanol 100%; y finalmente, (4) se eluyen los analitos mediante enjuague del cartucho con 1,5 ml de acetonitrilo que contiene un 6% de NaOH. Entonces se evapora el eluyente bajo nitrógeno hasta sequedad y se reconstituye con 150 μl de PBS 0,1M. La muestra/calibrador/ control reconstituida se traslada entonces a un vial de microinyección (Waters).
- 25

Equipo HPLC y condiciones cromatográficas

- 30 Se llevan a cabo los análisis en un cromatógrafo Waters 2695 conectado a un detector UV dual- λ Waters Modelo 2487 y un detector de fluorescencia 2475.

- 35 Para la determinación de KYN, KYNA y 3-HK, se cargan 100 μl de las muestras en una columna C8, Supersphere 60 RP-Select B de 250 mm x 4 mm (Merck, Darmstadt, Alemania). Debido a la concentración relativamente más alta, se realiza una segunda inyección con un volumen de 10 μl para la determinación de TRP. Con el fin de asegurar una resolución óptima de los picos en los cromatogramas y, por lo tanto, una separación eficaz de los analitos en un tiempo razonablemente corto (30 minutos), se lleva a cabo la elución en el modo de gradiente utilizando una fase móvil que se compone de una mezcla de acetato de sodio 0,050M (disolvente A: pH 4,80; disolvente B: pH 3,65), acetonitrilo (disolvente C) y metanol (disolvente D) en distintas proporciones (véase la Tabla 3).

- 40 El caudal se fija en 0,80 ml/minuto, la temperatura de columna se establece en $35,0^{\circ}\text{C}$, mientras se enfrían las muestras a $4,0^{\circ}\text{C}$. Se mide la TRP por detección de fluorescencia (λ_{ex} : 300 nm; λ_{em} : 350 nm), KYN (365 nm), KYNA (330 nm), y 3-HK (365 nm) se miden por detección de UV. El tiempo de operación aproximada después de la inyección hasta la detección de los compuestos es de aproximadamente 20,4 minutos para TRP, 13,4 minutos para KYN, 22,5 minutos para KYNA y 7,0 minutos para 3-HK.

- 45 Se procesan los datos por medio de EMPOWER para el software Windows 2000 (Waters). Las concentraciones se establecen por comparación de las alturas de pico de los analitos solos con las alturas de pico de las curvas de calibración respectivas.

Estadísticas

- 50 El análisis estadístico se realiza con SPSS (Versión 12.0.1.; SPSS, Chicago, Illinois) con procedimientos no paramétricos (Prueba de Kruskal-Wallis - Correlación de Rangos de Spearman). El nivel de significancia se establece en $p < 0,050$. Para controlar los efectos de la significancia entre grupos por la diferencia en edad, se utiliza un modelo lineal con diagnóstico como edad y factor independiente como covariante. Como las variables de salida no se distribuyen normalmente por inspección visual de los residuos de la regresión y las pruebas de Kolmogorov Smirnov ($p < 0,05$), se aplica un análisis de remuestreo (bootstrapping) a un modelo de regresión múltiple con diagnóstico y edad como variables predictoras independientes para una prueba de significancia sin distribución. Específicamente, se calcula iterativamente el modelo de regresión múltiple para cada par de diagnóstico en base a 999 muestras. Para evaluar si un

5 marcador que muestra diferencias significativas entre los grupos con AD y los grupos de comparación puede resultar útil también como prueba de diagnóstico potencial, se determina la sensibilidad del marcador cuando se fija la especificidad en > 80% y la especificidad cuando se fija la sensibilidad en > 80% utilizando el análisis ROC. Se elige el nivel del 80% en base a los criterios de consenso para un biomarcador clínicamente útil en AD (The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group (1998), Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. *Neurobiol. Aging* 19, 109-116).

Resultados

10 Se muestran en la Tabla 4 los niveles medios de triptófano en suero (TRP), quinurenina (KYN), ácido quinurénico (KYNA) y 3-hidroxiquinurenina (3-HK) en pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD), pacientes con depresión mayor (MD) y personas sanas con deterioro cognitivo subjetivo (SCI). Existe una diferencia no significativa de niveles de TRP entre los tres grupos (Kruskal-Wallis: $X^2 = 5,507$; $p = 0,064$) con los pacientes con AD que muestran niveles de TRP más bajos que con las personas de control sanas (Mann-Whitney $Z = -2,288$; $p = 0,022$). Los niveles de KYR en suero (15 $X^2 = 1,536$; $p = 0,464$) y de KYNA ($X^2 = 0,033$; $p = 0,984$) no son diferentes entre los grupos. En cambio, los niveles de 3-HK son significativamente diferentes entre los tres grupos ($X^2 = 20,281$; $p < 0,0001$), con niveles de 3-HK en suero más altos en los pacientes con AD en comparación con los pacientes de depresión mayor ($Z = 3,571$; $p < 0,001$) y los controles con SCI ($Z = -4,139$; $p < 0,0001$). Por contraste, los niveles de 3-HK en suero no difieren entre los pacientes con MD y los controles con SCI ($Z = -0,541$; $p = 0,602$). Como la disponibilidad del aminoácido esencial TRP es un factor limitativo para la producción de sus metabolitos, se calcula también la relación entre los niveles de 3-HK y TRP. De nuevo, existe una diferencia muy significativa entre los grupos ($X^2 = 21,911$; $p < 0,0001$) con una relación media más alta (3-HK/TRP) en los pacientes con AD que en los pacientes con MD ($Z = -3,517$; $p < 0,001$) y los controles sanos ($Z = -4,436$; $p < 0,0001$), pero sin diferencia entre los dos grupos de comparación ($Z = -0,757$; $p = 0,449$). En consecuencia, la relación entre el 3-HK neurotóxico y el KYNA neuroprotector aumenta significativamente en los pacientes con AD ($X^2 = 18,016$, $p = 0,0001$; AD frente a MD: $Z = -3,219$, $p = 0,001$; AD frente a SCI: $Z = -4,003$, $p = 0,00002$; MD frente a SCI: $Z = -0,649$, $p = 0,529$).

30 Cuando las diferencias significativas entre grupos en 3-HK y 3-HK/TRP se controlan en cuanto a la edad utilizando el análisis de remuestreo (bootstrapping) para la determinación de la distribución de muestreo, los niveles de 3-HK son significativamente diferentes entre los pacientes con AD y los controles con SCI (coeficiente de correlación parcial $-0,42$, $p < 0,05$) y entre los pacientes con AD y con MD (coeficiente de correlación parcial $-0,35$, $p < 0,05$). La relación entre 3-HK y TRP es significativamente diferente entre los pacientes con AD y los controles con SCI (coeficiente de correlación parcial $-0,47$, $p < 0,05$), pero no entre los pacientes con AD y con MD (coeficiente de correlación parcial $-0,2$).

35 Por medio del análisis de ROC del grupo con AD comparado con el grupo de MD combinado con SCI, para 3-HK la sensibilidad es del 75% cuando la especificidad se establece en un 85%, y la especificidad es del 70% cuando la sensibilidad se fija en un 90%. Para la relación entre 3-HK y TRP, la sensibilidad es del 80% cuando la especificidad se fija en un 82,5%, y la especificidad es del 77,5% cuando la sensibilidad se establece en un 85%.

TABLA 1

Grupo	Géner	Edad	TYR	VAL	TRP	PHE	ILE	LEU	Kym	KA	TRPI	KYN/TR	KAKYN	PROI
	M	68	67.14	263.7	55.31	86.47	66.66	129.95	2.99	31.84	8.58	0.0540	10.67	339.61
	M	44	79.93	376.89	88.94	87.77	137.2	226.64	2.51	29.33	9.76	0.0282	11.71	343.30
	F	35	82.87	260.05	62.23	62.86	96.06	156.65	2.06	24.96	9.04	0.0331	12.11	302.29
	M	31	63.29	230.9	62.43	68.38	76.53	125.46	1.85	17.87	11.06	0.0286	9.66	172.63
	F	52	63.12	246.49	84.73	61.67	82.9	141.06	1.49	14.34	13.77	0.0176	9.62	137.66
	F	68	105.1	376.3	101.54	110.33	140.93	198.4	1.90	26.61	10.91	0.0188	14.08	377.39
	M	20	68.26	300.6	89.45	110.23	86.08	182.06	1.80	33.71	11.66	0.0201	18.70	630.54
	F	34	57.66	210.25	47.97	69.85	89.7	125	1.63	11.60	9.68	0.0339	7.13	82.70
	M	61	57.29	241.98	58	66.2	76.73	117	1.33	13.79	10.35	0.0229	10.36	143.18
	F	67	62.67	251.93	58.7	76.58	74.52	126.63	1.93	28.16	10.22	0.0324	14.56	409.90
	F	30	66.08	245.14	75.71	94.63	83.71	154.31	1.43	16.71	11.76	0.0189	11.68	195.18
	M	40	48.34	193.21	63.76	61.03	55.14	94.44	1.52	24.85	11.89	0.0283	16.35	406.26
	F	23	62	317	51.3	60	80	191	1.44	21.67	7.03	0.0281	15.19	332.15
	M	46	80.82	318.26	104.36	102.46	106.22	188.57	2.46	21.47	12.94	0.0236	8.73	187.38
	M	33	72.31	418.11	86.75	104.43	112.24	185.43	3.94	56.28	9.61	0.0454	14.29	804.20
	F	51	52.06	215.4	54.45	74.58	82.56	134.33	1.91	35.54	9.67	0.0332	19.64	697.84
	F	50	106.3	357.06	84.05	95.28	127.88	204.86	1.82	35.21	9.43	0.0217	19.35	661.18
	M	20	72.26	343.18	85.84	86.24	128.5	220.42	1.91	25.86	9.97	0.0222	13.54	350.12
	M	37	53.39	257.99	64.99	64.92	86.14	143.17	2.91	19.80	10.73	0.0446	6.80	134.58
	F	52	80.22	267.88	77.55	63.11	90.69	169.15	1.85	14.61	11.22	0.0239	8.01	118.56
	F	61	78.16	237.18	49.76	103.12	95	135.61	1.98	25.47	7.67	0.0386	12.06	327.64
	F	41	71.59	309.67	54.17	114.52	97.29	216.88	1.06	27.26	6.69	0.0196	25.72	701.04
	M	39	79.65	278.68	66.04	89.76	98.05	163.32	1.92	28.56	9.05	0.0291	14.86	424.83
	M	45	64.56	295.44	42.61	78.98	123.37	208.21	1.20	25.59	5.60	0.0282	21.33	545.71
	M	36	59.25	276.07	61.44	79.84	82.34	155.45	1.46	26.29	9.41	0.0236	18.00	473.04
	F	38	96.4	306	79.8	94.2	93.2	168	1.42	19.00	10.57	0.0178	13.38	254.23
	F	35	53.12	188.28	46.91	56.48	57.41	101.99	0.75	15.94	10.26	0.0160	21.25	338.78
	M	20	71.83	276.7	68.19	93.48	78.02	179.17	1.77	36.28	12.63	0.0201	20.49	742.82
	M	32	82.7	306.59	57.24	86.81	101.51	199.25	1.72	24.70	7.38	0.0300	14.36	354.70

E	F	21	62.45	232.87	69.74	88.74	75.78	154.07	2.14	20.09	11.36	0.0307	9.39	188.60
	M	63	65.45	344.26	57.64	82.89	127.58	223.23	2.25	31.95	6.78	0.0389	13.93	436.81
N	M	67	68.36	282.86	59.19	82.04	72.61	152.41	2.06	26.97	9.02	0.0348	13.09	353.10
	F	40	63.58	244.54	70.29	72.7	72.23	141.26	1.01	20.36	11.83	0.0144	20.16	410.43
F	M	60	69.79	316.34	35.02	65	106.15	187.38	1.22	24.47	4.59	0.0348	20.06	490.80
	F	42	64.29	243.52	60.67	69.42	72.54	142.77	1.42	23.05	10.27	0.0233	16.23	374.16
E	M	41	60.03	225.76	48.69	66.74	69.3	123.48	2.01	22.78	8.97	0.0411	11.33	258.17
	M	42	66.65	270.91	72.22	74.28	92.07	169.43	1.79	31.10	10.73	0.0248	17.37	540.34
R	F	60	64.52	227.57	50.73	60.26	71.34	113.67	1.79	21.82	9.44	0.0353	12.19	265.98
	M	52	47.94	207.97	52.33	65.94	114.84	57.91	1.84	19.90	10.59	0.0352	10.82	215.22
M	M	49	64.68	283.25	62.09	59.75	79.29	148.15	1.39	17.80	9.78	0.0224	12.81	227.94
	M	66	50.5	207.19	38.14	62.38	65.21	117.37	1.35	10.78	7.59	0.0354	7.89	66.06
E	F	48	70.79	313.1	74.21	67.68	85.85	154.31	1.71	24.61	10.73	0.0230	14.39	354.18
	F	43	70.55	210.41	70.69	78.76	65.47	123.65	1.83	26.04	12.88	0.0231	15.98	416.00
D	M	43	42.96	204.91	55.37	55.74	76.35	125.37	1.88	13.61	10.96	0.0340	7.24	98.53
	F	43	84.69	212.39	57.9	68.17	55.94	117.44	1.41	23.44	10.75	0.0244	16.62	389.67
	F	24	56.28	264.5	66.27	73.73	78.58	167.06	1.42	15.56	10.35	0.0214	10.96	170.50
	F	68	73.73	257.95	69.25	78.04	82.88	140.21	2.02	34.10	10.94	0.0282	16.88	575.65
media		44.277	68.587	270.584	65.242	80.967	89.204	156.172	1.791	24.291	9.894	0.028	14.062	358.765
media		11.424	11.26	41.924	12.603	12.545	16.759	30.543	0.3677	5.8735	1.4505	0.0068	3.4879	142.69
dev														
Normal	M	26	85.92	280.85	66.2	80.74	81.71	155.62	2.60	35.93	9.67	0.0393	13.91	496.23
Normal	M	33	63.48	253.2	71.5	84.52	82.38	158.44	1.23	16.66	11.12	0.0171	13.59	226.35
Normal	F	38	50.88	257.27	74.66	64.11	76.45	135.14	2.10	55.74	12.78	0.0281	26.54	1479.50
Normal	F	25	50.52	226.25	47.26	64.66	60.52	114.16	1.74	32.69	9.18	0.0368	18.79	614.16
Normal	F	26	57.18	272.04	69.04	79.9	78.33	141.88	1.74	30.81	10.97	0.0252	17.71	545.55
Normal	M	31	77.22	295.32	64.76	86.19	95.89	170.99	1.66	53.85	8.93	0.0256	32.44	1746.88
Normal	F	23	75.91	235.17	65.24	60.12	65.54	122.97	1.41	36.05	11.66	0.0216	25.57	921.70
Normal	F	24	75.26	306.84	69.74	85.65	104.98	160.73	2.92	48.31	11.78	0.0325	16.54	789.27
Normal	F	43	81.76	364.43	82.47	99.37	132.87	217.79	2.64	36.53	9.20	0.0320	13.84	505.47
Normal	F	22	66.59	232.12	59.67	72.02	69.32	126.1	1.70	20.62	10.54	0.0265	12.13	250.17

Normal	F	39	98.54	389.11	68.22	85.16	151.75	243.89	1.46	26.57	9.11	0.0165	18.20	483.54
Normal	M	32	73.14	223.15	75.48	80.12	73.22	129.57	1.56	22.35	13.03	0.0209	14.15	316.15
Normal	F	36	42.31	174.21	53	69.31	54.96	98.29	1.43	22.51	12.07	0.0270	15.74	354.29
Normal	F	14	86.22	239.34	91.17	87.04	66.5	117.3	2.49	61.06	15.26	0.0273	24.62	1497.32
Normal	M	60	64.28	289.74	63.71	80.74	85.93	165.58	1.84	23.63	9.28	0.0269	12.84	303.47
Normal	M	35	45.61	217.82	48.39	54.85	45.59	94.08	1.51	25.13	10.54	0.0312	16.64	418.22
Normal	M	29	61.03	231.44	63.57	67.57	69.5	104.66	1.44	30.70	11.90	0.0227	21.32	654.51
Normal	M	49	77.08	208.37	73.35	68.73	65.18	121.83	2.05	65.47	13.55	0.0279	31.94	2090.89
Normal	M	18	70.9	308.78	75.86	78.37	81.05	172.04	1.48	30.15	10.67	0.0195	20.37	614.20
Normal	F	22	49.46	206.08	61.21	61.94	56.98	116.05	1.42	33.82	12.43	0.0232	23.62	805.49
Normal	M	27	125.39	512.98	136.14	128.46	161.38	272.7	2.34	56.99	11.34	0.0172	24.35	1367.97
Normal	F	21	79.66	340.52	83	76.15	99.53	185.28	1.67	41.63	10.63	0.0201	24.93	1037.76
Normal	M	34	74.22	289.78	64.62	82.71	102.22	175.94	1.22	29.44	11.67	0.0144	24.13	710.42
Normal	M	24	52.4	252	60	57.3	77.2	124	2.14	28.66	8.88	0.0428	13.46	388.33
Normal	F	24	70.58	333.52	67.99	70.88	94.63	155.29	2.19	35.85	8.00	0.0378	16.37	586.86
Normal	M	32	56.72	252.22	59.14	62.77	71.3	122.58	1.20	12.13	10.46	0.0203	10.11	122.61
Normal	F	22	103.82	319.45	80.37	86.42	125.75	203.7	0.98	25.15	9.58	0.0122	25.66	645.43
Normal	M	31	72.57	210.37	53.19	64.6	58.92	129.02	1.86	25.65	9.93	0.0368	13.09	335.67
Normal	F	40	47.62	238.7	58.23	65.74	115.79	72.11	1.73	43.77	10.63	0.0297	25.30	1107.41
Normal	M	23	50.62	230.92	57.6	66.21	119.85	81.02	1.75	32.98	10.50	0.0304	18.85	621.53
Normal	M	52	56.79	252.36	59.25	67.99	74.41	141.64	1.40	31.97	9.99	0.0296	22.84	730.06
Normal	M	24	54.4	260.4	75.91	68.38	75.88	139.54	2.14	30.91	12.87	0.0282	14.44	446.46
Normal	M	28	68.96	261.15	79.83	81.64	86.16	149.51	1.83	37.31	12.16	0.0229	20.39	760.68
Normal	M	33	62.44	254.3	65.66	79.66	92.25	149.36	1.87	39.17	10.31	0.0265	20.96	820.48
Normal	F	26	61.28	299.3	70.25	79.27	100.59	162.51	2.00	36.01	9.65	0.0265	19.00	722.27
Normal	F	21	73.79	387.97	71.24	83.14	131.4	197.62	1.79	36.61	8.11	0.0251	20.45	748.77
Normal	M	27	70.53	289.86	47.2	84.29	92.02	177.07	1.69	46.32	6.52	0.0368	27.41	1269.55
Normal	F	43	75.06	273.9	65.31	79.62	94.29	174.42	1.71	46.33	9.37	0.0262	28.26	1365.96
Normal	F	26	73.25	267.69	68.38	85.83	73.75	162.15	2.11	37.49	10.02	0.0318	17.77	666.11
Normal	F	13	67.48	226.24	89.84	75.04	60.82	117.82	2.07	55.93	16.35	0.0319	19.49	1089.95
Normal	M	45	73.78	256.3	59.39	74.66	97.42	152.32	1.31	24.92	9.07	0.0221	18.02	474.05

Normal	F	40	69.2	308.36	71.35	77.85	94.6	173.05	1.62	32.54	9.87	0.0255	17.88	581.79
Normal	F	48	47.69	230.78	74.85	81.22	68.3	125.92	1.64	35.70	13.51	0.0219	21.77	777.13
Normal	F	33	76.68	385.14	78.84	105.78	148.92	245.64	2.15	46.40	8.11	0.0273	21.58	1001.38
Normal	M	41	72.17	241.48	60.83	69.24	71.42	117.68	2.07	36.98	10.63	0.0340	17.88	661.67
Normal	F	18	88.52	285.21	74.86	115.75	107.42	176.77	2.29	53.20	9.55	0.0306	23.23	1235.91
Normal	M	21	87.65	342.55	79.53	106.68	116.75	222.82	1.62	37.09	9.07	0.0204	22.90	848.18
Normal	F	26	70.02	260.83	62.68	80.95	81.65	163.44	1.42	18.28	9.54	0.0227	12.87	235.32
Normal	F	19	65.12	342.15	72.42	89.35	104.28	159.65	2.12	36.88	9.52	0.0293	17.44	645.06
Normal	F	37	48.27	208.26	62.53	67.99	62.8	127.45	1.79	21.62	12.15	0.0286	12.08	281.13
Normal	F	50	109.86	365.58	112.91	107.94	98.64	202.86	1.88	31.98	12.76	0.0175	16.18	517.34
Normal	F	26	92	265.49	75.53	79.26	85.52	154.04	2.34	52.96	11.17	0.0309	22.67	1201.25
Normal	F	31	42.1	206	70.4	59.1	59.1	104	1.44	23.91	14.97	0.0205	16.58	396.43
Normal	F	18	71.59	259.86	61.03	67.87	62.68	122.62	1.62	28.86	10.09	0.0265	16.48	551.71
Normal	F	37	62.3	354.52	91.04	91.48	124.62	196.72	1.85	33.09	10.72	0.0214	17.00	562.67
Normal	F	49	78.7	282.09	79.83	76.4	82.1	158.04	4.06	69.31	11.82	0.0508	17.09	1184.49
Normal	F	22	105.24	350.8	69.12	69.9	129.86	216.99	1.58	30.51	9.88	0.0177	19.31	589.14
Normal	M	27	78.65	297.28	80.17	78.28	94.43	147.39	2.40	40.40	11.55	0.0289	16.85	680.78
Normal	M	34	89.01	336.88	67.05	106.2	128.22	229.63	2.01	24.39	9.78	0.0231	12.16	296.49
Normal	M	31	76.85	272.3	97.91	85.12	96.04	169.29	2.05	41.36	13.97	0.0209	20.18	834.46
Normal	M	26	98.99	356.51	83.67	90.85	139.19	217.67	1.56	37.37	9.26	0.0186	23.96	895.20
Normal	F	32	66.15	298.79	85.58	86.99	100.93	165.82	1.73	33.47	12.25	0.0202	19.35	647.54
Normal	M	37	63.65	247.58	80.1	82.73	64.41	134.1	1.66	30.32	13.52	0.0207	16.27	553.80
Normal	F	26	74.7	274.84	73.85	95.5	98.18	154.64	1.85	54.56	10.58	0.0264	27.87	1526.00
Normal	M	43	63.45	242.48	63.4	63.36	75.36	126.95	1.96	39.45	11.09	0.0310	20.08	792.06
Normal	M	39	48.92	246.31	68.5	68.91	67.12	130.77	1.88	30.30	12.19	0.0274	16.12	488.35
Normal	M	31	102.3	337.23	78.85	88.71	109.58	184.2	2.15	23.19	9.71	0.0269	10.79	250.13
Normal	M	29	65.05	284.12	78.39	80.25	87.29	159.73	1.88	61.03	11.42	0.0240	32.48	1981.20
Normal	F	46	86.14	281.2	56.99	78.41	84.89	145.01	2.23	59.84	8.31	0.0391	26.88	1611.12
Normal	M	19	65.77	316.33	80.69	72.82	115.68	175.47	2.55	33.29	10.82	0.0316	13.05	434.60
Normal	F	23	67.44	286.77	66.49	61.21	69.58	126.92	1.65	22.22	10.87	0.0248	13.47	299.23
Normal	F	19	57.39	248.82	55.97	70.29	63.96	135.13	2.38	68.78	9.72	0.0425	28.90	1587.68

Normal	F	34	49.96	171.17	51.75	75.47	52.99	97.59	1.52	27.51	11.57	0.0294	18.10	497.89
Normal	M	26	86.4	188	52.7	74.8	54.1	117	1.89	34.72	10.13	0.0321	20.54	713.30
Normal	F	33	46.46	203.96	59.74	66.81	62.2	108.33	1.27	30.27	12.25	0.0213	23.83	721.47
Normal	F	30	48.56	188.41	51.33	50.63	48.96	78.35	2.17	32.99	12.43	0.0423	15.21	501.95
Normal	M	28	62.42	189.75	60.42	80.6	59.2	88.85	1.73	58.87	12.31	0.0286	34.03	2003.28
Normal	F	32	54.7	266.7	65.5	64.5	83.1	138.8	2.03	26.47	10.77	0.0310	13.04	345.15
Normal	F	23	43.1	220.8	56.9	89.9	60.2	114.9	1.92	83.79	10.76	0.0337	43.64	3656.65
Normal	M	31	51.0	257.1	58.2	75.9	78.2	139.1	1.54	18.87	9.69	0.0264	12.25	231.22
Normal	M	47	71.14	317.02	75.23	85.47	95	182.33	1.94	48.06	10.02	0.0258	24.78	1191.58
Normal	M	33	61.89	334.76	70.1	66.31	98.9	174.95	1.94	30.19	9.51	0.0277	15.56	469.81
Normal	M	67	73.12	287.99	87.47	82.46	88.67	159.65	1.37	20.10	12.46	0.0157	14.87	294.90
Normal	M	21	69.26	294.2	77.84	67.53	90.06	161.12	1.82	35.00	11.41	0.0234	19.23	673.08
Normal	M	24	84.05	275.82	73.74	71.44	84.53	155.9	2.22	26.46	10.98	0.0301	11.92	315.37
Normal	M	20	69.79	359.13	79.53	105.21	111.28	203.68	1.90	33.78	9.37	0.0239	17.76	600.57
Normal	F	53	72.71	221.39	68.4	101.25	66.02	129.85	2.16	22.44	11.74	0.0311	10.40	233.49
Normal	M	34	76.2	298.56	71.03	85.26	90.85	155.15	1.91	34.31	10.06	0.0269	17.96	616.32
Normal	M	20	79.66	306.32	73.96	82.73	87.98	170.59	1.91	26.98	10.03	0.0258	14.13	381.11
Normal	F	20	55.33	212.5	60.85	67.5	56.66	131.09	1.63	25.51	11.63	0.0268	15.65	399.24
Normal	F	41	52.09	185.33	72.79	67.14	55.3	87.19	1.57	27.74	16.28	0.0216	17.67	480.13
Normal	M	69	47.92	220.84	71.21	70.24	85.09	111.4	2.30	44.41	13.82	0.0323	19.30	857.32
Normal	M	42	50.26	200.96	68.8	83.13	56.8	108.07	1.23	18.01	11.78	0.0208	14.65	264.54
Normal	M	35	63.85	218.86	66.85	73	70.82	118.73	1.62	25.81	12.26	0.0242	15.97	412.16
Normal	F	21	64.86	248.28	76.63	76.07	66.05	144.91	1.51	25.19	12.39	0.0197	16.64	419.16
media		31.632	69.400	273.009	71.090	78.811	86.675	150.345	1.865	35.959	10.971	0.027	19.360	757.701
media		8.494	12.656	45.118	10.490	10.633	19.504	30.568	0.322	10.086	1.386	0.005	4.500	368.848
dev														

TABLA 2

Grupo	Edad (años) Media \pm SD (Rango)	Género (n) Femenino / Masculino	Valoración MMSE Media \pm SD (Rango)
AD (n = 20)	74,0 \pm 7,6 (55-84)	16 / 4	19,6 \pm 6,4 (7-28)
MD (n = 20)	67,7 \pm 7,2 (57-82)	12 / 8	27,2 \pm 2,0 (21-30)
SCI (n = 20)	60,2 \pm 10,4 (40-74)	8 / 12	28,7 \pm 1,3 (25-30)

TABLA 3

Etapas Gradiente	Tiempo (min)	% A	% B	% C	% D
1	0,0	99,0	0,0	0,0	1,0
2	6,0	96,0	0,0	0,0	2,0
3	8,0	90,0	6,0	2,0	2,0
4	12,0	80,0	14,0	3,0	3,0
5	18,0	20,0	74,0	3,0	3,0
6	19,0	20,0	74,0	3,0	3,0
7	20,0	95,0	0,0	2,0	3,0
8	22,0	99,0	0,0	0,0	1,0
9	30,0	99,0	0,0	0,0	1,0

TABLA 4

	AD	MD	SCI	Kruskal-Wallis
TRP [μ g/ml]	10,7 \pm 2,1	10,9 \pm 2,4	12,6 \pm 3,0	$X^2 = 5,507$ $p = 0,064$
KYN [ng/ml]	550,5 \pm 232,8	466,2 \pm 120,2	487,3 \pm 123,3	$X^2 = 1,536$ $p = 0,464$
KYNA [ng/ml]	11,1 \pm 5,6	11,2 \pm 6,0	10,8 \pm 3,8	$X^2 = 0,033$ $p = 0,984$
3-HK [ng/ml]	32,6 \pm 13,0	16,9 \pm 17,5	13,3 \pm 10,5	$X^2 = 20,281$ $p < 0,0001$
Relación 3-HK:TRP	3,16 \pm 1,54	1,81 \pm 2,61	1,11 \pm 0,90	$X^2 = 21,919$ $p < 0,0001$

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar la enfermedad de Alzheimer que comprende la etapa de medir la concentración de 3-hidroxiquinurenina en un fluido corporal seleccionado de entre el grupo consistente en sangre total, suero, plasma y orina, obtenido de un individuo, y valorar la enfermedad de Alzheimer.
- 5 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque además comprende la etapa de medir la concentración de triptófano en dicho fluido corporal, determinándose el ratio por división del valor de la concentración de 3-hidroxiquinurenina x 1.000 entre el valor de la concentración de triptófano en dicho fluido corporal, y valorar la enfermedad de Alzheimer.
- 10 3. Método según la reivindicación 2, donde un individuo que padece la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por un ratio que es dos o superior.
4. Utilización de un ratio determinado por la división del valor de la concentración de 3-hidroxiquinurenina entre el valor de la concentración de triptófano en un fluido corporal como marcador predictivo para la detección de la enfermedad de Alzheimer.

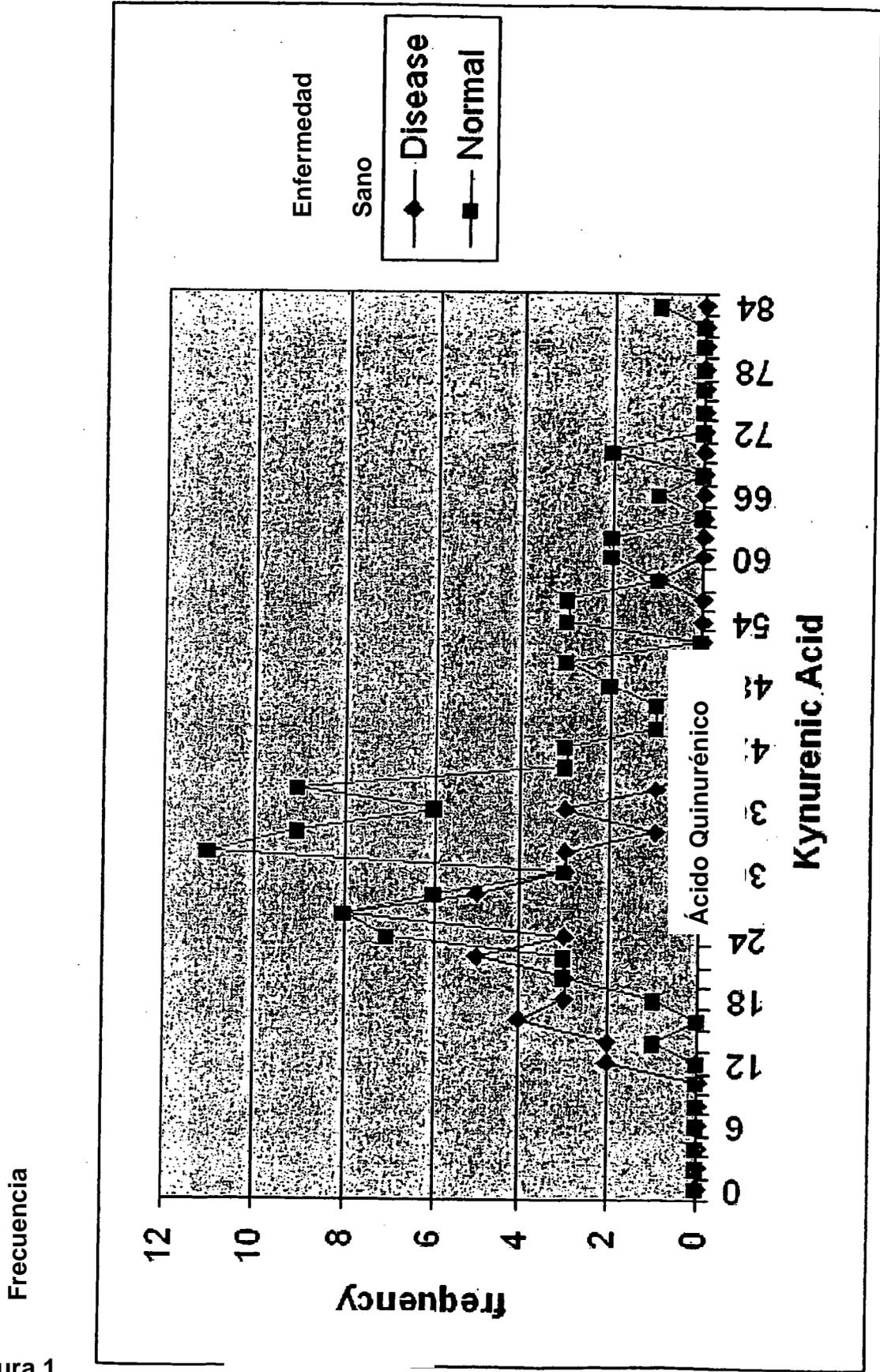


Figura 1

Frecuencia

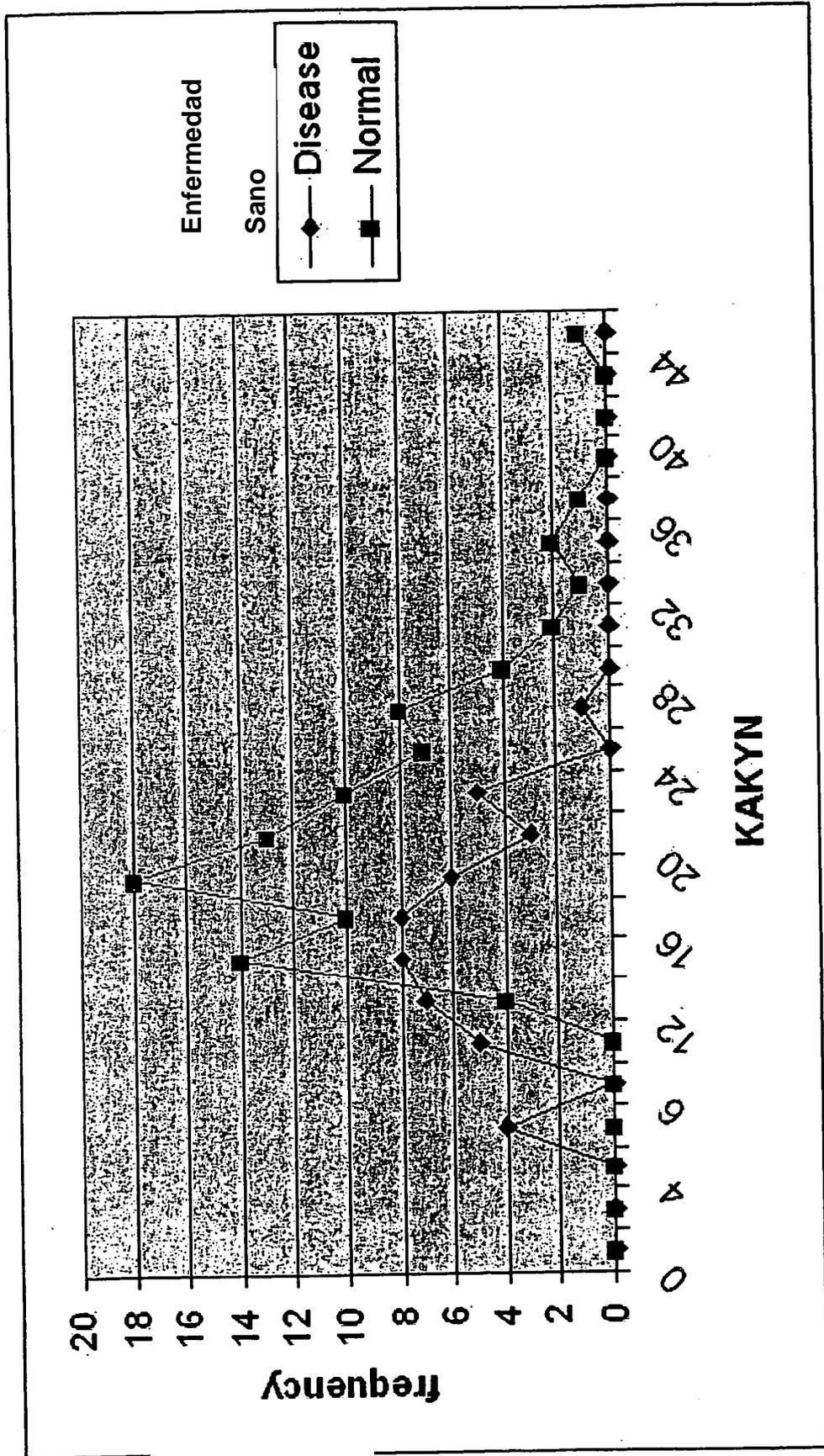


Figura 2

Figura 3

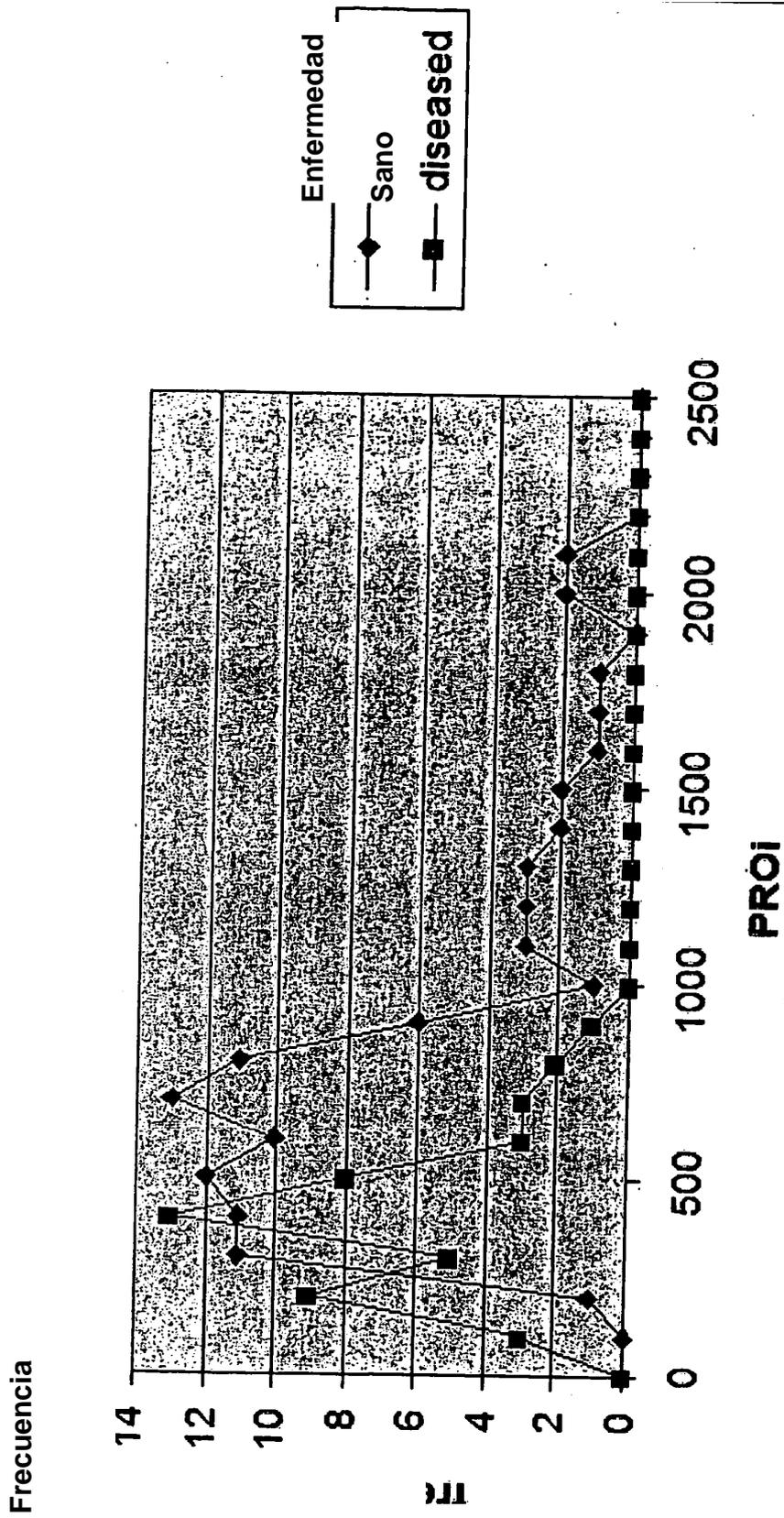


Figura 4

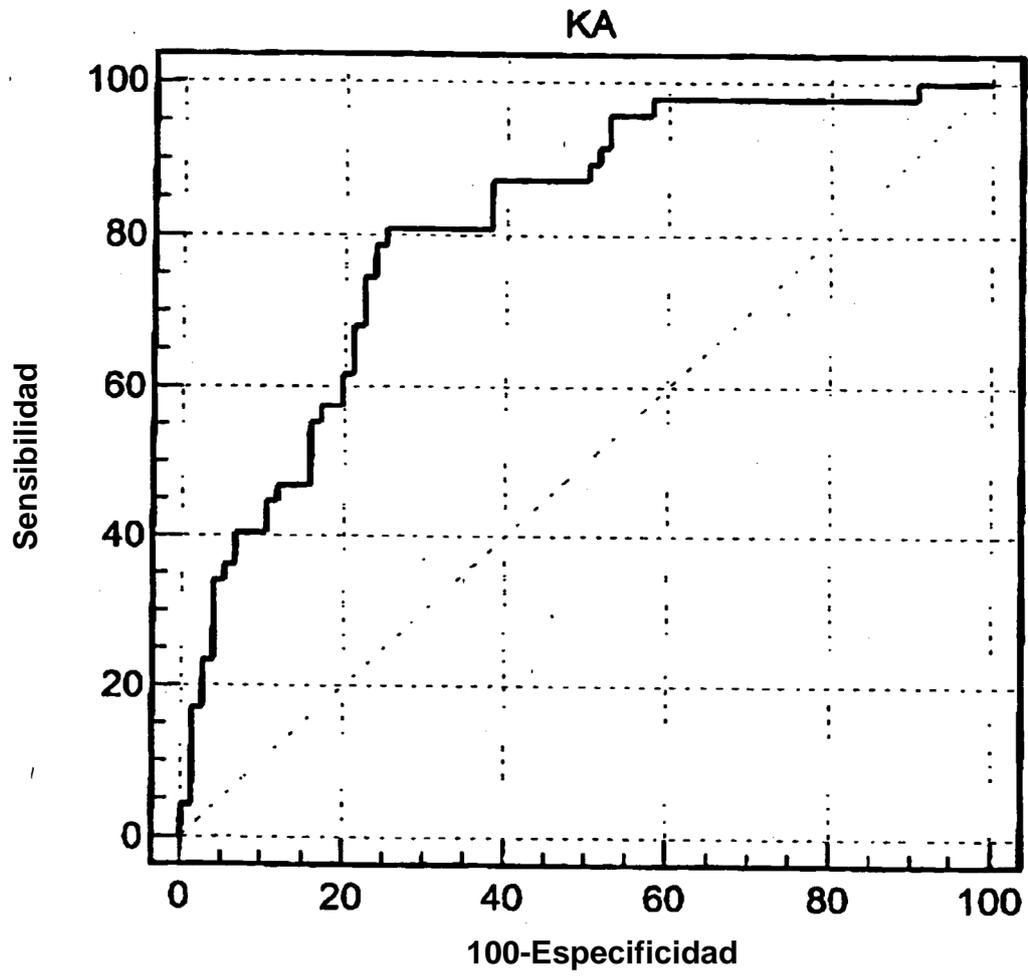


Figura 5

KAKYN2

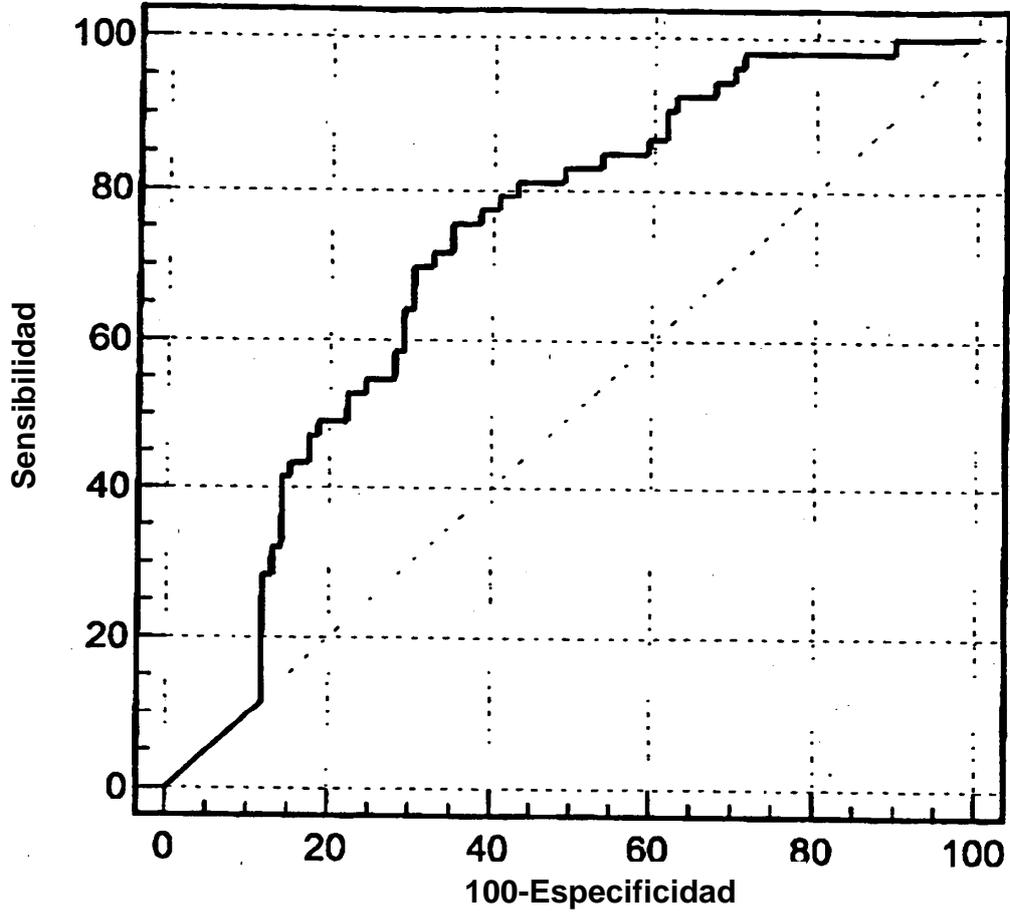


Figura 6

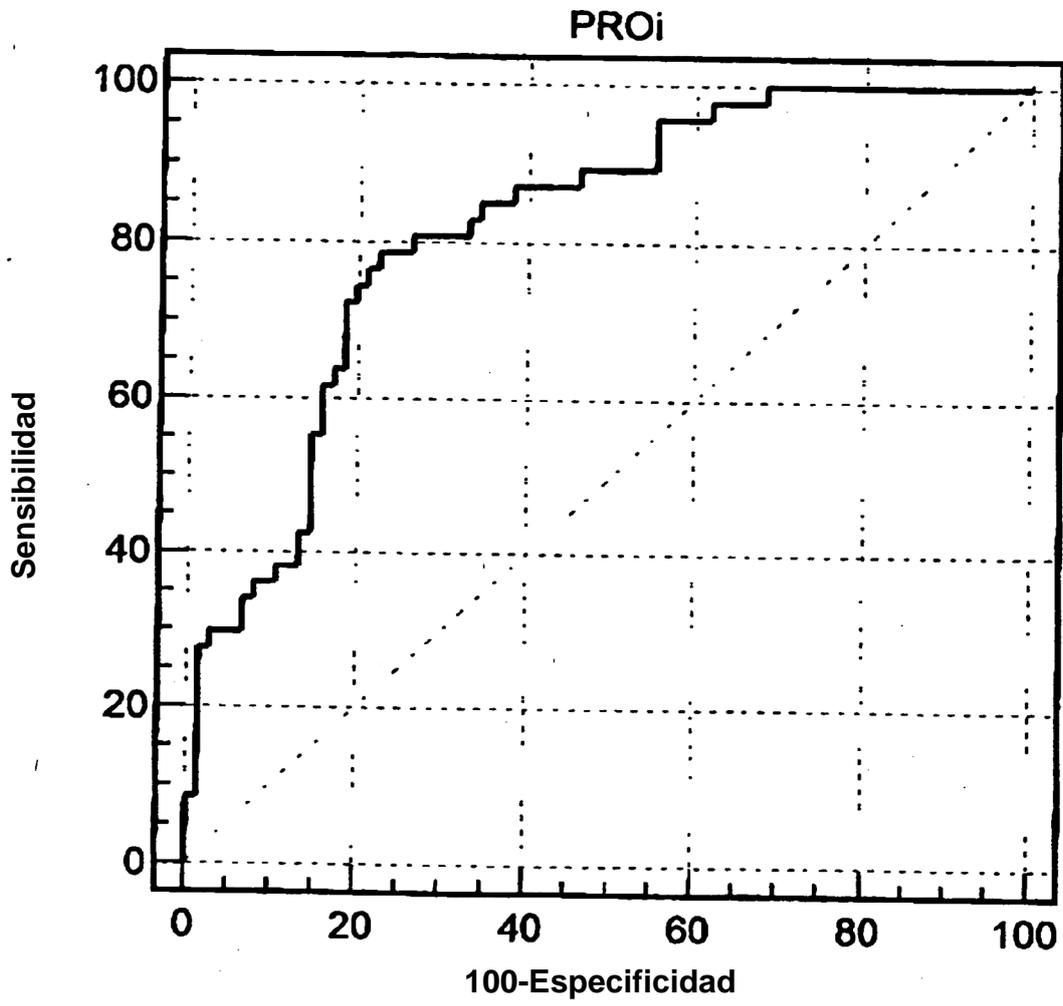


Figura 7

