

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 104**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08745665 .3**  
96 Fecha de presentación: **11.04.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2145187**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.01.2010**

54 Título: **Tinción con ácido peryódico-Schiff y detección en el campo infrarrojo**

30 Prioridad:  
**13.04.2007 US 911688 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.06.2012**

73 Titular/es:  
**AMICUS THERAPEUTICS, INC.  
6 CEDAR BROOK DRIVE  
CRANBURY, NJ 08512, US**

72 Inventor/es:  
**BENJAMIN, Elfrida**

74 Agente/Representante:  
**Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 383 104 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

Tinción con ácido peryódico-Schiff y detección en el campo infrarrojo.

### CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a un nuevo método para cuantificar glucógeno y otros polisacáridos en muestras biológicas utilizando una reacción fluorescente con ácido peryódico-Schiff (PAS) con detección en el campo infrarrojo.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Los polisacáridos son carbohidratos complejos que comprenden polímeros constituidos por muchos monosacáridos unidos entre sí por enlaces glicosídicos. Los polisacáridos incluyen polisacáridos de reserva tales como almidones y glucógeno, y polisacáridos estructurales tales como celulosa, polisacáridos que contienen ácido siálico o grupos de ésteres sulfúricos, y quitina. Los polisacáridos tienen diversas funciones biológicas que incluyen almacenamiento de azúcares a largo plazo (para energía), y soporte estructural y protección a los organismos; la celulosa es un componente principal de las paredes celulares en plantas y bacterias, y la quitina es un componente de las paredes celulares de los hongos y los exoesqueletos de los artrópodos. Los polisacáridos están implicados también en el reconocimiento molecular (antígenos) por las células del sistema inmunitario.

20 El glucógeno es un polisacárido de reserva constituido por glucosa. La mayoría de las unidades de glucosa están unidas por enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1,4, pero aproximadamente 1 de cada 12 residuos de glucosa forma también un enlace  $\alpha$ -1,6-glicosídico con una segunda glucosa, lo cual da como resultado la creación de una ramificación. El glucógeno está presente en una gran diversidad de tejidos, que incluyen piel, hígado, glándulas paratiroides y la musculatura esquelética y cardíaca. La detección del glucógeno se utiliza en situaciones clínicas para la diagnosis de enfermedades que incluyen cáncer, infecciones (hongos, *Chlamydia*), diabetes (Tipo 1), miopatías, enfermedad de almacenamiento de glucógeno (enfermedad de Pompe), y otras glucogenosis. La detección histoquímica del glucógeno se utiliza también para identificar estructuras tales como tejidos conectivos, moco y láminas basales, sustancias corporales amiláceas, cuerpos de poliglucosano y otras sustancias en muestras biológicas, todos los cuales contienen una proporción elevada de macromoléculas de carbohidratos (glucógeno, glucoproteína, proteoglicanos). Específicamente, PAS se utiliza para teñir mucopolisacáridos neutros, tales como los que se encuentran en las glándulas del tracto gastrointestinal y en la próstata; polisacáridos ácidos simples que contienen ácido siálico, tales como los encontrados en las células epiteliales; y polisacáridos ácidos sulfatados complejos tales como los encontrados en los adenocarcinomas.

30 Históricamente, la obtención de imágenes del contenido de polisacáridos, v.g., glucógeno, en células y tejidos se ha medido cualitativamente utilizando la reacción ácido peryódico-Schiff (PAS). PAS tiñe el glucógeno y otras moléculas de polisacáridos basándose en la escisión oxidante inducida por el ácido peryódico de los enlaces carbono-carbono en los glicoles 1,2 para formar dialdehídos que reaccionan con fuchsina-ácido sulfuroso en el reactivo de Schiff (pararosanilina y metabisulfato de sodio) para producir un tinte semejante a magenta (Bancroft y Stevens, *Theory and practice of histological techniques*. Churchill Livingstone, Edinburgo, p. 436-1977). Más recientemente, la técnica PAS se ha combinado con medidas de la densidad óptica, y se ha comparado con las densidades ópticas de estándares externos con concentraciones conocidas de glucógeno, para conversión en valores cuantitativos de glucógeno (Schaart et al., *Histochem Cell Biol.* 2004; 122:161-169).

40 Se ha descrito un método para la tinción de los glóbulos de la sangre con ácido peryódico/saliciloil-hidracina (PA-SH) (Burns et al., *Blood.* 1966; 28:674-682). El método es el de Stoward en el cual soluciones acidificadas de saliciloil-hidracina se conjugan con los dialdehídos formados por la oxidación con ácido peryódico de glicoles vecinales en glucógeno. Se decía que los sitios reactivos emiten fluorescencia de un color azul intenso por exposición a la luz ultravioleta.

45 La medida de la intensidad de fluorescencia es otro enfoque utilizado comúnmente para cuantificar cantidades relativas o absolutas de materiales biológicos seleccionados. La fluorescencia se produce cuando una molécula en un estado excitado (*es decir*, excitado por absorción de radiación EM) emite luz a medida que cae al estado energético inferior. La emisión tiene lugar típicamente a una longitud de onda más larga que la longitud de onda de la radiación excitante absorbida, y se encuentra en el campo visible del espectro electromagnético. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia es directa, puede conseguirse fácilmente con instrumentos que van desde lectores de placas de microtitulación, escáneres de fluorescencia, y microscopios de fluorescencia y confocales. El formato del lector de placas de microtitulación o de escáner de fluorescencia es particularmente adecuado para cuantificación y comparación simultáneas de un gran número de muestras, tal como es necesario en aplicaciones de alta capacidad.

55 La fluorescencia en el infrarrojo próximo es una técnica útil para obtención de imágenes *in vivo*, v.g., para detección de tumores. Este método está basado en el hecho de que el tejido vivo transmite fluorescencia con longitudes de onda en el IR próximo (aproximadamente 700 nm) más eficientemente que el mismo transmite luz con longitudes de onda en el campo visible, debido a penetración incrementada de fotones. Agentes de contraste de fluorescencia tanto orgánicos como inorgánicos están disponibles actualmente para conjugación química a moléculas diana para

obtención de imágenes. Sin embargo, esta técnica es para detección y obtención de imágenes *in vivo* y no se ha empleado para cuantificar material *ex vivo* en muestras biológicas.

La autofluorescencia de la tinción PAS en el campo visible rojo (excitación ~ 540-580 nm; emisión ~ 600-640 nm) ha sido descrita (Changaris et al., *Histochemistry*, 1977; 52:1-15; Schaart et al., *supra*) y se ha utilizado para medida cuantitativa de glucógeno en secciones de hígado (Changaris et al., *supra*). Aunque son útiles, las medidas de fluorescencia en el campo visible están sometidas a un alto ruido debido a la autofluorescencia de los materiales biológicos en el campo visible, y detección deficiente de la penetración de la señal a partir de secciones de tejido gruesas.

Una estrategia utilizada para resolver las limitaciones de las medidas de fluorescencia en el campo visible es la microscopía de obtención de imágenes por fluorescencia (Brenner et al., *J Histochem Cytochem.* 1976, 24:100-11). Este método requiere el ensamblaje y la integración de equipo complejo que incluye una fuente de luz y filtros apropiados para excitación, un microscopio con óptica sensible, foco fino, un control de platina XY para la obtención de imágenes resueltas espacialmente, filtros de emisión, una cámara sensible para captura de las imágenes, y una computadora para control del microscopio, equipada con recogida de imágenes y software de procesamiento para documentación. El enfoque, el posicionamiento XY, la configuración del filtro, la captura y la recogida de imágenes se llevan a cabo independientemente para cada muestra y cada fluoróforo. Se utiliza software de procesamiento de las imágenes para combinar las dos imágenes de cada fluoróforo de una muestra dada a fin de observar la localización espacial de los dos fluoróforos simultáneamente. Esta imagen combinada final es una imagen cualitativa de la distribución espacial de las muestras de fluoróforo. Se utiliza software adicional de cuantificación de imágenes, que está diseñado para seleccionar una región de interés y cuantificar la intensidad de fluorescencia dentro de dicha región para cada fluoróforo, a fin de cuantificar la fluorescencia. Así, la fluorescencia se mide dentro de áreas de células o tejidos de interés, y en una región definida como ruido. Cada medida de fluorescencia se corrige por el tamaño de la región y se sustrae luego el ruido. La resolución espacial y focal exquisita que se consigue con esta metodología permite una detección suficiente de señal a ruido en el campo visible. Sin embargo, este método es tedioso dado que las muestras se convierten en imágenes de una en una, y las imágenes capturadas se procesan y cuantifican también de una en una. A medida que aumenta el número de muestras, y se acrecienta el número de fluoróforos que se convierten en imágenes para cada muestra, el tiempo de adquisición y procesamiento de los datos se incrementan proporcionalmente, reduciéndose asimismo proporcionalmente la capacidad.

De acuerdo con ello, persiste la necesidad en la técnica de un método mejorado para cuantificar polisacáridos, particularmente glucógeno, en muestras biológicas.

### **SUMARIO DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona un método para detectar polisacáridos en una muestra biológica utilizando la tinción Ácido Peryódico-Schiff seguida por detección cuantitativa en el campo IR.

En una realización, la detección se realiza a una longitud de onda comprendida en un intervalo de aproximadamente 700 nM a 800 nM. En una realización específica, la detección se realiza a una longitud de onda de aproximadamente 800 nM.

En una realización adicional, el polisacárido es glucógeno.

En algunos aspectos de la invención, la muestra biológica se deriva de un humano o animal.

En una realización específica, la muestra biológica se deriva de un individuo humano que padece o se sospecha que padece una enfermedad de almacenamiento de glucógeno que incluye, pero sin carácter limitante, enfermedad de Pompe (con inclusión de enfermedad de Pompe de aparición en la infancia); enfermedad de Cori's-Forbes; enfermedad de Andersen; enfermedad de Tauri; enfermedad de McArdle; deficiencia de fosforilasa-b-quinasa (glucogenosis tipo VIII); Deficiencia de Ramificación del Glucógeno de los equinos; deficiencia de la isoforma A de fosfoglicerato-quinasa (glucogenosis IX); deficiencia en fosfoglicerato-mutasa M (glucogenosis Tipo X); deficiencia en triosafosfat-isomerasa (TIM); glucogenosis pulmonar intersticial; nefropatía diabética; y enfermedad de Lafora (epilepsia mioclónica).

En un aspecto de la presente invención, la muestra biológica aislada está constituida por células o tejido.

En un aspecto adicional, el tejido se selecciona del grupo constituido por piel, hígado, riñón, corazón, cerebro, o musculo esquelético.

La presente invención se refiere adicionalmente a la cuantificación del nivel de polisacáridos presente en la muestra biológica por comparación de la cantidad de luz emitida con la emitida por estándares de cantidades conocidas de polisacáridos.

La presente invención proporciona también un método de monitorización de la eficacia del tratamiento en un individuo que se está tratando por una enfermedad de almacenamiento de glucógeno por

- i) detección del glucógeno en una primera muestra biológica obtenida del individuo antes de la aparición del tratamiento de acuerdo con el método de la reivindicación 1;
- ii) detección de glucógeno en una segunda muestra biológica derivada del individuo después de la aparición del tratamiento de acuerdo con el método de la reivindicación 1;
- 5 iii) cuantificación de los niveles de glucógeno en las dos muestras; y
- iv) comparación del nivel de glucógeno en la primera muestra con el nivel de glucógeno en la segunda muestra, donde una reducción del nivel de glucógeno es indicativa de que el tratamiento es eficaz.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

10 Esta solicitud de patente contiene al menos un dibujo realizado en color. Copias de la publicación de esta patente o solicitud de patente con uno o más dibujos en color serán proporcionadas por la Oficina a petición y después del pago de los honorarios correspondientes.

**Figura 1.** La Figura 1 representa una curva de concentración de la tinción y detección PAS en el campo del infrarrojo próximo a 700 nM (**1A**) y 800 nM (**1B**) utilizando dos líneas de células de Pompe, una de aparición en la edad adulta y una de aparición en la infancia (PM-11 y PM-12, respectivamente), y un control normal de fibroblastos.

15 **Figura 2.** La Figura 2 representa la tinción PAS de células PM-12 con detección en el campo IR a 800 nM en presencia de diastasa.

**Figura 3.** La Figura 3 representa la obtención de imágenes fluorescentes de CRL-2076 (**3A**) de control y PM-12 (**3B**) con detección en el campo visible.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

20 Se proporciona un nuevo método para cuantificación del contenido de glucógeno de células o tejidos utilizando tinción PAS combinada con detección de fluorescencia IR. La fluorescencia IR es fácilmente cuantificable, exhibe una ratio excelente de señal a ruido, penetración excelente de la fluorescencia en secciones de tejido gruesas, e idoneidad para aplicaciones de alta capacidad. La detección de la fluorescencia IR y cuantificación del glucógeno utilizando PAS es superior a los métodos disponibles actualmente para cuantificación del contenido de glucógeno de

25 células o tejidos teñidos.

Hasta la fecha no se ha descrito la detección de las emisiones de luz en el campo IR para cuantificación de muestras teñidas con PAS. Nettleton et al. (*Stain Technology*, 1977; 42:63-77) describen el uso de espectroscopia de absorción en el infrarrojo para identificar la composición molecular de productos de reacción producidos por PAS, utilizando glucógeno como sustancia reaccionante. La espectroscopia IR es la medida de la longitud de onda e intensidad de la absorción de luz infrarroja media por una muestra química. La espectroscopia de absorción IR está basada en la capacidad de las moléculas para absorber la radiación IR. Esta absorción de energía (fotones) hace que las moléculas pasen a un estado de energía más alto, en el cual las mismas vibran o entran en rotación. Las vibraciones o rotaciones dentro de una molécula causan un cambio neto en el momento dipolar de la molécula, cambio que puede medirse utilizando espectrómetros infrarrojos. Las frecuencias a las que se producen las absorciones de reacción IR ("picos" o "señales") pueden correlacionarse directamente con los enlaces en el compuesto que se analiza. Cada molécula tendrá un espectro IR exclusivo.

30

35

Yano describe el uso de la espectroscopia de absorción infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) para evaluación de los niveles de glucógeno en tejidos de carcinoma humanos (*Trends in Analytical Science*, 1997; 1:1-20). Sin embargo, análogamente a Nettleton, éste es un método que depende de la identificación de hidrocarburos (que representan glucógeno) al nivel molecular utilizando espectroscopia de absorción IR.

40

En contraste, la presente invención se refiere a la detección y/o medida cuantitativa de los niveles de glucógeno en muestras biológicas utilizando fluorescencia IR. La autofluorescencia de materiales biológicos es significativamente menor en el campo infrarrojo (Frangioni JV., *Curr Opin Chem Biol*. 2003; 7:626-634; Ohnishi et al., *Am J Transplant*. 2006; 6:2321-31). Como se ha indicado arriba, la fluorescencia es la emisión de luz a una longitud de onda más larga que la longitud de onda de la energía de excitación absorbida. La diferencia en longitud de onda entre la absorbancia pico y la emisión pico es el Desplazamiento de Stokes. Este método difiere de la espectroscopia de absorbancia IR, anterior, que requiere que la frecuencia de la radiación infrarroja que pasa a través de una sustancia molecular sea igual a, o esté en resonancia con, una frecuencia de dos átomos unidos que vibran. Dicho de otro modo, en la espectroscopia de absorbancia, la cantidad de luz transmitida se mide a la misma longitud de onda que la radiación absorbida, y la cantidad de luz transmitida es inversamente proporcional a la cantidad de luz absorbida.

45

50

La presente invención demuestra que la luz fluorescente detectada en el campo IR es superior a la detección en el campo visible para cuantificación del contenido de polisacáridos en muestras biológicas. Esto está en contraste con muchos sistemas de obtención de imágenes fluorescentes, que contienen filtros para prevenir la transmisión de la luz infrarroja debido a que únicamente se desea la luz visible.

## Definiciones

El término "infrarrojo" cubre el campo de radiación electromagnética (EM) con longitudes de onda comprendidas entre aproximadamente 700 nm y 1 mm). Esto está en contraste con el campo rojo visible que emite en la zona de 600-640 nm. En una realización de la presente invención, la longitud de onda IR utilizada para detectar fluorescencia está comprendida entre aproximadamente 700 nm y 800 nm. En otra realización, la longitud de onda es aproximadamente 800 nm.

"Fluorescencia" es el fenómeno por el cual es absorbida energía luminosa ("luz excitante") por una molécula dando como resultado que la molécula "se excite". Después de un intervalo previamente descrito, la energía luminosa absorbida es emitida por la molécula excitada. La longitud de onda de la luz emitida se encuentra típicamente en una longitud de onda más larga que la luz excitante. A esta luz emitida se hace referencia como luz fluorescente. A una molécula que exhibe fluorescencia se hace referencia como un "fluoróforo". La relación entre longitudes de onda de la luz y grado de excitación de un fluoróforo dado a dicha longitud de onda se describe por el "espectro de excitación" del fluoróforo. El espectro de excitación se conoce también como el campo de longitud de onda de excitación. La relación entre la longitud de onda de la luz y la intensidad de la emisión de fluorescencia a dicha longitud de onda se describe por el espectro de emisión o espectro de fluorescencia del fluoróforo. El espectro de emisión se conoce también como el campo de longitud de onda emitida. El máximo de excitación es la longitud de onda de la luz excitante para la cual la fluorescencia del fluoróforo alcanza la intensidad máxima. El máximo de emisión es la longitud de onda de la luz emitida por el fluoróforo excitado cuando su fluorescencia alcanza la intensidad máxima.

Como se utiliza en esta memoria, los términos "glucogenosis" o "glucogenosis" o "enfermedad de almacenamiento de glucógeno" se refieren a enfermedades o patologías caracterizadas por una acumulación anormal de glucógeno en los tejidos. Tales enfermedades o patologías incluyen, pero sin carácter limitante, las siguientes: enfermedad de Pompe (deficiencia en maltasa ácida; glucogenosis tipo II); deficiencia de Debrancher (enfermedad de Cori's-Forbes; glucogenosis tipo III); deficiencia de ramificación (glucogenosis tipo IV; enfermedad de Andersen); deficiencia de la isoforma M de fosfofructoquinasa (enfermedad de Tauri; glucogenosis tipo VII); deficiencia de fosforilasa b-quinasa (glucogenosis tipo VIII); deficiencia en la isoforma A de fosfoglicerato-quinasa (glucogenosis IX); deficiencia en fosfoglicerato-mutasa M (glucogenosis Tipo X).

Otras enfermedades que se caracterizan por niveles elevados de glucógeno debidos a deficiencias enzimáticas incluyen deficiencia en trisafosfato-isomerasa (TIM); glucogenosis pulmonar intersticial; nefropatía diabética; y enfermedad de Lafora (epilepsia mioclónica).

El término "muestra biológica" hace referencia a células o tejidos aislados de un humano, animal, o insecto, incluso post-mortem, que se utiliza(n) en un ensayo para procedimientos de diagnóstico, pronóstico, o histológicos. De acuerdo con la presente invención, las muestras biológicas pueden proceder de cualquier célula o tejido de un humano, animal, o insecto, pero se derivan especialmente del riñón, hígado, cerebro, y músculo esquelético. En una realización específica, la muestra biológica es un tejido constituido por varios tipos de células.

El término "individuo" se refiere a cualquier organismo eucariota vivo con inclusión de humanos, animales, e insectos, del cual puede obtenerse una muestra biológica. En una realización, el individuo es un mamífero, particularmente un humano, caballo, o ratón. En otra realización, el individuo es un animal no mamífero tal como una codorniz.

El término "tratamiento eficaz" se refiere a un tratamiento administrado a un individuo que se encuentra en necesidad de dicho tratamiento, y que da como resultado una mejora en, mejoramiento o prevención de uno o más síntomas clínicos, o mejora o inversión de uno o más marcadores clínicos sustitutivos que pueden ser indicadores de la patología de la enfermedad. En una realización, el individuo sufre la enfermedad de Pompe de aparición en la infancia, y el marcador clínico sustitutivo es acumulación de glucógeno en los tejidos, donde una reducción en la acumulación de glucógeno indica que el tratamiento es eficaz.

Los términos "del orden de" y "aproximadamente" significarán por regla general un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las medidas. Grados ilustrativos típicos de error están comprendidos dentro de 20 por ciento (%), preferiblemente dentro de 10%, y más preferiblemente dentro de 5% de un valor o intervalo de valores dado. Alternativamente, y en particular en los sistemas biológicos, los términos "del orden de" y "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de un factor 5 y más preferiblemente dentro de un factor 2 de un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en esta memoria son aproximadas a no ser que se indique otra cosa, lo que significa que el término "del orden de" o "aproximadamente" puede deducirse cuando no se cita expresamente.

El término "purificado", como se utiliza en esta memoria, se refiere a material tal como una célula, que ha sido aislado en condiciones que reducen o eliminan los materiales no afines, *es decir*, contaminantes. Por ejemplo, una célula purificada está con preferencia sustancialmente exenta de otros tipos de células con los cuales la misma está asociada a un tejido. Como se utiliza en esta memoria, el término "sustancialmente exento" se utiliza operativamente, en el contexto de los tests analíticos del material. Preferiblemente, el material purificado sustancialmente exento de contaminantes tiene una pureza de al menos 50%; más preferiblemente, una pureza de al menos 90%, y más preferiblemente todavía una pureza de al menos 99%. La pureza puede evaluarse por medios convencionales, v.g. cro-

matografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de la composición, ensayo biológico, y otros métodos conocidos en la técnica.

### Aplicaciones

5 Como se ha indicado arriba, la cuantificación de glucógeno y otros polisacáridos en tejidos biológicos se utiliza para multitud de propósitos de diagnóstico y pronóstico, y también para análisis histológico de muestras biológicas para fines de investigación. Algunos ejemplos no limitantes se describen a continuación.

10 **Enfermedad de Pompe.** La enfermedad de Pompe (deficiencia en maltasa ácida) está causada por una deficiencia en la enzima  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA). GAA metaboliza el glucógeno, una forma de reserva de azúcar utilizada para energía, en glucosa. La acumulación de glucógeno conduce a miopatía muscular progresiva en todo el cuerpo, que afecta a diversos tejidos corporales, particularmente el corazón, los músculos esqueléticos, el hígado, y el sistema nervioso. De acuerdo con el National Institute of Neurological Disorders and Stroke, la enfermedad de Pompe se estima que aparece en aproximadamente 1 de cada 40.000 partos.

15 Existen tres tipos reconocidos de enfermedad de Pompe - de aparición infantil, juvenil, y adulta (Hirschhorn y Reuser, en: Scriver CR, Beaudet AL, Sly W, Valle D, editores. The metabolic and molecular bases of inherited disease. Vol. III. Nueva York: McGraw-Hill; 2001. p. 3389-420., 2001: 3389-3420). La infantil era más grave, y se presenta con síntomas que incluyen falta grave de tono muscular, debilidad, hígado y corazón dilatados, y cardiomiopatía. La deglución puede resultar difícil y la lengua puede sobresalir y llegar a dilatarse. La mayoría de los niños mueren por complicaciones respiratorias o cardíacas antes de la edad de 2 años, aunque un subconjunto de pacientes de aparición infantil viven más tiempo (pacientes infantiles no clásicos). La enfermedad de Pompe de aparición juvenil se presenta por primera vez en la infancia temprana a tardía e incluye debilidad progresiva de los músculos respiratorios en el tronco, el diafragma, y las extremidades inferiores, así como intolerancia al ejercicio. La mayoría de los pacientes de Pompe de aparición juvenil no viven más allá de la segunda o tercera década de vida. Los síntomas de aparición en la edad adulta implican debilidad muscular generalizada y atrofia de los músculos respiratorios en el tronco, las extremidades inferiores, y el diafragma. Algunos pacientes adultos no presentan los síntomas o limitaciones motoras principales.

20 A no ser que se trate de detección infantil o se identifique durante el escrutinio pre-natal, el diagnóstico de la enfermedad de Pompe es un problema. El diagnóstico del Pompe de aparición en la edad adulta es aún más difícil dado que el número, gravedad y tipo de los síntomas que experimenta un paciente varían ampliamente, y pueden sugerir trastornos más comunes tales como distrofias musculares. El diagnóstico se confirma por medida de la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa y/o detección de niveles patológicos de glucógeno de muestras biológicas. En la actualidad, la única terapia aprobada es una terapia de reemplazamiento enzimático con  $\alpha$ -glucosidasa recombinante.

30 La enfermedad de Pompe es una de varias patologías del glucógeno. Otras incluyen deficiencia de Debrancher (enfermedad de Cori's-Forbes; glucogenosis tipo III); deficiencia de ramificación (glucogenosis tipo IV; enfermedad de Andersen), miofosforilasa (enfermedad de McArdle; enfermedad de almacenamiento de glucógeno V); deficiencia de la isoforma M de fosfofructoquinasa (enfermedad de Tauri; glucogenosis tipo VII); deficiencia de fosforilasa b-quinasa (glucogenosis tipo VIII); deficiencia de isoforma A de fosfoglicerato-quinasa (glucogenosis IX); deficiencia de fosfoglicerato-mutasa M (glucogenosis Tipo X).

40 **Diabetes mellitus.** La diabetes mellitus deficientemente controlada da como resultado hepatopatía glucogénica (acumulación en las células parenquimáticas del hígado) y nefropatía (glomérulos) debidos a la acumulación de glucógeno.

45 **Miopatía de almacenamiento de polisacáridos.** La miopatía de almacenamiento de polisacáridos es una afección neuromuscular encontrada en los pacientes de Deficiencia de la Enzima de Ramificación del Glucógeno (Enfermedad de Almacenamiento de Glucógeno IV; Síndrome de Rabdomiólisis de los Equinos), que incluyen caballos Quarter Americanos y razas afines. En los caballos afectados, se ha encontrado que hasta el 40% de las fibras musculares de tipo II presentan una inclusión de mucopolisacárido ácido constituido en su mayoría por glucógeno. Esto da como resultado intolerancia al ejercicio, particularmente a velocidades altas. La acumulación anormal es debida típicamente a una mutación en la enzima 1 de ramificación del glucógeno (GBE1). Las biopsias quirúrgicas o musculares con aguja que se tiñen por PAS o se tiñen para detectar el aumento de ubiquitina proporcionarían una diagnosis definitiva (Valentine et al., *Vet Pathol.* 2006; 43:270-275).

50 En los humanos, los individuos con deficiencias en la Enzima de Ramificación del Glucógeno padecen la enfermedad de Andersen. En la mayoría de los individuos afectados, los síntomas y hallazgos se hacen evidentes en los primeros meses de vida. Tales características incluyen típicamente fallo del crecimiento y aumento de peso a la tasa esperada (fallo del desarrollo) y dilatación anormal del hígado y el bazo (hepatoesplenomegalia). En tales casos, el curso de la enfermedad se caracteriza típicamente por aparición progresiva de escaras (cirrosis) en el hígado (hepáticas) e insuficiencia hepática, que conduce a complicaciones potencialmente amenazantes para la vida.

55 **Infecciones de parásitos.** Muchos parásitos, especialmente hongos, almacenan alimento en forma de glucógeno y pueden diagnosticarse así utilizando el método de la presente invención. Como un ejemplo, los hongos filamentosos

- (dermatofitos) causan infecciones en la piel, las uñas y el cuero cabelludo y constituyen alrededor de 30 de las aproximadamente 55 especies de hongos consideradas como patógenas para el hombre. Éstas incluyen *Tinea capitis*, *Tinea corporis*, *Tinea barbae*, *Tinea pedis* (pie de atleta), *Tinea unguium*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, y *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenckii*, la forma de levadura de *Paracoccidioides brasiliensis*, y onicomycosis (hongo de las uñas).
- Las micosis sistémicas con organismos tales como *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* pueden causar infecciones amenazantes para la vida en humanos y animales, especialmente en los individuos que padecen inmunosupresión. El *Aspergillus* patógeno plantea también un riesgo grave para los individuos inmunodeficientes.
- Otros parásitos que producen glucógeno son bacterias y protozoos parásitos, e incluyen *Toxoplasma gondii* (Guimaraes et al., *Mem. Inst Oswaldo Cruz.* oct. 2003; 98(7): 915-7); *Tropheryma whipplei* (enfermedad de Whipple; Deriban et al., *Curr Med Chem.* 2006; 13 (24):2921-6); *Entamoeba histolytica* y helmintos parásitos tales como los Trematodos *Digenean*, las tenias (Cestodos) y las lombrices intestinales (Nematodos). La enfermedad de Whipple está causada especialmente por una bacteria resistente al cultivo y la diagnosis tiene que realizarse por tanto por análisis histológico.
- 15 Defectos del ciclo de la urea.** Recientemente, se ha descubierto que la acumulación de glucógeno en los hepatocitos en la enzima del ciclo de la urea se asemeja a la observada en la enfermedad de almacenamiento de glucógeno. Sin embargo, la acumulación en los pacientes de defectos de la enzima del ciclo de la urea podría distinguirse en la mayoría de los casos por una falta de uniformidad de distribución y/o por la ausencia de compresión sinusoidal por los hepatocitos expandidos (Miles et al., *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005; 40(4): 471-6).
- 20 Cáncer.** Niveles elevados de glucógeno o polisacáridos mucinosos son característicos de cánceres tales como lipoma condroide, cáncer colorrectal y otros carcinomas (v.g., cerebro, mama, pulmón, riñón). En los carcinomas colorectales, se ha demostrado utilizando tinción PAS que algunas de las células malignas producen siempre mucina PAS-positiva (Lushbaugh et al., *Digestive Diseases and Sciences.* 1985; 30: 119S-125S; Patente U.S. 6.187.591). En otro estudio, se demostró que los niveles de glucógeno eran máximos en tumores colorrectales con una elevada proporción de células en G1, y disminuían con la progresión a fase S. Takahashi et al., *J. Gastroenterology*, 1999; 34:474-80. El carcinoma de células claras ricas en glucógeno de la mama se caracteriza también como un carcinoma en el cual más del 90% de las células neoplásticas tienen un citoplasma claro abundante que contiene material PAS-positivo lábil a las diastasas, consistente con el glucógeno.
- Histológicamente, los linfomas condroides se caracterizan por la presencia de células que se asemejan a condroblastos y lipoblastos, tejido adiposo maduro, y matriz mixoide. Los mismos tienen núcleos irregulares rodeados por citoplasma claro y vacuolado. Puede demostrarse que las vacuolas contienen lípido utilizando el tinte de aceite rojo O, y glucógeno utilizando el tinte PAS.
- Se encuentra también glucógeno en tumores tales como tumores de las células de los islotes pancreáticos (Ladriere et al., *Diabetes Research*, 2003; 37: 9-14; carcinomas adenocarcinomas del cuello uterino (Fugiwara et al., *Cancer*, 1995; 76-1591-1600; y en astrocitoma anaplástico, glioblastoma multiforme (Kotonski et al., *Acta Biochim Pol.* 2001; 48(4): 1085-90).
- 40 Esófago de Barrett.** El esófago de Barrett es una afección en la cual el esófago, el tubo muscular que lleva los alimentos y la saliva desde la boca al estómago, cambia de tal manera que parte de su revestimiento se reemplaza por un tipo de tejido similar al encontrado normalmente en el intestino. El riesgo de desarrollo de adenocarcinoma esofágico es 30 a 125 veces mayor en las personas que padecen esófago de Barrett que en el resto de las personas. El contenido disminuido o ausente de glucógeno es indicativo de esófago de Barrett o carcinoma precoz de células escamosas del esófago.
- La acantosis glucogénica es otra afección esofágica que afecta a las personas de edad avanzada. En la acantosis glucogénica, se acumula glucógeno citoplásmico en el revestimiento de las células epiteliales escamosas del esófago, lo que causa un engrosamiento semejante a placas focales de la mucosa. La acantosis glucogénica puede manifestarse en estudios de doble contraste como nódulos o placas múltiples pequeñas.
- 50 Epilepsia mioclónica progresiva.** Conocida también como enfermedad de Lafora, este tipo de epilepsia se caracteriza por inclusiones neuronales de poliglucosano, que da como resultado ataques mioclónicos y/o alucinaciones. Los cuerpos de inclusión intracelulares de poliglucosano, denominados cuerpos de Lafora, se asemejan a glucógeno con ramificación reducida, lo que sugiere una alteración en el metabolismo del glucógeno (Fernández-Sánchez et al., *Human Molecular Genetics*, 2003; 12:3161-3171). La proteína laforina es una fosfatasa que contiene un dominio de fijación de carbohidratos. La laforina interacciona con otra fosfatasa, R5, su sustrato, glucógeno-sintasa, y glucógeno intracelular para formar un complejo multiproteínico asociado con partículas de glucógeno intracelulares.
- 55 Infertilidad.** El glucógeno disminuido en las biopsias endometriales puede ser indicativo de defecto de la fase luteínica (Zawar et al., *Indian J Pathol Microbiol.* 2003; 46(4): 630-3). La hormona luteinizante y la hormona estimulante de los folículos son hormonas glicopeptídicas; las células que contienen estas hormonas almacenadas en sus vacuolas secretoras se tiñen positivamente con PAS.

**Carcinogenicidad.** Estudios recientes han demostrado que el ácido dicloroacético (DCA), un subproducto de la cloración de los suministros públicos de agua, es carcinógeno tanto en ratas como en ratones. La evaluación del agua potable utilizando medaka japonés (*Oryzias latipes*), un modelo de pez pequeño y bien caracterizado, está siendo utilizada cada vez más para tests de carcinogenicidad debido a su bajo coste, facilidad de mantenimiento y sensibilidad a los cancerígenos. A concentraciones bajas de exposición a DCA, los cambios en el hígado incluían vacuolación citoplásmica hepatocelular acusada, citomegalia, cariomegalia, atipia nuclear y áreas multifocales de necrosis y pérdida hepatocelular tan temprana como en la semana 2 de la exposición a DCA. Por tinción con ácido peryódico-Schiff (PAS) se demostró que la mayoría de las vacuolas citoplásmicas hepatocelulares contienen grandes cantidades de glucógeno. Estos elevados niveles de glucógeno pueden reflejar una disrupción en los caminos enzimáticos para la glicólisis.

**Medicina forense.** Se sabe desde hace mucho tiempo que las reservas hepáticas de glucógeno disminuyen con la inanición, traumatismos, estrés agudo, y choque, y pueden evaluarse utilizando biopsias hepáticas post-mortem. Thogmartin et al., *Am J Forensic Med Pathol.* 2001; 22(3): 313-8.

Adicionalmente, la polineuropatía alcohólica se caracteriza por degeneración de neuronas gigantes en ganglios simpáticos que, en la autopsia, se demostró que están llenos con material eosinófilo positivo en la reacción ácido peryódico-Schiff.

**Monitorización de la Contaminación.** Se ha utilizado PAS para detectar contaminación bacteriana en alimentos tales como leche (Moats, *J Bacteriol.* 1959; 78(4): 589-593) y aves de corral; en cosméticos tales como lociones (Bernd et al., *Annals of Internal Medicine*, 1996; 125: 799-806); en soluciones de lentes de contacto con, v.g., *Acantamoeba keratitis* (Awwad et al., *Eye & Contact Lents: Science & Clinical Practice.* 2007, 33(1): 1-8); y en contaminación de agua con microorganismos (con inclusión de agua freática, agua potable, y agua de ríos y lagos).

### Ensayos

Para la práctica, se siembran células (v.g., fibroblastos) en cubreobjetos o placas de microtitulación. Los cubreobjetos y las placas de microtitulación pueden tratarse con cultivo de tejido, o recubrirse con fibronectina u otra molécula de adhesión similar. Después de ello, las células se fijan en formaldehído al 3,7% en PBS durante 0,5 h a la temperatura ambiente, y se lavan luego con agua desionizada durante aproximadamente un minuto. Se realiza luego la tinción PAS. Resumidamente, las células se tratan durante aproximadamente 5 minutos con ácido peryódico al 1%, seguido por lavado durante un minuto en agua del grifo, seguido por un enjuagado en agua purificada y desionizada (v.g., agua mili-Q). Se aplica luego el reactivo de Schiff (1% pararosanilina, 4% metabisulfito de sodio, y 0,25 mol/l de ácido clorhídrico) y las secciones se incuban durante aproximadamente 15 minutos a la temperatura ambiente. A continuación se realiza otro lavado en agua mili-Q, seguido por enjuagado durante aproximadamente 10 minutos con agua del grifo. Cuando se utilizan células en una placa de microtitulación, la placa debería secarse durante una noche antes del análisis. Como control negativo, las células se tratan previamente con diastasa, que desintegra el glucógeno y lo hace indetectable utilizando PAS.

Un enfoque para secciones de tejidos implica la cosecha de un fragmento reciente de tejido orgánico (v.g., hígado, corazón, etc.). El tejido se fija luego en formaldehído al 3,7% en etanol al 90% a la temperatura ambiente durante una noche. El tejido se incrusta luego en parafina, se corta a un espesor de 5 µm, y se monta luego en un portaobjetos de vidrio. Las secciones se desparafinan en xileno, y se rehidratan en una serie graduada de etanol hasta una solución final de 100% agua. Para el tratamiento con diastasa, las secciones se incuban con diastasa al 0,5% en agua desionizada a la temperatura ambiente durante 20 minutos. Los portaobjetos se lavan luego en agua desionizada. Después de ello, se realiza seguidamente la tinción PAS. Los portaobjetos se sumergen en ácido peryódico al 1% durante 5 min a la temperatura ambiente. Los portaobjetos se enjuagan luego varias veces en agua desionizada. Después de ello, se sumergen los portaobjetos en reactivo de Schiff durante 15 min a la temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavan en agua corriente del grifo durante 5 minutos, se secan luego a la temperatura ambiente o se rehidratan a través de una serie graduada de etanol. Se aplica luego un cubreobjetos al portaobjetos con medio de montaje basado en xileno.

La fluorescencia puede medirse en un escáner IR basado en láser, tal como Odyssey®, fabricado por LiCor, Inc.

Este enfoque puede prolongarse para cuantificar cantidades absolutas de glucógeno en células y tejidos por combinación de tinción PAS de diversas concentraciones de un estándar externo de glucógeno, y cuantificación de la fluorescencia IR emitida por las concentraciones estándar. Puede realizarse un análisis *de regresión lineal o no lineal* sobre los datos de la curva estándar, y puede utilizarse la línea o curva teórica para calcular los valores absolutos de glucógeno de las muestras teñidas con PAS y medidas utilizando tinción IR.

Una persona con experiencia ordinaria en la técnica apreciará que, para escrutinio de tejidos de alta capacidad, los procedimientos descritos en esta memoria utilizando células o tejidos precisarán probablemente adaptarse para algunos tejidos o para escrutinio de alta capacidad. Se han descrito redes de tejidos de alta capacidad en portaobjetos simples (Complete View™, Stratagene), y en microplacas por MatTek Corporation. La presente invención contempla también la utilización del método de la presente invención para detectar la tinción PAS en soluciones, con inclusión de solución biológica, leche, y agua.



**Kits**

La presente invención proporciona también un método para desarrollar kits de tests comerciales diagnóstico/pronóstico a fin de tomar decisiones de tratamiento terapéutico. El kit proporciona todos los materiales arriba descritos e ilustrados más adelante para preparación y realización del ensayo en un paquete conveniente, con inclusión de instrucciones y una guía analítica.

Por ejemplo, un kit incluirá placas de microtitulación, superfibronectina, diastasa, solución de ácido per-yódico, reactivo de Schiff, agua desionizada (purificada), estándares conocidos de glucógeno, e instrucciones para la detección por IR.

**EJEMPLOS****10 EJEMPLO 1: Detección Infrarroja de Glucógeno Utilizando la Reacción PAS**

La tinción PAS y detección en el IR utilizando un escáner infrarrojo a una longitud de onda de 800 nm se aplicó a células de pacientes con enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (enfermedad de Pompe).

**Métodos**

**Células.** Se obtuvieron fibroblastos Pompe PM-11 del Dr. W.J. Kleijer, Department of Cell Biology & Genetics, Erasmus University, The Netherlands. Se adquirieron fibroblastos Pompe PM-12 de Coriell (catálogo # GM03329). Los fibroblastos CRL-2076 (control negativo) se adquirieron de American Type Culture Collection (Manassas, VA). Todas las líneas de fibroblastos se cultivaron rutinariamente a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, en medio de crecimiento constituido por Medio Esencial Mínimo Modificado de Dulbecco que contenía 15% de suero bovino fetal (Hyclone, Logan, UT), 100 U/ml penicilina; 100 µg/ml estreptomina, y N-glutamina 2 mM.

**Preparación de las placas.** Antes del ensayo, placas negras de 96 pocillos de cubreobjetos de borosilicato con fondo de vidrio (Nunc; catálogo #164588) se recubren con superfibronectina (Sigma). Se encontró que las placas de cubreobjetos de borosilicato con fondo de vidrio tienen una ratio mejor de señal a ruido (4 veces mayor) que las placas de plástico o las placas de polímero de calidad óptica tratadas con cultivo de tejidos (datos no presentados). Resumidamente, se pipetea 100 µl de superfibronectina de 5 µg/ml (Sigma) en cada pocillo y la placa se incuba a 37°C durante 2 horas. Se aspira la solución de fibronectina, se lava la placa dos veces con PBS estéril, y se deja secar en un ambiente estéril al aire libre durante una noche. Las placas pueden guardarse durante hasta dos semanas a 4°C (envueltas en Parafilm).

Un día antes del ensayo, se sembraron las células en las placas recubiertas con superfibronectina. Las células se extendieron a densidades variables de 15.000-30.000 células/pocillo, o uniformemente a razón de 20.000 células/pocillo, y se incubaron durante una noche para permitir la fijación. Adicionalmente, a fin de determinar la especificidad de tinción del glucógeno, una placa con células sembradas uniformemente a razón de 20.000 células/pocillo se trata con diastasa al 0,1% (α-amilasa tipo VIB de Páncreas de Porcino de Sigma, catálogo #A3176) y se incuba durante tiempos variables desde 5 minutos a 60 minutos (por fila - 5, 10, 15, 20, 30, 40, 45, y 60 minutos respectivamente). Esto determina también el tiempo de incubación que es óptimo para digerir el glucógeno en la muestra para uso como control negativo.

**Tinción PAS.** El día del ensayo, las placas se lavan dos veces con PBS, y se fijan luego con 100 µl de formaldehído al 3,7% a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la incubación, las células se oxidan por adición de solución al 1% de ácido peryódico (Accustain, Sigma-Aldrich, catálogo #395132-IL) a cada pocillo y se incuban durante aproximadamente 5 minutos. Se lavan luego las placas una sola vez en agua destilada y se añaden 100 µl de reactivo de Schiff a cada pocillo (Poly Scientific; catálogo #S272), seguido por una incubación de 15 minutos. Las placas se lavaron luego brevemente con agua desionizada y se enjuagaron durante 10 minutos bajo agua del grifo para desarrollar la reacción. Las placas se secaron luego durante una noche al aire libre.

**Detección IR.** Después de la incubación durante una noche, la placa se lee en un escáner Odyssey IR basado en láser (Li-Cor, Inc.) a longitudes de onda de emisión de 700 nm (infrarrojo próximo) u 800 nm (IR). El detector cuenta las emisiones de fluorescencia en IR y en IR próximo independiente o simultáneamente de las muestras, y presenta estos recuentos como unidades arbitrarias. El detector barre a través de la placa de microtitulación entera, por lo que puede leer dos fluoróforos a partir de cualquier red de muestras de microtitulación formateada (96 pocillos, 384 pocillos, u otra) en el transcurso de pocos minutos. Se incluyen pocillos de ruido que carecen de células o tejido para sustracción del ruido.

**50 Resultados**

**Detección a 700 nm en el infrarrojo próximo.** A través del campo de densidad dinámica de células de aproximadamente 1000-30.000 células/pocillo, los fibroblastos PM-12, derivados de un paciente de Pompe de aparición infantil, exhiben fluorescencia PAS significativamente mayor en el IR próximo (700 nm; **Figura 1A**) y el campo IR (800 nm, **Figura 1B**) que la línea de células de aparición en edad adulta, PM-11, o la línea de células de control normal CRL-2076 (aproximadamente cinco veces mayor que la concentración normal a 30.000 células/pocillo).

Además, para un campo de densidad de células de 20.000 células/pocillo, la fluorescencia IR del tinte PAS es específica de glucógeno, dado que la digestión con diastasa del glucógeno celular media una disminución dependiente del tiempo en la señal de aproximadamente dos veces (Figura 2).

### Conclusión

5 Se demostró que la detección de la fluorescencia IR de PAS a 700 nm y 800 nm es un método viable para cuantificar fácilmente los niveles relativos de glucógeno en las células. En los fibroblastos derivados de un paciente grave con enfermedad de Pompe, una enfermedad de almacenamiento de glucógeno, la fluorescencia IR era significativamente mayor que en los fibroblastos normales. Asimismo, la señal de PAS era específica de glucógeno, dado que se reducía después de digestión con diastasa. Este enfoque puede extenderse para cuantificar cantidades absolutas de glucógeno en las células y tejidos por combinación de la tinción PAS de diversas concentraciones de un estándar de glucógeno externo, y cuantificación de la fluorescencia IR emitida por estas concentraciones estándar. Un análisis por regresión lineal o no lineal puede realizarse sobre los datos de la curva estándar, y puede utilizarse la línea o curva teórica para calcular los valores absolutos de glucógeno de muestras teñidas con PAS y medidas utilizando detección IR.

### 15 EJEMPLO 2: Comparación de PAS con Detección en el Campo Visible

Como se ha expuesto anteriormente, la microscopía fluorescente, es decir, la detección en el campo visible, puede utilizarse para detectar cualitativamente el glucógeno después de tinción PAS. Las Figuras 3A y 3B representan la obtención de imágenes fluorescentes de células de control CRL-2076 y células PM-12, respectivamente. Si bien este método puede detectar glucógeno en las muestras, es muy tedioso para cuantificar niveles absolutos de glucógeno. 20 Además, el mismo es menos susceptible de aplicaciones de alta capacidad, dado que los lectores de fluorescencia de placas de microtitulación de 96 pocillos o mayor densidad y los escáneres no son usualmente alternativas viables para medidas en el campo visible debido a sus bajas intensidad y resolución espacial que no pueden resolver el alto ruido debido a la autofluorescencia de los materiales biológicos en el campo visible. A medida que aumenta el número de muestras, y se incrementa el número de fluoróforos que se convierten en imágenes por muestra, aumenta 25 proporcionalmente el tiempo de adquisición y procesamiento de los datos, y la capacidad se reduce también proporcionalmente.

### EJEMPLO 3: Diagnóstico y Monitorización de la Prognosis de la Enfermedad de Pompe

Como se descrito arriba, la enfermedad de Pompe es una enfermedad rara que afecta sólo aproximadamente a uno de cada 40.000 individuos, y como resultado, está infradiagnosticada y diagnosticada erróneamente. La combinación de estos factores, la gravedad, la edad de aparición, el grado de progresión de la enfermedad, y la magnitud de implicación de los órganos pueden variar significativamente de un individuo a otro. La diagnosis concluyente requiere generalmente un test de ensayo enzimático para demostrar la actividad reducida o ausente para la enzima lisosómica  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA), utilizando fibroblastos de piel cultivados, biopsias musculares, y linfocitos.

Además, el único tratamiento para la enfermedad de Pompe, la terapia de reemplazamiento enzimático con  $\alpha$ -glucosidasa recombinante (Myozyme), está aprobado únicamente para la enfermedad de Pompe infantil, y la aprobación se basó en supervivencia sin ventilación como el único punto final clínico. Los únicos resultados secundarios estudiados fueron evaluaciones hechas no a ciegas de la función motora por la Escala Motora Infantil de Alberta (AIMS), que no mejoraban con el tratamiento, y el índice de masa del ventrículo izquierdo, que mejoraba con el tratamiento. Así, el reemplazamiento enzimático no es eficaz para mejorar la función motora, debido probablemente a una penetración y biodisponibilidad deficientes en los músculos esqueléticos. Sorprendentemente, la reducción de glucógeno no se evaluó como un punto final sustitutivo para la terapia de reemplazamiento enzimático.

Una terapia alternativa, que emplea moléculas pequeñas para "restablecer" la enzima deficiente en pacientes de Pompe que expresan cierta cantidad de  $\alpha$ -glucosidasa mutante se encuentra actualmente en pruebas clínicas. Se espera que las moléculas pequeñas tengan biodisponibilidad mejorada y por tanto, se consideran más prometedoras para mejorar la función motora en este grupo de pacientes.

Por consiguiente, persiste la necesidad en la técnica de ensayos que puedan ayudar en la diagnosis de la enfermedad de Pompe, y en la monitorización de la prognosis de los individuos (y modelos animales) que están siendo tratados por enfermedad de Pompe (por ejemplo por ERT o tratamiento con chaperona). De acuerdo con el método de la presente invención, la acumulación de glucógeno en los tejidos de pacientes de Pompe de aparición en edad infantil puede monitorizarse antes y después del tratamiento, lo cual puede ser una medida de eficacia o puede proporcionar finalmente una correlación con los resultados clínicos.

En conclusión, la fluorescencia IR tiene una ratio superior de señal a ruido, y penetración de la señal a partir de tejidos gruesos. La misma es también fácilmente cuantificable y compatible con aplicaciones de alta capacidad. La detección de la fluorescencia IR es superior a la medida de la densidad óptica y la medida de la fluorescencia de luz visible para cuantificación del contenido de glucógeno a partir de células o tejidos teñidos.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un método para detectar polisacáridos en una muestra biológica, método que comprende someter la muestra a tinción con Ácido Peryódico-Schiff seguido por detección de la luz emitida en el campo infrarrojo.
- 5 2.- El método de la reivindicación 1, en el cual la detección tiene lugar a una longitud de onda en el intervalo de aproximadamente 700 nM a 800 nM.
- 3.- El método de la reivindicación 1, en el cual el polisacárido es glucógeno.
- 4.- El método de la reivindicación 1, en el cual la muestra biológica se deriva de un individuo humano sospechoso de padecer una enfermedad de almacenamiento de glucógeno.
- 10 5.- El método de la reivindicación 4, en el cual la enfermedad de almacenamiento de glucógeno se selecciona del grupo constituido por enfermedad de Pompe; enfermedad de Cori's-Forbes; enfermedad de Andersen; enfermedad de Tauri; enfermedad de McArdle; deficiencia de fosforilasa b-quinasa (glucogenosis tipo VIII); Deficiencia de Ramificación del Glucógeno de los Equinos; deficiencia de isoforma A de la fosfoglicerato-quinasa (glucogenosis IX); deficiencia de fosfoglicerato-mutasa M (glucogenosis tipo X); deficiencia de triosafosfato-isomerasa (TIM); glucogenosis pulmonar intersticial; nefropatía diabética; y enfermedad de Lafora (epilepsia mioclónica).
- 15 6.- El método de la reivindicación 5, en el cual la enfermedad de almacenamiento de glucógeno es enfermedad de Pompe.
- 7.- El método de la reivindicación 6, en el cual la enfermedad de almacenamiento de glucógeno es enfermedad de Pompe de aparición en la infancia.
- 20 8.- El método de la reivindicación 7, en el cual la muestra biológica son células aisladas o tejido seleccionado del grupo constituido por músculo hepático, de riñón, cardíaco, de cerebro y esquelético.
- 9.- El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente cuantificar el nivel de polisacáridos presentes en la muestra biológica por comparación de la cantidad de luz emitida con la emitida por estándares de cantidades conocidas de polisacáridos.
- 25 10.- Un método de detección de glucógeno en una muestra biológica de un individuo que padece o se sospecha padece enfermedad de Pompe, método que comprende someter la muestra a tinción con Ácido Peryódico-Schiff seguido por detección de la luz emitida en el campo infrarrojo.
- 11.- El método de la reivindicación 10, en el cual la detección se realiza a una longitud de onda comprendida en un intervalo de aproximadamente 700 nM a 800 nM.
- 30 12.- El método de la reivindicación 10, en el cual la muestra biológica son células aisladas o tejido seleccionado del grupo constituido por hígado, riñón, corazón, cerebro y músculo esquelético.
- 13.- El método de la reivindicación 10, que comprende adicionalmente cuantificar el nivel de polisacáridos presentes en la muestra biológica por comparación de la cantidad de luz emitida con la emitida por estándares de cantidades conocidas de glucógeno.
- 35 14.- Un método de monitorización de la eficacia del tratamiento de un individuo que se trata por una enfermedad de almacenamiento de glucógeno, método que comprende:
- i) detectar glucógeno en una primera muestra biológica derivada del individuo antes de la iniciación del tratamiento de acuerdo con el método de la reivindicación 1;
- ii) detectar glucógeno en una segunda muestra biológica derivada del individuo subsiguientemente a la iniciación del tratamiento de acuerdo con el método de la reivindicación 1;
- 40 iii) cuantificar los niveles de glucógeno en las dos muestras; y
- iv) comparar el nivel de glucógeno en la primera muestra con el nivel de glucógeno en la segunda muestra, en el cual una reducción en el nivel de glucógeno en la segunda muestra indica que el tratamiento es eficaz.
- 15.- El método de la reivindicación 14, en el cual la enfermedad de almacenamiento de glucógeno es la enfermedad de Pompe.

Figura 1

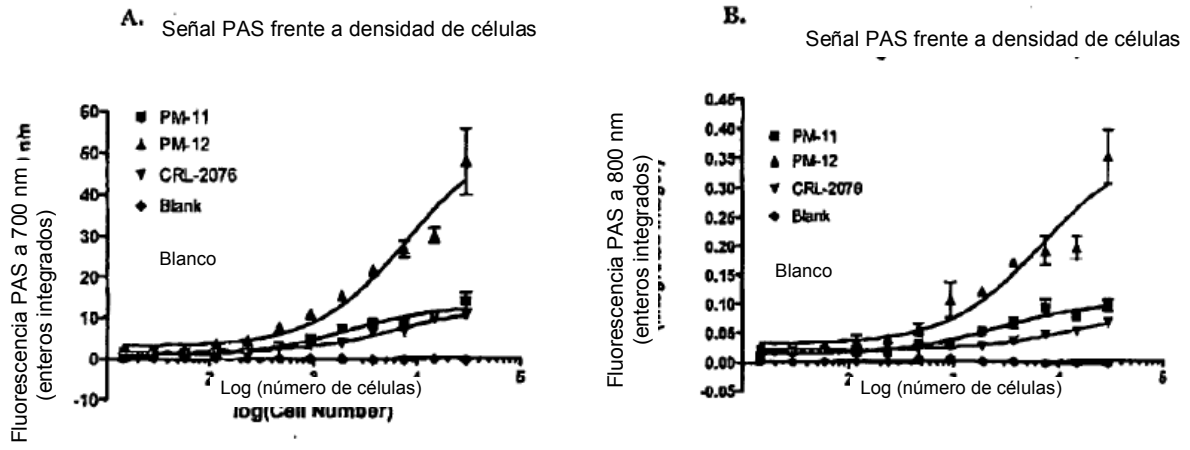


Figura 2

Señal PAS frente al tiempo

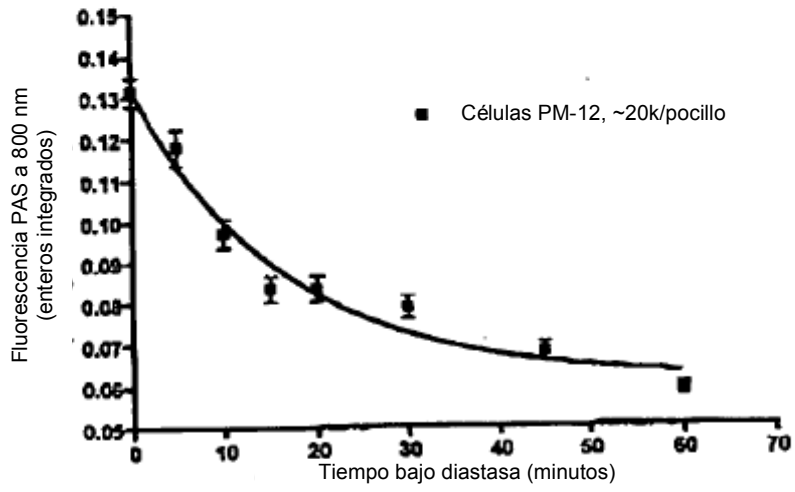
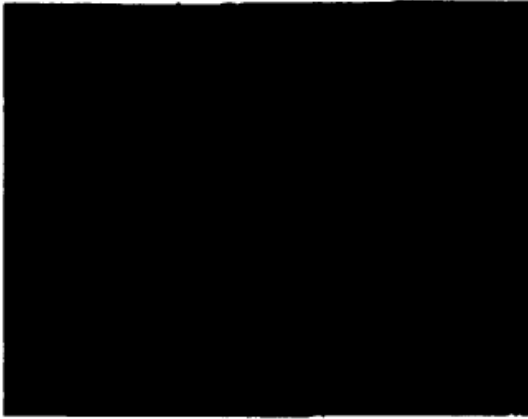


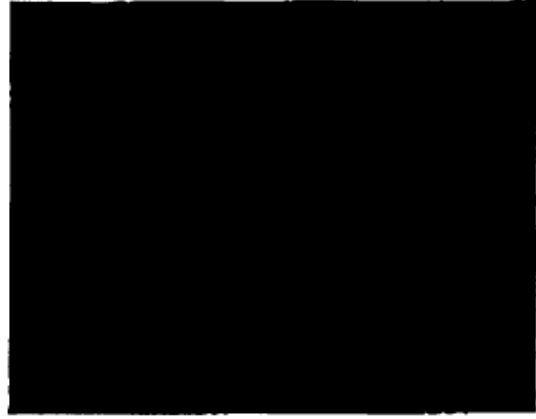
Figura 3

**A.**



**CRL-2076**

**B.**



**PM-12**