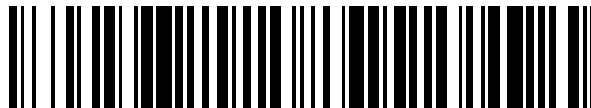


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 030**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2007 E 07734874 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013 EP 2013625**

54 Título: **Uso de la cadena de espectrina cerebral y fragmentos de la misma para diagnosticar enfermedades cerebrales**

30 Prioridad:

30.03.2006 EP 06290503

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

31.03.2014

73 Titular/es:

INSTITUT PASTEUR (50.0%)

28, rue du Docteur Roux

75015 Paris, FR y

UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI)

(50.0%)

72 Inventor/es:

PIED, SYLVIANE;

GUIYEDI, VINCENT;

CAZENAVE, PIERRE-ANDRÉ;

KOMBILA, MARYVONNE y

CHANSEAUD, YOURI

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 452 030 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

Uso de la cadena de espectrina cerebral y fragmentos de la misma para diagnosticar enfermedades cerebrales.

La presente invención se refiere a los campos de las enfermedades cerebrales y del control de la malaria. Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento para realizar un pronóstico y/o diagnóstico *in vitro* de malaria cerebral, con el fin de proporcionar rápidamente un tratamiento apropiado a un paciente en necesidad del mismo.

La malaria sigue siendo una de las principales causas de muerte en la mayoría del África subsahariana, y las tasas de mortalidad son particularmente altas para niños por debajo de la edad de cinco años, mujeres embarazadas e individuos inmunodeficientes (1). El desenlace mortal se produce casi exclusivamente en pacientes infectados con *Plasmodium falciparum* que progresa a malaria grave (1, 2). La anemia grave y la malaria cerebral (MC) son los tipos más prevalentes de malaria por *P. falciparum* grave, y la MC muestra el espectro clínico más agudo. Los pacientes que desarrollan MC presente con un intervalo de manifestación neurológica aguda y la patología se caracterizan por una encefalopatía difusa, alteración en niveles de consciencia, coma profundo y convulsión precedente a muerte (2, 3). Shukla y col. enseñan que cambios en los niveles de espectrina α no eritroide de longitud completa y la presencia de fragmentos proteolíticos de espectrina en muestras de tejido de cerebro son características patológicas de la malaria cerebral (44). Sin embargo, actualmente, los eventos patológicos que conducen a malaria mortal en seres humanos no están bien caracterizados. Entender los mecanismos implicados es un reto importante, ya que será crucial para el desarrollo de nuevas terapias y/o vacunas preventivas o curativas, y podría conducir a marcadores de pronóstico de definición.

En el estado de la técnica se han desvelado marcadores para lesiones neurales. Por ejemplo, los documentos WO 2004/025298 y WO 2002/046767 desvelan biomarcadores y procedimientos para el diagnóstico y la evaluación de la gravedad de lesiones neurales y/o trastornos neuronales. Entre los biomarcadores están fragmentos proteolíticos de espectrina α -II y β -II. El documento WO 2004/025298 enseña que la espectrina α -II y sus fragmentos proteolíticos son marcadores de diagnóstico y/o de pronóstico de lesión de células nerviosas en trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson e isquemia hemorrágica. El documento JP 07198717 desvela el uso diagnóstico de anticuerpos policlonales y monoclonales, que reconocen un fragmento de polipéptido de la cadena α de una espectrina no eritroide. Day y col. (1999) desvelan péptidos proteolíticos correspondientes a fragmentos de la cadena α de espectrina no eritroide como marcadores bioquímicos adecuados de enfermedad de Alzheimer (45). Vazquez y col. (1996) enseñan que los productos de degradación de la espectrina son útiles como marcadores de neurodegeneración (46).

En MC, el secuestro de glóbulos rojos maduros infectados por *P. falciparum* al endotelio cerebral es claramente un evento central en la patogénesis. Uno de los factores que se cree que influye en el desenlace clínico es el fino balance entre las citocinas pro- y antiinflamatorias producidas durante la infección y que modulan respuestas inmunitarias inducidas por parásitos (4, 5). Las citocinas pro-inflamatorias, tales como interferón γ (IFN γ) y factor de necrosis tumoral α (TNF α), son conocidas por desempeñar una función importante en la fisiopatología de la MC. El documento US 2005/260697 desvela TNF α y otras citocinas pro/antiinflamatorias como marcadores de pronóstico de malaria cerebral. Las citocinas pro-inflamatorias inducen cambios en las células endoteliales cerebrales que conducen a la expresión superficial de moléculas de adhesión, tales como ICAM-1, CD36 y proteína relacionada con trombospondina, y adhesión a parásito (6, 7). Sin embargo, también se ha informado que IFN γ y TNF α protegen contra malaria (8-10). La participación de citocinas antiinflamatorias en la malaria sigue siendo una materia de debate y varios estudios en seres humanos han informado de asociaciones entre altas concentraciones de IL-10 y tanto malaria grave como protección (5, 11-14).

Se ha mostrado recientemente que la producción de autoanticuerpos para los canales de calcio regulados por voltaje del cerebro, pero no otros canales de ion calcio, aumentaron con la gravedad de la infección por *P. falciparum* en niños keniatas (15). Los anticuerpos para las proteínas del sistema nervioso central se han asociado a convulsión y epilepsias en varias enfermedades autoinmunitarias y se cree que desempeñan una función en la patología (16). La hipergammaglobulinemia y la activación de linfocitos B policlonales comúnmente se producen en infecciones por *Plasmodium sp.* (17-19). Algunos de los anticuerpos producidos reconocen auto-componentes de diversos tejidos y órganos, tales como eritrocitos, linfocitos, estructuras de ácido nucleico, citoesqueleto, músculo liso, corazón y tiroides (20-28). Cada vez existen más pruebas de que altos niveles de anticuerpos contra fosfolípido (PL), cardiolipina (CL), ADNmc, ADNbc y factor reumatoide se correlacionan con la gravedad de la enfermedad en pacientes infectados por *P. falciparum* (22, 25, 29-31) y la prueba de antiglobulina de Coombs es positiva en individuos infectados por *P. falciparum* que padecen anemia grave (32-35). No está claro si los anticuerpos auto-reactivos desempeñan o no una función en inmunidad protectora contra parásitos en el estado de sangre (36-38). Además, no se sabe si la presencia de estos autoanticuerpos es o no una consecuencia de la infección o si contribuye o no a los eventos que conducen a malaria grave, que incluyen el desarrollo de complicaciones neurológicas ligadas a malaria cerebral por *P. falciparum*. Además, sigue sin estar claro si IFN γ , TNF α y IL-10 regulan o no la respuesta auto-reactiva de anticuerpos durante la malaria. La respuesta auto-reactiva de anticuerpos en cirrosis biliar primaria (39) está regulada por las tres citocinas mencionadas anteriormente.

En ese contexto, los inventores han investigado varios parámetros, entre los cuales la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra tejidos de cerebro en malaria por *P. falciparum*, con el fin de identificar marcadores relevantes para diagnosticar malaria cerebral. Para este fin, y como se describe en detalle en la parte experimental más adelante, reclutaron tres grupos de pacientes que asistían al Hospital pediátrico Owendo y al Centro hospitalario de Libreville en Gabón según su estado clínico en el momento del ingreso: malaria no complicada (MNC), malaria no cerebral grave (MNCG) o malaria cerebral (MC). Usando sueros recogidos de estos pacientes, se combinaron un procedimiento de inmunotransferencia cuantitativa (transferencia PANAMA) que facilitaba la comparación de miles de antígenos simultáneamente (40, 41) con análisis multifactorial para comparar el repertorio de reactividades de IgG con antígenos de cerebro humano desarrollados en los sueros de controles y grupos de pacientes infectados por *P. falciparum*. Investigaron adicionalmente si niveles de $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ y IL-10 circulantes en estos grupos de pacientes se asociaron o no al repertorio de reactividades de IgG y fenotipo de enfermedad.

Los inventores han demostrado la presencia de alto nivel de autoanticuerpos ampliamente dirigidos contra la cadena α de espectrina no eritroide (también llamada *fodrina*) en malaria por *P. falciparum*. Los resultados desvelados en la parte experimental más adelante muestran que hay una relación entre el nivel de autoanticuerpos y los síntomas clínicos, y que los anticuerpos auto-reactivos están asociados al desarrollo de malaria cerebral, especialmente cuando se asocian a alta concentración de $TNF\alpha$ circulante. Más específicamente, los inventores han demostrado que los anticuerpos auto-reactivos presentes a un alto nivel en pacientes con malaria cerebral están predominantemente dirigidos contra las partes central y/o del extremo C-terminal de la cadena α de espectrina no eritroide. En lo que sigue, la "parte central la cadena α de espectrina no eritroide" se define como la parte de la proteína que se extiende desde aproximadamente el aminoácido 1139 al aminoácido 1498, y la "parte del extremo C-terminal de la cadena α de espectrina no eritroide" engloba los residuos 1499 a 2472 de la proteína.

Además, la espectrina no eritroide se libera en el líquido cefalorraquídeo de pacientes que padecen lesión cerebral grave, tal como malaria cerebral.

Por tanto, la presente invención se refiere al uso de anticuerpos específicos para la cadena α de espectrina no eritroide, como marcador de pronóstico y/o de diagnóstico de malaria cerebral. Los anticuerpos específicos para la parte central y/o la parte del extremo C-terminal de la cadena α de espectrina no eritroide, por ejemplo, anticuerpos que reconocen un epítipo presente en un polipéptido seleccionado de entre los polipéptidos de SEQ ID Nos: 45 y 14-29 descritos más adelante, se usarán según la presente invención. Estos marcadores son los primeros marcadores séricos descritos para pronosticar y/o diagnosticar malaria cerebral.

La cadena α de espectrina no eritroide o productos de descomposición de espectrina también puede detectarse en el líquido cefalorraquídeo de pacientes que padecen malaria cerebral, aprovechándose del hecho de que el líquido cefalorraquídeo es sistemáticamente recogido en pacientes con malaria en un estado de coma, para el diagnóstico de meningitis. Estos productos de degradación son fragmentos polipeptídicos de la cadena α de espectrina no eritroide. En particular, los fragmentos que comprenden secuencias antigénicas tales como aquellas de SEQ ID Nos: 1 a 29 y 45, y más específicamente aquellas seleccionadas de entre SEQ ID No: 45 y SEQ ID Nos: 14 a 29, pueden buscarse, por ejemplo, mediante un inmunoensayo, para pronosticar y/o diagnosticar malaria cerebral.

La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para pronosticar y/o diagnosticar malaria cerebral, que comprende una etapa de detectar anticuerpos dirigidos contra espectrina no eritroide, en una muestra biológica.

La espectrina no eritroide es un componente principal del citoesqueleto de la mayoría de las células eucariotas. Forma heterodímeros compuestos por subunidades α y β . La espectrina eritroide se expresa en eritrocitos. Y, lo que es más importante, la cadena alfa de espectrina eritroide es muy diferente de la cadena alfa de espectrina no eritroide encontrada en el cerebro. Por tanto, se mide el nivel de anticuerpos dirigidos contra la cadena α de espectrina no eritroide. Se mide el nivel de anticuerpos dirigidos contra la parte central y/o la parte del extremo C-terminal de la cadena α de espectrina no eritroide. En el procedimiento según la presente invención, un alto nivel de auto-anticuerpos que reconocen específicamente la parte central y/o del extremo C-terminal de espectrina no eritroide es indicativo de malaria cerebral.

Una realización preferida del presente procedimiento comprende además una etapa de medir la concentración de $TNF\alpha$ en una muestra biológica. De hecho, las concentraciones de $TNF\alpha$ en plasma son claramente mayores en pacientes que desarrollan malaria grave que en aquellos que desarrollan malaria no complicada. El $TNF\alpha$ es conocido por mediar en inflamación durante MC. Además, como se muestra en la parte experimental más adelante, los inventores observaron que los pacientes con MC con las mayores concentraciones en plasma de $TNF\alpha$ (> 100 pg/ml) presentaron el mayor nivel de reactividad con antígenos cerebrales. El nivel de anticuerpos anti-fodrina y la concentración de $TNF\alpha$ en el suero pueden, por tanto, combinarse ventajosamente para obtener una puntuación para establecer eficazmente un pronóstico y/o un diagnóstico temprano de malaria cerebral.

Los anticuerpos que se detectan en el procedimiento según la invención son preferentemente inmunoglobulinas G

(IgG).

El experto puede elegir cualquier técnica conocida para realizar el procedimiento anteriormente descrito. En particular, los anticuerpos dirigidos contra la cadena α de espectrina no eritroide pueden detectarse y/o cuantificarse realizando cualquier tipo de inmunoensayo tal como, por ejemplo, un enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), un inmunoensayo de citometría de flujo o un ensayo inmunocromatográfico.

Un ejemplo de inmunoensayo tipo ELISA que puede usarse ventajosamente para realizar la invención es el sistema Bio-Plex (Bio-Rad). Este sistema permite multiplexar teóricamente hasta 100 ensayos diferentes dentro de una única muestra. Cada ensayo se realiza sobre la superficie de una perla de poliestireno de 5,5 μm . Las perlas se llenan con diferentes relaciones de dos colorantes fluorescentes diferentes, produciendo una matriz de 100 direcciones espectrales distintas. Cada conjunto de perlas puede conjugarse con una molécula de captura diferente. Por ejemplo, cada perla con una fluorescencia específica se conjuga con un péptido antigénico específico. Las perlas conjugadas pueden entonces mezclarse e incubarse con la muestra en un pocillo de microplaca para reaccionar con anticuerpos específicos. Los anticuerpos capturados, específicos para determinados epítopes, pueden entonces cuantificarse simultáneamente por citometría de flujo.

En una realización preferida, los procedimientos desvelados en el presente documento están adaptados para ser ejecutados con una instrumentación limitada, y en condiciones que no son óptimas para la conservación de reactivos. Por estos motivos, los ensayos inmunocromatográficos, tales como tira reactivo de flujo lateral, pueden usarse ventajosamente para realizar los presentes procedimientos.

Pueden usarse una o varias moléculas como moléculas de captura en los inmunoensayos para realizar los procedimientos anteriores. Entre aquellos, pueden citarse los siguientes: la espectrina no eritroide completa, la cadena α de espectrina no eritroide y fragmentos de la misma, además de moléculas antigénicas derivadas de la cadena α de espectrina no eritroide. Por "moléculas antigénicas derivadas de la cadena α de espectrina no eritroide" se indica un fragmento antigénico de la cadena α de la fodrina, pero también cualquier tipo de molécula que presente un epítipo de dicho antígeno, tal como un polipéptido optimizado que retiene la secuencia del epítipo, pero que tiene algunas mutaciones en los residuos adyacentes a dicho epítipo, siempre que la presentación del epítipo se retenga.

Las moléculas de captura usadas según la invención son preferentemente específicas para la cadena α de espectrina no eritroide. Ejemplos de moléculas antigénicas que son específicas para la cadena α de espectrina no eritroide son los polipéptidos de SEQ ID Nos: 1 a 29, desvelados en la Tabla 1 a continuación. De estos, las SEQ ID No: 45 y SEQ ID Nos: 14 a 20 de la parte central de la proteína, y las SEQ ID Nos: 15 a 29 son de su parte del extremo C-terminal. Ejemplos de moléculas antigénicas que reaccionan de forma cruzada con anticuerpos dirigidos contra tanto espectrinas eritroides como no eritroides son los polipéptidos de SEQ ID Nos: 30 a 44, desvelados en la Tabla 2, a continuación.

Tabla 1: Ejemplos de péptidos antigénicos específicos para la cadena α de espectrina no eritroide. Los números indican las posiciones del extremo N y C de los péptidos en la cadena α de espectrina no eritroide.

SEQ ID No	SECUENCIA
1	56-LEKWIQEKLQIASDENYKDP-75
2	94-ANSGAIVKLDETGNLMISEGHFASETI-120
3	195-TDMAAHEERVNEVNFQFAAKLIQEQHPHEELIKTKQD-231
4	276-QLMASDDFGRDLASVQALLRKHEGL-300
5	318-ADRLQQSHPLSATQIQVKREELITN-342
6	416-SFKSADESGQALLAAGHYAS-435
7	436-NNHYAMEDVATRRDALLSR-454
8	597-TDEAYKDPSNLQGVQKHQAFEA-619
9	635-GQKLIDVNHAKDEVAARMNEVISLWKKLLEA-666
10	688-EDIELWLYEVEGHLASDDYGKDLTNVQNLQKKHALLEADVAAH-730
11	747-AGHFDAENIKKKQEALVARY-766
12	1053-TRITKEAGSVSLRMKQVEELYHSLE-1078
13	1087-LEKSCCKFMLFREANELQQWINEKEAALTSEEVGADLEQVEVLQ-1130
45	1151-NKVAEDLESEGLMAEEVQAVQQQEXYGMMPRDETDSTASPWKSARLM-1198
14	1160-EGLMAEEVQAVQQQEXY-1176
15	1177-GMMPRDETDSTASPWKSARLMVHTVATFNSI-1208
16	1160-EGLMAEEVQAVQQQEXYGMMPRDETD-1195
17	1196-SKTASPWKSARLMVHTVATFNSI
18	1386-TEIDARAGTFQAFEQFGQQLLAHGHYASP-1414
19	1468-NTEDKGDSDLDSVEALIK-1484
20	1478-SVEALIKKHEDFDKAINVQEE-1499

SEQ ID No	SECUENCIA
21	1453-CEQAENWMAAREAFNLNTEKGDSDL-1477
22	1500-KIAALQAFADQLIAAGHYAK-1519
23	1617-IERGACAGSEDAVKARLAALADQWQFLVQK-1646
24	1671-DFWLSEVEALLASEDYGKDLASVN-1694
25	1939-KNNHHEENISSKMKGLNGKVSLEK-1963
26	2000-KTDDYGRDLSSVQTLT-2016
27	2038-ALKDQLLAAKHVQSK-2052
28	2114-LTDPVRCNSL-2123
29	2456-LPTAFDYVEFTRSLFVN-2472

5 Tabla 2: Ejemplos de péptidos antigénicos de la cadena α de espectrina no eritroide. Los números indican las posiciones del extremo N y C-terminal de los péptidos en la cadena α de espectrina no eritroide.

SEQ ID No	SECUENCIA
30	239-RLKGLALQRQ-248
31	390-LASDVAGAEALLDR-420
32	462-QYEQCMDLQLFY-473
33	857-AAEDVKAKLHE-867
34	925-AEALLKKH-931
35	1149-DINKVAE-1155
36	1225-RSLLGSAHEVQR-1237
37	1262-GHDLASVQALQ-1272
38	1280-RDLAALGDKVNS-1291
39	1440-MLDQCLELQLFHRD-1453
40	1687-GKDLASVNNLLKKHQLLEADI-1707
41	1809-LEAELAAHEPAIQGVLD-1826
42	1841-IQQRLAQFVEH-1851
43	1983-WKADVVE-1990
44	2275-ALILDN-2280

En una realización preferida del procedimiento según la invención, al menos una de las moléculas antigénicas usadas como moléculas de captura está seleccionada del grupo que consiste en los polipéptidos de SEQ ID Nos: 1 a 29 y 45. En una realización más preferida, al menos una de las moléculas antigénicas usadas como moléculas de captura está seleccionada del grupo que consiste en los polipéptidos de SEQ ID Nos: 45 y 14 a 29. En otra realización, al menos una molécula antigénica adicional está seleccionada del grupo que consiste en los polipéptidos de SEQ ID Nos: 30 a 44. En estas realizaciones, cada molécula de captura puede conjugarse ventajosamente con una perla marcada (o micropartícula, nanopartícula y similares), de manera que pueda realizarse un inmunoensayo de múltiplex (por ejemplo, un ensayo tipo ELISA de múltiplex) en una única muestra. Por tanto, la presente invención también se refiere al uso de un polipéptido seleccionado de entre los polipéptidos de SEQ ID Nos: 1 a 29 y 45, y/o de entre los polipéptidos de SEQ ID Nos: 30 a 44, posiblemente conjugados con una partícula marcada, en un inmunoensayo que tiene como objetivo pronosticar y/o diagnosticar malaria cerebral.

Alternativamente, el procedimiento según la invención puede realizarse realizando un ensayo de inmunocaptura como se describe en el Ejemplo 8 más adelante, en el que un anticuerpo dirigido contra inmunoglobulina humana se usa como molécula de captura, y una espectrina no eritroide marcada o fragmento de la misma se usa para la detección de los anticuerpos dirigidos contra la cadena α de espectrina no eritroide. En una realización particularmente ventajosa, este tipo de ensayo de inmunocaptura está adaptado para realizarse en un ensayo inmunocromatográfico, tal como una tira reactiva de flujo lateral.

Otro procedimiento para pronosticar y/o diagnosticar *in vitro* malaria cerebral comprende una etapa de detectar la propia espectrina no eritroide, de fragmentos de la misma, en una muestra biológica. En esta realización, anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra espectrina no eritroide se usan ventajosamente para detectar dicha espectrina no eritroide o fragmento de la misma. Por ejemplo, anticuerpos monoclonales dirigidos contra un polipéptido seleccionado de entre los polipéptidos de SEQ ID Nos: 1 a 29 y 45, preferentemente de entre los polipéptidos de SEQ ID Nos: 45 y 14 a 29, pueden obtenerse y usarse para tal fin.

Los procedimientos de la invención pueden realizarse en diferentes tipos de muestras biológicas tales como, por ejemplo, sangre, plasma o líquido cefalorraquídeo. El líquido cefalorraquídeo se usará para la detección de espectrina no eritroide o fragmento de la misma, mientras que la sangre o plasma se usan preferentemente para la detección de marcadores séricos tales como anticuerpos y fragmentos de degradación de la espectrina no eritroide.

La presente invención también se refiere a un kit para establecer un pronóstico y/o un diagnóstico de malaria

cerebral, que comprende al menos una molécula antigénica derivada de la cadena α de espectrina no eritroide. El kit comprende al menos una molécula antigénica que representa un epítipo que está presente en la cadena α de espectrina no eritroide, pero no en la espectrina eritroide, es decir, los polipéptidos de SEQ ID Nos: 45 y 1 a 29. La molécula antigénica comprendida en el kit está seleccionada de entre los polipéptidos de SEQ ID Nos: 45 y 14 a 29.

5

En una realización preferida del kit según la invención, al menos una molécula antigénica está unida a un soporte tal como, por ejemplo, una partícula marcada. Por "partícula marcada" se indica cualquier tipo de perla, microperla, nanopartícula, nanocristal semiconductor y similares.

- 10 Alternativamente, al menos una molécula antigénica se marca, y el kit según la invención comprende además un anticuerpo dirigido contra anticuerpos humanos, que es preferentemente monoclonal, y que puede unirse a un soporte tal como, por ejemplo, una microplaca, una microperla o una membrana.

Como se ha mencionado anteriormente, el experto elegirá preferentemente, como materiales y reactivos a incluir en el kit, componentes que sean fáciles de usar sin la necesidad de grandes infraestructuras de laboratorio.

15 La invención se ilustra adicionalmente por las siguientes figuras y ejemplos.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

20

Figura 1: Concentraciones de citocinas en plasma en el día 0. **A.** TNF α ; **B.** IL-10. Barras horizontales en todos los paneles indican valores de la mediana por grupos. NI: control no infectado, MNC: malaria no complicada, MNCG: malaria no cerebral grave, MC: malaria cerebral.

- 25 Figura 2: **A.** Perfiles de inmunorreactividad de IgG para 2, 2, 2, 2 y 3 pacientes en los grupos de CNIE, NI, MNC, MNCG y MC, respectivamente, en el día 0, día 7 y día 30 para cada paciente. **B.** Frecuencia de pacientes en cada grupo que reconocen intervalos de 0-4, 5-8, 9-12 y más de 12 bandas, respectivamente. Sd: plasma patrón, CNIE: control no infectado europeo, NI: control no infectado, MNC: malaria no complicada, MNCG: malaria no cerebral grave, MC: malaria cerebral.

30

Figura 3: Cargas de factor de PCA: Contribuciones relativas de bandas de reactividad a los dos primeros factores de PCA calculados en perfiles sin ajustar de inmunorreactividad de IgG con proteínas cerebrales separadas por 10 % de SDS-PAGE. **A.** Factor 1 de PCA. **B.** Factor 2 de PCA. **C.** Localización de la banda 0 en el perfil de transferencia Western obtenido después del análisis por ordenador de la membrana nº 5. Las bandas se ordenan de alto a bajo peso molecular (entre aproximadamente 230 kDa y 20 kDa). PCA: Análisis del componente principal. Sd: plasma patrón.

35

Figura 4: Puntuaciones del factor de PCA de perfiles de inmunorreactividad de IgG sin ajustar. **A.** Distribución por grupos de las puntuaciones del factor 1. **B.** Distribución por grupos de las puntuaciones del factor 2. **C.** Frecuencia de pacientes en cada grupo con puntuaciones del factor 1 por encima de la media. **D.** Frecuencia de pacientes en cada grupo con puntuaciones del factor 2 por encima de la media. CNIE: control no infectado europeo, NI: control no infectado, MNC: malaria no complicada, MNCG: malaria no cerebral grave, MC: malaria cerebral.

40

Figura 5: Propiedades de reactividad anticerebral de IgG sin ajustar en términos de puntuaciones del factor 1 de PCA. **A.** Asociación con la edad. **B.** Asociación con la concentración de IgG en plasma total. Las líneas de regresión en ambos paneles se calculan en todos los pacientes. CNIE: control no infectado europeo, NI: control no infectado, MNC: malaria no complicada, MNCG: malaria no cerebral grave, MC: malaria cerebral.

45

Figura 6: Propiedades de reactividad anticerebral de IgG ajustada en términos de puntuaciones del factor 1 de PCA. **A.** Relación con concentración de IgG en plasma total, y disección en tres subgrupos: α (IgG<25 mg/ml; F1<0,5), β (IgG<25 mg/ml; F1>0,5), δ (IgG>25 mg/ml; F1<0,5). **B.** Frecuencias de pacientes por encima de un año de edad en cada grupo, con respecto a los tres subgrupos. **C.** Distribución por grupos de puntuaciones del factor 1 de PCA entre pacientes de más de un año, indicando las barras horizontales valores de la mediana. Se indica la significancia de la diferencia entre pacientes con malaria cerebral (MC) y con malaria clínica no cerebral (MNC+MNCG). NI: control no infectado, MNC: malaria no complicada, MNCG: malaria no cerebral grave, MC: malaria cerebral.

50

Figura 7: Inmunorreactividades de IgG con proteínas cerebrales separadas por 10 % (izquierda) y 6 % (derecha) de SDS-PAGE. Para las tres bandas correspondientes a proteínas de alto peso molecular, los pesos moleculares se han estimado comparando con marcadores. Sd: plasma patrón. KDa: kiloDalton. MW: peso molecular.

55

Figura 8: Intensidad de IgG que reacciona con la banda 0 en niños de más de un año en cada grupo. Las barras horizontales indican medianas; se indica la diferencia significativa entre pacientes con malaria cerebral (MC) y con malaria clínica no cerebral (MNC+MNCG). NI: control no infectado, MNC: malaria no complicada, MNCG: malaria no cerebral grave, MC: malaria cerebral.

60

65

- Figura 9:** Reactividad total con proteínas cerebrales e intensidad de IgG que reacciona con la banda 0 en función de los niveles de citocinas en plasma en niños de más de 1 año. **A.** Correlación positiva entre el factor 1 de PCA y concentraciones de TNF α en el grupo de MC, indicada por la línea de regresión discontinua. **B.** Correlación positiva entre reactividad sin ajustar con la banda 0 y niveles de TNF α . **C.** Se observó alta reactividad de la banda 0 más frecuentemente en pacientes con MC con niveles de TNF α por encima de 100 pg/ml (indicado como TNF α alto en un grupo separado a la derecha). Las barras horizontales indican medianas. Solo se muestran niños por encima de la edad de 1 año. NI: control no infectado, MNC: malaria no complicada, MNCG: malaria no cerebral grave, MC: malaria cerebral.
- 10 **Figura 10:** Resultado de ELISA de espectrina de eritrocito anti-IgG. Representación gráfica en recuadros de la relación para individuos por grupos. IA: individuos infectados asintomáticos; MC: malaria cerebral; MNCG: malaria no cerebral grave; NI: individuos no infectados; MNC: malaria no complicada. * La relación se define como sigue: (DO de muestra – DO de ruido de fondo) / (DO de control positivo** - DO de ruido de fondo). ** El control positivo es un conjunto de pacientes incluido en cada placa de ELISA.
- 15 **Figura 11:** Concentraciones de IgG anti-fragmento del extremo N de la cadena α de la espectrina no eritroide. El número de individuos probados se indica bajo el nombre del grupo correspondiente. Los diagramas de barras representan los valores de la mediana. Los valores extremos se representan por círculos abiertos. El análisis estadístico se realizó usando la prueba de Kruskal-Wallis no paramétrica, seguida de una Mann-Whitney no paramétrica (Statview 5.0, Institute Inc., Cary, NC).

EJEMPLOS

Abreviaturas

- 25 En todos estos ejemplos se usarán las siguientes abreviaturas: CNIE, controles no infectados europeos; NI, no infectado; MNC, malaria no complicada; MNCG, malaria no cerebral grave; MC, malaria cerebral; TNF α , factor de necrosis tumoral alfa; IFN γ , interferón gamma; IL-10, interleucina-10; PL, fosfolípido; CL, cardioplipina; PCA, análisis del componente principal; OPH, Hospital pediátrico de Owendo; LHC, Centro hospitalario de Libreville; OPD, O-fenilendiamina; SDS, dodecilsulfato de sodio; Sd, plasma patrón; DTT, ditioneitol; TLCK, N- α -tosil-L-lisina-clorometilcetona.

Pacientes y procedimientos

- 35 Los siguientes ejemplos se realizaron usando muestras de pacientes y procedimientos como se describe a continuación.

Población del estudio

- 40 Los pacientes se incluyeron en el estudio solo después de haber obtenido el consentimiento informado de sus padres, en el Hospital pediátrico de Owendo (OPH) y el Centro hospitalario de Libreville (LHC) en Gabón, entre 1996 y 2000. El comité ético de la Oficina sanitaria de Gabón autorizó este estudio. Los pacientes se asignaron a los diversos grupos basándose en las pautas de la Organización Mundial de la Salud para la definición de malaria no complicada y grave. Los niños incluidos en este estudio tuvieron edades entre 2 meses y 5 años, y se clasificaron en tres grupos para malaria por *P. falciparum*: 1) malaria no complicada (MNC), 2) malaria no cerebral grave (MNCG) con anemia grave (nivel de hemoglobina < 5 g/dl) o hipoglucemia (glucemia < 2,2 mmol/ml), y 3) malaria cerebral (MC) con una puntuación de coma de Blantyre < 2, o tres episodios convulsivos durante las 24 horas antes del ingreso, con un estado comatoso poscrítico que dura > 15 minutos. También se estudió un grupo de control - el grupo no infectado (NI) - que comprende niños con gotas finas de sangre negativas para *P. falciparum*. Todos los
- 50 pacientes que presentan enfermedades distintas de la malaria se excluyeron del estudio. Todos los sujetos NI (25) fueron del mismo área de la ciudad de Libreville, y los pacientes en los grupos de MNC (66), MNCG (36) y MC (21) fueron todos reclutados de los hospitales OPH y LHC (Tabla 3). Durante el periodo de reclutamiento, el 5,4 % (8/148) de los pacientes murieron en el grupo de MC. No hubo diferencia significativa en la edad media entre los niños en los diversos grupos, con la excepción del grupo de MNCG, para el que la edad media fue menor. No se
- 55 observaron diferencias significativas en la relación de sexo, con una relación 1:1 de niños con respecto a niñas en cada grupo (Tabla 3).

- 60 Tabla 3: Distribución de pacientes según edad y sexo en diferentes grupos.

		NI	MNC	MNCG	MC	Total
Personal		25	66	36	21	148
Edad	Intervalo medio	2,9 (0,5 - 5)	3,2 (0,5 - 5)	1,8 (0,2 - 4,5)	2,7 (0,5 - 5)	2,6 (0,2 - 5)
Sexo	Masculino	13	23	18	13	67

	Femenino	11	32	14	8	65
Mortalidad		0	0	0	8	8 (5,4 %)

Los controles de NI se examinaron diariamente para síntomas clínicos. La parasitemia (gotas finas de sangre) se determinó en los días 0, 7 y 30. Los sujetos NI se comprobaron para helmintiasis intestinal en los días 0 y 30. Cada individuo recibió 400 mg de albendazol oral (Zentel®) en el día 7. Los pacientes se trataron con amodiaquina o quinina, dependiendo de la gravedad de la enfermedad. Los niños con malaria no complicada se administraron con amodiaquina oral (25 mg/kg) durante tres días; aquellos con malaria grave recibieron quinina intravenosa (25 mg/kg/día) durante cinco días. Los niños con anemia grave se sometieron a transfusión de sangre. Ninguno de los participantes había sufrido MC antes.

10 Recogida de muestras de sangre

Se recogió sangre venosa de cada paciente en EDTA en Vacutainers estériles el día de la hospitalización (día 0, antes de cualquier tratamiento), día 7 y día 30. El plasma se obtuvo centrifugando las muestras de sangre a 5000 g durante 15 min. Las muestras de plasma se almacenaron a -80 °C hasta que se usaron.

15 Evaluación de parásitos

La parasitemia se evaluó contando formas asexuales de *P. falciparum* en gotas finas de sangre bajo un microscopio óptico después de la tinción con 10 % de disolución de Giemsa. Se puntuaron cien glóbulos rojos y la parasitemia se expresa como el porcentaje de glóbulos rojos infectados.

20

Anticuerpos

Se cuantificó IgG total por ELISA “tipo sándwich” usando un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra IgG humana (específico para la cadena γ) sin conjugar (Sigma Aldrich, Francia) para el recubrimiento de placas y un anticuerpo policlonal de cabra secundario dirigido contra IgG humana (específico para la cadena γ) conjugado con peroxidasa (Sigma Aldrich, Francia). El patrón se hizo usando IgG humana purificada total (Immunopure, IgG humana, molécula completa, Pierce, Francia). La inmunotransferencia se realizó usando un anticuerpo policlonal de cabra secundario dirigido contra IgG humana (específico para la cadena γ) conjugado con la fosfatasa alcalina (Sigma Aldrich, Francia).

30

Cuantificación de IgG en plasma total

Para la cuantificación de la IgG en el plasma de pacientes, placas de 96 micropocillos (Reacti-Bind 96 EIA Plat.Corn.Not. 100/PKG, Pierce) se recubrieron por incubación durante la noche a 4 °C con 5 μ g/ml de anticuerpos monoclonales dirigidos contra IgG humana (Sigma-Aldrich, Francia). Las placas se lavaron con 0,05 % de Tween en PBS y se saturaron por incubación con 1 % de gelatina en PBS durante 1 hora a 37 °C. Las muestras de plasma se diluyeron entonces en serie en 1 % de gelatina y 0,01 % de Tween-20 en PBS. Se añadieron 100 μ l de plasma diluido a cada pocillo sin recubrir y las placas se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Las placas se lavaron minuciosamente y se incubaron con anticuerpo dirigido contra IgG humana conjugado con peroxidasa durante 2 h a 37 °C. La unión se detectó en la oscuridad, usando 100 μ l/pocillo de O-fenilendiamina (OPD) en tampón fosfato-citrato 0,05 M, pH 5 (Sigma-Aldrich, Francia) como sustrato. La reacción de peroxidasa se detuvo después de 30 min añadiendo 10 % de SDS (dodecilsulfato de sodio). La absorbancia se midió a 450 nm, con un lector de placas de ELISA. La cantidad total de IgG en la muestra se determinó a partir de un curva patrón que cubría el intervalo 0,001-2 μ g/ml de IgG. Cada muestra se probó por duplicado.

45

Ensayos de citocinas

Se usó un ELISA de tipo sándwich para determinar niveles de citocinas (TNF α , IFN γ y IL-10) usando un kit (conjunto OptEIA, Pharmingen, BD Bioscience, Francia), según las recomendaciones del fabricante. Los niveles de citocinas se determinaron en muestras de sangre de 106 pacientes elegidas al azar de los diversos grupos (18 NI, 26 MNC, 25 MNCG y 20 MC). Las cantidades de TNF α , IFN γ y IL-10 en las muestras se calcularon a partir de curvas patrón que cubrían el intervalo 1,1 a 75 pg/ml para IFN γ , 1,9 a 1000 pg/ml para IL-10 y 1,9 a 2000 pg/ml para TNF α .

50

Preparación de extracto de cerebro, electroforesis en gel e inmunotransferencia

55

Estos procedimientos fueron como se describen en cualquier parte (41). Brevemente, tejido de cerebro humano normal de una persona sin enfermedad cerebral se solubilizó y se homogeneizó sobre hielo por alteración mecánica en Tris 60 mM, 2 % de SDS, DTT 100 mM (ditiotretol), 1,0 μ g/ml de aprotinina, 1,0 μ g/ml de pepstatina, 50 μ g/ml de TLCK (N- α -tosil-L-lisina-clorometil-cetona), pH 6,8. Las proteínas del extracto de cerebro se almacenaron a -20 °C. Las proteínas (aproximadamente 300 μ g de proteína/gel) se separaron por una SDS-PAGE convencional en un 10 % de gel de acrilamida, a 25 mA. Todos los reactivos de electroforesis se compraron de Bio-Rad (Richmond, CA). Las proteínas se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schull, Dassel, Alemania) por electrotransferencia semi-seca (Instituto Pasteur, París) durante 1 h a 0,8 mA/cm². Las membranas se bloquearon

60

por incubación durante la noche a temperatura ambiente con 0,2 % de Tween 20 en PBS (PBST).

Entonces, las membranas se incubaron con muestras de plasma de pacientes diluidas 1:20 en PBST (ensayo no ajustado), o a una concentración de IgG total de 200 µg/ml (ensayo ajustado), en un sistema Miniblot de casete (Immuntics, Cambridge, MA). Este sistema de casete consiste en 28 canales de incubación, que permiten la incubación simultánea de cada membrana con 22 muestras individuales y 2 muestras de plasma patrón. Las membranas se incubaron durante 4 h a temperatura ambiente con agitación suave. Entonces se eliminaron de los casetes y las inmunoglobulinas unidas se detectaron por incubación con anticuerpo de conejo secundario dirigido contra IgG humana específico para cadena acoplada a fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich) durante 90 minutos a temperatura ambiente. La inmunorreactividad se detectó con NBT/BCPI (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato).

Los pesos moleculares de las proteínas cerebrales se determinaron comparando con "Precision Plus Protein Standards" (Bio-Rad, Richmond, CA) después de la separación por SDS-PAGE en 6 % y 10 % de geles de acrilamida. Este patrón contiene diez proteínas recombinantes altamente purificadas con masas moleculares de 10 a 250 kDa.

Tratamiento de datos y cuantificación de la inmunorreactividad

Se barrieron membranas secadas con un escáner de alta resolución (600 DPI) usando una escala de grises lineal de 8 bit como se describe previamente (41). Las proteínas sobre la membrana se tiñeron entonces con oro coloidal (Protogold, BritishBioCell, Cardiff, GB) y se barrieron de nuevo. La tinción de proteína total correspondiente se usó en los espacios entre las ranuras de incubación para ajustar los perfiles de inmunorreactividad para desigualdades de migración de manera que las inmunorreactividades equivalentes pudieran volver a escalarse a posiciones equivalentes en una escala de migración convencional común. La tinción de proteínas también se usó para ajustar diferentes transferencias con el mismo extracto cerebral entre sí y una muestra de plasma patrón se aplicó dos veces al gel para el ajuste de la intensidad total. Una mezcla de diversas preparaciones de plasma gabonés diluidas 1/20 se usó como muestra de plasma patrón.

30 Identificación de proteínas por espectrometría de masas

La localización de las bandas de proteína sobre el gel se hizo por transferencia Western (mismo procedimiento experimental usado para el análisis de repertorios) después de la separación por SDS-PAGE en 10 % de geles de acrilamida del extracto de proteína de cerebro usando un conjunto de sueros de 10 pacientes con MC definidos como que presentan una alta reactividad con la banda de interés. Para un gel, la mitad del gel se usó para transferir proteína sobre membrana de nitrocelulosa y análisis de transferencia Western. La otra mitad se tiñó con azul de Coomassie R250 brillante (Bio-Rad). Después de la inmunotransferencia y la tinción con Protogold de las proteínas sobre la membrana se usaron imágenes densitométricas para ajustar el perfil de proteínas e identificar las bandas de proteína. Las bandas de proteína de la mitad de gel teñida por Coomassie se seleccionaron y se cortaron manualmente usando un bisturí limpio, y luego se analizaron por espectrometría de masas.

Las proteínas se identificaron por huella peptídica con un espectrómetro de masas (EM) de ionización/desorción láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF), Voyager DE-STR (Applied Biosystems, Framingham, MA, EE.UU.). El sistema Investigator Progest (Genomic Solutions) se usó para la digestión en gel de proteínas con tripsina porcina modificada (Promega). El sistema Investigator ProMS (Genomic Solutions) se usó para desalar muestras (µZip-TipC18, Millipore) y para cargar la muestra con la matriz (ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico) sobre la placa de muestra de MALDI. La calibración interna de espectros de MALDI se llevó a cabo usando los picos de autólisis de la tripsina.

Para buscar en la base de datos NCBI nr, masas monoisotópicas se asignaron usando una copia local de Mascot (Matrix Science, Londres, RU). Los parámetros se fijaron del siguiente modo: ninguna restricción en el punto isoelectrico de proteínas, un error de masa máximo de 50 ppm y se consideró una escisión incompleta por péptido.

Análisis estadístico

Como las concentraciones de citocinas y las cargas de parásitos estuvieron lejos de normalmente distribuidas, estando más próximas a distribuciones normales logarítmicas, estos datos se describieron sistemáticamente, se mostraron y se analizaron con transformación logarítmica. Para esta transformación, niveles de citocinas en plasma indetectables se consideraron que eran 1 pg/ml (umbral de detección mínimo). Los análisis de correlación y regresión lineales también se llevaron a cabo en los datos transformados logarítmicamente para estos parámetros. Los datos de inmunotransferencia se analizaron por procedimientos estadísticos multifactoriales usando el software IGOR (Wavemetrics, Lake Oswego, OR), que incluye paquetes de software especialmente escritos. La escala de migración convencional se dividió en secciones alrededor de picos individuales de inmunorreactividad. Después de la resta de un nivel inicial, las áreas del pico bajo el perfil densitométrico respectivo se determinaron para cada sección y se dividieron entre la longitud de sección. Los números de bandas individualmente reconocidos se

determinaron contando secciones con valores superiores al 50 % del valor de plasma patrón cuando se promediaron sobre todas las secciones. Los valores de absorbancia relacionados con la sección se sometieron a análisis del componente principal (PCA), basado en el cálculo de la covarianza, un procedimiento clásico para el análisis multifactorial de datos correlacionados altamente dimensionales que implican proyección sobre subespacios característicos de menor dimensionalidad. Los factores de PCA se ordenan según la proporción de la varianza de datos total ajustada. Así, el primer componente (factor 1) es el vector de ajuste unidimensional que explica la mayor proporción de la varianza y el factor 2 es el segundo mejor vector unidimensional sin correlacionar que ajusta los datos. Para comparaciones cuantitativas entre grupos se usaron las pruebas de Mann-Whitney (entre dos grupos) o Kruskal-Wallis (>2 grupos). La asociación cualitativa se probó por la prueba de χ^2 de Pearson. La asociación entre parámetros cuantitativos continuos se evaluó por regresión lineal, con la excepción de correlaciones entre dos tipos diferentes de parámetros tales como perfiles de reactividad y de citocinas, que se probaron por la correlación del orden de Spearman. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

Ejemplo 1: Concentraciones de IgG en plasma total y de citocinas según edad, sexo, parasitemia y estado

15 clínico

Se determinaron los niveles de parasitemia y de IgG circulante en el día 0 (ingreso en el hospital) para los 129 pacientes aleatoriamente seleccionados y se distribuyeron entre los diversos grupos del siguiente modo: NI (18) MNC (61), MNCG (33) y MC (17) (datos no mostrados). La mediana de los niveles de parasitemia no se diferenció significativamente entre los grupos: MNC (3,2 %), MNCG (2,8 %) y MC (4,0 %). La parasitemia no se asoció significativamente a tanto el sexo como la edad. No se observó diferencia significativa en niveles de IgG total entre los grupos de NI, MNC, MNCG y MC en el día 0 (datos no mostrados). Los niveles de IgG total también fueron similares entre los sexos y no aumentó con la carga de parásitos. Sin embargo, la concentración de IgG total en plasma aumentó con la edad.

25

Las concentraciones de $\text{TNF}\alpha$, IL-10 y $\text{IFN}\gamma$ en plasma se determinaron en el día 0 (antes del tratamiento) en 18 pacientes NI, 26 MNC, 25 MNCG y 20 MC. Las concentraciones de $\text{TNF}\alpha$ en plasma fueron significativamente mayores en los grupos de NI, MNCG y MC que en el grupo de MNC ($p=0,0006$, $p=0,0001$ y $p=0,001$, respectivamente) (Figura 1a). Las concentraciones de $\text{TNF}\alpha$ en plasma en pacientes con malaria grave (MNCG y MC) se diferenciaron significativamente de aquellas en sujetos con NI, mientras que no se observó diferencia significativa en estas concentraciones entre pacientes con MNCG y MC. Sin embargo, el 75 % de los pacientes con MCG que murieron tenían un nivel en plasma muy alto de $\text{TNF}\alpha$ (62,5 % de 500 a 1520 pg/ml y 12,5 % de 100 a 500 pg/ml) (datos no mostrados). Las concentraciones de IL-10 en plasma fueron las más bajas en el grupo de NI, seguido del grupo de MNC, luego el grupo de MC y finalmente el grupo de MNCG (Figura 1b). Los niveles de IL-10 fueron significativamente menores en el grupo de NI que en los grupos de MNC ($p=0,0009$) y de malaria grave ($p<0,0001$), pero fueron similares en los grupos de MNC, MNCG y MC. Así, a diferencia de las concentraciones de $\text{TNF}\alpha$, las concentraciones de IL-10 no se diferenciaron significativamente entre los grupos de MNC, MNCG y MC. IL-10 fue la única de las tres citocinas estudiadas asociada significativamente a carga de parásitos en el día 0, tanto para el grupo de MNC ($R_{\text{Spearman}}=+0,65$; $p=0,003$), como para todos los pacientes infectados ($R_{\text{Spearman}}=+0,27$; $p=0,03$) (datos no mostrados). Ninguna de las citocinas determinada en el día 0 estuvo significativamente asociada a edad o sexo en la muestra en conjunto o en cualquiera de los grupos. Las concentraciones de $\text{IFN}\gamma$ fueron las mayores en los grupos de MNC y MC (datos no mostrados). Las diferencias entre los grupos de MC y NI fueron estadísticamente significativas ($p=0,007$), mientras que no se observaron diferencias significativas entre los grupos de MNC, MNCG y MC.

45

Ejemplo 2: Diversidad de la reactividad de IgG con antígenos de cerebro en los diversos grupos clínicos

Se compararon patrones de reconocimiento de antígenos de cerebro por IgG de plasma de pacientes infectados por *P. falciparum* con diferentes formas clínicas de malaria. Los patrones se detectaron por inmunotransferencia cuantitativa (transferencia PANAMA) usando un extracto de proteína del cerebro de un individuo sano como fuente de antígenos. Se llevó a cabo un ensayo ajustado como se describe previamente (40-42), en el que plasma de pacientes se diluyó sistemáticamente para probar a una concentración de IgG total idéntica (200 $\mu\text{g/ml}$), para determinar la proporción de IgG total justificada para autoanticuerpos. 122 de los pacientes enrolados se seleccionaron aleatoriamente en las cohortes, y se analizaron sueros recogidos en el día 0 (ingreso en el hospital), día 7 y día 30. No fue posible determinar los perfiles de nueve pacientes debido a precipitación. Los restantes pacientes se distribuyeron del siguiente modo: 18 NI, 57 MNC, 24 MNCG y 14 MC. La Figura 2 muestra ejemplos típicos de los perfiles inmunes obtenidos con el extracto de cerebro, para varios pacientes de cada grupo, en los días 0, 7 y 30. Los patrones de reactividad fueron más diversos en los grupos de MNC, MNCG y MC que en el grupo de NI y CNIE (controles no infectados europeos), pero no cambió durante este periodo de tiempo (Figura 2a). La mediana del número de antígenos cerebrales reconocidos por IgG en plasma fue significativamente mayor en sujetos con MNC ($p=0,02$), MNCG ($p=0,01$) y MC ($p=0,02$) que en NI (datos no mostrados), mientras que la diferencia en el número de bandas reconocidas no se diferenció significativamente entre pacientes con MNC, MNCG y MC. Se determinó la proporción de pacientes en cada grupo con IgG en plasma que reconoció un número particular de bandas (Figura 2b). La proporción de individuos con un gran número de bandas (> 12) fue mayor en sujetos con MC (71 %) y MNCG (58 %) que en MNC (49 %) y NI (17 %). La diferencia global entre grupos fue

65

significativa ($\chi^2=11,2$, $p=0,01$). Así, el número de antígenos de cerebro reconocidos por IgG circulante de individuos infectados por *P. falciparum* aumentó con la gravedad de la enfermedad, reaccionando los sueros de la mayoría de los sujetos NI con menos de ocho bandas (Figura 2b).

5 **Ejemplo 3: Relación entre el tamaño del repertorio de IgG dirigido contra antígenos de cerebro y gravedad de la enfermedad**

La distribución de reactividades de IgG circulantes a proteínas cerebrales se investigó llevando a cabo un segundo ensayo de inmunotransferencia cuantitativa, usando el mismo procedimiento pero analizando cada muestra de
 10 plasma a una dilución fija de 1/20 (ensayo no ajustado). En este ensayo se incluyeron diez niños europeos de edades similares que nunca se habían expuesto a la malaria. Entonces, los patrones de reactividad de los pacientes se analizaron por análisis del componente principal (PCA), ajustados a los datos gaboneses. En PCA, los componentes se identifican en orden decreciente de importancia. Así, por definición, los dos primeros componentes identificados explican una gran proporción de reactividad total. El factor 1 se caracterizó por cargas de factor positivo
 15 globales (Figura 3). Por tanto, las puntuaciones del factor 1 proporcionan una medida cuantitativa de reactividad total. Las puntuaciones del factor 2 reflejaron principalmente el reconocimiento de una sección particular (la sección 0) en vez de las otras. El factor 1 y las puntuaciones del factor 2 fueron mayores en los pacientes con MC que en NI, MNC y MNCG (Figura 4a y 4b). Las puntuaciones del factor 1 fueron significativamente menores en CNIE que en NI gaboneses ($p=0,045$). No se observó diferencia significativa entre los grupos de NI, MNC, MNCG y MC (Figura 4a).
 20 Las puntuaciones del factor 2 se diferenciaron significativamente entre pacientes con MC y MNCG ($p=0,001$) y entre pacientes con MC y MNC ($p=0,04$) (Figura 4b).

La proporción de pacientes con altas puntuaciones del factor 1 (y, por tanto, alta actividad anticerebral global) pareció ser la mayor para pacientes con MC, pero no se encontró diferencia significativa entre los grupos (Figura 4c).
 25 La proporción de pacientes con altas puntuaciones del factor 2 fue significativamente menor en sujetos con CNIE, NI, MNC y MNCG (70 %, 67 %, 61 % y 50 %, respectivamente) que en MC (100 %) (χ^2 corregida de Yates = 6,8, $p=0,009$; $\chi^2_{\text{Todos los grupos}} = 10,4$, $p = 0,03$) (Figura 4d). Sorprendentemente, todos los pacientes con MC tuvieron puntuaciones del factor 2 por encima de la media.

30 Además de las muestras del día 0, también se analizaron las muestras tomadas de los mismos individuos (14 pacientes NI, 42 MNC, 27 MNCG y 3 MC) en los días 7 y 30 después del ingreso. Las puntuaciones de factor obtenidas para estas muestras se determinaron por proyección, usando cargas de factor calculadas a partir de los datos del día 0. Las puntuaciones del factor 1 aumentaron significativamente entre los días 0 y 7 en pacientes que desarrollaron malaria mientras que, en el día 30, los patrones de reactividad fueron idénticos a aquellos en el día 7
 35 para la mayoría de los niños (datos no mostrados). No se observó tal aumento en las puntuaciones del factor 2.

Ejemplo 4: Reactividad a proteínas cerebrales según edad, sexo, parasitemia y niveles de IgG circulantes

La reactividad a antígenos de cerebro representada por puntuaciones del factor 1 se correlacionó significativamente
 40 con la edad ($R=+0,39$, $p=0,001$) (Figura 5a) en el ensayo no ajustado, mientras que no se encontró correlación entre perfiles de reactividad, sexo y parasitemia (datos no mostrados). Sin embargo, se encontró que la concentración de IgG circulante se correlacionaba significativamente con la reactividad en todos los grupos ($R=+0,21$, $p=0,03$) (Figura 5b) excepto para controles no infectados (datos no mostrados). Estas correlaciones con concentración de IgG total y edad fueron menos significativas ($p=0,038$ y $0,026$, respectivamente) si se usaron ensayos de inmunotransferencia
 45 ajustados para análisis de PCA. Así, el determinar las proporciones, como para la evaluación de diversidad, puede mejorar las propiedades del repertorio intrínsecas y hacer posible tratar cambios específicos. En el ensayo ajustado se observó alta reactividad anticerebral (puntuaciones del factor 1) solo para pacientes con bajas concentraciones de IgG total (Figura 6a). Los niños se asignaron a tres subgrupos del siguiente modo: α) baja reactividad anticerebral y niveles moderados de IgG circulante (por debajo de 25 mg/dl), β) alta reactividad anticerebral y niveles moderados
 50 de IgG circulante y δ) baja reactividad anticerebral y altos niveles de IgG circulante. Los subgrupos α y β mostraron distribuciones desiguales de pacientes con MNC, MNCG y MC. Los pacientes con MNC y MNCG se expresaron en exceso en el subgrupo α (72 % de los pacientes con MNC y 75 % de los pacientes con MNCG, pero solo el 36 % de los pacientes con MC; prueba de χ al cuadrado para todos los grupos: $p=0,049$). El subgrupo β incluyó 50 % de los pacientes con MC, pero solo el 21 % de todas las muestras (prueba de χ al cuadrado: $p=0,028$). No se observó
 55 distribución preferencial de ningún grupo particular de pacientes en el subgrupo δ .

Durante los doce primeros meses de vida, el plasma puede contener IgG materna. Las diferencias entre los tres subgrupos fueron más pronunciadas si el análisis se limitó a puntuaciones del factor 1 para la reactividad anticerebral ajustada de sueros de niños por encima de la edad de un año. En este análisis, el subgrupo α contuvo
 60 el 89 % de los pacientes con MNC y el 79 % de los pacientes con MNCG, pero solo el 11 % de los pacientes con MC, mientras que el 78 % de los pacientes con MC se encontraron en el subgrupo β (Figura 6b). Las asociación entre los niveles de IgG reactivas en el cerebro y estado clínico fue altamente significativa para los subgrupos α y β ($p=0,0005$ y $0,0004$, respectivamente). Similarmente, los pacientes con MC por encima de la edad de un año también mostraron la mayor reactividad anticerebral (puntuaciones del factor 1) (Figura 6c). Las puntuaciones del

factor 1 fueron significativamente mayores para pacientes con MC que para pacientes con MNCG y MNC ($p=0,005$ y $0,009$, respectivamente) en el ensayo ajustado.

Así, la reactividad de IgG contra el cerebro, que se correlacionó con tanto la edad como la concentración de IgG en plasma total en el ensayo sin ajustar, refleja diferencias no específicas en el repertorio de autoanticuerpos natural. En cambio, los resultados para el ensayo ajustado, en los que el efecto de tanto la edad como las concentraciones de IgG total se eliminaron en gran medida, indican que un repertorio de anticuerpos auto-reactivos específico se induce durante la infección por *P. falciparum*.

10 Ejemplo 5: La reactividad de IgG con un antígeno de cerebro de alto peso molecular está asociada con MC

Los perfiles de la reactividad de muestras de plasma patrón y de pacientes con proteínas cerebrales se separaron en 33 secciones sobre la escala de migración normalizada. El análisis de PCA reveló que la reactividad con sección 0, correspondiente a un conjunto de proteínas de alto peso molecular, fue la más informativa (Figura 3). En los dos tipos de ensayo, esta sección tuvo el mayor impacto sobre el factor 1 de PCA. Para el factor 2 de PCA, la sección 0 se distinguió del resto del repertorio por una carga positiva. La sección 0 incluye al menos tres proteínas con pesos moleculares estimados de 230 kDa, 147 kDa y una doble banda a 130 kDa sobre SDS-PAGE en un 6 % de gel de acrilamida con patrones de tamaño de proteína (Figura 7). En ensayos ajustados, la IgG en plasma de niños con MC por encima de la edad de un año reaccionó más fuertemente con las proteínas cerebrales contenidas en la sección 0 que el IgG en plasma de niños de los grupos de MNC y MNCG (ambos $p=0,0008$) (Figura 8): 90 % de los pacientes con MC tuvieron una reacción detectable, frente al 50 % de pacientes con MNCG, 44 % de NI y 39 % de MNC (datos no mostrados). Los resultados obtenidos en ensayos sin ajustar fueron cualitativamente similares, pero las diferencias entre MC y MNC y entre MC y MNCG fueron menos significativas ($p=0,02$ y $0,01$, respectivamente). La reactividad sin ajustar con las proteínas de la sección 0 aumentó con la edad ($R=0,25$; $p=0,04$) (datos no mostrados).

Ejemplo 6: Identificación por espectrometría de masas

Se separaron proteínas de extracto de cerebro humano sobre un 10 % de gel de acrilamida. Después de la tinción con Coomassie, tres bandas correspondientes a bandas reactivas detectadas por transferencia Western se cortaron y su contenido de proteínas se analizó por huella peptídica. En tres experimentos independientes, la banda 1 se correspondió con la cadena beta de la espectrina no eritroide isoforma 2 mientras que las bandas 2 y 3 con siete isoformas diferentes de la cadena alfa de la espectrina no eritroide. En este último caso no es posible distinguir si solo una, varias o todas estas isoformas están presentes en las bandas 2 y 3 (Tabla 4).

Tabla 4: Resultado de huella peptídica. * La puntuación de Mascot es $10 \times \log(p)$ en la que p es la probabilidad de que la coincidencia observada sea un evento al azar. Las puntuaciones de proteínas superiores a 64 son significativas ($p < 0,05$).

Número de banda		Número de acceso de NCBI	MW (kDa)	Péptidos coincidentes	Cobertura de la secuencia (%)	Puntuación de Mascot *
banda 1		gi 30315658	251	28	15	89
banda 2	y/o	gi 56757656	285	64	28	401
		gi 55663122	285	64	28	401
		gi 31565122	282	64	28	400
		gi 62089306	288	64	28	399
		gi 55663121	288	64	28	398
		gi 1805280	285	64	28	398
		gi 4507191	284	63	28	390
banda 3	y/o	gi 56757656	285	53	24	303
		gi 55663122	285	53	24	303
		gi 31565122	282	53	24	303
		gi 62089306	288	53	24	300
		gi 55663121	288	53	24	300
		gi 1805280	285	53	24	300
		gi 4507191	284	53	24	303

Ejemplo 7: Relaciones entre reactividad de IgG con proteínas del cerebro, perfil de citocinas en plasma y manifestaciones clínicas de malaria

Los inventores evaluaron si la auto-respuesta de anticuerpos IgG y el tipo de enfermedad se asociaron o no a un perfil de citocinas circulantes específico en pacientes infectados por *P. falciparum*. Las concentraciones de IFN γ en

plasma y la reactividad no se asociaron en los diversos grupos. En el ensayo ajustado, la reactividad a antígenos de cerebro, como se mide por la puntuación del factor 1 de PCA, se correlacionó positivamente con la concentración de TNF α . Esta correlación fue significativa para niños por encima de la edad de un año ($R_{\text{Spearman}}=+0,41$, $p=0,02$) (Figura 9a). La puntuación del factor 1 fue particularmente alta en los pacientes con MC con las mayores concentraciones de TNF α e plasma (> 100 pg/ml). La intensidad de la reactividad sin ajustar (pero no de la ajustada) con la banda de sección 0 también se correlacionó con las concentraciones de TNF α (en todos los niños: $R_{\text{Spearman}}=+0,35$, $p=0,008$; niños de edades superiores a 1 año: $R_{\text{Spearman}}=+0,54$, $p=0,002$) (Figura 9b). La reactividad con las bandas de la sección 0 fue significativamente más fuerte para los pacientes con MC con las mayores concentraciones de TNF α en plasma (> 100 pg/ml) que para pacientes con MNCG y MNC ($p=0,0006$ y $p=0,003$, respectivamente) (Figura 9c).

Ejemplo 8: Ensayos de inmunocaptura

Los ensayos de inmunocaptura se realizan para detectar tanto autoanticuerpos IgG, IgM como IgA contra espectrina no eritroide.

La fase sólida (microplacas, microperlas, membranas) se sensibiliza con un anticuerpo humano anti-gamma, anti-alfa o y anti-mu (preferentemente monoclonal).

Después de un periodo de incubación (24 h a 48 °C), la fase sólida se lava y se satura.

Cada muestra que va a probarse se diluye apropiadamente (aproximadamente 1/100 para suero de adulto, y aproximadamente 1/10 para suero neonatal e infantil) y se deposita sobre la fase sólida sensibilizada (por triplicado). Entonces se incuba la fase sólida.

Después de lavar, una espectrina de no eritrocito marcada o un fragmento de la misma se añade sobre la fase sólida. La fase sólida se incuba de nuevo.

Después de un segundo lavado, la reacción inmunitaria se lee, directamente si la espectrina de no eritrocito o un fragmento está por sí misma directamente marcado (partículas magnéticas o coloreadas) o indirectamente si la marca es una enzimática, mediante la adición del sustrato y cromógeno apropiado.

Este ensayo permite la detección de ligeras concentraciones de anticuerpo.

Ejemplo 9: Comparación de las respuestas de anticuerpos con la cadena α de la espectrina eritroide y la no eritroide en pacientes infectados por *P. falciparum*.

La alfa-espectrina no eritroide comparte el 60 % de identidad de secuencias de aminoácidos con la proteína de glóbulos rojos humana (43). Como los glóbulos rojos que reconocen autoanticuerpos se informan frecuentemente durante la infección por *Plasmodium*, los inventores han investigado si los anticuerpos auto-reactivos que reconocen la cadena α de la espectrina no eritroide observados en pacientes con MC son o no un resultado de una reactividad cruzada con la espectrina eritroide α . Para este fin, estimaron niveles de IgG en plasma contra la forma eritroide de esta proteína en la cohorte de pacientes estudiada usando una prueba de ELISA. Además de la primera cohorte se probaron otros individuos, que incluyen un nuevo grupo definido como individuos infectados asintomáticos (IA).

Los anticuerpos anti-IgG de espectrina se cuantificaron en el plasma de los niños infectados por *P. falciparum*. Se desarrolló un ensayo de ELISA para probar la reactividad de IgG específica contra la forma de eritrocito de la espectrina. La espectrina eritroide purificada de Sigma se recubrió sobre placa de 96 pocillos a la concentración de 2,5 microg/ml. Las muestras de plasma se probaron a la dilución de 1/50 y se incubaron 1 hora a 37 °C. El anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa dirigido contra IgG humana específico (Sigma) se incubó a la dilución de 1/500 durante 1 hora a 37 °C. Las reactividades se revelaron con OPD en tampón citrato y luego se detuvieron con 10 % de SDS. La densidad óptica (DO) se cuantificó a 450 nm. Los resultados se expresaron como una relación definida como (DO de la muestra – DO del ruido de fondo) / (DO de control positivo – DO del ruido de fondo) en la que el control positivo de DO es un conjunto de plasmas que se incluyó en cada placa como control positivo. Los grupos de pacientes se compararon usando la prueba de la U de Mann-Whitney no paramétrica.

Se encontró mayor nivel de IgG que reacciona con espectrina eritroide en MNC (media de la relación por grupo \pm desviación estándar: $1,016 \pm 0,679$) cuando se comparó con MNCG ($0,874 \pm 0,433$), MC ($0,788 \pm 0,526$), IA ($0,752 \pm 0,484$) y NI ($0,643 \pm 0,285$) (Figura 10). Como se muestra por las pruebas de la U de Mann-Whitney, los grupos fueron significativamente diferentes cuando se compararon MNC frente a NI ($p=0,0095$), MNC frente a MC ($p=0,0118$), MC frente a malaria no cerebral (MNCG y MNC) ($p=0,015$), (IA + NI) sanos frente a (MNC + MNCG + MC) no sanos ($p=0,0205$) y (IA + MNC + MNCG + MC) infectados frente a (NI) no infectados ($p=0,0457$).

Estos resultados sugieren que, al contrario de lo que podría haberse esperado, los anticuerpos contra la cadena α de la espectrina no eritroide producidos en pacientes con MC y los anticuerpos contra la cadena α de la espectrina

eritroide encontrados en el plasma del mismo grupo de pacientes con malaria no reconocen los mismos epítopes. Por tanto, los anticuerpos auto-reactivos que reconocen la cadena α de la espectrina no eritroide observados en pacientes con MC no resultan de una reactividad cruzada con la espectrina eritroide α .

5 Ejemplo 10: Los anticuerpos auto-reactivos producidos en pacientes con MC no están dirigidos al fragmento del extremo N-terminal de la cadena α de la espectrina no eritroide

La cadena α de la espectrina no eritroide (espectrina α -II) se escinde durante la apoptosis. La escisión se efectúa tras la activación de una proteasa activada por calcio neutra, calpaína y caspasa-3, ambos miembros de la familia de las cisteína proteasas, que se ha mostrado que desempeña una función importante en las cascadas proteolíticas asociadas a varios otros trastornos del sistema nervioso central tales como accidente cerebrovascular, hipoxia-isquemia, hidrocefalo experimental y lesión de la médula espinal. La escisión de espectrina intacta (280 kDa) mediada por calpaína produce fragmentos de 150 kDa (extremo C-terminal) y 145 kDa (extremo N), específicos para calpaína.

15 De forma interesante, se ha mostrado que los anticuerpos contra alfa-fodrina están presentes en hasta el 98 % de los pacientes sin tratar con síndrome de Sjögren. Estos anticuerpos son específicamente dirigidos contra un producto de escisión apoptótica de alfa-fodrina, que es un fragmento del extremo N de 120 kDa de la espectrina α -II (producto de una degradación parcial del fragmento de 145 kDa mencionado anteriormente).

20 Los inventores han investigado si los anticuerpos encontrados en pacientes con enfermedad de Sjögren reconocieron o no la misma parte de la espectrina α -II que los anticuerpos encontrados en pacientes con MC. Para este objetivo, usaron un kit comercial (Aesku Diagnostic, Alemania), que permite cuantificar IgG específica para el fragmento del extremo N de 120 kDa de la espectrina α -II. Se probó la misma cohorte de pacientes que antes. Los
25 datos obtenidos mostraron que la cantidad de IgG específicas que reconocen este fragmento del extremo N de la espectrina α -II es significativamente elevada en los pacientes asintomáticos (IA), agudos (MNC) y con malaria no cerebral grave (MNCG) en comparación con los individuos no infectados vivos en la misma área endémica (NI). Por el contrario, la cantidad de IgG que reconocen el fragmento del extremo N de 120 kDa de la espectrina α -II en pacientes con malaria cerebral (MC) fue estadísticamente la misma que en sujetos sin infectar (NI) (Figura 11).

30 En conclusión, las IgG circulantes contra el fragmento del extremo N de 120 kDa de la espectrina α -II observadas en los sueros de pacientes infectados por *P. falciparum* no puede explicar la reactividad de IgG circulante con la cadena α de la espectrina no eritroide encontrada en pacientes con MC. Estos resultados también sugieren que los anticuerpos producidos en sujetos IA, MNC y MNCG no reconocen los mismos péptidos antigénicos de la espectrina
35 α -II que los anticuerpos producidos en pacientes MC. Claramente, la hipótesis de una función desempeñada por autoanticuerpos para proteínas cerebrales en la patofisiología de MC está de acuerdo con las observaciones del inventor y con aquellas previamente hechas para numerosas enfermedades autoinmunitarias que implican el cerebro tales como esclerosis múltiple. Según este concepto, altos niveles de autoanticuerpos para espectrina α -II encontrados en pacientes con MC no se producirían por la estimulación antigénica directa de clones de linfocitos de
40 anti-espectrina α -II de cerebro, pero serían una consecuencia de un defecto inducido por *P. falciparum* o debilitamiento de la regulación natural de autorreactividad del homínulo. Por consiguiente y ya que el fragmento de espectrina α -II reconocido por las IgG de pacientes infectados por *P. falciparum* se diferencia del reconocido por IgG de pacientes con MC, se propone usar el anticuerpo para espectrina α -II como marcador de MC.

45

REFERENCIAS

1. Breman, J.G., A. Egan y G.T. Keusch. 2001. The intolerable burden of malaria: a new look at the numbers. Am J Trop Med Hyg. 64:iv-vii.
- 50 2. Idro, R., N.E. Jenkins y C.R. Newton. 2005. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. Lancet Neurol. 4:827-840.
3. Idro, R., G. Otieno, S. White, A. Kahindi, G. Fegan, S. Mithwani, K. Maitland, B.G. Neville, B. Ogotu y C.R. Newton. 2005. Decorticate, decerebrate and opisthotonic posturing and seizures in Kenyan children with cerebral
55 malaria. Malar J. 4:57.
4. Akanmori, B.D., J.A. Kurtzhals, B.Q. Goka, V. Adabayeri, M.F. Ofori, F.K. Nkrumah, C. Behr y L. Hviid. 2000. Distinct patterns of cytokine regulation in discrete clinical forms of Plasmodium falciparum malaria. Eur Cytokine
60 Netw. 11:113-118.
5. Issifou, S., E. Mavoungou, S. Borrmann, M.K. Bouyou-Akotet, P.B. Matsiegui, P.G. Kremsner y F. Ntoumi. 2003. Severe malarial anemia associated with increased soluble Fas ligand (sFasL) concentrations in Gabonese children. Eur Cytokine Netw. 14:238-241.

6. Miller, K.L., P.H. Silverman, B. Kullgren y L.J. Mahlmann. 1989. Tumor necrosis factor alpha and the anemia associated with murine malaria. *Infect Immun.* 57:1542-1546.
- 5 7. Miller, L.H., D.I. Baruch, K. Marsh y O.K. Doumbo. 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 415:673-679.
8. Taylor-Robinson, A.W., R.S. Phillips, A. Severn, S. Moncada y F.Y. Liew. 1993. The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection. *Science.* 260:1931-1934.
- 10 9. Taylor-Robinson, A.W. y M. Looker. 1998. Sensitivity of malaria parasites to nitric oxide at low oxygen tensions. *Lancet.* 351:1630.
10. Luty, A.J., B. Lell, R. Schmidt-Ott, L.G. Lehman, D. Luckner, B. Greve, P. Matousek, K. Herbich, D. Schmid, F. Migot-Nabias, P. Deloron, R.S. Nussenzweig y P.G. Kremsner. 1999. Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with *Plasmodium falciparum* in young African children. *J Infect Dis.* 179:980-988.
- 15 11. Peyron, F., N. Burdin, P. Ringwald, J.P. Vuillez, F. Rousset y J. Banchereau. 1994. High levels of circulating IL-10 in human malaria. *Clin Exp Immunol.* 95:300-303.
- 20 12. Ho, M., T. Schollaardt, S. Snape, S. Looareesuwan, P. Suntharasamai y N.J. White. 1998. Endogenous interleukin-10 modulates proinflammatory response in *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 178:520-525.
13. Kurtis, J.D., D.E. Lanar, M. Opollo y P.E. Duffy. 1999. Interleukin-10 responses to liver-stage antigen 1 predict human resistance to *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* 67:3424-3429.
- 25 14. Nussenblatt, V., G. Mukasa, A. Metzger, G. Ndezi, E. Garrett y R.D. Semba. 2001. Anemia and interleukin-10, tumor necrosis factor alpha, and erythropoietin levels among children with acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8:1164-1170.
- 30 15. Lang, B., C.I. Newbold, G. Williams, N. Peshu, K. Marsh y C.R. Newton. 2005. Antibodies to voltage-gated calcium channels in children with *falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 191:117-121. Epub 2004 Dec 2001.
16. McKnight, K., Y. Jiang, Y. Hart, A. Cavey, S. Wroe, M. Blank, Y. Shoenfeld, A. Vincent, J. Palace y B. Lang. 2005. Serum antibodies in epilepsy and seizure-associated disorders. *Neurology.* 65:1730-1736.
- 35 17. Freeman, R.R. y C.R. Parish. 1978. Polyclonal B-cell activation during rodent malarial infections. *Clin Exp Immunol.* 32:41-45.
18. Kataaha, P.K., C.A. Facer, S.M. Mortazavi-Milani, H. Stierle y E.J. Holborow. 1984. Stimulation of autoantibody production in normal blood lymphocytes by malaria culture supernatants. *Parasite Immunol.* 6:481-492.
19. Shiddo, S.A., G. Huldt, H. Jama, L.A. Nilsson, O. Ouchterlony, M. Warsame y J. Jonsson. 1994. Reference ranges for IgG, IgM and IgA in the serum of urban and rural Somalis. *Trop Geogr Med.* 46:27-31.
- 45 20. Houba, V. y A.C. Allison. 1966. M-antiglobulins (rheumatoid-factor-like globulins) and other gamma-globulins in relation to tropical parasitic infections. *Lancet.* 1:848-852.
21. Shaper, A.G., M.H. Kaplan, N.J. Mody y P.A. McIntyre. 1968. Malarial antibodies and autoantibodies to heart and other tissues in the immigrant and indigenous peoples of Uganda. *Lancet.* 1:1342-1346.
- 50 22. Adu, D., D.G. Williams, I.A. Quakyi, A. Voller, Y. Anim-Addo, A.A. Bruce-Tagoe, G.D. Johnson y E.J. Holborow. 1982. Anti-ssDNA and antinuclear antibodies in human malaria. *Clin Exp Immunol.* 49:310-316.
23. Ravindran, B., A.K. Satapathy y M.K. Das. 1988. Naturally-occurring anti-alpha-galactosyl antibodies in human *Plasmodium falciparum* infections--a possible role for autoantibodies in malaria. *Immunol Lett.* 19:137-141.
- 55 24. Daniel-Ribeiro, C., L. Ben Slama y M. Gentilini. 1991. Antinuclear and anti-smooth muscle antibodies in Caucasians, Africans and Asians with acute malaria. *J Clin Lab Immunol.* 35:109-112.
- 60 25. Jakobsen, P.H., S.D. Morris-Jones, L. Hviid, T.G. Theander, M. Hoier-Madsen, R.A. Bayoumi y B.M. Greenwood. 1993. Anti-phospholipid antibodies in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. *Immunology.* 79:653-657.
26. Maeno, Y., R.W. Steketee, T. Nagatake, T. Tegoshi, R.S. Desowitz, J.J. Wirima y M. Aikawa. 1993. Immunoglobulin complex deposits in *Plasmodium falciparum*-infected placentas from Malawi and Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg.* 49:574-580.
- 65

27. Wenisch, C., H. Wenisch, H.C. Bankl, M. Exner, W. Graninger, S. Looareesuwan y H. Rumpold. 1996. Detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies after acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Diagn Lab Immunol.* 3:132-134.
- 5 28. Jhaveri, K.N., K. Ghosh, D. Mohanty, B.D. Parmar, R.R. Surati, H.M. Camoens, S.H. Joshi, Y.S. Iyer, A. Desai y S.S. Badakere. 1997. Autoantibodies, immunoglobulins, complement and circulating immune complexes in acute malaria. *Natl Med J India.* 10:5-7.
- 10 29. Soni, P.N., C.C. De Bruyn, J. Duursma, B.L. Sharp y D.J. Pudifin. 1993. Are anticardiolipin antibodies responsible for some of the complications of severe acute *Plasmodium falciparum* malaria? *S Afr Med J.* 83:660-662.
30. Facer, C.A. y G. Agiostratidou. 1994. High levels of anti-phospholipid antibodies in uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* and in *P. vivax* malaria. *Clin Exp Immunol.* 95:304-309.
- 15 31. Consigny, P.H., B. Cauquelin, P. Agnamey, E. Comby, P. Bresseur, J.J. Ballet y C. Roussilhon. 2002. High prevalence of co-factor independent anticardiolipin antibodies in malaria exposed individuals. *Clin Exp Immunol.* 127:158-164.
- 20 32. Facer, C.A. 1980. Direct antiglobulin reactions in Gambian children with *P. falciparum* malaria. III. Expression of IgG subclass determinants and genetic markers and association with anaemia. *Clin Exp Immunol.* 41:81-90.
33. Ritter, K., A. Kuhlencord, R. Thomssen y W. Bommer. 1993. Prolonged haemolytic anaemia in malaria and autoantibodies against triosephosphate isomerase. *Lancet.* 342:1333-1334.
- 25 34. Stoute, J.A., A.O. Odindo, B.O. Owuor, E.K. Mibei, M.O. Opolo y J.N. Waitumbi. 2003. Loss of red blood cell-complement regulatory proteins and increased levels of circulating immune complexes are associated with severe malarial anemia. *J Infect Dis.* 187:522-525.
- 30 35. Torres, J.R., L. Villegas, H. Perez, L. Suarez, V.M. Torres y M. Campos. 2003. Low-grade parasitaemias and cold agglutinins in patients with hyper-reactive malarious splenomegaly and acute haemolysis. *Ann Trop Med Parasitol.* 97:125-130.
36. Jayawardena, A.N., C.A. Janeway, Jr. y J.D. Kemp. 1979. Experimental malaria in the CBA/N mouse. *J Immunol.* 35 123:2532-2539.
37. Jarra, W. 1983. Protective immunity to malaria and antierythrocyte autoimmunity. *Ciba Found Symp.* 94:137-158.
38. Daniel-Ribeiro, C.T. 2000. Is there a role for autoimmunity in immune protection against malaria? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 95:199-207.
39. Krams, S.M., S. Cao, M. Hayashi, J.C. Villanueva y O.M. Martinez. 1996. Elevations in IFN-gamma, IL-5, and IL-10 in patients with the autoimmune disease primary biliary cirrhosis: association with autoantibodies and soluble CD30. *Clin Immunol Immunopathol.* 80:311-320.
- 45 40. Nobrega, A., M. Haury, A. Grandien, E. Malanchere, A. Sundblad y A. Coutinho. 1993. Global Analysis of Antibody Repertoires .2. Evidence For Specificity, Self-Selection and the Immunological Homunculus of Antibodies in Normal Serum. *European Journal of Immunology.* 23:2851-2859.
- 50 41. Haury, M., A. Grandien, A. Sundblad, A. Coutinho y A. Nobrega. 1994. Global Analysis of Antibody Repertoires .1. an Immunoblot Method For the Quantitative Screening of a Large Number of Reactivities. *Scandinavian Journal of Immunology.* 39:79-87.
42. Stahl, D., S. Lacroix-Desmazes, L. Mouthon, S.V. Kaveri y M.D. Kazatchkine. 2000. Analysis of human self-reactive antibody repertoires by quantitative immunoblotting. *Journal of Immunological Methods.* 240:1-14.
- 55 43. Baines, A. J. y J. C. Pinder. 2005. The spectrin-associated cytoskeleton in mammalian heart. *Front Biosci.* 10: 3020-3033.
- 60 44. Shukla, M., Rajgopal, Y. y Babu, P.P. (2006) Activation of calpains, calpastatin and spectrin cleavage in the brain during the pathology of fatal murine cerebral malaria. *Neurochem Int,* 48, 108-113.
45. Day, N.P., Hien, T.T., Schollaardt, T., Loc, P.P., Chuong, L.V., Chau, T.T., Mai, N.T., Phu, N.H., Sinh, D.X., White, N.J. y Ho, M. (1999) The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis,* 180, 1288-1297.
- 65

46. Vazquez, J., Fernandez-Shaw, C., Marina, A., Haas, C., Cacabelos, R. y Valdivieso, F. (1996) Antibodies to human brain spectrin in Alzheimer's disease. J Neuroimmunol, 68, 39-44.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSTITUT PASTEUR UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6) PIED, Silvianna GUIYEDI, Vincent CAZENAVE, Pierre-André KOMBILA, Maryvonne CHANSEAUD, Youri

10

<120> USO DE LA CADENA ALFA DE ESPECTRINA CEREBRAL Y FRAGMENTOS DE LA MISMA PARA DIAGNOSTICAR ENFERMEDADES CEREBRALES.

<130> VMAahF226-126

15

<160> 45

<170> PatentIn versión 3.3

20 <210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> polipéptido

<400> 1

Leu Glu Lys Trp Ile Gln Glu Lys Leu Gln Ile Ala Ser Asp Glu Asn
1 5 10 15

Tyr Lys Asp Pro
20

30

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

40 <400> 2

Ala Asn Ser Gly Ala Ile Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Asn Leu Met
1 5 10 15

Ile Ser Glu Gly His Phe Ala Ser Glu Thr Ile
20 25

<210> 3

45 <211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

50 <223> polipéptido

<400> 3

ES 2 452 030 T3

Thr Asp Met Ala Ala His Glu Glu Arg Val Asn Glu Val Asn Gln Phe
 1 5 10 15

Ala Ala Lys Leu Ile Gln Glu Gln His Pro Glu Glu Glu Leu Ile Lys
 20 25 30

Thr Lys Gln Asp
 35

<210> 4

<211> 25

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

10

<400> 4

Gln Leu Met Ala Ser Asp Asp Phe Gly Arg Asp Leu Ala Ser Val Gln
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Arg Lys His Glu Gly Leu
 20 25

15 <210> 5

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> polipéptido

<400> 5

Ala Asp Arg Leu Gln Gln Ser His Pro Leu Ser Ala Thr Gln Ile Gln
 1 5 10 15

Val Lys Arg Glu Glu Leu Ile Thr Asn
 20 25

25

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

35 <400> 6

Ser Phe Lys Ser Ala Asp Glu Ser Gly Gln Ala Leu Leu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

His Tyr Ala Ser
 20

<210> 7

40 <211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 452 030 T3

<220>

<223> polipéptido

5 <400> 7

Asn Asn His Tyr Ala Met Glu Asp Val Ala Thr Arg Arg Asp Ala Leu
1 5 10 15

Leu Ser Arg

<210> 8

10 <211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> polipéptido

<400> 8

Thr Asp Glu Ala Tyr Lys Asp Pro Ser Asn Leu Gln Gly Lys Val Gln
1 5 10 15

Lys His Gln Ala Phe Glu Ala
20

20

<210> 9

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> polipéptido

<400> 9

30

Gly Gln Lys Leu Ile Asp Val Asn His Tyr Ala Lys Asp Glu Val Ala
1 5 10 15

Ala Arg Met Asn Glu Val Ile Ser Leu Trp Lys Lys Leu Leu Glu Ala
20 25 30

<210> 10

<211> 43

35 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

40

<400> 10

ES 2 452 030 T3

Glu Asp Ile Glu Leu Trp Leu Tyr Glu Val Glu Gly His Leu Ala Ser
1 5 10 15

Asp Asp Tyr Gly Lys Asp Leu Thr Asn Val Gln Asn Leu Gln Lys Lys
20 25 30

His Ala Leu Leu Glu Ala Asp Val Ala Ala His
35 40

<210> 11

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

10

<400> 11

Ala Gly His Phe Asp Ala Glu Asn Ile Lys Lys Lys Gln Glu Ala Leu
1 5 10 15

Val Ala Arg Tyr
20

15 <210> 12

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> polipéptido

<400> 12

Thr Arg Ile Thr Lys Glu Ala Gly Ser Val Ser Leu Arg Met Lys Gln
1 5 10 15

Val Glu Glu Leu Tyr His Ser Leu Leu Glu
20 25

25

<210> 13

<211> 44

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> polipéptido

<400> 13

35

Leu Glu Lys Ser Cys Lys Lys Phe Met Leu Phe Arg Glu Ala Asn Glu
1 5 10 15

Leu Gln Gln Trp Ile Asn Glu Lys Glu Ala Ala Leu Thr Ser Glu Glu
20 25 30

Val Gly Ala Asp Leu Glu Gln Val Glu Val Leu Gln
35 40

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

5
 <220>
 <223> polipéptido

<220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce naturalmente

<400> 14
 15

Glu Gly Leu Met Ala Glu Glu Val Gln Ala Val Gln Gln Gln Glu Xaa
 1 5 10 15

Tyr

<210> 15
 <211> 32
 20 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> polipéptido
 25
 <400> 15

Gly Met Met Pro Arg Asp Glu Thr Asp Ser Lys Thr Ala Ser Pro Trp
 1 5 10 15

Lys Ser Ala Arg Leu Met Val His Thr Val Ala Thr Phe Asn Ser Ile
 20 25 30

30 <210> 16
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> polipéptido

<220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce naturalmente

<400> 16

Glu Gly Leu Met Ala Glu Glu Val Gln Ala Val Gln Gln Gln Glu Xaa
 1 5 10 15

Tyr Gly Met Met Pro Arg Asp Glu Thr Asp
 20 25

45
 <210> 17
 <211> 23
 <212> PRT
 50 <213> Artificial

ES 2 452 030 T3

<220>

<223> polipéptido

<400> 17

5

Ser Lys Thr Ala Ser Pro Trp Lys Ser Ala Arg Leu Met Val His Thr
1 5 10 15

Val Ala Thr Phe Asn Ser Ile
20

<210> 18

<211> 29

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

15

<400> 18

Thr Glu Ile Asp Ala Arg Ala Gly Thr Phe Gln Ala Phe Glu Gln Phe
1 5 10 15

Gly Gln Gln Leu Leu Ala His Gly His Tyr Ala Ser Pro
20 25

20 <210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> polipéptido

<400> 19

Asn Thr Glu Asp Lys Gly Asp Ser Leu Asp Ser Val Glu Ala Leu Ile
1 5 10 15

30 Lys

<210> 20

<211> 21

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

40 <400> 20

Ser Val Glu Ala Leu Ile Lys Lys His Glu Asp Phe Asp Lys Ala Ile
1 5 10 15

Asn Val Gln Glu Glu
20

<210> 21

45 <211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 452 030 T3

<220>

<223> polipéptido

5 <400> 21

Cys Glu Gln Ala Glu Asn Trp Met Ala Ala Arg Glu Ala Phe Leu Asn
 1 5 10 15
 Thr Glu Asp Lys Gly Asp Ser Leu Asp
 20 25

<210> 22

10 <211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> polipéptido

<400> 22

Lys Ile Ala Ala Leu Gln Ala Phe Ala Asp Gln Leu Ile Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 His Tyr Ala Lys
 20

20

<210> 23

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> polipéptido

<400> 23

30

Ile Glu Arg Gly Ala Cys Ala Gly Ser Glu Asp Ala Val Lys Ala Arg
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Leu Ala Asp Gln Trp Gln Phe Leu Val Gln Lys
 20 25 30

<210> 24

<211> 24

35 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

40

<400> 24

Asp Phe Trp Leu Ser Glu Val Glu Ala Leu Leu Ala Ser Glu Asp Tyr
 1 5 10 15
 Gly Lys Asp Leu Ala Ser Val Asn
 20

45 <210> 25

<211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> polipéptido
 <400> 25

Lys Asn Asn His His Glu Glu Asn Ile Ser Ser Lys Met Lys Gly Leu
 1 5 10 15

10 Asn Gly Lys Val Ser Asp Leu Glu Lys
 20 25

<210> 26
 <211> 17
 <212> PRT

15 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido

20 <400> 26

Lys Thr Asp Asp Tyr Gly Arg Asp Leu Ser Ser Val Gln Thr Leu Leu
 1 5 10 15

Thr

<210> 27

25 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

30 <223> polipéptido

<400> 27

Ala Leu Lys Asp Gln Leu Leu Ala Ala Lys His Val Gln Ser Lys
 1 5 10 15

35

<210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> polipéptido

<400> 28

45

Leu Thr Asp Pro Val Arg Cys Asn Ser Leu
 1 5 10

<210> 29
 <211> 17

50 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

<400> 29

5

Leu Pro Thr Ala Phe Asp Tyr Val Glu Phe Thr Arg Ser Leu Phe Val
 1 5 10 15

Asn

<210> 30

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

15

<400> 30

Arg Leu Lys Gly Leu Ala Leu Gln Arg Gln
 1 5 10

20 <210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> polipéptido

<400> 31

Leu Ala Ser Asp Val Ala Gly Ala Glu Ala Leu Leu Asp Arg
 1 5 10

30

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

40 <400> 32

Gln Tyr Glu Gln Cys Met Asp Leu Gln Leu Phe Tyr
 1 5 10

<210> 33

45 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

50 <223> polipéptido

<400> 33

Ala Ala Glu Asp Val Lys Ala Lys Leu His Glu
 1 5 10

<210> 34
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> polipéptido

10 <400> 34

Ala Glu Ala Leu Leu Lys Lys His
 1 5

<210> 35
 15 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 20 <223> polipéptido

<400> 35

Asp Ile Asn Lys Val Ala Glu
 1 5

25
 <210> 36
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

30
 <220>
 <223> polipéptido

<400> 36

35
 Arg Ser Gln Leu Leu Gly Ser Ala His Glu Val Gln Arg
 1 5 10

<210> 37
 <211> 11
 40 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> polipéptido

45
 <400> 37

Gly His Asp Leu Ala Ser Val Gln Ala Leu Gln
 1 5 10

50 <210> 38
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> polipéptido

<400> 38

ES 2 452 030 T3

Arg Asp Leu Ala Ala Leu Gly Asp Lys Val Asn Ser
1 5 10

<210> 39
5 <211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> polipéptido

<400> 39

Met Leu Asp Gln Cys Leu Glu Leu Gln Leu Phe His Arg Asp
1 5 10

15
<210> 40
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial
20
<220>
<223> polipéptido

<400> 40

25
Gly Lys Asp Leu Ala Ser Val Asn Asn Leu Leu Lys Lys His Gln Leu
1 5 10 15

Leu Glu Ala Asp Ile
20

<210> 41
<211> 18
30 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido
35
<400> 41

Leu Glu Ala Glu Leu Ala Ala His Glu Pro Ala Ile Gln Gly Val Leu
1 5 10 15

Asp Thr

40 <210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> polipéptido

<400> 42

ES 2 452 030 T3

Ile Gln Gln Arg Leu Ala Gln Phe Val Glu His
 1 5 10

<210> 43
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido
 10 <400> 43

Trp Lys Ala Asp Val Val Glu Ser
 1 5

15 <210> 44
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> polipéptido
 <400> 44

Ala Leu Ile Leu Asp Asn
 1 5

25 <210> 45
 <211> 48
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce naturalmente
 40 <400> 45

Asn Lys Val Ala Glu Asp Leu Glu Ser Glu Gly Leu Met Ala Glu Glu
 1 5 10 15

Val Gln Ala Val Gln Gln Gln Glu Xaa Tyr Gly Met Met Pro Arg Asp
 20 25 30

Glu Thr Asp Ser Lys Thr Ala Ser Pro Trp Lys Ser Ala Arg Leu Met
 35 40 45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento *in vitro* para pronosticar y/o diagnosticar malaria cerebral, caracterizado porque comprende una etapa de medir el nivel de anticuerpos dirigidos contra las partes central y/o del extremo C-terminal de la cadena α de espectrina no eritroide, que se extiende respectivamente del aminoácido 1139 al aminoácido 1498 y del aminoácido 1499 al aminoácido 2472 de dicha proteína, en una muestra biológica.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es una muestra de sangre o plasma.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que se mide el nivel de inmunoglobulinas G (IgG) dirigidas contra las partes central y/o del extremo C-terminal de la cadena α de espectrina no eritroide.
- 15 4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además una etapa de medir la concentración de $TNF\alpha$ en una muestra biológica.
- 20 5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la IgG dirigida contra las partes central y/o del extremo C-terminal de la cadena α de espectrina no eritroide se detectan y/o cuantifican por un inmunoensayo.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que varias moléculas antigénicas derivadas de la cadena α de espectrina no eritroide se usan como moléculas de captura en dicho inmunoensayo.
- 25 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que al menos una de dichas moléculas antigénicas está seleccionada del grupo que consiste en los polipéptidos de SEQ ID Nos: 14 a 29 y SEQ ID No: 45.
- 30 8. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho inmunoensayo es un ensayo de inmunocaptura, en el que un anticuerpo dirigido contra inmunoglobulina humana se usa como molécula de captura, y una espectrina no eritroide marcada o fragmento de la misma se usa para la detección de los anticuerpos dirigidos contra las partes central y/o del extremo C-terminal de la cadena α de espectrina no eritroide.
- 35 9. Un kit para establecer un pronóstico y/o un diagnóstico de malaria cerebral, caracterizado porque comprende al menos una molécula antigénica seleccionada del grupo que consiste en los polipéptidos de SEQ ID No: 45 y SEQ ID Nos: 14 a 29.

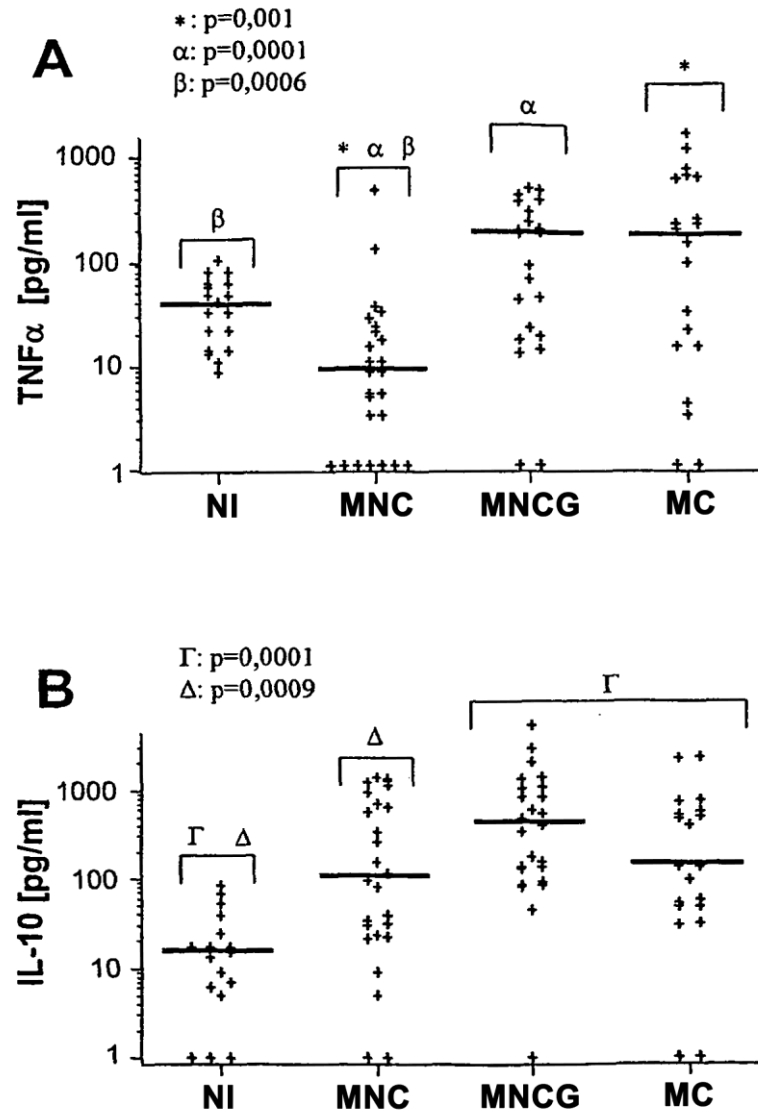


Figura 1

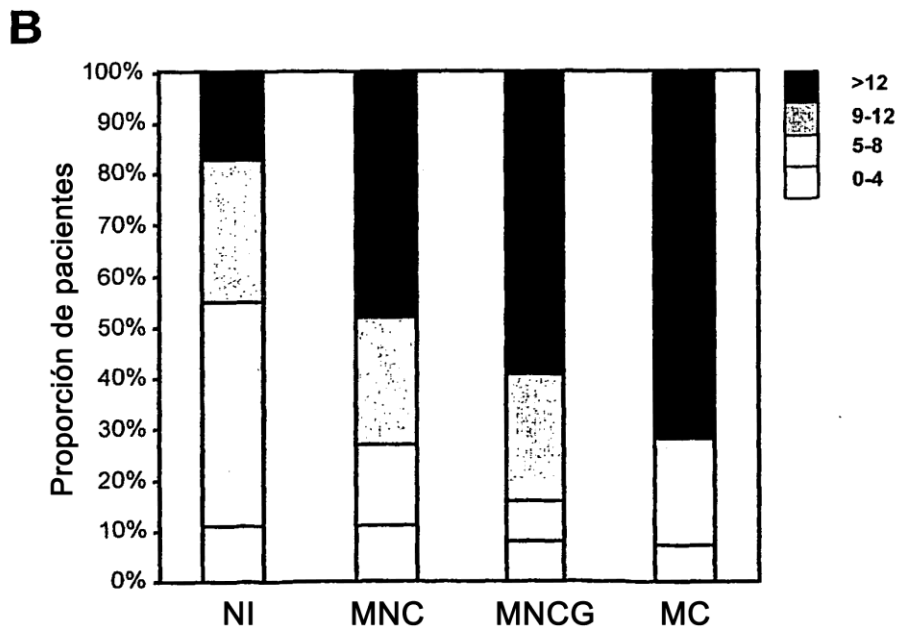
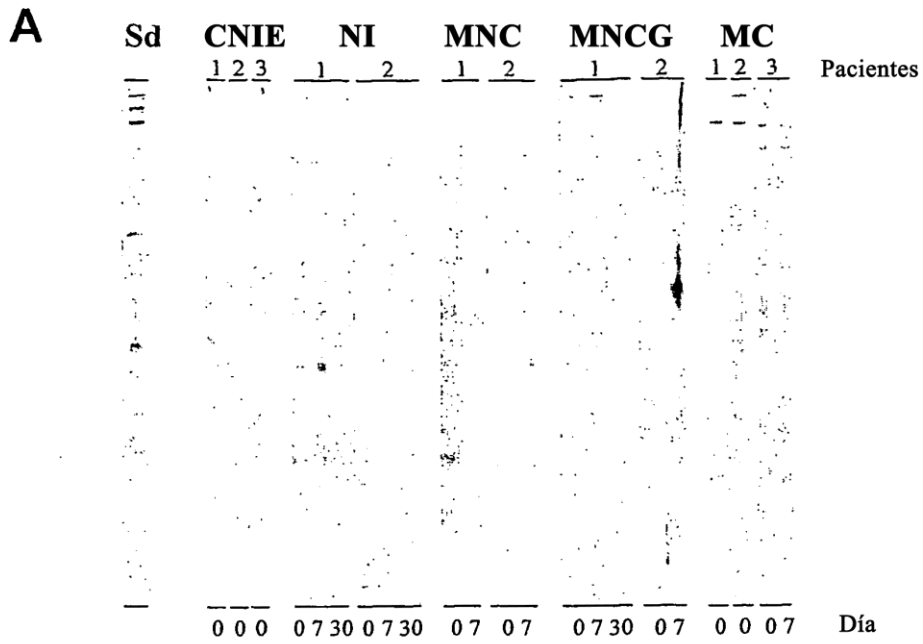


Figura 2

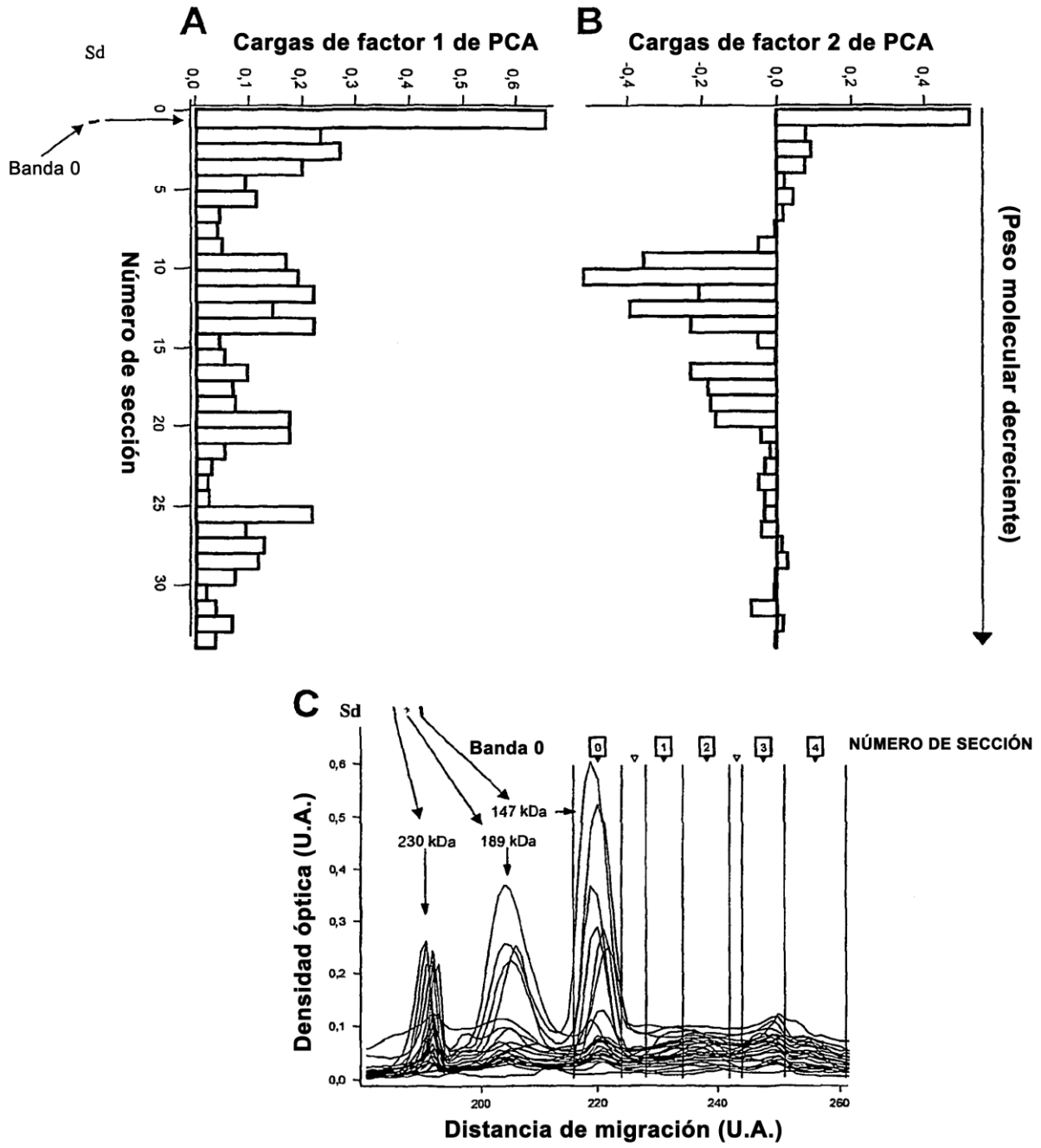


Figura 3

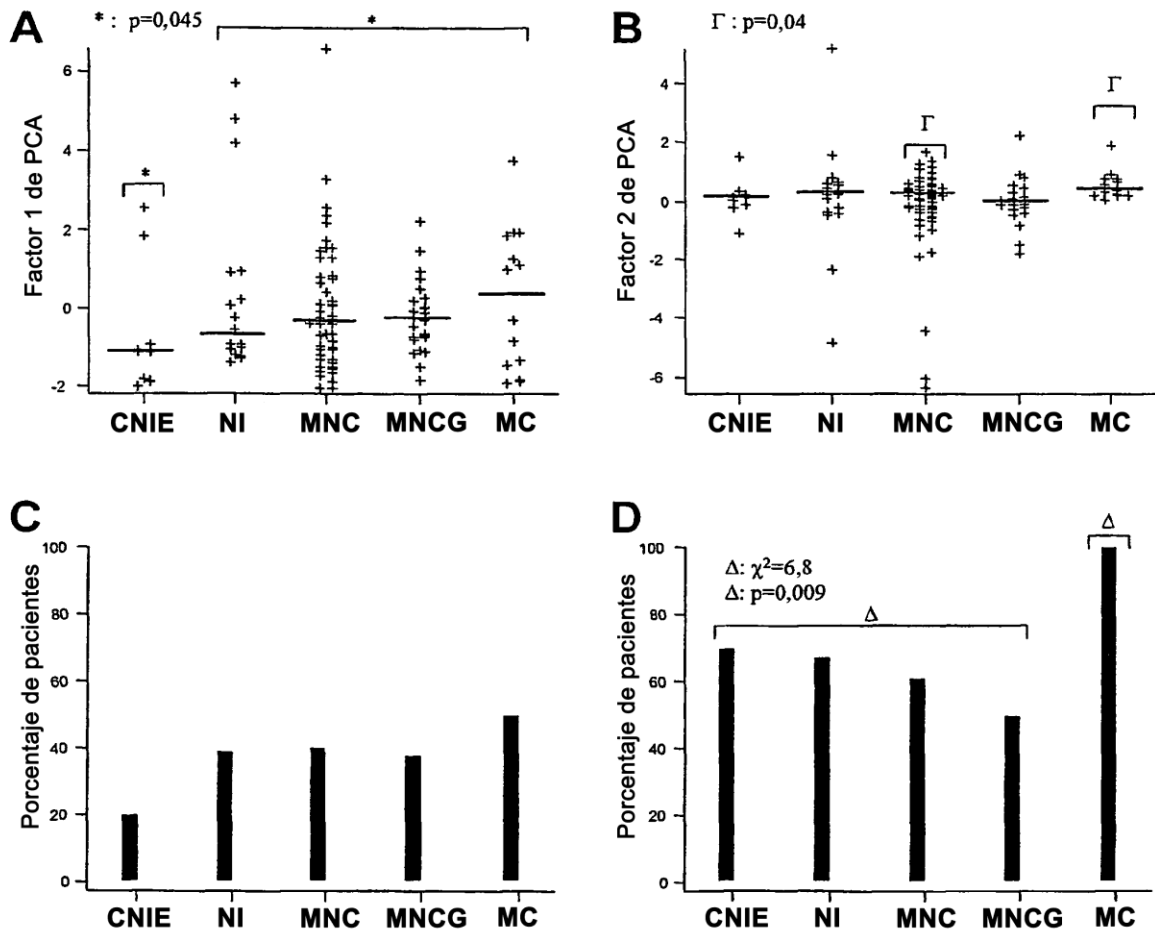


Figura 4

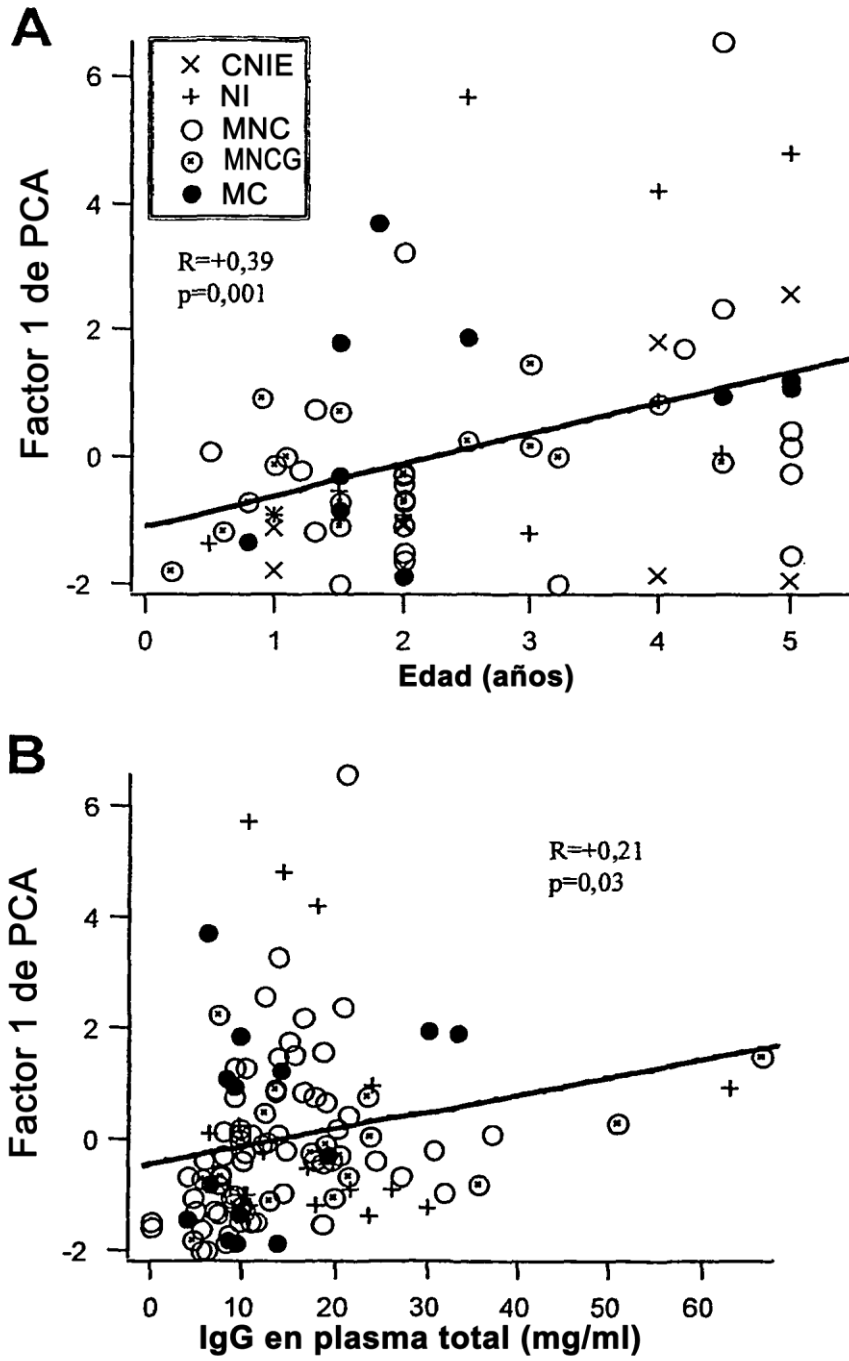


Figura 5

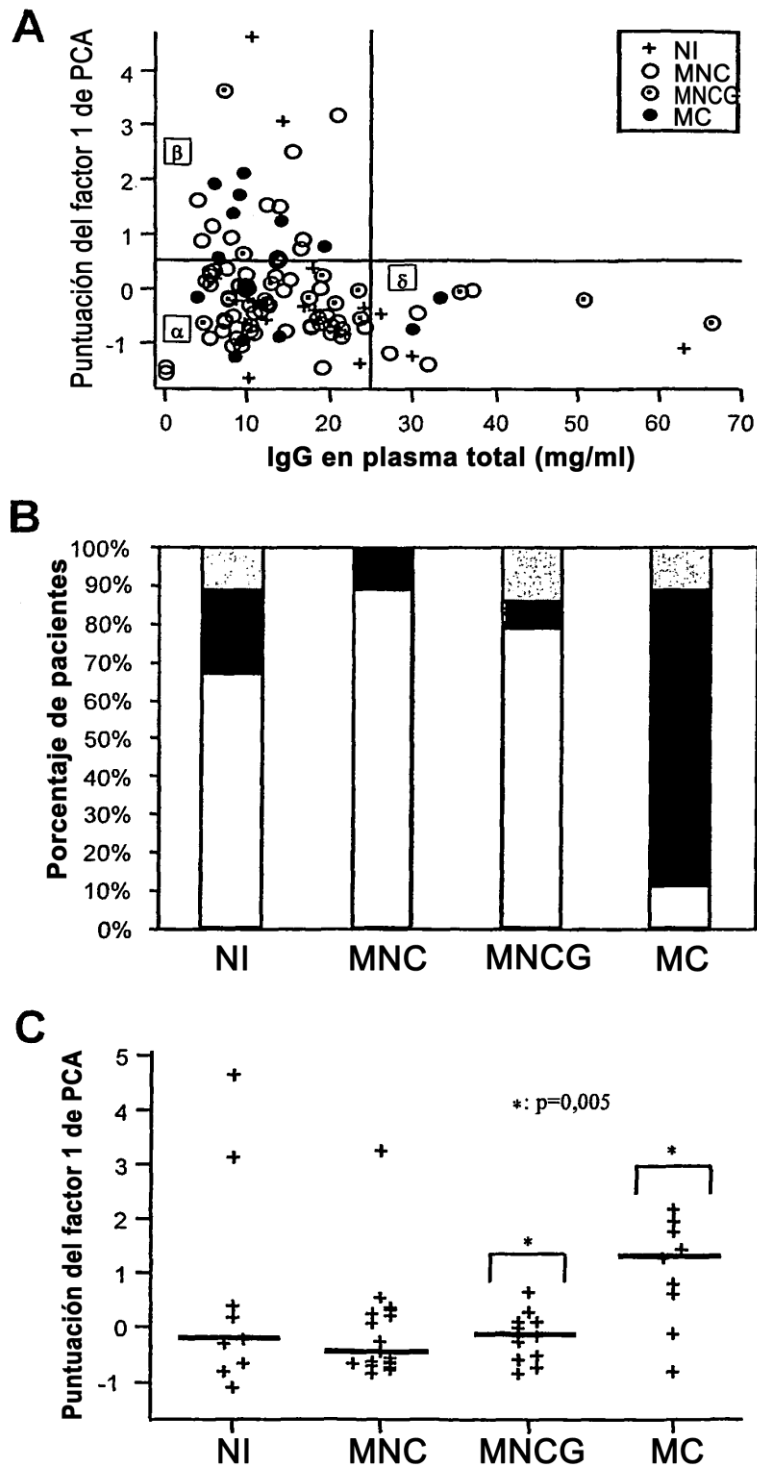


Figura 6

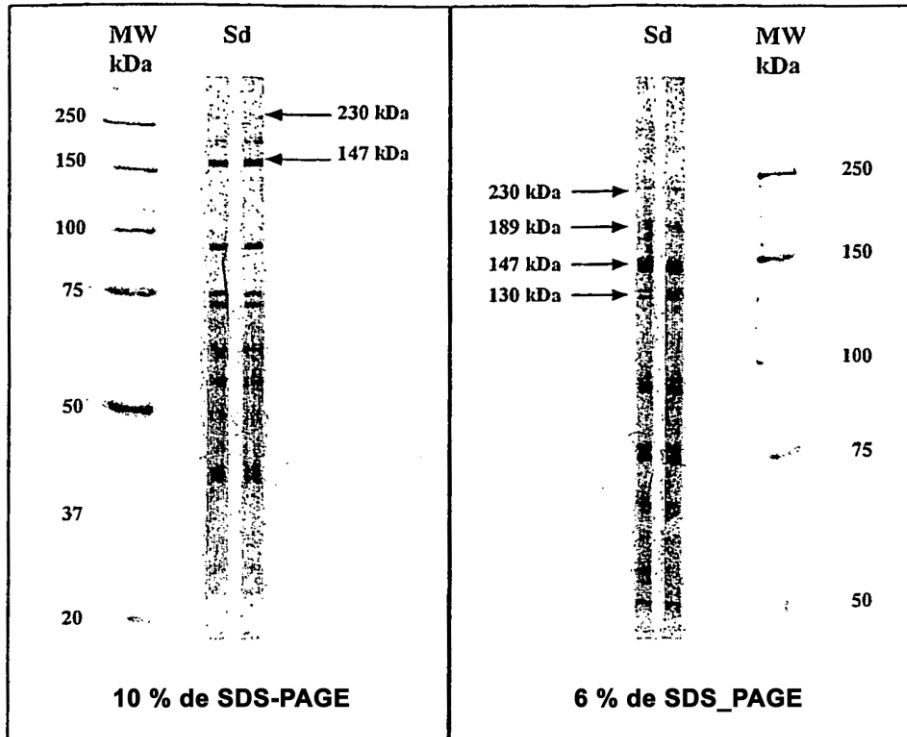


Figura 7

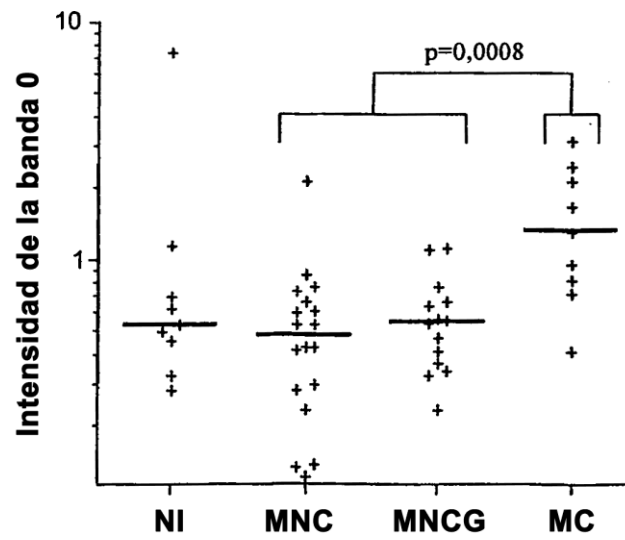


Figura 8

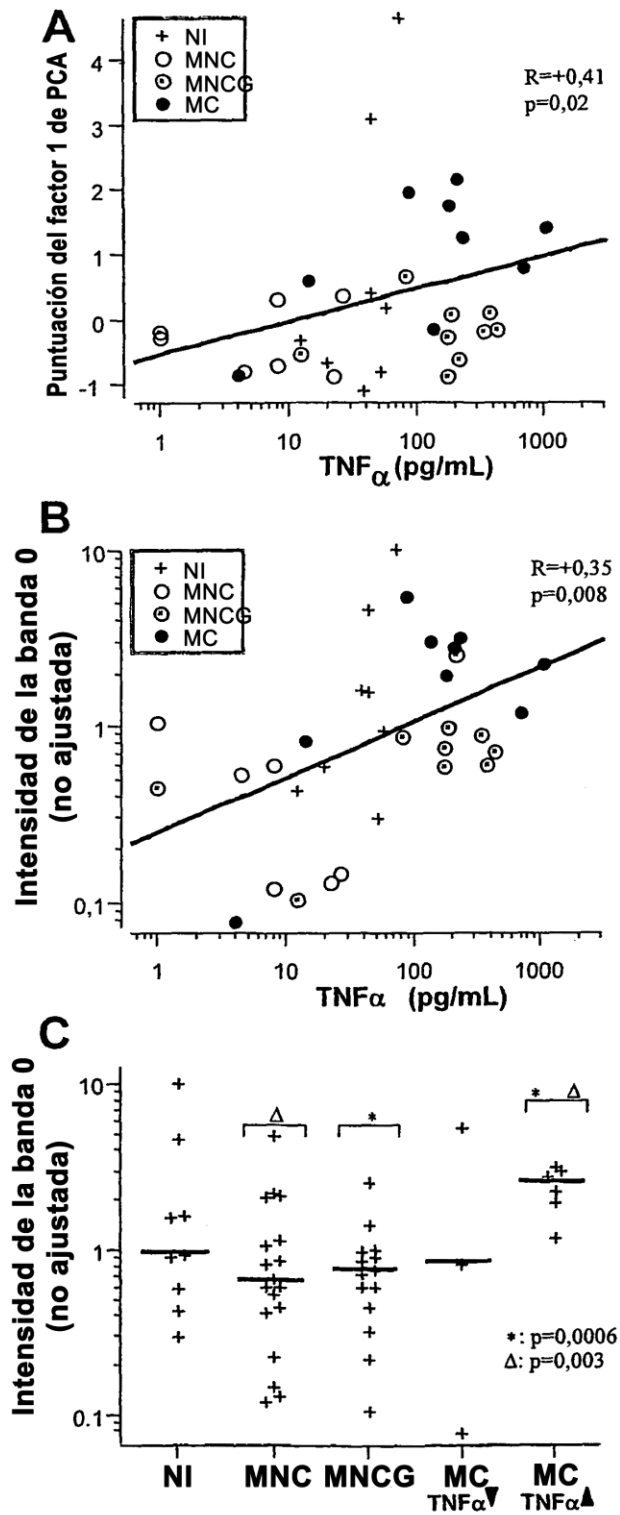


Figura 9

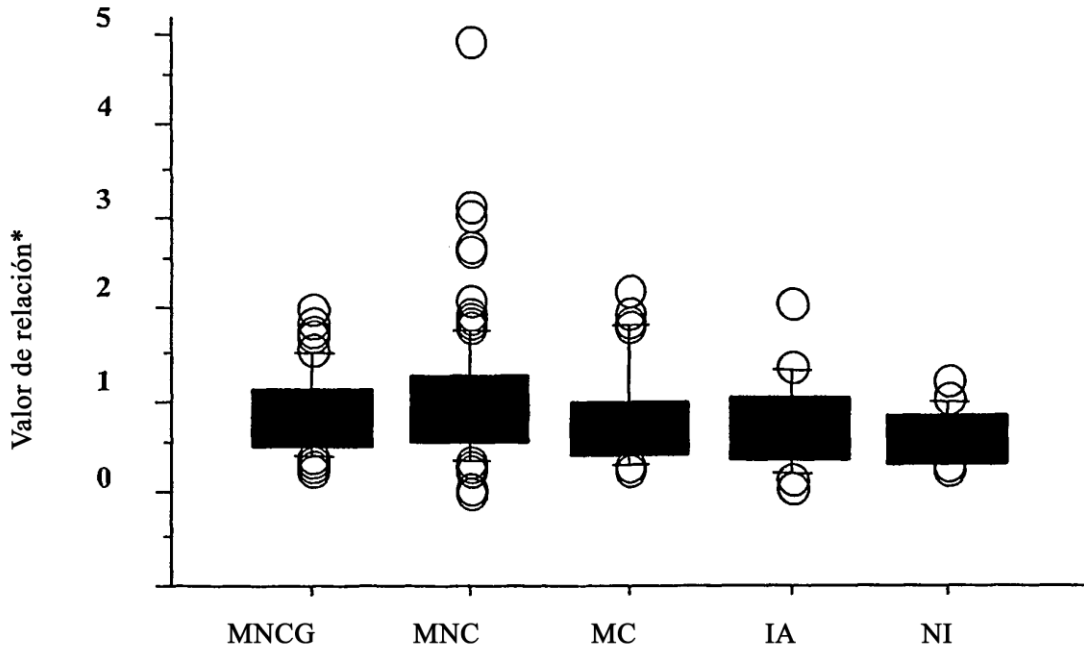


Figura 10

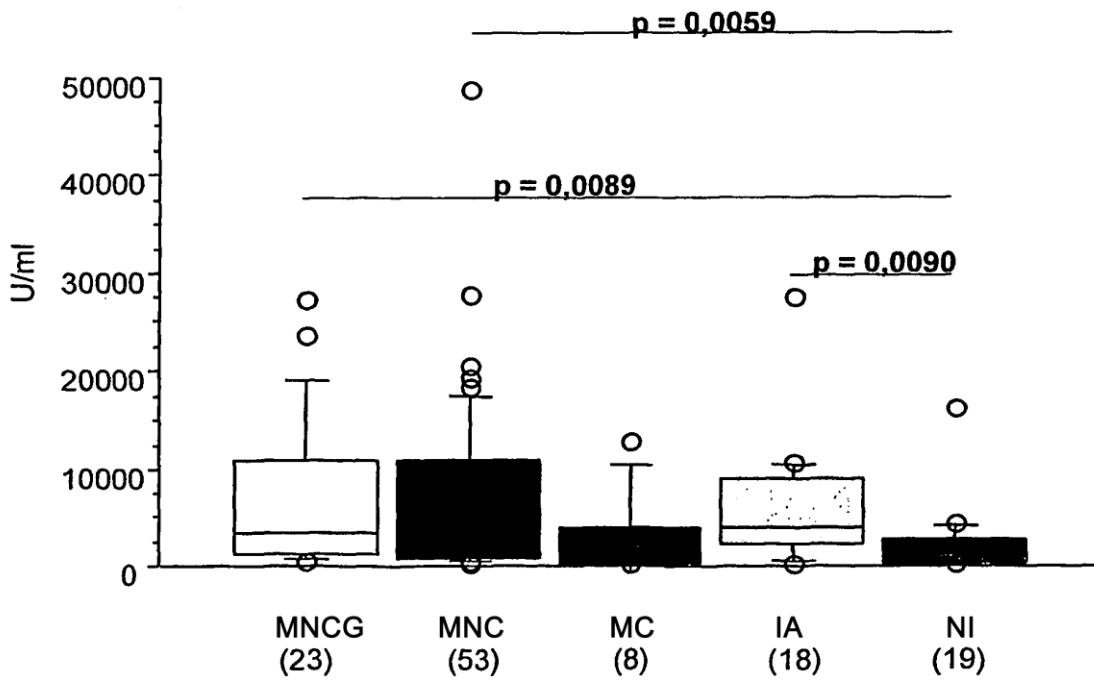


Figura 11