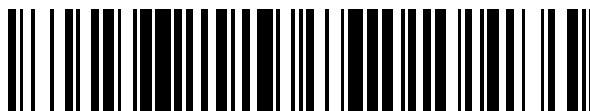


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 369**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/66 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2003** **E 03718773 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014** **EP 1495328**

54 Título: **Un marcador para medir cirrosis hepática**

30 Prioridad:

16.04.2002 EP 02076501

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.09.2014

73 Titular/es:

**VLAAMS INTERUNIVERSITAIR INSTITUUT VOOR
BIOTECHNOLOGIE VZW. (50.0%)
Rijvisschestraat 120
9052 Zwijnaarde, BE y
UNIVERSITEIT GENT (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CALLEWAERT, NICO LUC MARC y
CONTRERAS, ROLAND HENRI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 498 369 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

Un marcador para medir cirrosis hepática

Campo de la invención

5 La invención proporciona métodos y kits para detectar cirrosis hepática en mamíferos. El ensayo de diagnóstico se basa en la elaboración del perfil e identificación de hidratos de carbono de diagnóstico presentes en un fluido corporal tal como suero sanguíneo.

Antecedentes de la invención

10 La mayoría de las causas comunes de lesión hepática dan como resultado cirrosis. La cirrosis es la destrucción del tejido hepático normal que deja tejido cicatrizal que no funciona alrededor de áreas de tejido hepático que funciona, acompañada de la formación de nódulos hepáticos regenerativos. En los Estados Unidos de América, la causa más común de cirrosis es abuso de alcohol. Entre personas con edades de 45 a 65, la cirrosis es la tercera causa más común de muerte, tras cardiopatía y cáncer. En muchas partes de Asia y África, la hepatitis crónica es una causa principal de cirrosis. Muchas personas con cirrosis leve no tienen síntomas y parecen estar bien durante años. Otras son débiles, tienen poco apetito, se sienten enfermas, y pierden peso. Si el flujo biliar está crónicamente obstruido, la persona tiene ictericia, prurito, y pequeños nódulos de la piel amarillos, especialmente alrededor de los párpados. La malnutrición resulta habitualmente de un apetito pobre y la absorción alterada de grasas y vitaminas solubles en grasas provocado por la producción reducida de sales biliares. Ocasionalmente, la persona puede toser o vomitar grandes cantidades de sangre debido a la hemorragia de venas varicosas en el extremo inferior del esófago (varices esofágicas). Estos vasos sanguíneos agrandados resultan de una tensión arterial elevada en las venas que corren desde el intestino hasta el hígado. Tal tensión arterial elevada, denominada hipertensión portal, junto con una mala función hepática, también puede conducir a la acumulación de fluido en el abdomen (ascitis). También se pueden desarrollar insuficiencia renal y encefalopatía hepática. Se pueden desarrollar otros síntomas de hepatopatía de larga duración, tal como debilitamiento muscular, enrojecimiento de las palmas (eritema palmar), curvado de los dedos (contractura de Dupuytren de las palmas), pequeñas venas en la piel semejantes a arañas, agrandamiento de la mama en los hombres (ginecomastia), agrandamiento de la glándula salivar en las mejillas, pérdida del cabello, contracción de los testículos (atrofia testicular), función nerviosa anormal, tanto en el sistema nervioso periférico (neuropatía periférica) como en el sistema nervioso central.

30 Actualmente no existe cura para la cirrosis. El tratamiento incluye la retirada de agentes tóxicos tales como alcohol, la administración de una nutrición apropiada que incluya vitaminas suplementarias, y el tratamiento de complicación cuando surjan. El trasplante hepático es actualmente la única cura, y puede ayudar a una persona con cirrosis avanzada. Además, la presencia de cirrosis aumenta el riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular alrededor de 40 veces con respecto al riesgo en la población general, y, en un fondo etiológico de hepatitis crónica y alcoholismo, el desarrollo de cirrosis multiplica el riesgo ya incrementado del paciente a desarrollar carcinoma hepatocelular de 34,4 a 119 veces y de 2,4 a 22,4 veces, respectivamente (Kuper et al., 2001). Habitualmente se lleva a cabo un número de ensayos sanguíneos para medir la función hepática y ayudar a determinar la gravedad y causa de la cirrosis. Uno de los factores más importantes indicativos del daño hepático es la bilirrubina, un pigmento amarillo-rojizo que es metabolizado normalmente en el hígado y después se excreta en la orina. En pacientes con hepatitis, el hígado no puede procesar bilirrubina, y los niveles de sangre de esta sustancia aumentan, provocando algunas veces ictericia. Los niveles de ciertas enzimas hepáticas pueden también ser indicativas de cirrosis (por ejemplo niveles de aspartato y alanina aminotransferasa, y varias enzimas de coagulación). Sin embargo, los resultados de estos ensayos de la función hepática a menudo son normales debido a que sólo se necesita un pequeño porcentaje de células hepáticas que funcionan para llevar a cabo las funciones químicas esenciales. Además, se usa un número de ensayos de formación de imágenes para diagnosticar posible cirrosis y sus complicaciones. Por ejemplo, un barrido con ultrasonidos puede mostrar que el hígado está agrandado y que existen lesiones particulares tales como nódulos regenerativos. Otras técnicas de formación de imágenes, mucho más costosas, son la formación de imágenes mediante resonancia magnética (MRI) y la tomografía computerizada (CT). En la mayoría de los pacientes que presentan alguna forma de trastorno hepático crónico, se lleva a cabo la biopsia hepática para evaluar el grado de fibrosis y detectar la presencia de cirrosis (Fracanzani et al., 2001). Puesto que la biopsia hepática es un procedimiento invasivo, generalmente es difícil llevarla a cabo en base a un seguimiento normal en un marco clínico normal. Un marcador sérico específico para la detección de cirrosis hepática podría tener así un impacto muy significativo sobre la práctica gastroenterológica, permitiendo el seguimiento habitual de pacientes con hepatopatía crónica y proporcionando una advertencia prematura del comienzo de la cirrosis. En el caso particular de alcoholismo crónico, un marcador sérico para la cirrosis podría proporcionar un argumento importante para convencer al paciente de que detenga el alcoholismo.

55 En la técnica se describe la aplicación de la medición de glucanos de diagnóstico en enfermedades del metabolismo de hidratos de carbono (documento WO9219975). En el campo de trastornos hepáticos, también se conoce que las actividades de enzimas de glucosilación individuales cambian en trastornos hepáticos. Por ejemplo, una mayor actividad de la enzima UDP-N-acetil-glucosamina:glucoproteína N-acetilglucosaminiltransferasa (GnTIII) está correlacionada con la progresión de hepatopatía (Ishibashi et al., 1989), un hallazgo que se ha elaborado recientemente en un marco de diagnóstico (Mori et al., 1998). Sin embargo, estos ensayos son complicados por la

separación de los productos de la reacción enzimática mediante HPLC. Además, la estabilidad de la enzima en el suero en condiciones de almacenamiento es desconocida, y los valores obtenidos para la actividad de GnTIII sérica tuvo grandes solapamientos entre cirrosis y hepatitis crónica. Las diferencias de glucosilación también se han estudiado en una proteína purificada, transferrina sérica, y estas diferencias se usan para la detección de alcoholismo crónico (Matsumoto K. et al (1994) Clin. Chim. Acta 224(1): 1-8). El análisis de estructuras de hidratos de carbono de IgG en pacientes que tienen cirrosis hepática se describe en el documento US 0.698.793. También se han descrito alteraciones en el resto de hidrato de carbono de proteínas purificadas individuales en fluido ascítico cirrótico humano (Biou, D. et al (1987) Biochimica et Biophysica Acta 913, 308-312). Los métodos para la detección de enfermedades hepáticas se describen en las patentes EP0503886 y DE3838718. Sin embargo, estas últimas patentes se refieren a la cuantificación de hidratos de carbono simples (fucosa) en orina. A la vista de la técnica anterior, actualmente no hay ningún marcador sérico fiable, fácilmente medible, para la diferenciación de cirrosis hepática de otros trastornos hepáticos. En la presente invención, se han identificado múltiples parámetros de hidratos de carbono de diagnóstico derivados del conjunto de proteínas presentes en el suero de pacientes cirróticos. En el suero, existe una mezcla compleja de proteínas glucosiladas y no glucosiladas que derivan de células hepáticas y del plasma. Inesperadamente, se ha encontrado que cantidades (relativas) de hidratos de carbono de diagnóstico presentes en una mezcla de glucoproteínas, que están presentes en el suero total, sirven como marcador de diagnóstico para la diferenciación de pacientes con cirrosis hepática de pacientes con hepatitis crónica, y para la diferenciación de cirrosis hepática de otros trastornos hepáticos no malignos y malignos. Una ventaja de analizar el conjunto de glucoproteínas séricas totales es que la cantidad de trabajo requerida para la preparación de las muestras se reduce al mínimo. Esto permite el análisis de números clínicamente relevantes de pacientes.

Breve descripción de figuras y tablas

Fig. 1 Ejemplos de perfil

El panel superior contiene un hidrolizado de dextrano y se puede usar para asignar un valor de unidades de glucosa a cada pico. El segundo panel muestra un electroferograma típico de los N-glucanos derivados de las proteínas en una muestra de suero de control. Se observan claramente nueve picos en el intervalo de detección, y su altura se usa para obtener una descripción numérica de los perfiles de todas las muestras en esta invención. El tercer panel muestra electroferograma obtenido de un caso de cirrosis. Los picos extra 10, 11, 12, 13 y 14 (véanse cajas de inserto) sólo se hacen visibles en el electroferograma tras una concentración diez veces mayor de N-glucanos derivados de las proteínas procedentes de los sueros. Son evidentes varias alteraciones de los perfiles, y forman la base para el marcador de diagnóstico.

Fig. 2 Diagrama de caja que resumen los datos.

Las muestras se han clasificado en 7 grupos (Código 0 a 6) como se muestra en la Tabla 1, cuarta columna. Para cada uno de los 9 picos, la mediana de los valores en cada uno de estos 7 grupos se representa mediante la línea negra más gruesa, y los intervalos de intercuartiles se representan mediante los límites de las cajas y barras de error. Para los picos 1, 2, 3, 7 y 8, los intervalos de intercuartiles internos del grupo 0 y 2 de muestra por un lado, y del grupo 1 por otro lado, no se solapan, y la cantidad relativa entre los picos 1, 2, 7 y el pico 8 se calculó para crear tres nuevas variables, cuyas propiedades se resumen en la columna derecha de la figura. Obsérvese que la escala de ordenadas es logarítmica para estas tres nuevas variables.

Fig. 3 Evaluación de la eficiencia diagnóstica de las tres variables usando el análisis de la Curva Operativa del Receptor (ROC) y regresión logística binaria.

Sección 1: Se llevó a cabo el análisis de ROC para evaluar la eficiencia de las tres variables a la hora de diferenciar el grupo de muestra con cirrosis y el grupo con hepatitis vírica crónica sin cirrosis. Los valores de corte determinados a partir de estas curvas de ROC (sensibilidad y especificidad combinadas óptimas) se usaron en las secciones 2, 3, 4, 5 y 6 subsiguientes de esta figura para dividir los campos de diagrama de dispersión bidimensional en cuadrantes (siendo el cuadrante derecho superior el cuadrante positivo para cirrosis hepática, y constituyendo los otros tres cuadrantes el área negativa). La línea de regresión obtenida a partir del análisis de regresión logística binaria con dos variables cada vez como independientes también se muestra en estos diagramas de dispersión. El grupo de muestra de cirrosis se muestra en cada diagrama de dispersión como triángulos negros. El grupo "negativo" en cada sección se representa con círculos o con cuadrados. Sección 7: se realizó una comparación mediante análisis de ROC de la eficiencia de clasificación entre el grupo de muestra con cirrosis y el grupo con hepatitis vírica crónica sin cirrosis, para la variable $\log(\text{Pico 7/Pico 8})$ y la concentración de seroalbúmina y la concentración de bilirrubina sérica total. El resultado muestra que el marcador derivado del perfil de N-glucano sérico tiene una reducción de aproximadamente 5 veces en la tasa de casos clasificados incorrectamente (aproximadamente 1 en 25 frente a aproximadamente 1 en 4 (bilirrubina) o 1 en 5 (albúmina)). Sección 8: para validar los valores de corte derivados de ROC para los marcadores derivados del perfil de N-glucano sérico, estos valores se usaron para clasificar un segundo grupo independiente de pacientes con hepatitis crónica con o sin cirrosis. Se obtuvieron eficiencias de clasificación muy similares en este segundo grupo como se obtuvieron en el grupo de optimización (véase Sección 2 de la figura).

Fig. 4 Análisis estructural parcial de los N-glucanos diferencialmente regulados.

Las tres columnas en esta figura representan los resultados de secuenciación de matriz de exoglucosidasa en los N-glucanos derivados de las glucoproteínas en tres muestras de suero. Estas muestras se escogieron para reflejar el intervalo cuantitativo de las alteraciones observadas en este estudio. La columna de secuenciación más a la izquierda se obtuvo del análisis de una muestra con hepatitis crónica, y es indistinguible de un perfil de control sano. La columna central representa una alteración leve, que traspasa ya los valores de corte para las tres variables descritas en el texto. La columna de la derecha resulta del análisis de una de las muestras peor afectadas. Es útil comparar los picos descritos en el texto con estas tres columnas, y la posibilidad de esta comparación simplifica enormemente el rastreo de los picos a lo largo de los paneles de secuenciación de exoglucosidasas. Los picos representados en negro no poseen un resto de GlcNAc bisecante. A este respecto, todos se pueden considerar como derivados del oligosacárido nuclear trimanosil-GlcNAc₂. Se encontró que los picos representados en gris están todos modificados con un resto de GlcNAc bisecante, y de este modo se pueden considerar como derivados del oligosacárido nuclear trimanosil-GlcNAc₂ sustituido con GlcNAc bisecante. El panel de referencia bajo la columna de secuenciación central se ensambló a partir de 6 electroferogramas diferentes, conteniendo cada uno una digestión de exoglucosidasa específica en glucanos de referencia con estructura conocida. Los glucanos de referencia usados fueron: 1) trisialo, trigalacto triantenario; 2) bisialo, bigalacto biantenariano con fucosa enlazada α -1,6 al núcleo (panel de referencia bajo la columna central), y 3) asialo, bigalacto biantenariano con fucosa enlazada α -1,6 al núcleo y GlcNAc bisecante (panel de referencia bajo la columna más a la derecha).

Fig. 5 Características de la variable de fucosilación nuclear.

Para evaluar si la α -1,6-fucosilación nuclear aumentó en el grupo de cirrosis, se creó una nueva variable mediante la suma de las alturas de los picos normalizadas de todos los picos identificados que poseen esta modificación. Se muestra una visualización del diagrama de caja análoga a aquellas en la Fig. 2, junto con los resultados de los ensayos de ANOVA y ensayos post hoc subsiguientes. Nuevamente, el grupo de cirrosis se aparta como un subgrupo homogéneo, confirmando así la mayor fucosilación del núcleo en estos trastornos.

Fig. 6 Discriminación entre casos de cirrosis con y sin carcinoma hepatocelular

El diagrama de dispersión de los casos de cirrosis con y sin carcinoma hepatocelular, que representa la altura del Pico 7 frente al Pico 14 véase figura 1), normalizada a la altura de los picos medidos totales en el perfil de N-glucano de la proteína sérica. Los casos solamente con cirrosis se representan como triángulos en blanco. Los casos con cirrosis y HCC se representan como triángulos negros con la punta hacia abajo. La regresión logística binaria permitió la identificación de casos con HCC con una sensibilidad de 71% y una especificidad de 90%. La función logística del modelo es: $Z = -0,649[\% \text{ Pico 7}] + 5,722[\% \text{ Pico 14}] + 2,967$. La línea diagonal en la figura es la línea de corte en la que cada punto en la línea sería un caso con idéntica probabilidad para pertenecer a cualquiera de los dos grupos distinguidos.

Objetivos y descripción detallada de la invención

El estudio de glucanos complejos (glucobiología (Kobata, 2000; Roseman, 2001)) está comenzando a evolucionar en un enfoque más general que se puede denominar glucómica (Hirabayashi et al., 2001; Taniguchi et al., 2001). Análogamente a la proteómica, la glucómica se puede definir como el estudio del reino de los glucanos presentes en todos o en una clase particular de glucoconjugados en una muestra biológica en una base cuantitativa, y la comparación de los perfiles obtenidos para derivar información biológica. En el lado de la investigación básica, la gluco(proteo)mica funcional tiene la ambición de aclarar los papeles en un intervalo diverso de procesos fisiológicos de los restos de glucano de los glucoconjugados al detectar cambios en el glucoma y determinar subsiguientemente la identidad de los restos no glucánicos (mayoritariamente proteínas) que poseen los glucanos alterados. A este respecto, es análogo en sus enfoques a la investigación de proteómica básica, pero las tecnologías usadas son generalmente demasiado complejas y/o consumen tiempo para encontrar aplicaciones fuera de los laboratorios de investigación básica. Especialmente en el campo clínico, en el que es necesario el análisis de centenares de muestras para derivar una información significativa, los actuales enfoques de glucómica tienen limitaciones significativas debido a su complejidad. En la actual invención se ha desarrollado una plataforma tecnológica para una aplicación de glucómica clínica en la detección de cirrosis hepática. Se han elaborado perfiles de las estructuras de hidratos de carbono derivadas de las glucoproteínas presentes en el suero y se han identificado diferencias estadísticamente relevantes en los perfiles de glucanos entre pacientes que sufren cirrosis hepática y pacientes libres de cirrosis hepática. En otras palabras, en la presente invención se han identificado cantidades de hidratos de carbono de diagnóstico o cantidades relativas entre dichos hidratos de carbono que están correlacionados con la presencia de cirrosis hepática. La elaboración del perfil de los hidratos de carbono usados en el ensayo de diagnóstico para cirrosis hepática de la presente invención se puede llevar a cabo por ejemplo con un secuenciador de ADN a base de gel de Applied Biosystems 377 (Callewaert et al., 2001).

De este modo, con el método de diagnóstico de la presente invención, es posible diferenciar de forma fiable pacientes con cirrosis hepática y cirrosis hepática complicada con carcinoma hepatocelular de (1) donantes sanos, (2) pacientes que sufren hepatitis crónica B o C, (3) pacientes que sufren trastornos reumatoideos, (4) pacientes con un abuso sospechado crónico del alcohol, y (5) pacientes con metástasis no HCC al hígado. Además, el método de

diagnóstico de la invención también puede diagnosticar una predisposición o presencia de carcinoma hepatocelular (HCC) en un fondo de cirrosis hepática. Fue posible diferenciar pacientes con cirrosis procedentes de los cinco grupos mencionados anteriormente con sensibilidades y especificidades que nunca estuvieron por debajo del 90%, y en el diagnóstico más relevante (distinción entre voluntarios con cirrosis y sanos y la distinción entre cirrosis y pacientes que sufren hepatitis crónica), los valores para la sensibilidad y especificidad fueron mayores que 95%.

Puesto que actualmente no hay ningún marcador de diagnóstico sérico fácilmente medible y específico para la cirrosis, el uso de este ensayo de diagnóstico no invasivo puede incluir la guía de decisiones terapéuticas en el tratamiento de cirrosis (actualmente sólo el trasplante hepático es una cura), la monitorización más estrecha de pacientes positivos a la cirrosis para el desarrollo de carcinoma hepatocelular, y la evaluación del grado de daño hepático en un paciente que presenta síntomas de consumo crónico de alcohol. Este marcador sérico para la cirrosis también se puede usar para medir de forma no invasiva la tasa de conversión en cirrosis de pacientes infectados crónicamente con el virus de la hepatitis C en ensayos clínicos de vacunas, ya que una incidencia reducida y/o un retraso del comienzo de la cirrosis hepática constituye un criterio de evaluación clínico importante que actualmente es muy difícil de evaluar debido a la necesidad de técnicas de biopsia invasiva.

En una primera realización, la invención proporciona un método para detectar cirrosis hepática en un mamífero, que comprende (a) generar un perfil de hidratos de carbono o fragmentos derivados de los mismos, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos, o rasgos de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos de hidratos de carbono que se determinan mediante la estructura de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos de hidratos de carbono; estando presentes en u obteniéndose dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos a partir de una mezcla de glucoconjugados que están presentes en o se aíslan de una muestra de un fluido corporal procedente de dicho mamífero, y (b) medir en el perfil generado en la etapa a) la cantidad de al menos un hidrato de carbono o un fragmento derivado del mismo o un derivado marcado de dicho hidrato de carbono o de dicho fragmento, o un rasgo de al menos un hidrato de carbono o un fragmento derivado del mismo presente en dicho perfil de hidrato de carbono, y (c) comparar los datos medidos obtenidos en la etapa b) con los datos medidos obtenidos de perfiles derivados de mamíferos libres de cirrosis hepática, y (d) atribuir la desviación obtenida en la etapa c) a cirrosis hepática. La expresión “un método para detectar cirrosis hepática” se puede entender de forma amplia como un método para identificar, un método para el diagnóstico o un método para el pronóstico de cirrosis hepática.

En otra realización, se usa un perfil de hidratos de carbono para la fabricación de un ensayo de diagnóstico para la detección de cirrosis hepática, dicho ensayo de diagnóstico comprende las siguientes etapas: (a) generar un perfil de hidratos de carbono o fragmentos derivados de los mismos, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos, o rasgos de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos de hidratos de carbono que se determinan mediante la estructura de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos de hidratos de carbono; estando presentes en u obteniéndose dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos a partir de una mezcla de glucoconjugados que están presentes en o se aíslan de una muestra de un fluido corporal procedente de dicho mamífero, y (b) medir en el perfil de la etapa a) la cantidad de al menos un hidrato de carbono o un fragmento derivado del mismo o un derivado marcado de dicho hidrato de carbono o de dicho fragmento, o un rasgo de al menos un hidrato de carbono o un fragmento derivado del mismo presente en dicho perfil de hidrato de carbono, y (c) comparar los datos medidos obtenidos en la etapa b) con los datos medidos obtenidos a partir de perfiles derivados de mamíferos libres de cirrosis hepática, y (d) atribuir la desviación obtenida en la etapa c) a cirrosis hepática.

En otra realización, la invención proporciona un método para detectar cirrosis hepática en un mamífero, que comprende (a) generar un perfil de hidratos de carbono o fragmentos derivados de los mismos, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos, o rasgos de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos de hidratos de carbono que se determinan mediante la estructura de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos de hidratos de carbono; estando presentes en u obteniéndose dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos a partir de una mezcla de glucoconjugados que están presentes en o se aíslan de una muestra de un fluido corporal procedente de dicho mamífero, y comparar aspectos cuantitativos y cualitativos de dicho perfil con los aspectos cuantitativos o cualitativos de tal perfil mencionado obtenido de uno o más individuos de dicha especie de mamífero.

La expresión “glucoconjugados que están presentes en” se refiere a hidratos de carbono que se detectan en los glucoconjugados sin ninguna etapa de aislamiento de dichos hidratos de carbono; de este modo, la muestra se usa como tal y no implica ninguna etapa de aislamiento de los hidratos de carbono, mientras que la expresión “o se aíslan de una muestra de un fluido corporal” se refiere al hecho de que los hidratos de carbono se aíslan de los glucoconjugados presentes en la muestra.

En una realización particular, el método de la invención se puede usar para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un mamífero que sufre cirrosis hepática. En otra realización particular, el método de la invención detecta específicamente cirrosis hepática. El término “específicamente” se refiere al hecho de que la cirrosis hepática se puede diagnosticar diferentemente de otros trastornos hepáticos que comprenden mamíferos que sufren una infección por hepatitis B o C.

La expresión “hidrato de carbono” se puede entender como glucanos que están presentes en la estructura de o que derivan a partir de glucoconjugados, que comprenden las categorías de glucanos conocidas en la técnica como glucanos enlazados a asparagina (también denominados N-glucanos) o glucanos enlazados a serina/treonina (también denominados como O-glucanos) de proteínas o glucosaminoglucanos o glucanos derivados de proteoglucanos, glucanos presentes en o derivados de glucolípidos, e hidratos de carbono derivados de anclaje de GPI. Los términos “glucano” e “hidrato de carbono” son intercambiables. Un “glucoconjugado” significa cualquier compuesto (por ejemplo proteína o lípido) que contiene un resto de hidrato de carbono. Con la expresión “una mezcla de glucoconjugados” se quiere decir una composición que contiene al menos dos (al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o más) de dichos glucoconjugados, potencialmente que también comprenden materiales que no son glucoconjugados, tales como proteínas, lípidos, sales y agua. La expresión “hidratos de carbono o fragmentos derivados de los mismos” significa que los hidratos de carbono se pueden fragmentar para producir al menos un oligosacárido o un derivado del mismo entre los productos del proceso de fragmentación. Otros productos de este proceso de fragmentación pueden incluir monosacáridos y oligosacáridos, o sus derivados. Un oligosacárido es un hidrato de carbono cuya estructura química consiste en al menos dos unidades enlazadas químicamente conocidas en la técnica como monosacárido. El mencionado proceso de fragmentación puede implicar tratamientos enzimáticos, químicos y físicos. Por ejemplo, los hidratos de carbono se pueden tratar (o digerir) con una enzima glucosidasa (por ejemplo una sialidasa para eliminar los restos de ácido siálico de los hidratos de carbono, o una fucosidasa, para eliminar restos de fucosa de los hidratos de carbono), y por lo tanto el perfil obtenido consiste en fragmentos de los hidratos de carbono. Las digestiones con glucosidasa se pueden llevar a cabo, por ejemplo, para obtener un perfil más simple de los hidratos de carbono. Los ácidos siálicos también se pueden eliminar de una manera química mediante hidrólisis de los hidratos de carbono con ácidos suaves. En los métodos de análisis espectrométricos de masa, el término “fragmentos” se refiere al hecho de que los hidratos de carbono están muy a menudo fragmentados en el proceso de análisis (por ejemplo en disociación inducida por colisión), en cuyo caso los productos de la fragmentación también pueden producir un derivado oligosacárido constituido por un oligosacárido químicamente enlazado al resto de uno o más monosacáridos que fueron parte de la estructura del hidrato de carbono antes de que tuviese lugar la fragmentación. Un ejemplo de tal derivado oligosacárido que es el producto de un proceso de fragmentación espectrométrico másico es conocido en la técnica como unión de producto de escisión de cruce de anillos. Un “rasgo de dicho hidrato de carbono” se refiere a cualquier parámetro medible cuyas propiedades y/o cantidad se determinan mediante la estructura del hidrato de carbono. Los ejemplos de tales parámetros medibles son, por ejemplo, parámetros de resonancia magnética nuclear tales como desplazamientos químicos, constantes de acoplamiento homonucleares y heteronucleares, Efectos Overhauser Nucleares y acoplamientos dipolares residuales. Como alternativa, tales parámetros medibles pueden ser el grado de unión a dicho hidrato de carbono a otras moléculas tales como lectinas y anticuerpos que reconocen determinantes estructurales específicos o sus combinaciones en el hidrato de carbono. Aún otros de tales parámetros medibles pueden ser el grado de la capacidad del hidrato de carbono para funcionar como sustrato para una enzima que modifica específicamente ciertos hidratos de carbono tales como glucosiltransferasas y glucosidasas.

La expresión “estando presentes u obteniéndose dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos a partir de una mezcla de glucoconjugados” se refiere al hecho de que “un perfil de hidratos de carbono o fragmentos derivados de los mismos, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos, o rasgos de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos de hidratos de carbono que se determinan mediante la estructura de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos de hidratos de carbono” se puede obtener ya sea a partir de hidratos de carbono que todavía están químicamente enlazados a los glucoconjugados en la mezcla, o a partir de hidratos de carbono que han sido liberados de los glucoconjugados por medios enzimáticos, químicos o físicos. En una realización preferida, los N-glucanos se liberan de las glucoproteínas en la mezcla mediante digestión enzimática con Péptido N-glucosidasa F u otras endoglucosidasas conocidas en la técnica. En otra realización, los N- y O-glucanos se pueden liberar usando un procedimiento que implica hidrazina, conocido por los expertos en la técnica. En todavía otra realización, los O-glucanos se pueden liberar selectivamente usando eliminación beta en condiciones alcalinas, según procedimientos bien conocidos. En el caso de que el perfil se obtenga en hidratos de carbono que todavía están enlazados químicamente a los glucoconjugados en la mezcla, una realización implica el uso de enzimas o procedimientos químicos para modificar la parte que no es de glucano del glucoconjugado antes de obtener el perfil, tal como proteasas o enzimas que modifican la parte lipídica de los glucolípidos. La expresión “un perfil de hidratos de carbono” significa cualquier entidad que comprenda información cualitativa y/o cuantitativa sobre dichos hidratos de carbono. Por ejemplo, esto puede significar un perfil electroforético o cromatográfico de dichos hidratos de carbono. En un caso particular, el perfil es un espectro de masas de dichos hidratos de carbono. Como alternativa, el perfil puede ser información obtenida mediante análisis por resonancia magnética nuclear. En todavía otro ejemplo, el perfil puede ser información que describa aspectos cualitativos o cuantitativos de lectina que se une a los hidratos de carbono. Como alternativa, el perfil puede ser información que describa el grado en el cual los hidratos de carbono son sustratos para enzimas específicas tales como glucosiltransferasas o glucosidasas. Tal información puede incluir lecturas de las mediciones de subproductos de tales reacciones enzimáticas, tales como nucleótidos liberados en cantidades equimolares en reacciones de glucosiltransferasas. En una realización particular, la expresión “generar un perfil de hidratos de carbono” o “elaborar el perfil de hidratos de carbono” también puede implicar que las estructuras de glucano se separan y se detectan subsiguientemente. Habitualmente, en un perfil de hidratos de carbono se identifica un número de hidratos de carbono. Habitualmente, los hidratos de carbono están presentes en una mezcla compleja, y es necesaria la separación para una detección eficiente. La separación se puede llevar a cabo con métodos que comprenden métodos electroforéticos y cromatográficos. La

detección se puede llevar a cabo con métodos que comprenden detección mediante anticuerpos, detección con lectina, RMN, espectrometría de masas, y fluorescencia. En una realización particular, es necesario eliminar química y/o enzimáticamente los glucanos de las glucoproteínas antes de que se pueda elaborar el perfil de los glucanos. Los métodos para preparar glucanos a partir de glucoproteínas son bien conocidos en la técnica. En otra realización particular, es necesario derivatizar los glucanos antes de la separación y de la detección. En un enfoque, el método de la presente invención para la elaboración del perfil (incluye separación y detección) de los glucanos se puede llevar a cabo en combinación con un secuenciador de ADN. Sin embargo, está claro para la persona experta en la técnica que este método también se puede aplicar en relación con sistemas de electroforesis capilar adaptables a un detector de fluorescencia inducida por láser. Tales sistemas incluyen, por ejemplo, los sistemas de electroforesis capilar serie P/ACE (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, Calif.). La invención también se puede aplicar con cualquier sistema de electroforesis que sea adaptable con un detector de fluorescencia inducida por láser. En otra realización, también se pueden usar métodos de detección espectrométricos de masas, tales como MALDI-TOF-MS para la medida de la cantidad de al menos un hidrato de carbono o un fragmento derivado del mismo. En los métodos espectrométricos de masas, los hidratos de carbono están fragmentados muy a menudo, y por lo tanto en dichos métodos se detectan fragmentos de hidratos de carbono.

En todavía otra realización, la elaboración del perfil se puede llevar a cabo con métodos microfluídicos. La microfluídica es un campo que está creciendo rápidamente y se basa en la migración de fluidos a través de canales de calibre estrecho creados en un medio sólido (mayoritariamente obleas de sílice o placas de vidrio de alta pureza) vía técnicas sacadas de la industria de microchips (fotolitografía y grabado en húmedo químico). Los fluidos pueden migrar a través de estos canales vía acción capilar o bombeo activo, y los analitos pueden migrar en canales llenos de fluido, a través de electroforesis (Schmalzing et al (2001) *Methods Mol. Biol.* 163, 163-173). En todavía otra realización, la separación de los hidratos de carbono se puede llevar a cabo vía una separación cromatográfica con métodos que incluyen cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de líquidos de altas prestaciones, o cromatografía de gases. La expresión "al menos un hidrato de carbono" se refiere a la medida de la cantidad de al menos un hidrato de carbono presente en el perfil de hidratos de carbono que es relevante desde el punto de vista del diagnóstico para la detección de cirrosis hepática (por lo tanto, dicho al menos un hidrato de carbono se puede designar como un al menos un hidrato de carbono de diagnóstico). En una realización, la medida de un hidrato de carbono es suficiente para diagnosticar cirrosis hepática. Esto significa que, en un caso particular, un hidrato de carbono está presente en un mamífero que sufre cirrosis y está ausente en un mamífero libre de cirrosis; en otro caso particular, un hidrato de carbono está presente en un mamífero libre de cirrosis y ausente en un mamífero que sufre cirrosis. En otro ejemplo particular, una cantidad diferente de un hidrato de carbono es suficiente para diferenciar entre un mamífero que sufre cirrosis y un mamífero libre de cirrosis. En una realización preferida, se mide la cantidad de uno, dos o incluso más hidratos de carbono (de diagnóstico). En un método de elaboración del perfil, la cantidad del hidrato de carbono (de diagnóstico) se puede medir, por ejemplo, calculando la altura del pico o la superficie del pico. Comparando la cantidad de al menos un hidrato de carbono (de diagnóstico), presente en muestras de pacientes, con los niveles de hidratos de carbono de diagnóstico correspondientes presentes en un individuo libre de cirrosis hepática, se puede diagnosticar la presencia o ausencia de cirrosis hepática. La invención se puede usar en muestras obtenidas de mamíferos tales como seres humanos. Los hidratos de carbono de diagnóstico pueden ser oligosacáridos, o polisacáridos. Los hidratos de carbono de diagnóstico pueden ser ramificados o no ramificados. Los hidratos de carbono de diagnóstico en una muestra procedente de un individuo afligido con cirrosis hepática están presentes con una abundancia (cantidad) que es consistentemente mayor o consistentemente menor que en una muestra procedente de un individuo que no está afligido (que no tiene cirrosis hepática). La expresión "derivados marcados de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos" se refiere a hidratos de carbono que se han marcado con un agente que conduce a una detección eficiente de los hidratos de carbono. Tales hidratos de carbono marcados también se denominan hidratos de carbono derivatizados. Como ejemplo, se puede usar un compuesto fluorescente para el marcaje de los hidratos de carbono. Dichos compuestos fluorescentes también están preferentemente cargados de manera que los compuestos derivatizados pueden migrar en condiciones electroforéticas. Cuando el marcador fluoróforo no está cargado, se puede acoplar con una especie que proporciona carga. Dicho marcador fluoróforo también permite la medición cuantitativa mediante fluorescencia de los hidratos de carbono derivatizados. Los compuestos fluorescentes tales como ácido 9-aminopiren-1,4,6-trisulfónico (APTS) y ácido 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfónico (ANTS) son particularmente adecuados para la separación electroforética de hidratos de carbono derivatizados. Otros compuestos para el marcaje fluorescente de hidratos de carbono incluyen 2-aminopiridina (AP), 5-aminonaftalen-2-sulfonato (ANA), ácido 1-amino-4-naftalensulfónico (ANSA), ácido 1-amino-6,8-disulfónico (ANDA), 3-(4-carboxibenzoil)-2-quinolincarboxaldehído (CBQCA), amarillo de lucifer, 2-aminoacridona y 4-aminobenzonitrilo (ABN).

En una realización particular, en relación con la detección de los hidratos de carbono marcados fluorescentemente, se puede aplicar cualquier método de detección conocido en la técnica, pero preferiblemente la detección se lleva a cabo con un láser tal como un láser de diodo, un láser de He/Cd o un láser de ion argón. En una realización particular, el perfil de las bandas de hidratos de carbono marcados producidas mediante la separación electroforética se visualiza usando un sistema de formación de imágenes basado en una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD). La información procedente de la cámara CCD se puede almacenar subsiguientemente en forma digital y se puede analizar mediante diversos programas de ordenador para comparar patrones de hidratos de carbono de diagnóstico entre individuos y entre patrones de referencia. En otra realización particular, los hidratos de carbono de diagnóstico separados mediante gel se pueden transferir a una membrana inmovilizante, es decir, se pueden

transferir y después sondear con diversos reactivos específicos de los hidratos de carbono de diagnóstico tales como lectinas o con anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para dichos hidratos de carbono de diagnóstico. En una realización específica, la invención proporciona un método para detectar cirrosis hepática en un mamífero, que comprende medir y detectar al menos una estructura de glucano y/o un glucoconjugado que tiene una abundancia diferente en muestras derivadas de individuos con y sin cirrosis usando ligandos que se unen específicamente a dicha al menos una estructura de glucano y/o glucoconjugado. Los ligandos comprenden lectinas y anticuerpos. Por ejemplo, la mayor abundancia de las estructuras de N-glucanos (o sus conjugados) con un resto de "GlcNAc bisecante" (producto GnT-III) en una muestra de fluido corporal se puede detectar con una lectina que reconoce específicamente glucanos (o sus conjugados) que se modifican con una GlcNAc bisecante, tal como la lectina eritroaglutinante procedente de *Phaseolus vulgaris* (E-PHA). Como alternativa, la mayor abundancia de las estructuras de N-glucanos con un resto de "GlcNAc bisecante" (o sus conjugados) se puede detectar mediante una reducción en la unión a los N-glucanos (o sus conjugados) de lectinas que sólo se unen a N-glucanos (o sus conjugados) si no están sustituidos con un resto de GlcNAc bisecante. Un ejemplo de tal lectina es la lectina procedente de *Canavalia ensiformis* (Con A). La subgalactosilación observada de los N-glucanos glucoproteicos del suero se puede detectar mediante una lectina que se une a GlcNAc terminal, tal como la lectina *Griffonia simplicifolia* II (GS-II). Como alternativa, la subgalactosilación se puede medir mediante una reducción en la unión de una lectina que se une a galactosa terminal, tal como la lectina procedente de *Erythrina cristagalli*.

En una realización particular, el "perfil de un rasgo determinado por la estructura de los hidratos de carbono" se obtiene midiendo la propiedad de los hidratos de carbono que está constituida por ser un sustrato para una glucosiltransferasa específica. En una realización preferida, esta glucosiltransferasa es beta-1,4-galactosiltransferasa, y los hidratos de carbono son aquellos presentes en la mezcla total de proteínas séricas o plasmáticas. Un sustrato adicional para esta reacción es UDP-galactosa, y la reacción produce UDP en una cantidad estequiométrica. De este modo, el perfil se puede obtener midiendo la diferencia entre el grado de galactosilación de las proteínas desialiladas antes y después de la reacción, por ejemplo mediante un método que implica la unión de las glucoproteínas a una lectina específica para beta-galactosa terminal (tal como las lectinas conocidas en la técnica derivadas de *Ricinus communis* y de *Erythrina cristagalli*, o las galectinas tales como la derivada de *Coprinus cinereus*). Como alternativa, el perfil se puede obtener midiendo la cantidad de UDP generada en la reacción de beta-1,4-galactosiltransferasa en la mezcla de proteínas séricas o plasmáticas, por ejemplo mediante HPLC. La cantidad de UDP se puede medir también usando una reacción de enzima acoplada, con una o más enzimas conocidas procedentes del metabolismo nucleotídico, tales como, por ejemplo, una nucleótido difosfatasa tal como la GDPasa de Golgi de levadura, que también muestra actividad hidrolítica significativa con respecto a UDP. En este último caso, el perfil se puede obtener midiendo UMP o fosfato, usando técnicas bien conocidas. Todavía otro ejemplo de una medición de UDP implica el uso de poros de membranas supramoleculares con afinidad diferencial por UDP-Gal y UDP, como se conoce en la técnica. Los perfiles así obtenidos se pueden por ejemplo estandarizar para la cantidad total de proteína o hidrato de carbono presente en la muestra sérica o plasmática. En todavía otra realización, el perfil se puede obtener usando los hidratos de carbono presentes en la mezcla de proteínas séricas o plasmáticas como sustrato tanto para beta-1,4-galactosiltransferasa como una sialiltransferasa, con UDP-galactosa y ácido CMP-N-acetil-neuramínico como sustratos donantes de azúcar. En esta realización, el perfil puede consistir en la diferencia en la unión de una lectina que se une a ácido siálico (tal como la lectina bien conocida en la técnica derivada de *Maackia amurensis* o *Sambucus nigra*) a las glucoproteínas antes o después de la reacción, o puede consistir en la medición de la cantidad de UDP y/o CMP liberada durante la reacción, usando métodos conocidos en la técnica.

En otra realización, el método de elaboración del perfil de hidratos de carbono se puede suplementar pre-electroforéticamente con uno o más patrones internos marcados con un cromóforo o fluoróforo diferente del marcador unido a los analitos de los hidratos de carbono. El patrón interno permite la determinación exacta y reproducible de las movilidades electroforéticas del hidrato de carbono derivatizado al referenciar estas movilidades a las movilidades de los componentes en la mezcla del patrón interno. Por ejemplo, se puede añadir a los glucanos derivatizados, antes de la elaboración del perfil, un patrón oligonucleotídico marcado con rodamina Genescan™ 500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) o una mezcla de oligonucleótidos 6-, 18-, 30-, y 42-méricos marcados con rodamina. Los patrones de diagnóstico se pueden marcar antes del marcaje de las muestras para el análisis; sin embargo, los patrones de diagnóstico se marcan preferiblemente de forma concomitante con el marcaje para los patrones para análisis. Además, los hidratos de carbono de diagnóstico en los patrones se cuantifican preferentemente para proporcionar comparaciones cuantitativas o cualitativas con la cantidad de hidratos de carbono de diagnóstico en las muestras para análisis.

La expresión "fluido corporal" incluye sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, saliva, orina, fluido de la médula ósea, fluido cerebroespinal, fluido sinovial, fluido linfático, fluido amniótico, fluido de aspiración de pezón, y similar. Los fluidos corporales preferidos para análisis son aquellos que se obtienen convenientemente de pacientes; los fluidos corporales particularmente preferidos incluyen suero sanguíneo y plasma sanguíneo.

Aunque la presente invención se puede llevar a cabo sin pretratamiento de la muestra antes de la elaboración del perfil de los glucanos (derivatizados), en una realización particular las muestras para análisis pueden requerir el procesamiento antes de la separación y cuantificación de los hidratos de carbono de diagnóstico. El método preciso de procesamiento de las muestras empleado puede variar según un número de factores atribuibles a la elección del fluido de la muestra y la identidad de los hidratos de carbono de diagnóstico; estos factores incluyen: la abundancia

del hidrato de carbono de diagnóstico, la concentración de los hidratos de carbono de fondo, la presencia de moléculas interferentes, por ejemplo moléculas que afectan de forma adversa a la movilidad de la banda de los hidratos de carbono de diagnóstico o al marcaje fluorescente de los hidratos de carbono de diagnóstico, y si el marcador fluorescente se ha de separar de los hidratos de carbono de diagnóstico derivatizados. Los métodos adecuados para este procesamiento o pretratamiento de las muestras incluyen: diálisis, para eliminar moléculas interferentes (por ejemplo sal para una detección espectrométrica de masas eficiente); ultrafiltración, para concentrar hidratos de carbono de diagnóstico y eliminar moléculas interferentes; centrifugación, para eliminar partículas interferentes y células concentradas; precipitación, para eliminar moléculas interferentes; eliminación de la albúmina del suero para enriquecer proteínas glucosiladas y por tanto reducir la abundancia de glucanos; desglucosilación con una glucosidasa (por ejemplo una digestión de los glucanos con sialidasa), para generar un perfil de glucanos más simple; cromatografía, tal como cromatografía de afinidad, para eliminar, por ejemplo, albúmina del suero.

En aún otra realización, la invención proporciona un método para detectar cirrosis hepática en un mamífero, comprendiendo dicho método (a) generar un perfil de hidratos de carbono o fragmentos derivados de los mismos, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos, o rasgos de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos de hidratos de carbono que se determinan mediante la estructura de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos de hidratos de carbono; estando presentes en u obteniéndose dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos a partir de una mezcla de glucoconjugados que están presentes en o derivan de una muestra de un fluido corporal procedente de dicho mamífero, y (b) medir la cantidad relativa de al menos un hidrato de carbono o un fragmento derivado del mismo, o un derivado marcado de dicho hidrato de carbono o de dicho fragmento, presente en dicho perfil de hidratos de carbono. La expresión "medir la cantidad relativa" se refiere al aspecto que la cantidad de al menos un hidrato de carbono o fragmento (por ejemplo un hidrato de carbono o fragmento particular) se puede medir entre dos perfiles, derivándose un perfil de un mamífero libre de cirrosis hepática y derivándose el otro perfil de un mamífero que sufre posiblemente cirrosis hepática y al que se le va a diagnosticar cirrosis hepática. Como alternativa, la cantidad de un hidrato de carbono particular se puede comparar entre un intervalo de referencia promedio tomado de mamíferos libres de cirrosis hepática y la cantidad medida de dicho hidrato de carbono particular en un mamífero al que se le va a diagnosticar cirrosis hepática. En todavía otra realización, la "medición de la cantidad relativa" se refiere a medir la cantidad relativa de al menos dos hidratos de carbono o fragmentos derivados del mismo, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos, o rasgos de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos de hidratos de carbono presentes en un perfil de hidratos de carbono derivado de una muestra de un fluido corporal procedente de un animal.

En otra realización de la invención, a fin de ser capaces de medir cantidades relativas de los hidratos de carbono, se incluyen patrones de diagnóstico en los geles usados para analizar los hidratos de carbono de diagnóstico en las muestras de los sujetos; sin embargo, la información obtenida mediante el patrón de diagnóstico, por ejemplo distancia de migración de la banda e intensidad, también se puede obtener a partir de la comparación con registros almacenados obtenidos a partir de patrones de diagnóstico previamente sometidos a electroforesis de hidratos de carbono asistida con fluoróforos en condiciones similares a las condiciones a las que se exponen las muestras para análisis. Los patrones de diagnóstico pueden ser tanto positivos, es decir, que corresponden al patrón de hidrato de carbono completo en un individuo afectado, o negativos, es decir, que corresponden a un individuo no afectado. Los patrones de diagnóstico pueden tener una composición similar a la de las muestras para análisis, por cuanto pueden contener tanto hidratos de carbono de diagnóstico como hidratos de carbono de fondo con composición similar a la encontrada en muestras reales. Los patrones de diagnóstico pueden derivar de muestras obtenidas de individuos afectados y no afectados. Como alternativa, los patrones de diagnóstico pueden contener uno o más hidratos de carbono de diagnóstico libres de hidratos de carbono de fondo.

En una realización particular, la técnica de diagnóstico para medir cirrosis hepática no requiere un conocimiento detallado a priori de la estructura de los hidratos de carbono.

En otra realización particular, la técnica de diagnóstico para medir cirrosis hepática usa el conocimiento de la estructura de los hidratos de carbono. Los resultados del análisis estructural de los glucanos diferencialmente regulados se puede resumir como una mayor abundancia de productos de N-acetilglucosaminiltransferasa III (GlcNAc bisecante, estructuras de glucano de picos 2, 4 y 7 representados en la figura 1), y galactosilación reducida de los glucanos biantenarios (mayor intensidad de las estructuras de glucano de los picos 1 y 2 representados en la figura 1), y una disminución en la abundancia de las estructuras de glucano completamente galactosiladas bi- y triantenarias (estructuras de glucano de los picos 3 y 8 representados en la figura 1).

En otra realización, la invención proporciona un método para la detección de cirrosis hepática en un mamífero, comprendiendo dicho método generar un perfil de hidratos de carbono o fragmentos derivados de los mismos, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos, o rasgos de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos de hidratos de carbono que se determinan mediante la estructura de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos de hidratos de carbono; estando presentes en u obteniéndose dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos a partir de una mezcla de glucoconjugados que están presentes en o derivan de una muestra de un fluido corporal procedente de dicho mamífero, y medir la cantidad de al menos un hidrato de carbono o un fragmento derivado del mismo o un derivado marcado de dicho hidrato de carbono o de dicho fragmento, o un rasgo de al menos un hidrato de carbono o fragmento derivado del mismo presente en dicho perfil de hidratos de carbono, en el que dicho al menos un hidrato de carbono se selecciona del grupo que consiste en:

i) GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,3)[GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,6)]Man(β -1,4)GlcNAc(β -1,4)[Fuc(α -1,6)]GlcNAc (glucano 1),

ii) GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,3)[GlcNAc(β -1,4)][GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,6)]Man(β -1,4)GlcNAc(β -1,4)[Fuc(α -1,6)]GlcNAc (glucano 2),

5 iii) Gal(β -1,4)GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,3)[Gal(β -1,4)GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,6)]Man(β -1,4)GlcNAc(β -1,4)GlcNAc (glucano 3),

iv) Gal(β -1,4)GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,3)[GlcNAc(β -1,4)][Gal(β -1,4)GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,6)]Man(β -1,4)GlcNAc(β -1,4)[Fuc(α -1,6)]GlcNAc (glucano 7),

10 v) Gal(β -1,4)GlcNAc(β -1,2)[Gal(β -1,4)GlcNAc(β -1,4)]Man(α -1,3)[Gal(β -1,4)GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,6)]Man(β -1,4)GlcNAc(β -1,4)GlcNAc (glucano 8),

vi) un fragmento derivado de glucano 1, 2, 3, 7 u 8,

vii) un derivado sialilado de glucano 1, 2, 3, 7 u 8,

viii) un rasgo de glucano 1, 2, 3, 7 u 8 o derivado o fragmento del mismo.

15 En aras de la claridad, las estructuras de los picos 1, 2, 3, 7 y 8 corresponden al perfil de hidratos de carbono representado en la figura 1 y a la representación gráfica de estas estructuras en la Figura 4. Dicho perfil de hidratos de carbono es un perfil desialilado (sin ácido siálico en los glucanos), queriendo decir que las estructuras de los picos 1, 2, 3, 7 y 8 se expresan estrictamente como fragmentos de hidratos de carbono (perdiendo las estructuras de ácido siálico). Los hidratos de carbono se presentan aquí con las reglas IUPAC para la nomenclatura (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/2carb/38.html>), los picos según la figura 1 se han identificado en la presente invención y se representan por su nomenclatura condensada y extendida. En las reivindicaciones, se usa la nomenclatura condensada. El nombre de las cuatro estructuras se resume aquí más abajo.

Estructura de glucano desialilado del pico 1 de la figura 1:

Nomenclatura condensada:

GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,3)[GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,6)]Man(β -1,4)GlcNAc(β -1,4)[Fuc(α -1,6)]GlcNAc

25 Nomenclatura extendida:

β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)-[β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 6)]-D-GlcpNAc

Estructura de glucano desialilado del pico 2 de la figura 1:

Nomenclatura condensada:

30 GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,3)[GlcNAc(β -1,4)][GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,6)]Man(β -1,4)GlcNAc(β -1,4)[Fuc(α -1,6)]GlcNAc

Nomenclatura extendida:

β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)-[β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)][β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 6)]-D-GlcpNAc

35 Estructura de glucano desialilado del pico 3 de la figura 1:

Nomenclatura condensada:

Gal(β -1,4)GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,3)[Gal(β -1,4)GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,6)]Man(β -1,4)GlcNAc(β -1,4)GlcNAc

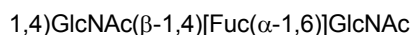
Nomenclatura extendida:

40 β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)-[β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcpNAc

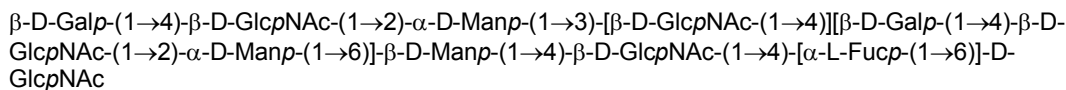
Estructura de glucano desialilado del pico 7 de la figura 1:

Nomenclatura condensada:

Gal(β -1,4)GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,3)[GlcNAc(β -1,4)][Gal(β -1,4)GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,6)]Man(β -

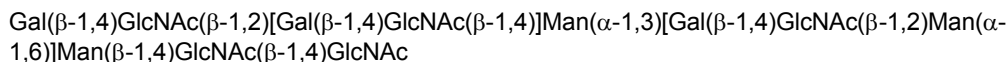


Nomenclatura extendida:

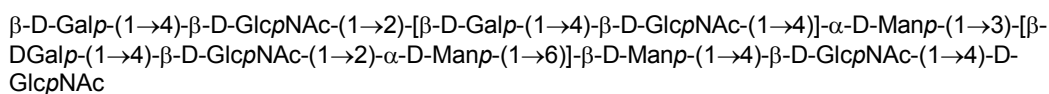


Estructura de glucano desialilado del pico 8 de la figura 1:

Nomenclatura condensada:



Nomenclatura extendida:



En otra realización, la invención proporciona un método para detectar cirrosis hepática, que comprende las etapas de (a) generar un perfil de hidratos de carbono o fragmentos derivados de los mismos, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos, o rasgos de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos de hidratos de carbono que se determinan mediante la estructura de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos de hidratos de carbono; estando presentes en u obteniéndose dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos a partir de una mezcla de glucoconjugados que están presentes en o derivan de una muestra de un fluido corporal procedente de dicho mamífero, y (b) medir la cantidad relativa de la estructura de glucano 1 o un fragmento de la misma y la estructura de glucano 8 o un fragmento de la misma y/o la estructura de glucano 2 o un fragmento de la misma y la estructura de glucano 8 o un fragmento de la misma y/o la estructura de glucano 7 o un fragmento de la misma y la estructura de glucano 8 o un fragmento de la misma y/o la estructura de glucano 1 o un fragmento de la misma y la estructura de glucano 3 o un fragmento de la misma y/o la estructura de glucano 2 o un fragmento de la misma y la estructura de glucano 3 o un fragmento de la misma y/o la estructura de glucano 7 o un fragmento de la misma y la estructura de glucano 3 o un fragmento de la misma.

Las alturas promedio de los picos para las estructuras de glucano 1, 2, 7 y 8 se calcularon en los diferentes grupos de pacientes. Las cantidades relativas promedio entre estas estructuras de glucano para el grupo de cirrosis (n = 37) son: pico 1/pico 8: 2,444, pico 2/pico 8: 0,590 y pico 7/pico 8: 1,479. Las cantidades relativas para el grupo de control sano (n = 60) son pico 1/pico 8: 0,809, pico 2/pico 8: 0,081 y pico 7/pico 8: 0,7234. Esto significa que una muestra se diagnostica por tener cirrosis cuando las cantidades relativas entre el pico 1/pico 8 es 3,02 veces mayor que el promedio dentro de esta población sana, y/o cuando las cantidades relativas entre el pico 2/pico 8 es 7,28 veces mayor que el promedio dentro de esta población sana, y/o cuando las cantidades relativas entre el pico 7/pico 8 es 2,04 veces mayor que el promedio dentro de esta población sana.

Las cantidades relativas entre estas estructuras de glucano para el grupo de hepatitis crónica (n = 27) son: pico 1/pico 8: 1,21, pico 2/pico 8: 0,25 y pico 7/pico 8: 0,95. Esto significa que una muestra se diagnostica por tener cirrosis cuando las cantidades relativas entre el pico 1/pico 8 es 2,01 veces mayor que el promedio dentro de este grupo de hepatitis crónica, y/o cuando las cantidades relativas entre el pico 2/pico 8 es 2,36 veces mayor que el promedio dentro de este grupo de hepatitis crónica, y/o cuando las cantidades relativas entre el pico 7/pico 8 es 1,56 veces mayor que el promedio dentro de este grupo de hepatitis crónica.

Las cantidades relativas entre estas estructuras de glucano para la población de control completa (n = 153, que consiste en individuos sanos, individuos que sufren hepatitis crónica e individuos que sufren alcoholismo crónico) son: pico 1/pico 8: 0,98, pico 2/pico 8: 0,115 y pico 7/pico 8: 0,87. Esto significa que una muestra se diagnostica por tener cirrosis cuando las cantidades relativas entre el pico 1/pico 8 es 2,49 veces mayor que el promedio dentro de esta población de control completa, y/o cuando las cantidades relativas entre el pico 2/pico 8 es 5,13 veces mayor que el promedio dentro de esta población de control completa, y/o cuando las cantidades relativas entre el pico 7/pico 8 es 1,7 veces mayor que el promedio dentro de esta población de control completa.

De este modo, en otra realización, cuando la relación (cantidades relativas) entre el pico 1/pico 8 es mayor que al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70% o al menos 80% de la cantidad relativa del promedio dentro de la población de control, una muestra se diagnostica como derivada de un mamífero que sufre cirrosis hepática.

En una realización específica, la invención proporciona un método para detectar cirrosis hepática, que comprende las etapas de (a) generar un perfil de hidratos de carbono o fragmentos derivados de los mismos, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos, o rasgos de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos de hidratos de carbono que se determinan mediante la estructura de dichos hidratos de carbono o dichos

fragmentos de hidratos de carbono; estando presentes en u obteniéndose dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos a partir de una mezcla de glucoconjugados que están presentes en o derivan de una muestra de un fluido corporal procedente de dicho mamífero, y (b) medir la cantidad relativa de la estructura de glucano 1 o un fragmento de la misma y la estructura de glucano 8, y en el que dicha cantidad relativa entre dichas estructuras de glucano o sus fragmentos es al menos 80% mayor que el promedio de dicha cantidad relativa en mamíferos libres de cirrosis hepática.

En otra realización, cuando la cantidad relativa entre el pico 2/pico 8 es mayor que al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 100% de la cantidad relativa del promedio dentro de la población de control, una muestra se diagnostica como derivada de un mamífero que sufre cirrosis hepática.

En una realización específica, la invención proporciona un método para detectar cirrosis hepática, que comprende las etapas de (a) generar un perfil de hidratos de carbono o fragmentos derivados de los mismos, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos, o rasgos de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos de hidratos de carbono que se determinan mediante la estructura de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos de hidratos de carbono; estando presentes en u obteniéndose dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos a partir de una mezcla de glucoconjugados que están presentes en o derivan de una muestra de un fluido corporal procedente de dicho mamífero, y (b) medir la cantidad relativa de la estructura de glucano 2 o un fragmento de la misma y la estructura de glucano 8, y en el que dicha cantidad relativa entre dichas estructuras de glucano o sus fragmentos es al menos 100% mayor que el promedio de dicha cantidad relativa en mamíferos libres de cirrosis hepática.

En todavía otra realización, cuando la cantidad relativa entre el pico 7/pico 8 es mayor que al menos 20%, al menos 30% o al menos 40% de la cantidad relativa del promedio dentro de la población de control, una muestra se diagnostica como derivada de un mamífero que sufre cirrosis hepática.

En otra realización específica, la invención proporciona un método para detectar cirrosis hepática, que comprende las etapas de (a) generar un perfil de hidratos de carbono o fragmentos derivados de los mismos, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos, o rasgos de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos de hidratos de carbono que se determinan mediante la estructura de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos de hidratos de carbono; estando presentes en u obteniéndose dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos a partir de una mezcla de glucoconjugados que están presentes en o derivan de una muestra de un fluido corporal procedente de dicho mamífero, y (b) medir la cantidad relativa de la estructura de glucano 7 o un fragmento de la misma y la estructura de glucano 8, y en el que dicha cantidad relativa entre dichas estructuras de glucano o sus fragmentos es al menos 40% mayor que el promedio de dicha cantidad relativa en mamíferos libres de cirrosis hepática.

En otra realización, la invención también incluye un kit para llevar a cabo el diagnóstico de la cirrosis hepática. Por ejemplo, se puede obtener un kit para llevar a cabo el diagnóstico de la cirrosis hepática mediante electroforesis de los hidratos de carbono asistida por fluoróforos. Como otro ejemplo, se puede obtener un kit para llevar a cabo el diagnóstico de la cirrosis hepática mediante espectrometría de masas. Los kits de diagnóstico mediante electroforesis de hidratos de carbono asistida por fluoróforos proporcionan colecciones de reactivos requeridos para llevar a cabo el diagnóstico de la cirrosis hepática. Los kits adecuados permiten a los laboratorios realizar convenientemente el diagnóstico mediante electroforesis de hidratos de carbono asistida por fluoróforos. Los kits pueden incluir reactivos para llevar a cabo ensayos para identificar cirrosis hepática. Los kits pueden incluir patrones de diagnóstico, marcador fluorescente, materiales de transferencia y de unión, por ejemplo membranas, reactivos de unión específicos de hidratos de carbono, lectinas, instrucciones, recipientes para muestras, y reactivos de gel de poliacrilamida, geles premoldeados, tampones enzimáticos, agentes reductores (para uso en el marcaje de hidratos de carbono con fluoróforos), y enzimas glicosidasas (por ejemplo sialidasa, galactosidasa, fucosidasa) capaces de catalizar reacciones que alteran estructuralmente los hidratos de carbono de diagnóstico. Los kits más completos pueden incluir equipo para realizar la electroforesis de hidratos de carbono asistida por fluoróforos, tal como un aparato de gel de poliacrilamida, CCDs, láser, secuenciador de ADN, ordenadores, software, y similar. Los reactivos incluidos en los kits de diagnóstico mediante electroforesis de hidratos de carbono asistida por fluoróforos se proporciona preferiblemente en cantidades previamente medidas. Los kits incluyen preferiblemente las instrucciones para llevar a cabo el método de electroforesis de hidratos de carbono asistida por fluoróforos de la presente invención.

El ensayo de diagnóstico es útil en la práctica debido a que es suficientemente fácil de aplicar a gran escala por personal de laboratorio normalmente entrenado. Además, puesto que los analizadores de alta resolución y alta sensibilidad basados en electroforesis para la secuenciación de ADN y detección de mutaciones ya están presentes en un número rápidamente creciente de laboratorios clínicos, o son asequibles para la mayoría de los laboratorios clínicos, el nuevo ensayo de glucómica de diagnóstico para la cirrosis hepática se puede llevar a cabo en ellos. Además, el abanico disponible de analizadores de ADN permite que se escale fácilmente la producción de las muestras desde unas pocas hasta centenares de muestras por día por máquina, dependiendo de la demanda de cada laboratorio. Este equipo de análisis de ADN ofrece la ventaja añadida de automatización, reduciendo la complejidad del procedimiento analítico global. La elaboración del perfil en la mezcla total de glucoproteínas

incrementa la tolerancia del ensayo a pequeñas variaciones interindividuales de la abundancia y el patrón de glucosilación de cada glucoproteína individual en la mezcla, y de este modo permite un ensayo más robusto que los enfoques clásicos actuales en los que la glucosilación se estudia en glucoproteínas purificadas.

En otra realización, el método para la detección de cirrosis hepática comprende además parámetros de química clínica y/o datos histológicos. De este modo, la presente invención también se puede llevar a cabo convenientemente en combinación con parámetros de química clínica y/o histología y/o parámetros de formación de imágenes. La medición de los parámetros de química clínica comprende medir niveles de bilirrubina, albúmina, tiempo de protrombina, proteína reactiva C, abundancia de IgA, concentración sérica de ácido hialurónico, aminotransferasas, y varios ensayos de metabolismo hepático conocidos en la técnica. La histología comprende biopsias hepáticas. La formación de imágenes comprende ultrasonidos, barrido mediante CT, barrido mediante MRI, y formación de imágenes de trazadores radioactivos específicos para el hígado.

En todavía otra realización, la invención proporciona un método para detectar la presencia o la predisposición de carcinoma hepatocelular en un mamífero que sufre cirrosis hepática, que comprende a) generar un perfil de hidratos de carbono o de fragmentos derivados de los mismos, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos, o rasgos de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos de hidratos de carbono que se determinan mediante la estructura de dichos hidratos de carbono o de dichos fragmentos de hidratos de carbono; estando presentes en u obteniéndose dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos a partir de una mezcla de glucoconjugados que están presentes en o se aíslan a partir de una muestra de un fluido corporal procedente de dicho mamífero, y (b) medir en el perfil de la etapa a) la cantidad de al menos un hidrato de carbono o de un fragmento derivado del mismo o de un derivado marcado de dicho hidrato de carbono o de dicho fragmento, o un rasgo de al menos un hidrato de carbono o de un fragmento derivado del mismo presente en dicho perfil de hidratos de carbono, y c) comparar los datos medidos obtenidos en la etapa b) con los datos medidos obtenidos a partir de perfiles derivados de mamíferos que sufren cirrosis hepática pero están libres de carcinoma hepatocelular, y (d) atribuir la desviación obtenida en la etapa c) a la presencia de carcinoma hepatocelular. En todavía otra realización en el método para detectar la presencia o la predisposición de carcinoma hepatocelular en la etapa c), se lleva a cabo un análisis de dos parámetros con los glucanos 7 y 14 derivados de un perfil de hidratos de carbono de suero humano. En todavía otra realización, dicho análisis de dos parámetros es un análisis de regresión logística binaria de dos parámetros.

Los ejemplos que siguen se ofrecen como descriptivos de ciertas realizaciones. Como tales, son solamente ejemplares y no limitantes en su naturaleza.

Ejemplos

Recogida de datos y características del perfil sérico de glucómica

Se obtuvieron perfiles del conjunto de N-glucanos presentes en la colección completa de proteínas presentes en los 214 sueros humanos, partiendo de 5 µl de suero, sin ningún pretratamiento. Para este estudio, se usó el secuenciador de ADN Applied Biosystems 377. La altura de los picos de 14 picos se cuantificó en cada muestra de suero analizada, dando cuenta del >99% de la intensidad de señal observada total. Se limita la discusión aquí a los 9 picos en el intervalo de movilidad de 8 a 12 unidades de glucosa (Fig. 1). Su intensidad es suficientemente elevada para permitir la cuantificación normal fácil.

Procesamiento estadístico

Permaneciendo fieles a la configuración "ómica" de nuestro estudio, se aproximó el análisis de datos de una manera puramente estadística, sin sesgo con respecto a la identidad de los picos medidos.

En la Fig. 2, se da un resumen de las características de los datos (mediana e intervalos de intercuartiles) para estos 9 picos con respecto a 7 grupos de muestra. Tempranamente en el análisis, se observa que se produjo un cambio de perfil muy similar en las muestras procedentes de pacientes que sufren carcinoma hepatocelular y de pacientes con cirrosis hepática (las características generales de este cambio de perfil son evidentes a partir de la comparación de los 2 paneles inferiores en la Fig. 1). Puesto que todos los pacientes con carcinoma hepatocelular en este estudio también tuvieron cirrosis hepática (16), se decidió considerar estas muestras como un grupo (n = 37, grupo 1 en la Tabla I) en el análisis estadístico posterior, designado como el grupo de cirrosis. El grupo 0 consiste en las 60 muestras de control procedentes de donantes de sangre de la Cruz Roja. Todas las muestras de pacientes con hepatitis B o C crónica, sin cirrosis, se tomaron juntas en el grupo 2 (n = 27). El grupo 3 consiste en 8 muestras de pacientes con metástasis no HCC al hígado. En el grupo 4, todas las muestras se reunieron de pacientes con abuso crónico sospechado de alcohol y un resultado del ensayo de transferrina deficiente en hidratos de carbono (CDT) positivo. El grado de glucosilación de transferrina sérica es sensible a la ingesta reciente (2-3 semanas) de alcohol, y actualmente es el mejor marcador sérico para la detección de abuso crónico de alcohol (Anton, 2001; Wuyts et al., 2001). Es obvio que la presencia de CDT podría influir en el perfil de glucosilación de la glucoproteína sérica total medida a aquí. Con fines comparativos, el grupo 5 consiste en muestras (n = 33) de abusadores crónicos de alcohol con una CDT negativa. El grupo 6, finalmente, consiste en muestras de pacientes con trastornos autoinmunitarios (n = 24). Los cambios de glucosilación (especialmente subgalactosilación y mayor presencia de fucosa nuclear

enlazada α -1,6) de IgG se ha documentado bien en artritis reumatoide y espondilitis anquilosante (Martin et al., 2001; Watson et al., 1999), y también podrían influir en el patrón de glucanos de glucoproteína sérica total, puesto que IgG es una proteína sérica muy abundante.

A partir de los datos en la Fig. 2, es manifiesto que en el grupo de cirrosis, los picos 1, 2 y 7 están aumentados y los picos 3 y 8 están disminuidos suficientemente de manera que el intervalo de intercuartil inferior de sus valores para el grupo de cirrosis no se solapa con los intervalos de intercuartiles interiores del grupo de control (Grupo 0). Además, estos cambios están muy correlacionados, como se muestra mediante el análisis de correlación de Spearman (Tabla 2). Por lo tanto, se crearon nuevas variables escalando los picos aumentados 1, 2 y 7 al pico disminuido 8, y subsiguientemente se transformaron logarítmicamente estas nuevas variables para normalizar las distribuciones. Un análisis que tuvo en cuenta la cantidad diferencial del Pico 4 no mejoró la eficiencia de la clasificación (véase más abajo) y tampoco lo hizo la incorporación de la disminución del Pico 3. Los valores para las tres nuevas variables resultantes se resumen en el panel derecho de la Fig. 2. Para detectar diferencias significativas en las medias de los valores de estas variables entre los 7 grupos de muestras, se llevó a cabo el análisis de varianza de una vía, seguido de dos ensayos de comparación múltiple diferentes (prueba de la diferencia honestamente significativa de Tukey y la comparación de Scheffé) para detallar las diferencias intergrupales específicas. A una tasa de error por familia de comparaciones de 0,0001, para las tres variables, el grupo de cirrosis fue significativamente diferente de todos los otros grupos de muestras (Tabla 3). La eficiencia de la clasificación de esta diferencia se evaluó con el análisis de la Curva Operativa del Receptor (ROC) no paramétrico y con regresión logística binaria. Para la relevancia clínica óptima y tras consultar con el hepatólogo colaborador (Dr. H. Van Vlierberghe, UZGent), estos algoritmos de clasificación se usaron en una comparación del grupo de cirrosis y el grupo de pacientes con hepatitis B o C crónica. En un marco clínico gastroenterológico típico, la detección de cirrosis es lo más relevante en pacientes con hepatitis crónica (y en pacientes con abuso crónico del alcohol). El grupo de muestras procedentes de pacientes con abuso crónico de alcohol que estuvo a nuestra disposición estuvo insuficientemente bien caracterizado en cuanto a la presencia de cirrosis para incluir esta colección en esta determinación del valor de corte. Los resultados del análisis de ROC se muestran en la Fig. 3.1, y permiten eficiencias de clasificación muy satisfactorias de alrededor de 95%. Los valores de corte obtenidos a partir de estas curvas ROC (valor al que se logra la sensibilidad y especificidad combinadas más elevada) se representan como las líneas que dividen los diagramas de dispersión bidimensionales en el resto de la Fig. 3 en cuadrantes. La línea asimétrica que divide los diagramas de dispersión en dos mitades son las líneas de regresión calculadas a partir de un modelo de regresión logística binaria lineal para cada una de las dos variables. Es instructivo comparar la eficiencia de los valores de corte calculados y las líneas de regresión en la distinción entre el grupo de cirrosis y todos los otros grupos de muestras (Fig. 3.2-6). Es una observación general que la clasificación "doble ROC" tiene una mayor especificidad y una menor sensibilidad que el enfoque de regresión. En la distinción del grupo de cirrosis y del grupo de hepatitis crónica, la sensibilidad y especificidad están ambas en el intervalo de 90-98%. Como se puede observar en la Fig. 3.3, el grupo de muestras de los donantes de sangre sanos de la Cruz Roja no tiene (para la gráfica izquierda y derecha) o sólo tiene 1 (en 60, para la gráfica del centro) falso positivo para la clasificación doble ROC, y ningún (para la gráfica derecha) o 1 (centro e izquierda) falso positivo para el enfoque de regresión. Esta especificidad próxima a 100% a una sensibilidad de alrededor de 95% es muy similar a los valores obtenidos en la distinción con hepatitis crónica, e indica nuevamente que las variables medidas indican un cambio patológico que es específico para cirrosis y no cambia significativamente con el comienzo de hepatitis crónica (como también se puede derivar a partir de los resultados de ANOVA). Una observación particular es que hay más falsos positivos en el grupo de muestras procedentes de alcohólicos crónicos (Fig. 3.4) en los análisis de regresión que incorporan el parámetro Log(Pico 7/Pico 8). Sin embargo, la clasificación doble ROC con uno de los otros dos parámetros todavía mantiene estos casos fuera del "área positiva". En el grupo de enfermedades autoinmunitarias (Fig. 3.5), los falsos positivos fueron principalmente debidos a valores crecientes de Log(Pico 1/Pico 8) en el 25% de los casos, y debidos a mayores valores de Log(Pico 7/Pico 8) en el 17% de los casos. Log(Pico 2/Pico 8) sólo traspasó el valor de corte en 1 caso (4%). Nuevamente, el análisis doble ROC fue más exitoso que la regresión logística binaria a la hora de mantener estos casos fuera del área positiva. La Fig. 3.6 da una imagen total de todos estos análisis. Globalmente, la combinación de los parámetros en la gráfica más a la izquierda produce el mejor resultado para este montaje de "muestras de conveniencia", con una sensibilidad y especificidad de 95% vía regresión logística binaria y una sensibilidad de 92% y una especificidad de 98% vía análisis doble ROC.

Análisis estructural de los N-glucanos diferencialmente regulados

Los resultados como se presentan en el último párrafo tienen valor por sí mismos para la diferenciación de pacientes con cirrosis de pacientes con un trastorno hepático crónico mucho menos avanzado. Sin embargo, para aumentar la confianza en la información obtenida a partir de un enfoque "óptico" a un problema biológico, se realiza habitualmente un intento para relacionar el resultado del procesamiento estadístico de datos con aspectos ya conocidos del problema bajo estudio. Para la glucómica, un prerrequisito para ser capaces de evaluar tales relaciones es el análisis estructural de los glucanos que están diferencialmente "expresados". Haciendo uso de matrices de exoglucosidasas, fue posible obtener suficiente información estructural sobre los glucanos diferencialmente regulados. Varios elementos adicionales hicieron esto posible: en primer lugar, los N-glucanos presentes en suero humano "sano" se han cartografiado supuestamente en un enfoque de HPLC tridimensional (Nakagawa et al., 1995). Este estudio constituye un "catálogo" verdadero de los N-glucanos que están presentes en las glucoproteínas en suero normal, y de este modo es una fuente que, para nuestro estudio, es comparable en valor

como un proteoma completamente anotado en un estudio de proteómica. En segundo lugar, para nuestros estudios de diagnóstico, las muestras estuvieron disponibles con un intervalo cuantitativo amplio en los cambios de interés. Esto fue de mucha ayuda a la hora de “rastrear” los picos de interés a lo largo de los perfiles de matrices de post-exoglucosidasas. La secuenciación de exoglucosidasas de tres de estas muestras se muestra en la Fig. 4. La estructura de cinco de los picos principales en el perfil de suero sano (las estructuras y sus productos de exoglucosidasas se muestran como picos negros en la Fig. 4. La posición de los glucanos de referencia con estas estructuras y algunos de sus productos de exoglucosidasas se muestran en el panel inferior de la secuencia central. Este panel se montó a partir de paneles individuales, conteniendo cada uno uno de estos picos). La disponibilidad de estas estructuras simplificó considerablemente la tarea de rastrear los picos diferencialmente regulados restantes a lo largo de los perfiles.

Estructura de glucano que corresponde con el pico 1 en la figura 1

El pico 1 desplaza 1,2 unidades de glucosa con la digestión con fucosidasa a la posición de un glucano de referencia a-galacto biantenarico (primer pico en el panel de referencia en la parte inferior de la columna de secuenciación central). Además, con la digestión con galactosidasa, el pico en esta posición se hace muy intenso debido a que el Pico 6 se desplaza a esta posición (estructura del Pico 6: glucano biantenarico fucosilado en el núcleo bigalacto. Tomados juntos, estos datos demuestran que el Pico 1 es el glucano α -1,6-fucosilado nuclear, agalacto, biantenarico. Este aumento en el grupo de muestras de cirrosis señala así una combinación de subgalactosilación y mayor fucosilación nuclear de las glucoproteínas del suero.

Estructura de glucano que corresponde al pico 2 en la figura 1

La identificación de este pico es más difícil debido a su abundancia relativamente baja. No obstante, se puede derivar información suficiente para identificar positivamente esta estructura: en el perfil que resulta de la doble digestión con sialidasa y β -1,4-galactosidasa, el producto del pico 7 comigra exactamente con el pico 2 en el panel de sialidasa. Subsiguientemente, puesto que el pico 2 no se observa en la columna de secuenciación izquierda (muestra de hepatitis), se pueden identificar sus productos de exoglucosidasas en el patrón de digestión doble de sialidasas + fucosidasa de las otras dos muestras, en el que es detectable el pico 2. Ya no hay ningún pico presente en la posición del Pico 2 con la digestión con fucosidasa, y sólo hay un nuevo pico que puede ser el producto de la digestión (resaltado en gris, primera flecha en el perfil de sialidasa + fucosidasa de la columna de secuenciación central). En el perfil de la triple digestión (β -1,4-galactosidasa suplementaria), este pico se hace más intenso debido a que el producto de la digestión del Pico 7 comigra con él. La digestión suplementaria con hexosaminidasa no deja rastro de un pico en esta posición. Esto nos condujo a la conclusión de que el Pico 2 representa la estructura α -1,6-fucosilada del núcleo agalacto, bisecada.

De este modo, este pico posee una combinación de las alteraciones estructurales del pico 3 y del pico 7, es decir, no está galactosilado y tiene un resto de GlcNAc bisecante.

Estructura de glucano que corresponde al pico 3 en la figura 1

Este es el N-glucano más abundante en las glucoproteínas séricas totales. Tras la digestión con sialidasa, su tamaño se estima que es 9 unidades de monosacárido, en comparación con la escalera de referencia de malto-oligosacáridos. Tras la digestión con sialidasa/ β -1,4-galactosidasa, este glucano pierde dos restos de galactosa y pierde posteriormente dos restos de GlcNAc con la digestión con β -N-acetilhexosaminidasa. El glucano residual migra a la posición de la estructura de N-glucano nuclear $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Se concluye que la estructura de glucano nº 3 es biantenaria, bi- β -1,4-galactosilada. Esta conclusión se corrobora por su comigración exacta con un glucano de referencia de esta estructura, tanto sin digerir como digerido con β -1,4-galactosidasa. El pico 3 está disminuido en cirrosis, con una mayor abundancia de su producto (o precursor) subgalactosilado y la mayor presencia de otros glucanos biantenarios, para los que este sustrato biantenarico base es el precursor.

Estructura de glucano que corresponde al pico 7 en la figura 1

Este pico también está presente en una abundancia relativamente baja en el perfil de suero procedente de un paciente con hepatitis crónica (tercera flecha en el segundo panel de la columna de secuenciación izquierda en la Fig. 4) y en suero normal (no mostrado). Su secuenciación se puede seguir muy fácilmente en la tercera columna de secuenciación, que representa uno de los sueros más gravemente afectados en nuestra colección. El Pico 7 es el tercer glucano más abundante en este perfil, y este pico, en ninguno de sus productos de digestión, comigra con uno de los glucanos de referencia mencionados anteriormente o sus productos de digestión. Puesto que no se observa comigración hacia la digestión con exoglucosidasas cuádruple, esto significa muy probablemente que hay un sustituyente que está ausente de estos glucanos de referencia. Después de la digestión cuádruple, el producto de la digestión del Pico 7 migra 1 unidad de glucosa de forma más lenta que el oligosacárido nuclear trimanósico, lo que significa que existe un sustituyente en este núcleo de trimanosa con un tamaño de un monosacárido. A partir del estudio de cartografiado de los N-glucanos de glucoproteínas séricas totales, esto sólo puede ser una GlcNAc denominada bisecante. El hecho de que este sustituyente sea resistente a la digestión en estas condiciones con β -N-acetilhexosaminidasa de *Canavalia ensiformis* no es esperado, ya que se sabe que los restos de GlcNAc bisecantes son particularmente resistentes a la eliminación enzimática (confirmado por la resistencia de este resto

sobre un glucano de referencia al mismo tratamiento con exoglucosidasas como se usa aquí, véase Fig. 4, panel de referencia bajo la tercera columna de secuenciación). La digestión con fucosidasa induce un desplazamiento de 1,2 unidades de glucosa, que señala la presencia de un resto de fucosa enlazado α -1,6 al núcleo. La digestión con β -1,4-galactosidasa suplementaria desplaza el pico otras 2 unidades de glucosa, lo que indica la presencia de dos restos de β -1,4-galactosa. De este modo, se concluye que el Pico 7 representa la estructura de glucano α -1,6-fucosilada al núcleo, bi- β -1,4-galactosilada, biantenaria bisecada. Este resultado se corrobora mediante la coelución de todos los productos de la digestión del Pico 7 con los productos de la digestión correspondiente de un glucano de referencia con esta estructura (panel inferior de la columna de secuenciación derecha; el panel se ensambló a partir de los electroferogramas de diferentes líneas, que contienen cada una los productos de digestión de una matriz de exoglucosidasa específica sobre el glucano de referencia con estructura 7). Este sustituyente de GlcNAc bisecante es el producto de la actividad de N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII) sobre la estructura representada por el Pico 6, la variante α -1,6-fucosilada nuclear del Pico 3.

Estructura de glucano que corresponde al pico 8 en la figura 1

El glucano que corresponde al pico 8 es alrededor de 2 unidades de monosacárido más largo que el glucano 3, no es digerible por fucosidasa renal bovina, y comigra con un glucano de referencia completamente β -1,4-galactosilado triantenario. Además, β -1,4-galactosidasa elimina 3 restos de galactosa del glucano, después de lo cual el glucano es 1 unidad de monosacárido más largo que el remanente de glucano 3, de acuerdo con el resto de GlcNAc extra que se espera para un glucano triantenario cuando se compara con una estructura biantenaria. En conclusión, el pico 8 representa una estructura de glucano tri- β -1,4-galactosilada, triantenaria 2,4-ramificada.

Estructura de glucano que corresponde al pico 9 en la figura 1

Este glucano es una unidad de glucosa más largo que el glucano no fucosilado triantenario del pico 8, y es sensible a fucosidasa tanto de riñón bovino como de harina de almendras, después de cuyas digestiones el glucano se convierte en el pico 8. De este modo, el resto de glucano presente en este glucano está enlazado α -1,3/4. Se concluye que el glucano del pico 9 es un derivado de glucano 8 fucosilado en la ramificación. La posición exacta del resto de fucosa de la ramificación no se puede determinar usando digestiones con exoglucosidasas.

Glucanos que corresponden a otros picos en la figura 1

El Pico 4 también está aumentado en el grupo de cirrosis, aunque no lo suficientemente para que el intervalo de intercuartil interior no solape con aquel del grupo de control. Su estructura completa es difícil de elucidar sin ambigüedad usando sólo exoglucosidasas, ya que su posición en el perfil digerido con sialidasa solapa con aquella de un glucano biantenario monogalactosilado fucosilado nuclear. Este glucano monogalactosilado es responsable de la mayoría de la intensidad del Pico 4 en el perfil digerido con sialidasa de suero normal. El hecho de que no es esta estructura que está presente en mayores cantidades en los sueros de pacientes cirróticos se sugiere por la siguiente observación: con la digestión con β -1,4-galactosidasa suplementaria, aparece un pico en la misma posición como se describe anteriormente con la digestión del Pico 2 con fucosidasa. Esto indica que debe estar presente una variante galactosilada del Pico 2 en los perfiles tratados con sialidasa enfermos, que es uno o dos restos de galactosa más grande. El único pico diferencialmente regulado que satisface estos requisitos y no se ha identificado hasta ahora es el Pico 4. La distancia entre el Pico 4 y su producto de β -1,4-galactosidasa es exactamente la misma que entre el glucano biantenario, bigalactosilado, y su producto de β -1,4-galactosidasa, lo que es una prueba importante para la presencia de 2 restos de galactosa enlazados β -1,4 en el Pico 4. De este modo, se asignó provisionalmente al menos parte de la mayor intensidad del pico del Pico 4 en cirrosis al glucano bisecado, bigalactosilado (sin fucosilación).

Será necesaria la espectrometría de masas para identificar positivamente los otros picos, muchos de los cuales son muy probablemente variantes monogalactosiladas de las estructuras descritas anteriormente.

Análisis de la α -1,6-fucosilación del núcleo

Se ha dado a conocer en carcinoma hepatocelular una mayor expresión de la α -1,6-fucosiltransferasa (Noda et al., 1998). Puesto que varios de los picos aumentados (1, 2 y 7) y el Pico 6 no diferencialmente regulado identificado en el párrafo anterior poseen un resto de fucosa enlazado α -1,6 en la GlcNAc próxima del núcleo de N-glucano, fue interesante investigar las características de una variable compuesta de estas cuatro alturas de pico. Por lo tanto, se añadieron las alturas de los picos de estos 4 picos y se realizó un ANOVA de una vía sobre los mismos grupos como se describen anteriormente para las otras variables, seguido de las mismas pruebas de comparación múltiple a la tasa de error por familia de comparaciones de 0,0001. Los resultados se presentan en la Fig. 5. La media del grupo con cirrosis fue significativamente diferente de la media de todos los otros grupos. Cuando el grupo de cirrosis se dividió en casos con y sin HCC, no se pudo detectar ninguna diferencia significativa en el grado de fucosilación del núcleo (prueba de la t, $P > 0,1$).

Desarrollo de un protocolo de desglucosilación y marcaje de alto rendimiento clínicamente útil que usa sólo un termociclador de PCR

Los protocolos disponibles de desglucosilación y marcaje todavía necesitan relativamente gran cantidad de mano de obra y de suero para obtener glucanos marcados desialilados listos para el análisis, tardan alrededor de dos días y medio, de manera que el análisis completo se puede llevar a cabo en tres días laborales estándar. En un entorno de investigación básico, los protocolos son enormemente satisfactorios, pero serían más engorrosos en un laboratorio de investigación clínica debido a que algunos elementos del equipo no son de uso general (placa y centrifugadoras de vacío). Incluso más importantemente, el protocolo implica varias transferencias de tubo a tubo y procedimientos manuales que son difíciles de validar, ya que el rastreo de muestras se hace relativamente complicado. También, el trabajo implicado y el tiempo bastante prolongado desde la muestra hasta los resultados no son favorables para la implementación fácil en el laboratorio clínico. Por lo tanto, se decidió repensar radicalmente el procedimiento de preparación de muestras, desde un punto de vista verdaderamente aplicado. Puesto que la concentración de glucoproteína sérica es muy elevada (casi todas las proteínas excepto la albúmina están glucosiladas, lo que significa alrededor de 35 g de glucoproteína por litro), una muestra de 5 μ l contiene alrededor de 175 μ g de glucoproteína. El cálculo posterior con un MW promedio estimado para las glucoproteínas séricas de 50 kDa y los tres sitios de N-glucosilación ocupados por molécula, se obtiene una estimación aproximada de 10 nmoles de N-glucano en esta muestra de suero de 5 μ l. Sabiendo que un pico de 15 fmoles se detecta fácilmente en DSA-FACE, y que, para tener un perfil relativamente completo, tendríamos que ser capaces de detectar picos que representan alrededor de 0,5% del conjunto de glucanos totales, es deseable alrededor de 5 pmoles de glucano marcado en la etapa de análisis del protocolo. Esto significa que hay un margen amplio de 3000 veces entre la cantidad de N-glucanos que teníamos disponible y la cantidad que realmente se necesita para el análisis. Este margen amplio se puede sacrificar para hacer que algunas etapas en el protocolo de preparación de las muestras sean menos eficientes, pero más fáciles de aplicar. Buscando un aparato asequible y familiar que esté diseñado para manipular muestras de fluido de pequeños volúmenes con evaporación mínima, se encontró que los termocicladores con tapa calentada usados para PCR parecen ser adecuados para esto. Después, mediante la consideración cuidadosa de los sistemas de tampón subsiguientes usados, se desarrolló un procedimiento que sólo implica adición/eliminación de fluido y dilución, a partir de suero hasta N-glucanos marcados listos para el análisis. Protocolo para determinar el marcaje de N-glucano proteico sérico a base de una máquina de PCR:

1) Añádanse 5 microlitros de suero a un tubo de PCR (o a un tubo de una placa de PCR de 96 pocillos) y añádase 1 microlitro de un tampón 20 mM de NH_4Ac que contiene 10% de SDS, pH = 7. Mézclase y ciérrese el tubo. Colóquese en un termociclador con una tapa calentada, y caliéntese a 96 grados durante 5 min. Enfríese el termociclador (esta etapa desnaturaliza las glucoproteínas para incrementar la accesibilidad para PNGasa F).

2) Añádanse 1 microlitro de una disolución al 10% de NP-40 para neutralizar el efecto desnaturalizante de SDS sobre PNGasa F (procedimiento estándar para la digestión de PNGasa F). Añádanse 2 microlitros de disolución de PNGasa F (1000 unidades Biolabs). Ciérrese el tubo y caliéntese en el termociclador a 37 grados durante 3 h.

3) Transfírase 1 microlitro de la disolución a otro tubo de PCR (o placa de PCR de 96 pocillos), y manténgase esta muestra durante la desialilación (etapa 4) del resto. Esta muestra dará el perfil de los glucanos sialilados, si se requiere.

4) Añádanse 8 microlitros de tampón de NaAc 50 mM pH = 5, y mézclase. (Esta cantidad de tampón se calculó para tener en cuenta la capacidad tamponante basada en bicarbonato del suero, y es suficiente para compensar variaciones de 2 veces en esta capacidad tamponante, lo que es mucho más que lo observado clínicamente). Añádanse 2 μ U (2 microlitros) de sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens*. Ciérrese el tubo y caliéntese en el termociclador a 37°C durante 3 h.

5) Tómese 1 microlitro y transfírase a un nuevo tubo (o placa) de PCR. Como alternativa (pero menos exactamente debido a efectos de evaporación mínima), elimínense 19 microlitros del tubo y procésese el 1 μ l restante. También, tómense los tubos de la etapa 3 (glucanos sialilados) y procésense ambas muestras de forma similar más allá.

6) En el termociclador, colóquense los tubos abiertos y la tapa del ciclador abierta, y caliéntese hasta 65 grados. Esto evapora las muestras, lo que está terminado en menos de 5 minutos debido a los volúmenes muy pequeños (1 μ l).

7) Prepárese la disolución de marcaje que contiene 10 mM de APTS en ácido cítrico 0,6 M y cianoborohidruro de sodio 0,5 M en 50% de DMSO. Añádanse 1,5 microlitros de esta disolución de marcaje a la parte inferior de los tubos de PCR ahora secos. Ciérrense los tubos muy bien y con la tapa calentada puesta, caliéntense a 90 grados durante 1 h (esta es la química de marcaje de cinética rápida para glucanos desialilados. Para los glucanos sialilados, la disolución de marcaje es la misma pero la temperatura debería mantenerse a 37 grados, y la reacción se debería llevar a cabo toda la noche para evitar desialilación).

8) Añádanse 150 microlitros de agua a cada tubo para detener la reacción, y dilúyase el marcador hasta alrededor de 100 pmoles/ μ l. La disolución resultante se puede usar directamente para cargarla en los secuenciadores de ADN (tras la adición de formamida y el patrón interno). En experimentos previos, se

determinó que 100 pmoles de marcador libre representan la cantidad máxima tolerable que se puede cargar en una línea de gel de secuenciación sin sobrecargar en gran medida la capacidad de separación del gel.

Globalmente, este protocolo conduce a la presencia de 1/3000 de la cantidad original de N-glucanos en 1 µl de la preparación de glucano marcado.

- 5 Se analizaron cuatro muestras de suero de donantes sanos como se describe anteriormente. La intensidad de las señales y la calidad de los datos son muy satisfactorios, probando el principio de que la preparación de muestras de N-glucano séricas se puede lograr usando solamente un termociclador relativamente barato, con muy pocas transferencias de tubos. El potencial para la (semi)automatización, análogo a un montaje de PCR a gran escala, será claro para el lector. La implementación de este protocolo permite completar análisis séricos para cirrosis con un tiempo de respuesta de 24 h (o menos si se pueden usar analizadores más rápidos basados en matrices capilares).
- 10 Estamos convencidos de que esta mejora en el procedimiento de la preparación de muestras lleva al ensayo de diagnóstico para cirrosis hepática mucho más cerca al uso real en química clínica rutinaria.

Validación del diagnóstico de cirrosis hepática en un grupo de pacientes independiente

- 15 Para validar los valores de corte para la detección de cirrosis obtenidos en el estudio anterior, se clasificó un grupo independiente de pacientes con hepatitis crónica con (n = 10) o sin (n = 13) cirrosis, usando estos valores de corte. Como se puede observar en la Fig. 3, sección 8, se obtuvo una eficiencia de clasificación de 91% para las tres combinaciones de parámetros. De este modo, aunque el tamaño de este segundo grupo de sujetos es más bien pequeño, se concluye que el modelo de clasificación derivado de nuestro grupo de optimización no está sobreajustado, y que se conserva la eficiencia de clasificación >90%.

- 20 Comparación entre parámetros de química clínica clásicos y elaboración de glucoperfiles para la detección de cirrosis hepática

- En la presente invención, se evaluó con el análisis de la Curva Operativa del Receptor (ROC) la eficiencia de los parámetros derivados para discriminar entre HCC y/o cirrosis y hepatitis B y C crónica no cirrótica. Los resultados del análisis de ROC indican eficiencias de la clasificación de alrededor de 95%. El análisis de ROC en el mismo grupo de muestras de parámetros de química clínica solamente clásicos relacionados con la disfunción hepática (Fig. 3, sección 7) produce valores de: $76 \pm 6\%$ para bilirrubina total y $80 \pm 5\%$ para seroalbúmina, mientras que AST, ALT, GGT y CRP produjeron valores de AUC no significativos: $P > 0,05$. Además, para el subgrupo de 14 casos de cirrosis "compensados" (casos de cirrosis con niveles normales de bilirrubina y albúmina) en nuestro grupo de estudio de cirrosis con concentraciones séricas de bilirrubina total y seroalbúmina dentro del intervalo de referencia (bilirrubina total $<1,3$ mg/dl y seroalbúmina $>3,5$ g/dl), se evaluó cuántos de éstos cayeron dentro de la región positiva para cada uno de los tres marcadores derivados a partir del perfil de glucanos de proteínas séricas totales (cortes determinados mediante análisis de ROC de los marcadores en la distinción entre hepatitis crónica sin cirrosis y el grupo de cirrosis total (tanto compensado como descompensado para albúmina y bilirrubina). Para log(Pico 1/Pico 8), esto fue 12/14 (85,7%); para log(Pico 2/Pico 8): 11/14 (78,5%); para log(Pico 7/Pico 8): 11/14 (78,5%). Así,
- 25 en promedio, estos marcadores pueden detectar alrededor de 80% de casos de cirrosis que se perdieron mediante la medición tanto de seroalbúmina como de bilirrubina total sérica. Esto demuestra claramente que los glucomarcadores de esta invención se comportan mejor que estos marcadores estándar de química clínica usados en la evaluación rutinaria de pacientes hepáticos crónicos. De este modo, nuestros marcadores de elaboración de glucoperfiles detectan cirrosis hepática en una etapa más temprana de la enfermedad.

- 40 Diagnóstico de carcinoma hepatocelular (HCC) en pacientes que sufren cirrosis hepática

- Hasta ahora, todos los casos con HCC se tomaron junto con el grupo de cirrosis, ya que todos menos uno de ellos tuvieron cirrosis subyacente. Sin embargo, es sabido en la técnica que el diagnóstico actual de HCC en un fondo de cirrosis es difícil, y hay lugar significativo para la mejora. Por lo tanto, dentro del grupo de HCC y/o cirrosis descrito anteriormente, se cribaron alteraciones en el patrón de N-glucoma del suero que podrían señalar los casos de HCC.
- 45 El análisis de ROC de todos los 14 picos detectados (véase la figura 1) dentro del grupo de HCC y/o cirrosis indicó que la abundancia de los Picos 5, 7 y 14 tuvo poder diferenciador significativo (ROC; $P < 0,05$). Se encontró que un análisis de dos parámetros con los Picos 7 y 14 tuvo la mejor eficiencia de la clasificación (Fig. 6). Esto se evaluó con un modelo de regresión logística binaria de dos parámetros, cuya recta de regresión se muestra en la Fig. 6 (un caso que cae en esta recta tendría igual probabilidad para caer en cualquiera de las dos categorías diferenciadas). La función logística de este modelo fue: $Z = -0,649[\% \text{ de pico } 7] + 5,722[\% \text{ de pico } 14] + 2,967$. La clasificación basada en este modelo detectó casos de HCC con una sensibilidad de 71% y una especificidad de 91% (eficiencia global de la clasificación: 82%). La estructura del Pico 14 no se pudo asignar debido a su baja abundancia. Está en desarrollo la caracterización espectrométrica de masas adicional. Se teoriza que este glucano es un producto de N-acetilglucosaminiltransferasa V, puesto que corre en una posición compatible con un glucano tetraantenario, y
- 50 puesto que la mayor actividad de GnT-V es una marca distintiva de muchos tumores.

Materiales y métodos

Diseño del estudio

El estudio clínico se basó en muestras de conveniencia y fue aprobado por el comité ético local del Hospital Universitario de Gante. Se incluyó una muestra de 73 pacientes (que presentan síntomas de trastornos hepáticos crónicos en el Departamento de Gastroenterología del Hospital Universitario de Gante durante un período de un año (12/2000-12/2001). El diagnóstico de hepatitis B (n = 8) y C (n = 39) crónica se realizó mediante una elevación en el nivel de ALT (por encima del límite superior del normal) en al menos dos muestras de sangre en un período de tiempo de 6 meses en presencia de hepBsAg y ADN de HBV detectables o anticuerpos anti-HCV detectables y ARN de HCV. En los pacientes sin contraindicaciones para una biopsia hepática (trastornos de coagulación, presencia de ascitis, etc.), esto se confirmó mediante biopsia hepática percutánea. El diagnóstico de cirrosis (n = 37) se realizó sobre bases clínica (presencia de ascitis, varices, encefalopatía) y bioquímica (nivel de albúmina y bilirrubina, INR) en los pacientes con una cirrosis descompensada. En los otros pacientes (cuando estaban ausentes las contraindicaciones para una biopsia hepática), el diagnóstico se realizó mediante una biopsia hepática percutánea. La etiología subyacente de la cirrosis fue abuso crónico del alcohol (n = 15) y hepatitis crónica (n = 20). En un caso cada vez, la etiología de la cirrosis fue hepatitis autoinmunitaria o desconocida (cirrosis criptogénica). En los pacientes con cirrosis, el diagnóstico de un carcinoma hepatocelular (HCC, n = 16) se realizó mediante la presencia de una elevación en alfa-fetoproteína o la presencia de una lesión hepática focal en ultrasonido, CT o MRI con las características de un HCC; en algunos de los pacientes, estaban presentes ambos. En ausencia de cirrosis y en pacientes en los que había dudas sobre el diagnóstico, se realizó una biopsia con aguja de corte verdadera de la lesión focal. El centro clínico en el que se llevó a cabo el diagnóstico es el centro de referencia para HCC para Flandes, una región de baja incidencia para HCC de alrededor de 6 millones de habitantes, principalmente caucásicos pero con comunidades italianas, turcas y marroquíes importantes (alrededor de 15% de la población). También, se incluyó una muestra de 58 pacientes con abuso crónico sospechado de alcohol, y se admitieron por esta razón en el Departamento de Psiquiatría, Hospital Académico Stuivenberg en Amberes (una ciudad importante en la región de Flandes). El consumo importante reciente de alcohol se evaluó mediante la medida de Transferrina Deficiente en Hidratos de Carbono (%CDT-TIA™, Axis Biochemicals, Oslo, Noruega), y el grupo de muestra se dividió en dos subpoblaciones, siendo una positiva en la prueba de CDT (más de 6% CDT, n = 25) y el otro, negativo (n = 33).

Se incluyeron veinticuatro muestras de pacientes con artritis reumatoide (n = 8), espondilitis anquilosante (n = 8) o enfermedad de Crohn (n = 8), diagnosticados con estos trastornos en el Departamento de Reumatología del Hospital Universitario de Gante.

Para establecer valores de referencia para los glucanos medidos, se estudió un grupo de control de 60 donantes de sangre (de los cuales 26 eran mujeres, edad promedio de las mujeres: 60 años, de los hombres: 59 años), cuya situación sanitaria cumplía con las normas de la Cruz Roja. Estas muestras se obtuvieron del Centro de Transfusión de la Cruz Roja en Gante, Bélgica.

Las etiologías, datos de edad y género se resumen en la Tabla 1.

Glucómica de diagnóstico de suero

Procedimiento de preparación de las muestras: Se incubaron 5 µl de los sueros (215 en total) con 50 µl de tampón RCM (8M de urea, 360 mM de Tris, pH 8,6, 3,2 mM de EDTA) a 50°C durante 1 h para desnaturalizar las proteínas del suero. Subsiguientemente, estas mezclas se cargaron en los pocillos de una placa Multiscreen-IP (Millipore, Bedford, CA, USA), preparada como se describe previamente Papac et al., 1998). Las etapas de reducción, yodoalquilación y desglucosilación se llevaron a cabo según los procedimientos dados a conocer (*ibid.*).

Reacción de derivatización con APTS y eliminación: La derivatización de N-glucanos con ácido 8-amino-1,3,6-pirentrisulfónico y la eliminación del exceso de marcador libre fue como se describió recientemente (Callewaert et al., 2001). De forma breve, la mezcla de desglucosilación se evaporó hasta sequedad y se añadió 1 µl de una mezcla 1:1 de 20 mM de APTS (Molecular Probes, Eugene, CA, USA) en 1,2 M de ácido cítrico y 1 M de NaCNBH₃ en DMSO. La derivatización se dejó durante 18 h a 37°C. Después de esto, la reacción se paralizó mediante la adición de 10 µl de agua DI. El exceso de APTS sin reaccionar se eliminó usando un lecho de Sephadex G10 empaquetado en una placa de filtro Multiscreen (Millipore, Bedford, CA, USA). Después de la aplicación de las muestras, los lechos de resina se eluyeron tres veces mediante adición de 10 µl de agua y una centrifugación durante 10 segundos a 750 x g en una centrifugadora de mesa equipada para alojar placas de 96 pocillos (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El eluato se evaporó hasta sequedad. Tras la evaporación, los glucanos derivatizados se reconstituyeron en 5 µl de agua.

Digestión con exoglucosidasa: Se transfirieron lotes de 1 µl de los N-glucanos derivatizados eliminados a tubos de PCR de 250 µl o a placas de microtitulación de pocillos ahusados para el tratamiento con sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens* (2 U/ml, Glyko, Novato, CA), toda la noche a 37°C en 10 µl de acetato de sodio 20 mM pH 5,0. Una unidad de la sialidasa es la cantidad de enzima que hidroliza 1 µmol de N-acetilneuraminosil-D-lactosa por minuto a 25°C y pH 5,0. Tras terminar la digestión, las muestras se evaporaron hasta sequedad y se reconstituyeron en 1 µl de agua.

Análisis mediante FACE adaptada a secuenciador de ADN: A cada muestra, se añadieron 0,5 µl de la mezcla estándar Genescan™ 500 marcada con rodamina (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) y 1 µl de formamida

desionizada, para referencia interna y para facilitar la carga de las muestras, respectivamente.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en un secuenciador de ADN Applied Biosystems 377A (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA), adaptado para el enfriamiento como se describió (Callewaert et al., 2001). El gel de 36 cm contenía 10% de una mezcla 19:1 de acrilamida:bisacrilamida (89 mM de Tris, 89 mM de borato, 2,2 mM de EDTA). La pasada previa se realizó a 3000 V durante 1 h. El voltaje de la electroforesis durante la separación fue 3500 V, y los datos se recogieron durante 3 h (separación de glucanos hasta 15 unidades de glucosa en tamaño).

Procesamiento de los datos: El análisis de los datos se llevó a cabo usando el software Genescan 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se eligió usar las alturas de 14 picos bien definidos para obtener una descripción numérica de los perfiles. Esto es un subconjunto del número total de picos observados, debido a que sólo esos picos que se incluyeron fueron cuantificables en todas las muestras. Se eligió la altura de los picos en lugar de la superficie de los picos, debido a que esta última fue mucho más difícil de cuantificar de una manera rutinaria debido al solapamiento de los picos algunas veces amplio. Estos datos se ensamblaron en MS Excell y se procesaron posteriormente con el paquete estadístico SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La suposición de normalidad de las variables a lo largo de las poblaciones estudiadas se evaluó usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov al nivel de significancia de 0,05. El análisis paramétrico de varianza de una vía fue seguido de las pruebas de Diferencia Honestamente Significativa de Tukey y la comparación múltiple de Scheffé, a un nivel de significancia de 0,0001. Tanto el análisis de la Curva Operativa del Receptor (ROC) como la regresión logística binaria se usaron para evaluar la eficiencia de la clasificación de las variables de diagnóstico potenciales.

Para la preparación de las figuras, todas las líneas en el mismo gel se alinearon con la línea que contiene el patrón de malto-oligosacárido marcado con APTS, usando las posiciones de los picos del patrón de rodamina-oligonucleótido interno. Por claridad, los picos que corresponden a los patrones internos marcados con rodamina se han omitido tras el procedimiento de alineamiento.

Secuenciación de la matriz de exoglucosidasas del conjunto de N-glucanos

Lotes de 1 µl de N-glucanos marcados con APTS, preparados como se describe en el párrafo 8.2.2, se sometieron a digestión con diferentes mezclas de exoglucosidasas altamente purificadas. La identidad de las mezclas se indica en las Figuras, y fueron combinaciones de lo siguiente: sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens* (2 U/ml, Glyko, Novato, CA); β-1,4-galactosidasa de *Diplococcus pneumoniae* (1 U/ml, Boehringer, Mannheim, Alemania); β-N-acetilhexosaminidasa de *Canavalia ensiformis* (30 U/ml, Glyko, Novato, CA, USA), y α-fucosidasa de epidídimo bovino (0,5 U/ml, Glyko, Novato, CA, USA). Las definiciones de unidades son como se especifican por los proveedores de las enzimas. Tras terminar las digestiones, las muestras se evaporaron hasta sequedad, se reconstituyeron en 1 µl de agua desionizada, y se analizaron en un ABI377 como se describe anteriormente.

Tablas

Tabla 1

	Detalles	N	Número de grupo	Edad (años)	Sexo (% de varones)
Control sano		60	0	59,5+/-12,1	57
HCC + cirrosis	Alcoholismo	7	1	60,0+/-9,0	70
	Hepatitis viral crónica	9			
Cirrosis	Alcoholismo	8			
	Hepatitis viral crónica	11			
	Hepatitis autoinmunitaria	1			
	Criptogénica	1			
Hepatitis viral crónica	HBV	5	2	44,6+/-17,3	60
	HCV	22			
Metástasis hepática no HCC		8	3	71,3+/-6,5	38
Alcoholismo crónico	CDT+	25	4	N.A.	N.A.
	CDT-	33	5		

Enfermedades autoinmunitarias	Enfermedad de Crohn	8	6	44,4+/-13,5	46
	Espondilitis anquilosante	8			
	Artritis reumatoide	8			

Tabla 2:

Análisis de correlación de Pearson (n=214)					
	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 7	Pico 8
Pico 1	1	0,845	-0,802	0,418	-0,596
Pico 2		1	-0,81	0,551	-0,609
Pico 3			1	-0,759	0,533
Pico 7				1	-0,471
Pico 8					1
Todas las correlaciones son significativas al nivel de 0,00001 (2 colas)					

Tabla 3:

Análisis de varianza de una vía a lo largo de los 7 grupos de muestra						
ANOVA						
		Suma de cuadrados	df	Cuadrado de la media	F	Sig.
Log (Pico 1/Pico 8)	Entre grupos	21,47	6	3,5787	49,3741	2,267E-37
	En los grupos	15	207	0,0725		
	Total	36,48	213			
Log (Pico 2/Pico 8)	Entre grupos	44,39	6	7,399	58,0935	9,212E-42
	En los grupos	26,36	207	0,1274		
	Total	70,76	213			
Log (Pico 7/Pico 8)	Entre grupos	13,85	6	2,3084	46,7134	6,091E-36
	En los grupos	10,23	207	0,0494		
	Total	24,08	213			
Resultados de la prueba de comparación múltiple						
Log (Pico 1/Pico 8)						
				N	Subconjunto para alfa =0,001	
Grupos de muestra					1	2
HSD de Tukey	Controles			60	-0,0918	
	Alcoholismo CDT-			33	-0,0184	
	Alcoholismo CDT+			25	-0,0045	

	Metástasis hepáticas no HCC	8	0,053		
	Hepatitis crónica	27	0,0631		
	Enfermedades autoinmunitarias	24	0,1381		
	cirrosis	37		0,8128	
	Sig.		0,0688	1	
Comparación de Scheffé	Controles	60	-0,0918		
	Alcoholismo CDT-	33	-0,0184		
	Alcoholismo CDT+	25	-0,0045		
	Metástasis hepáticas no HCC	8	0,053		
	Hepatitis crónica	27	0,0631		
	Enfermedades autoinmunitarias	24	0,1381		
	cirrosis	37		0,8128	
	Sig.		0,2413	1	
Se muestran las medias para grupos en subconjuntos homogéneos					
Log (Pico 2/Pico 8)					
		N	Subconjunto para alfa = 0,001		
	Grupos de muestra		1	2	3
HSD de Tukey	Controles	60	-1,0926		
	Alcoholismo CDT-	33	-0,9803	-0,9803	
	Alcoholismo CDT+	25	-0,9537	-0,9537	
	Enfermedades autoinmunitarias	24	-0,8616	-0,8616	
	Metástasis hepáticas no HCC	8	-0,7223	-0,7223	
	Hepatitis crónica	27		-0,5947	
	cirrosis	37		0,8128	0,204
	Sig.		0,0103	0,0062	1
Comparación de Scheffé	Controles	60	-1,0926		
	Alcoholismo CDT-	33	-0,9803		
	Alcoholismo CDT+	25	-0,9537		
	Enfermedades autoinmunitarias	24	-0,8616		
	Metástasis hepáticas no HCC	8	-0,7223		
	Hepatitis crónica	27	-0,5947		
	cirrosis	37		0,204	
Log (Pico 2/Pico 8)					
		N	Subconjunto para alfa = 0,001		
	Grupos de muestra		1	2	3

	Sig.		0,0022	1	
Se muestran las medias para grupos en subconjuntos homogéneos					
Log (Pico 7/Pico 8)					
		N	Subconjunto para alfa = 0,001		
	Grupos de muestra		1	2	
HSD de Tukey	Enfermedades autoinmunitarias	24	-0,1435		
	Controles	60	-0,1406		
	Metástasis hepáticas no HCC	8	-0,0848		
	Hepatitis crónica	27	-0,0212		
	Alcoholismo CDT-	33	-0,0076		
	Alcoholismo CDT+	25	0,0258		
	cirrosis	37		0,5798	
	Sig.		0,1491	1	
Comparación de Scheffé	Enfermedades autoinmunitarias	24	-0,1435		
	Controles	60	-0,1406		
	Metástasis hepáticas no HCC	8	-0,0848		
	Hepatitis crónica	27	-0,0212		
	Alcoholismo CDT-	33	-0,0076		
	Alcoholismo CDT+	25	0,0258		
	cirrosis	37		0,5798	
	Sig.		0,3845	1	
Se muestran las medias para grupos en subconjuntos homogéneos					

Referencias

- Adam, B. L., Vlahou, A., Semmes, O. J. y Wright, G. L., Jr. (2001) Proteomic approaches to biomarker discovery in prostate and bladder cancers, *Proteomics*, 1, 1264-1270.
- Anton, R. F. (2001) Carbohydrate-deficient transferrin for detection and monitoring of sustained heavy drinking. What have we learned? Where do we go from here?, *Alcohol*, 25, 185-188.
- Aoyagi, Y., Suzuki, Y., Igarashi, K., Saitoh, A., Oguro, M., Yokota, T., Mori, S., Suda, T., Isemura, M. y Asakura, H. (1993) Carbohydrate structures of human alpha-fetoprotein of patients with hepatocellular carcinoma: presence of fucosylated and non-fucosylated triantennary glycans, *Br J Cancer*, 67, 486-492.
- Ashwell, G. y Harford, J. (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver, *Annu Rev Biochem*, 51, 531-554.
- Ashwell, G. y Steer, C. J. (1981) Hepatic recognition and catabolism of serum glycoproteins, *Jama*, 246, 2358-2364.
- Burgess, J. B., Baenziger, J. U. y Brown, W. R. (1992) Abnormal surface distribution of the human asialoglycoprotein receptor in cirrhosis, *Hepatology*, 15, 702-706.
- Byrn, R., Thomas, P., Medrek, P., Spigelman, Z. y Zamcheck, N. (1984) Modified radioassay for measuring asialoglycoprotein in serum, *Clin Chem*, 30, 1692-1696.
- Callewaert, N., Geysens, S., Molemans, F. y Contreras, R. (2001) Ultrasensitive profiling and sequencing of N-linked oligosaccharides using standard DNA-sequencing equipment, *Glycobiology*, 11, 275-281.

9. Dell, A. y Morris, H. R. (2001) Glycoprotein structure determination by mass spectrometry, *Science*, 291, 2351-2356.
10. Eto, T. y Takahashi, H. (1999) Enhanced inhibition of hepatitis B virus production by asialoglycoprotein receptor-directed interferon, *Nat Med*, 5, 577-581.
- 5 11. Fracanzani, A. L., Burdick, L., Borzio, M., Roncalli, M., Bonelli, N., Borzio, F., Maraschi, A., Fiorelli, G. y Fargion, S. (2001) Contrast-enhanced Doppler ultrasonography in the diagnosis of hepatocellular carcinoma and premalignant lesions in patients with cirrhosis, *Hepatology*, 34, 1109-1112.
12. Fung, E. T., Wright, G. L., Jr. y Dalmasso, E. A. (2000) Proteomic strategies for biomarker identification: progress and challenges, *Curr Opin Mol Ther*, 2, 643-650.
- 10 13. Granovsky, M., Fata, J., Pawling, J., Muller, W. J., Khokha, R. y Dennis, J. W. (2000) Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice, *Nature Medicine*, 6, 306-312.
14. Guile, G. R., Rudd, P. M., Wing, D. R., Prime, S. B. y Dwek, R. A. (1996) A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles, *Anal Biochem*, 240, 210-226.
- 15 15. Ha-Kawa, S. K., Tanaka, Y., Hasebe, S., Kuniyasu, Y., Koizumi, K., Ishii, Y., Yamamoto, K., Kashiwagi, T., Ito, A., Kudo, M., Ikekubo, K., Tsuda, T. y Murase, K. (1997) Compartmental analysis of asialoglycoprotein receptor scintigraphy for quantitative measurement of liver function: a multicentre study, *Eur J Nucl Med*, 24, 130-137.
16. Hirabayashi, J., Arata, Y. y Kasai, K. (2001) Glycome project: concept, strategy and preliminary application to *Caenorhabditis elegans*, *Proteomics*, 1, 295-303.
- 20 17. Ikeda, Y. y Taniguchi, N. (2001) Enzymatic properties and biological functions of beta 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 13, 167-176.
18. Ise, H., Sugihara, N., Negishi, N., Nikaido, T. y Akaike, T. (2001) Low asialoglycoprotein receptor expression as markers for highly proliferative potential hepatocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, 285, 172-182.
- 25 19. Ishibashi, K., Nishikawa, A., Hayashi, N., Kasahara, A., Sato, N., Fujii, S., Kamada, T. y Taniguchi, N. (1989) N-Acetylglucosaminyltransferase-III in Human-Serum, and Liver and Hepatoma Tissues - Increased Activity in Liver-Cirrhosis and Hepatoma Patients, *Clinica Chimica Acta*, 185, 325-332.
20. Johnson, P. J., Poon, T. C., Hjelm, N. M., Ho, C. S., Blake, C. y Ho, S. K. (2000) Structures of disease-specific serum alpha-fetoprotein isoforms, *Br J Cancer*, 83, 1330-1337.
- 30 21. Johnston-Wilson, N. L., Bouton, C. M., Pevsner, J., Breen, J. J., Torrey, E. F. y Yolken, R. H. (2001) Emerging technologies for large-scale screening of human tissues and fluids in the study of severe psychiatric disease, *Int J Neuropsychopharmacol*, 4, 83-92.
22. Kang, R., Ikeda, Y., Miyoshi, E., Wang, W., Li, W., Ihara, Y., Sheng, Y. y Taniguchi, N. (2000) Cell cycle-dependent regulation of N-acetylglucosaminyltransferase-III in a human colon cancer cell line, Colo201, *Arch Biochem Biophys*, 374, 52-58.
- 35 23. Kellner, R. (2000) Proteomics. Concepts and perspectives, *Fresenius J Anal Chem*, 366, 517-524.
24. Kitada, T., Miyoshi, E., Noda, K., Higashiyama, S., Ihara, H., Matsuura, N., Hayashi, N., Kawata, S., Matsuzawa, Y. y Taniguchi, N. (2001) The addition of bisecting N-acetylglucosamine residues to E-cadherin down-regulates the tyrosine phosphorylation of beta-catenin, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 475-480.
25. Kobata, A. (2000) A journey to the world of glycobiology, *Glycoconj J*, 17, 443-464.
- 40 26. Kuper, H., Ye, W., Broome, U., Romelsjo, A., Mucci, L. A., Ekblom, A., Adami, H. O., Trichopoulos, D. y Nyren, O. (2001) The risk of liver and bile duct cancer in patients with chronic viral hepatitis, alcoholism, or cirrhosis, *Hepatology*, 34, 714-718.
27. Marshall, J. S., Green, A. M., Pensky, J., Williams, S., Zinn, A. y Carlson, D. M. (1974) Measurement of circulating desialylated glycoproteins and correlation with hepatocellular damage, *J Clin Invest*, 54, 555-562.
- 45 28. Martin, K., Talukder, R., Hay, F. C. y Axford, J. S. (2001) Characterization of changes in IgG associated oligosaccharide profiles in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis using fluorophore linked carbohydrate electrophoresis, *J Rheumatol*, 28, 1531-1536.
29. Matsumoto, K., Maeda, Y., Kato, S. y Yuki, H. (1994) Alteration of asparagine-linked glycosylation in serum transferrin of patients with hepatocellular carcinoma, *Clin Chim Acta*, 224, 1-8.

30. Miki, K., Kubota, K., Inoue, Y., Vera, D. R. y Makuuchi, M. (2001) Receptor measurements via Tc-GSA kinetic modeling are proportional to functional hepatocellular mass, *J Nucl Med*, 42, 733-737.
31. Miyoshi, E., Ihara, Y., Hayashi, N., Fusamoto, H., Kamada, T. y Taniguchi, N. (1995) Transfection of N-acetylglucosaminyltransferase III gene suppresses expression of hepatitis B virus in a human hepatoma cell line, HB611, *J Biol Chem*, 270, 28311-28315.
32. Miyoshi, E., Ihara, Y., Nishikawa, A., Saito, H., Uozumi, N., Hayashi, N., Fusamoto, H., Kamada, T. y Taniguchi, N. (1995) Gene expression of N-acetylglucosaminyltransferases III and V: a possible implication for liver regeneration, *Hepatology*, 22, 1847-1855.
33. Miyoshi, E., Nishikawa, A., Ihara, Y., Gu, J. G., Sugiyama, T., Hayashi, N., Fusamoto, H., Kamada, T. y Taniguchi, N. (1993) N-Acetylglucosaminyltransferase-III and N-Acetylglucosaminyltransferase-V Messenger-Rna Levels in Lec Rats During Hepatocarcinogenesis, *Cancer Research*, 53, 3899-3902.
34. Miyoshi, E., Nishikawa, A., Ihara, Y., Hayashi, N., Fusamoto, H., Kamada, T. y Taniguchi, N. (1994) Selective Suppression of N-Acetylglucosaminyltransferase-III Activity in a Human Hepatoblastoma Cell-Line Transfected with Hepatitis-B Virus, *Cancer Research*, 54, 1854-1858.
35. Miyoshi, E., Noda, K., Ko, J. H., Ekuni, A., Kitada, T., Uozumi, N., Ikeda, Y., Matsuura, N., Sasaki, Y., Hayashi, N., Hori, M. y Taniguchi, N. (1999) Overexpression of alpha 1-6 fucosyltransferase in hepatoma cells suppresses intrahepatic metastasis after splenic injection in athymic mice, *Cancer Research*, 59, 2237-2243.
36. Mori, S., Aoyagi, Y., Yanagi, M., Suzuki, Y. y Asakura, H. (1998) Serum N-acetylglucosaminyltransferase III activities in hepatocellular carcinoma, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 13, 610-619.
37. Nakagawa, H., Kawamura, Y., Kato, K., Shimada, I., Arata, Y. y Takahashi, N. (1995) Identification of neutral and sialyl N-linked oligosaccharide structures from human serum glycoproteins using three kinds of high-performance liquid chromatography, *Anal Biochem*, 226, 130-138.
38. Noda, K., Miyoshi, E., Uozumi, N., Yanagidani, S., Ikeda, Y., Gao, C., Suzuki, K., Yoshihara, H., Yoshikawa, K., Kawano, K., Hayashi, N., Hori, M., Taniguchi, N. y Yoshikawa, M. (1998) Gene expression of alpha1-6 fucosyltransferase in human hepatoma tissues: a possible implication for increased fucosylation of alpha-fetoprotein, *Hepatology*, 28, 944-952.
39. Noda, K., Miyoshi, E., Uozumi, N., Yanagidani, S., Ikeda, Y., Gao, C. X., Suzuki, K., Yoshihara, H., Yoshikawa, M., Kawano, K., Hayashi, N., Hori, M. y Taniguchi, N. (1998) Gene expression of alpha 1-6 fucosyltransferase in human hepatoma tissues: A possible implication for increased fucosylation of alpha-fetoprotein, *Hepatology*, 28, 944-952.
40. Opanasopit, P., Shirashi, K., Nishikawa, M., Yamashita, F., Takakura, Y. y Hashida, M. (2001) In vivo recognition of mannosylated proteins by hepatic mannose receptors and mannan-binding protein, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280, G879-889.
41. Pandey, A. y Mann, M. (2000) Proteomics to study genes and genomes, *Nature*, 405, 837-846.
42. Papac, D. I., Briggs, J. B., Chin, E. T. y Jones, A. J. (1998) A high-throughput microscale method to release N-linked oligosaccharides from glycoproteins for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis, *Glycobiology*, 8, 445-454.
43. Paweletz, C. P., Trock, B., Pennanen, M., Tsangaris, T., Magnant, C., Liotta, L. A. y Petricoin, E. F., 3rd (2001) Proteomic patterns of nipple aspirate fluids obtained by SELDI-TOF: potential for new biomarkers to aid in the diagnosis of breast cancer, *Dis Markers*, 17, 301-307.
44. Petricoin, E. F., Ardekani, A. M., Hitt, B. A., Levine, P. J., Fusaro, V. A., Steinberg, S. M., Mills, G. B., Simone, C., Fishman, D. A., Kohn, E. C. y Liotta, L. A. (2002) Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer, *Lancet*, 359, 572-577.
45. Roseman, S. (2001) Reflections on glycobiology, *J Biol Chem*, 276, 41527-41542.
46. Saitoh, A., Aoyagi, Y. y Asakura, H. (1993) Structural analysis on the sugar chains of human alpha 1-antitrypsin: presence of fucosylated biantennary glycan in hepatocellular carcinoma, *Arch Biochem Biophys*, 303, 281-287.
47. Salas-Solano, O., Schmalzing, D., Koutny, L., Buonocore, S., Adourian, A., Matsudaira, P. y Ehrlich, D. (2000) Optimization of high-performance DNA sequencing on short microfabricated electrophoretic devices, *Anal Chem*, 72, 3129-3137.

48. Sawamura, T., Nakada, H., Hazama, H., Shiozaki, Y., Sameshima, Y. y Tashiro, Y. (1984) Hyperasialoglycoproteinemia in patients with chronic liver diseases and/or liver cell carcinoma. Asialoglycoprotein receptor in cirrhosis and liver cell carcinoma, *Gastroenterology*, 87, 1217-1221.
- 5 49. Taniguchi, N., Ekuni, A., Ko, J. H., Miyoshi, E., Ikeda, Y., Ihara, Y., Nishikawa, A., Honke, K. y Takahashi, M. (2001) A glycomic approach to the identification and characterization of glycoprotein function in cells transfected with glycosyltransferase genes, *Proteomics*, 1, 239-247.
50. Taniguchi, N., Miyoshi, E., Ko, J. H., Ikeda, Y. y Ihara, Y. (1999) Implication of N-acetylglucosaminyltransferases III and V in cancer: gene regulation and signaling mechanism, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1456, 287-300.
- 10 51. Verma, M., Wright, G. L., Jr., Hanash, S. M., Gopal-Srivastava, R. and Srivastava, S. (2001) Proteomic approaches within the NCI early detection research network for the discovery and identification of cancer biomarkers, *Ann N Y Acad Sci*, 945, 103-115.
52. Wang, W., Li, W., Ikeda, Y., Miyagawa, J. I., Taniguchi, M., Miyoshi, E., Sheng, Y., Ekuni, A., Ko, J. H., Yamamoto, Y., Sugimoto, T., Yamashita, S., Matsuzawa, Y., Grabowski, G. A., Honke, K. y Taniguchi, N. (2001) Ectopic expression of alpha 1,6 fucosyltransferase in mice causes steatosis in the liver and kidney accompanied by a modification of lysosomal acid lipase, *Glycobiology*, 11, 165-174.
- 15 53. Wassler, M. J., Foote, C. I., Gelman, I. H. y Shur, B. D. (2001) Functional interaction between the SSeCKS scaffolding protein and the cytoplasmic domain of beta1,4-galactosyltransferase, *J Cell Sci*, 114, 2291-2300.
54. Wassler, M. J. y Shur, B. D. (2000) Clustering of cell surface (beta)1,4-galactosyltransferase I induces transient tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and loss of stress fibers, *J Cell Sci*, 113, 237-245.
- 20 55. Watson, M., Rudd, P. M., Bland, M., Dwek, R. A. y Axford, J. S. (1999) Sugar printing rheumatic diseases: a potential method for disease differentiation using immunoglobulin G oligosaccharides, *Arthritis Rheum*, 42, 1682-1690.
56. Wuyts, B., Delanghe, J. R., Kasvosve, I., Wauters, A., Neels, H. y Janssens, J. (2001) Determination of carbohydrate-deficient transferrin using capillary zone electrophoresis, *Clin Chem*, 47, 247-255.
- 25 57. Yamashita, K., Koide, N., Endo, T., Iwaki, Y. y Kobata, A. (1989) Altered glycosylation of serum transferrin of patients with hepatocellular carcinoma, *J Biol Chem*, 264, 2415-2423.
58. Yoshimura, M., Ihara, Y., Matsuzawa, Y. y Taniguchi, N. (1996) Aberrant glycosylation of E-cadherin enhances cell-cell binding to suppress metastasis, *J Biol Chem*, 271, 13811-13815.
- 30 59. Yoshimura, M., Nishikawa, A., Ihara, Y., Taniguchi, S. y Taniguchi, N. (1995) Suppression of Lung Metastasis of B16 Mouse Melanoma by N-Acetylglucosaminyltransferase-III Gene Transfection, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 8754-8758.
60. Zhang, S. W., Fu, X. Y., Cao, S. L., Shen, Z. H. y Gu, J. X. (1999) Down-regulation of beta1,4-galactosyltransferase gene expression by cell-cycle suppressor gene p16, *Biochim Biophys Acta*, 1444, 49-54.
- 35 61. Zhang, S. W., Lin, W. S., Ying, X. L., Zhu, D., Guo, M. Y. y Gu, J. X. (2000) Effect of suppression of TGF-beta1 expression on cell-cycle and gene expression of beta-1,4-galactosyltransferase 1 in human hepatocarcinoma cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 273, 833-838.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar cirrosis hepática en un mamífero, que comprende:

a) generar un perfil del conjunto de hidratos de carbono enlazados a asparagina o de dicho conjunto de hidratos de carbono enlazados a asparagina que se ha marcado; estando presentes en u obteniéndose dicho conjunto de hidratos de carbono enlazados a asparagina a partir del conjunto de (gluco)proteínas totales que están presentes en o se aíslan a partir de una muestra de suero o de plasma sanguíneo derivada de dicho mamífero, y

b) medir en el perfil de la etapa a) la cantidad de al menos un hidrato de carbono enlazado a asparagina o dicho hidrato de carbono enlazado a asparagina que se ha marcado, y

c) comparar los datos medidos obtenidos en la etapa b) con los datos medidos obtenidos a partir de perfiles derivados de mamíferos libres de cirrosis hepática, y

d) atribuir la desviación obtenida en la etapa c) a cirrosis hepática.

2. Un método según la reivindicación 1, en el que dicho al menos un hidrato de carbono enlazado a asparagina se selecciona del grupo que consiste en:

i) GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,3)[GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,6)]Man(β -1,4)GlcNAc(β -1,4)[Fuc(α -1,6)]GlcNAc (glucano 1),

ii) GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,3)[GlcNAc(β -1,4)]GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,6)]Man(β -1,4)GlcNAc(β -1,4)[Fuc(α -1,6)]GlcNAc (glucano 2),

iii) Gal(β -1,4)GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,3)[Gal(β -1,4)GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,6)]Man(β -1,4)GlcNAc(β -1,4)GlcNAc (glucano 3),

iv) Gal(β -1,4)GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,3)[GlcNAc(β -1,4)]Gal(β -1,4)GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,6)]Man(β -1,4)GlcNAc(β -1,4)[Fuc(α -1,6)]GlcNAc (glucano 7),

v) Gal(β -1,4)GlcNAc(β -1,2)[Gal(β -1,4)GlcNAc(β -1,4)]Man(α -1,3)[Gal(β -1,4)GlcNAc(β -1,2)Man(α -1,6)]Man(β -1,4)GlcNAc(β -1,4)GlcNAc (glucano 8),

vi) un derivado sialilado de glucano 1, 2, 3, 7 u 8,

3. Un método según la reivindicación 2, en el que dicha cantidad se mide como una cantidad relativa entre glucano 1 y glucano 8 y/o glucano 2 y glucano 8 y/o glucano 7 y glucano 8 y/o glucano 1 y glucano 3 y/o glucano 2 y glucano 3 y/o glucano 7 y glucano 3.

4. El método según la reivindicación 3, en el que dicha cantidad relativa entre glucano 1 y glucano 8 es al menos 80% mayor que el promedio de dicha cantidad relativa en mamíferos libres de cirrosis hepática.

5. El método según la reivindicación 3, en el que dicha cantidad relativa entre glucano 2 y glucano 8 es al menos 100% mayor que el promedio de dicha cantidad relativa en mamíferos libres de cirrosis hepática.

6. El método según la reivindicación 3, en el que dicha cantidad relativa entre glucano 7 y glucano 8 es al menos 40% mayor que el promedio de dicha cantidad relativa en mamíferos libres de cirrosis hepática.

7. Un método según las reivindicaciones 1-6, en el que dicho mamífero es un ser humano.

8. Un método para el diagnóstico de cirrosis hepática en un mamífero según las reivindicaciones 1-7, que comprende además otras evaluaciones cuantitativas o cualitativas de la condición física del mamífero, tales como parámetros de química clínica y datos histológicos.

9. Un método para detectar la presencia o la predisposición de carcinoma hepatocelular en un mamífero que sufre cirrosis hepática, que comprende:

a) generar un perfil del conjunto de hidratos de carbono enlazados a asparagina, o dicho conjunto de hidratos de carbono enlazados a asparagina que se ha marcado; estando presentes en u obteniéndose dicho conjunto de hidratos de carbono enlazados a asparagina a partir del conjunto de (gluco)proteínas totales que están presentes en o se aíslan a partir de una muestra de suero o de plasma sanguíneo procedente de dicho mamífero, y

b) medir en el perfil de la etapa a) la cantidad de al menos un hidrato de carbono enlazado a asparagina o de dicho hidrato de carbono enlazado a asparagina que se ha marcado, y

c) comparar los datos medidos obtenidos en la etapa b) con los datos medidos obtenidos a partir de perfiles derivados de mamíferos que sufren cirrosis hepática pero están libres de carcinoma hepatocelular, y

d) atribuir la desviación obtenida en la etapa c) a la presencia de carcinoma hepatocelular.

- 5 10. Un método según la reivindicación 9, en el que al menos un hidrato de carbono enlazado a asparagina citado en la etapa b) comprende $\text{Gal}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,3)[\text{GlcNAc}(\beta-1,4)][\text{Gal}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,6)]\text{Man}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,4)[\text{Fuc}(\alpha-1,6)]\text{GlcNAc}$ (glucano 7).

Fig. 1

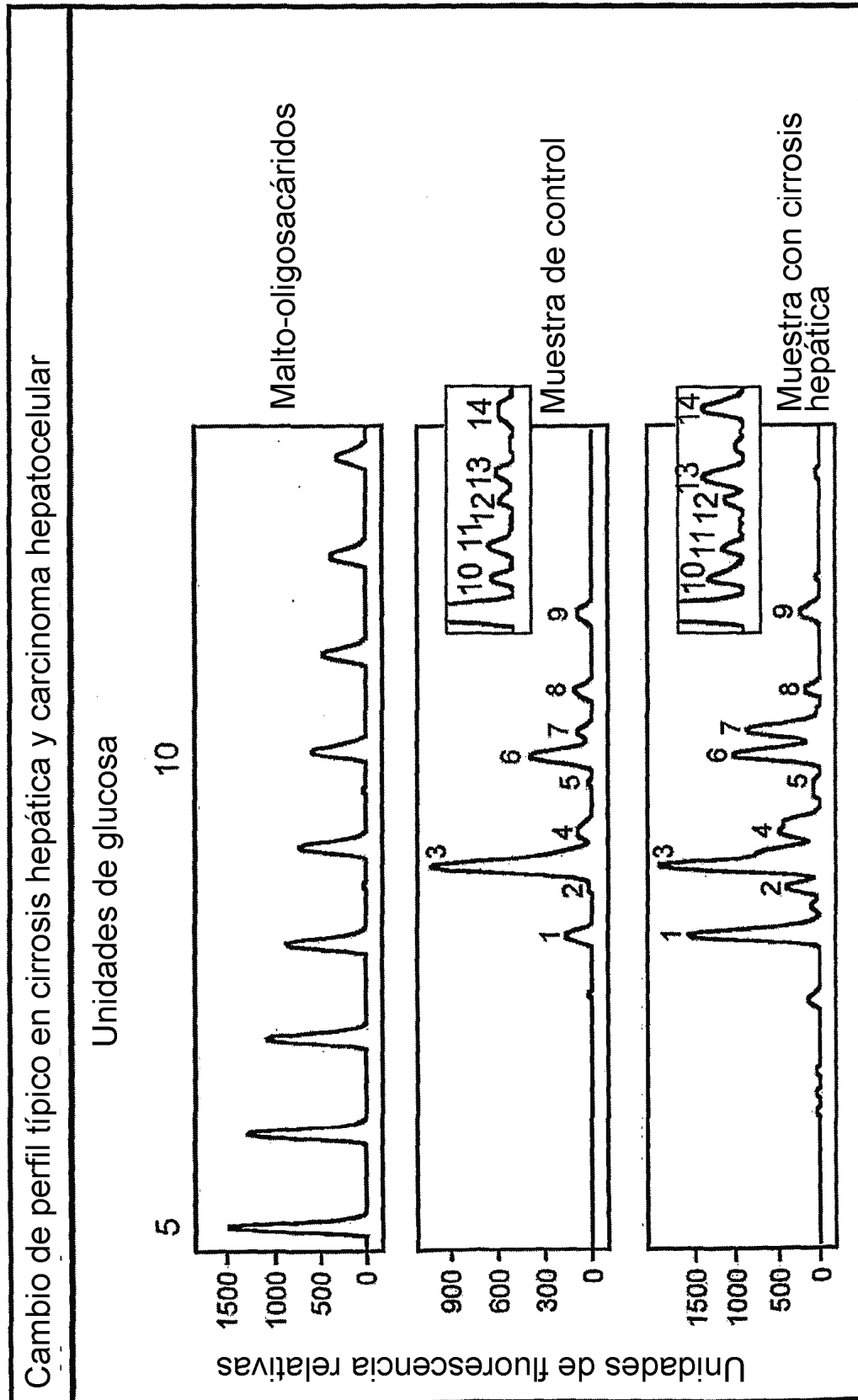


Fig. 2

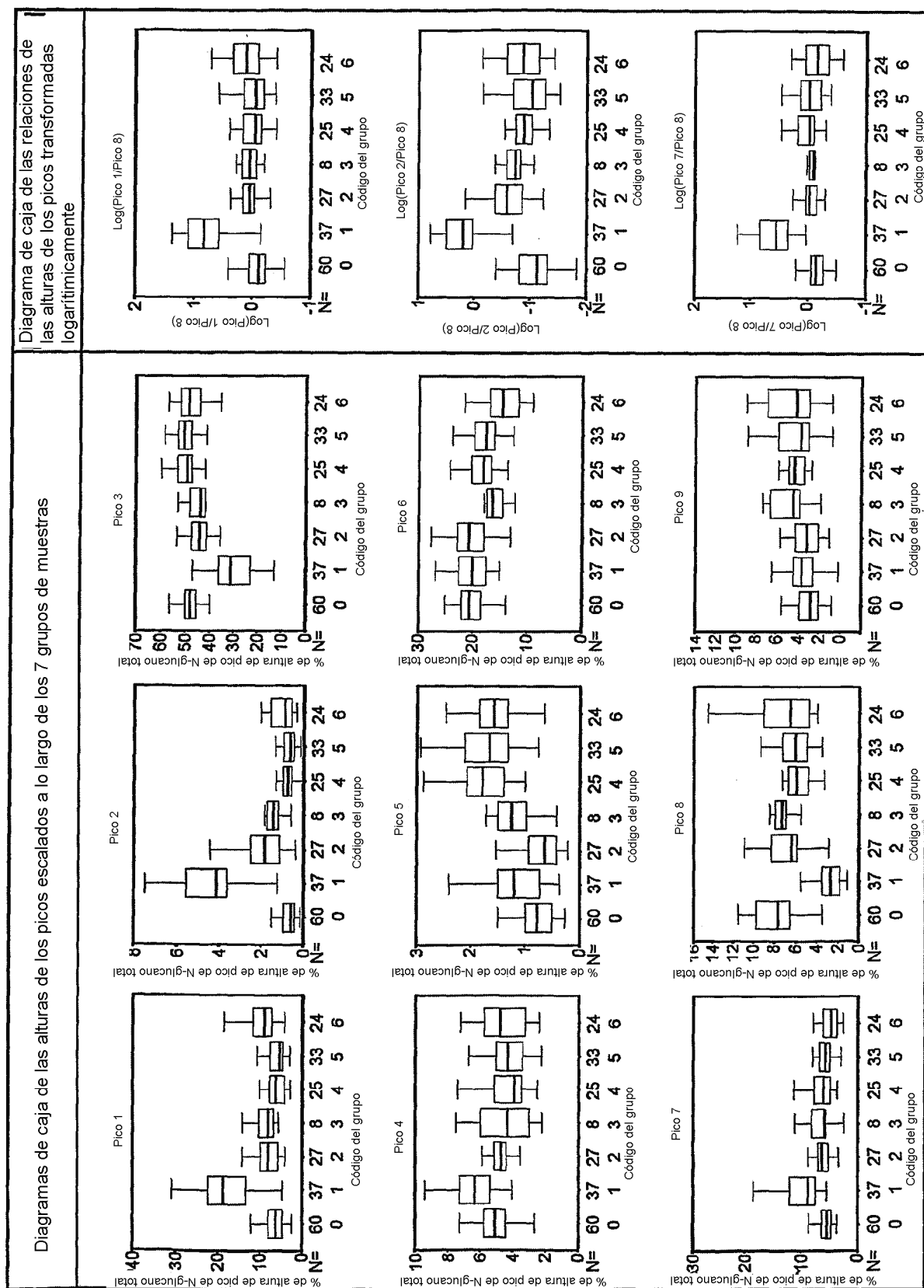


Fig. 3 (parte 1)

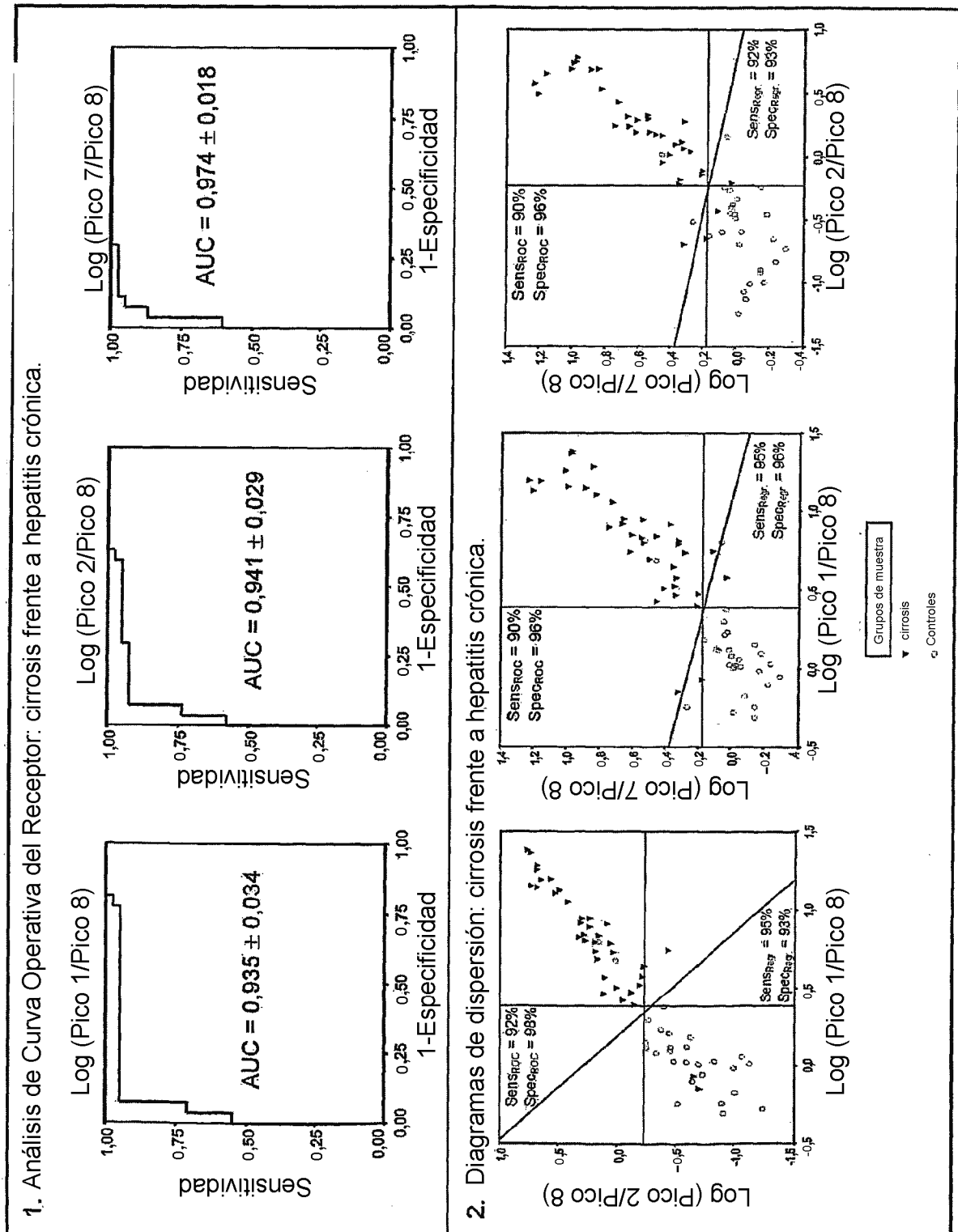


Fig. 3 (parte 2)

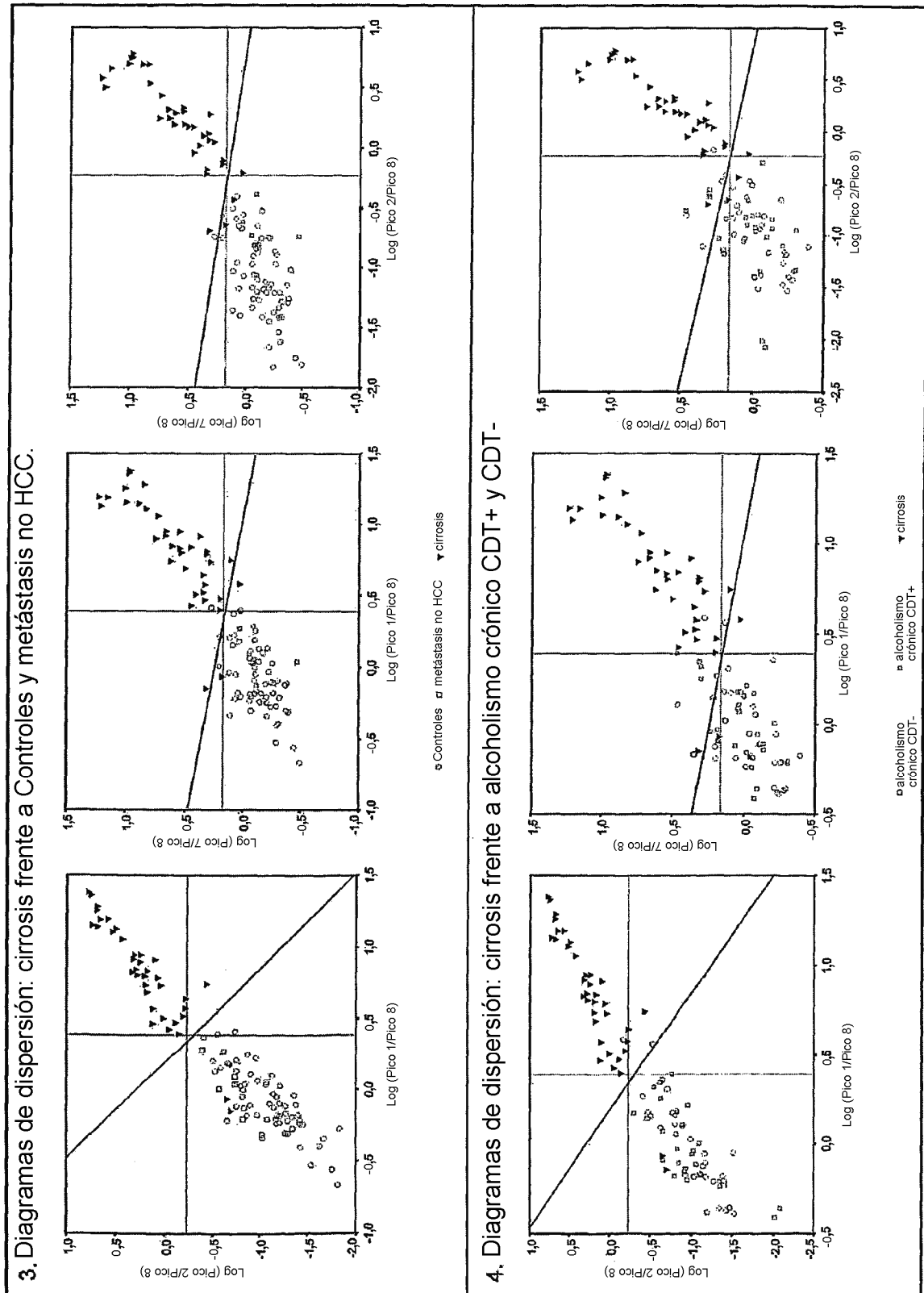


Fig. 3 (parte 3)

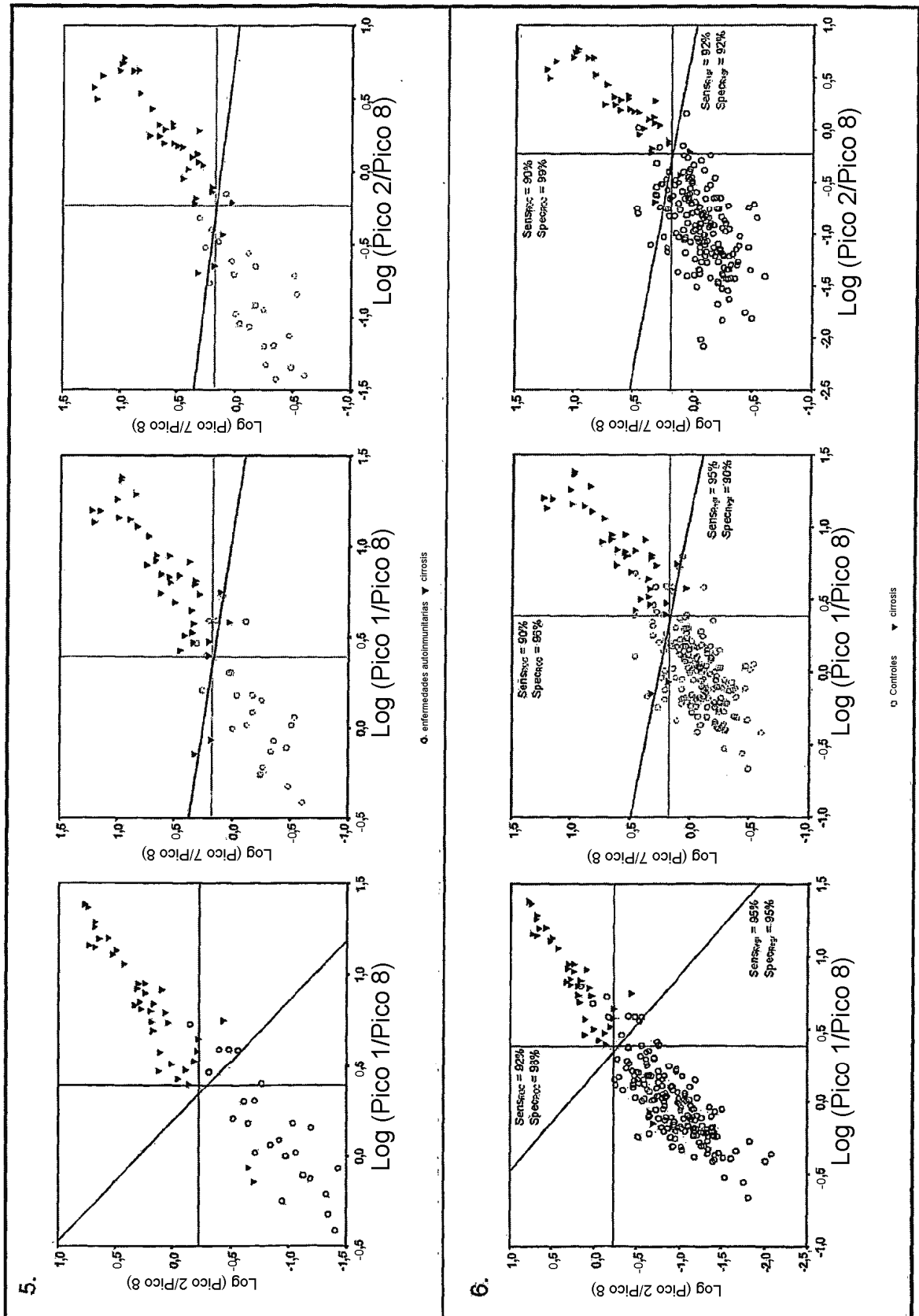
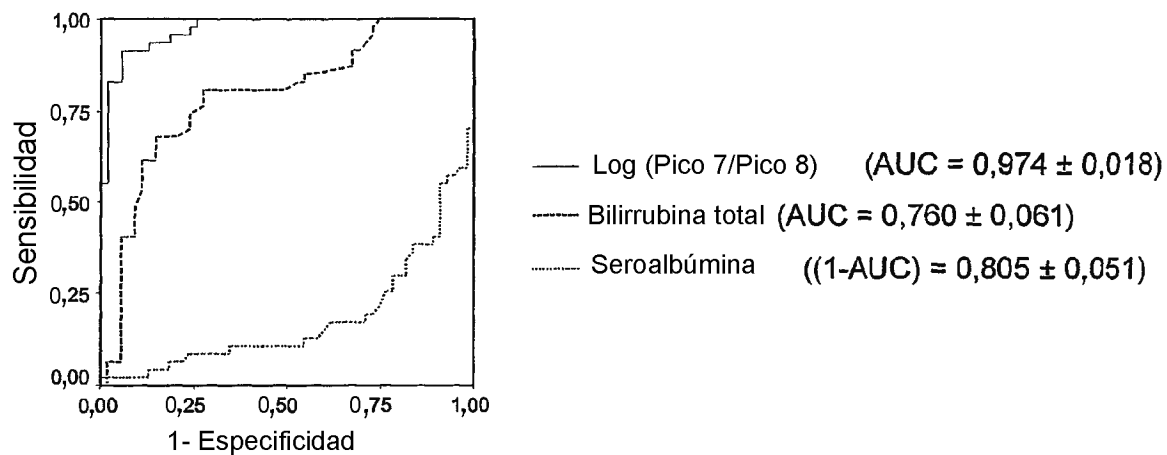


Fig. 3 (parte 4):

7. Curvas ROC: marcador de cirrosis de glucómica frente a albúmina y bilirrubina



8. Validación de la clasificación en grupo independiente de pacientes con hepatopatía

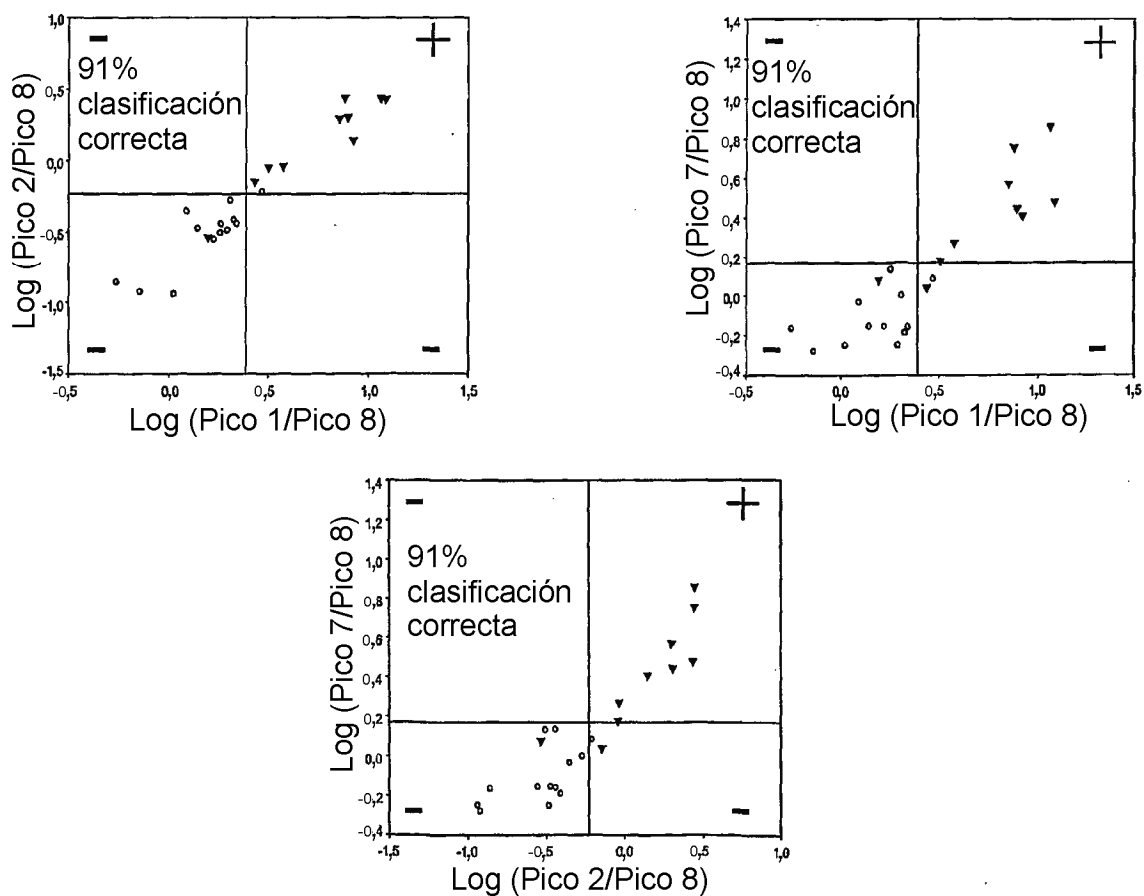


Fig. 4

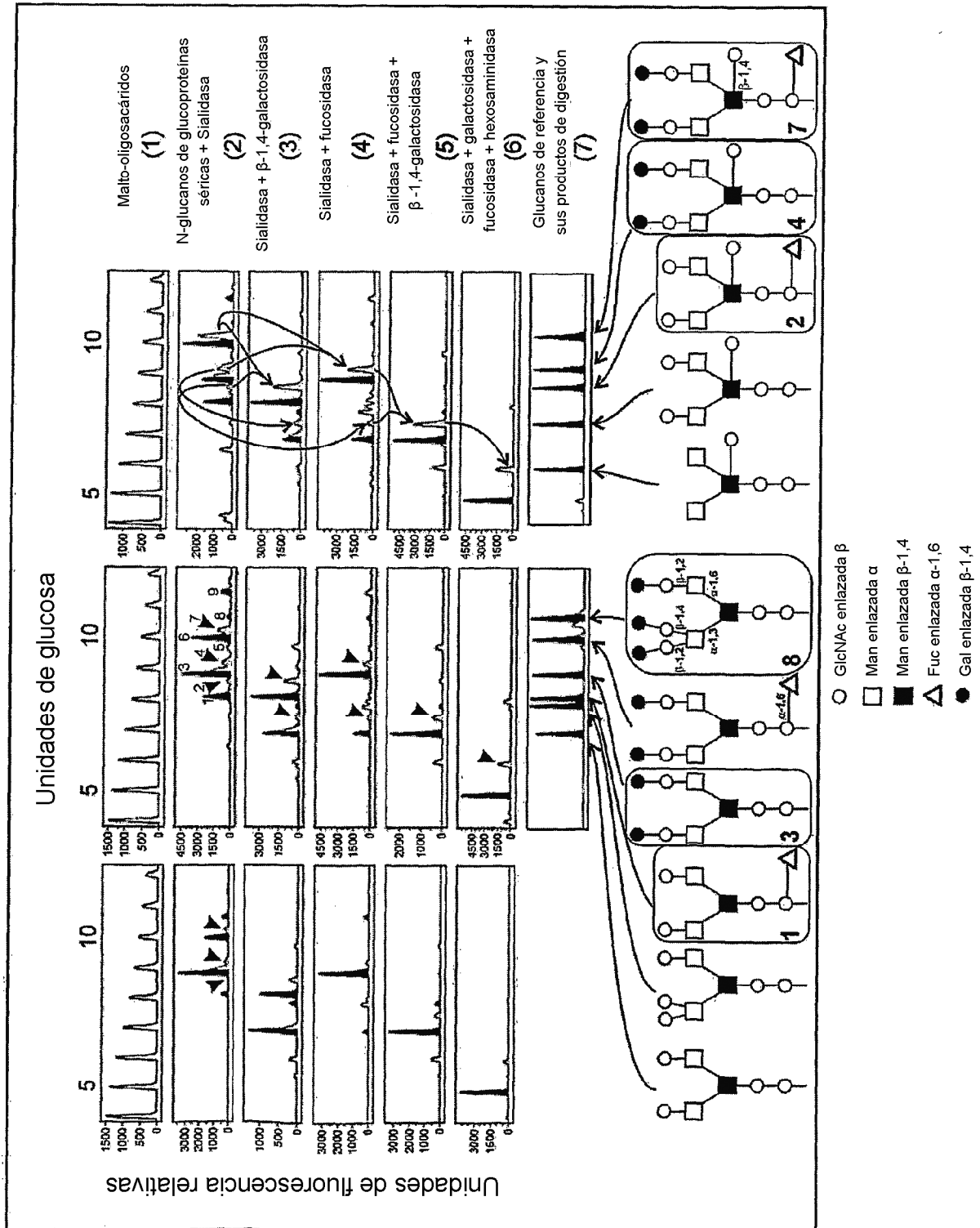
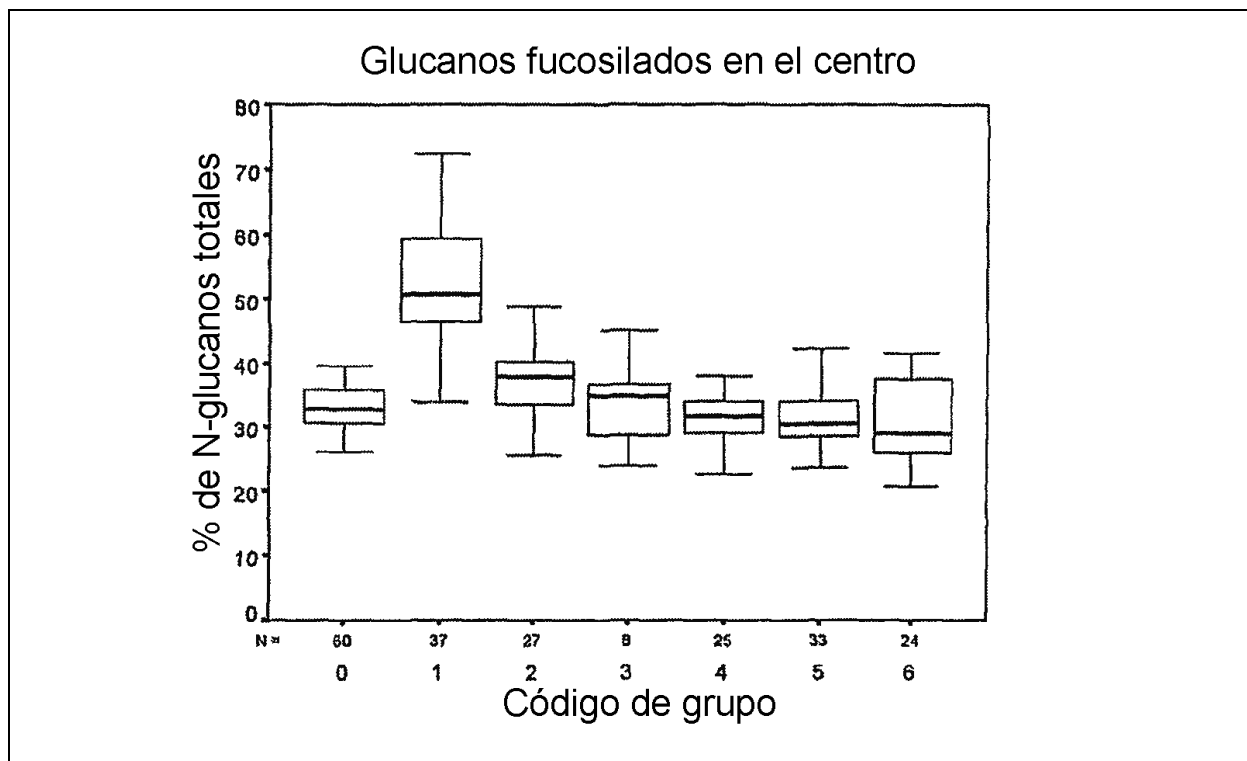


Fig.5



ANOVA para la fucosilación del núcleo

	Suma de cuadrados	df	Cuadrado de la media	F	Sig.
Entre grupos	12602,80763	6	2100,467938	62,6218	7,01 E-44
En los grupos	6943,217403	207	33,54211306		
Total	19546,02503	213			

		N	Subconjunto para alfa =0,0001	
Grupos de muestra			1	2
HSD de Tukey	Enfermedades autoinmunitarias	24	30,92	
	Alcoholismo CDT-	33	31,45	
	Alcoholismo CDT+	25	31,57	
	Controles	60	33,05	
	Metástasis hepáticas no HCC	8	33,68	
	Hepatitis crónica	27	37,13	
	cirrosis	37		52,63
Sig.			0,007	1
Comparación de Scheffé	Enfermedades autoinmunitarias	24	30,92	
	Alcoholismo CDT-	33	31,45	
	Alcoholismo CDT+	25	31,57	
	Controles	60	33,048	
	Metástasis hepáticas no HCC	8	33,68	
	Hepatitis crónica	27	37,13	
	cirrosis	37		52,63
Sig.			0,053765023	1
Se muestran las medias para grupos en subconjuntos homogéneos.				

Fig. 6:

