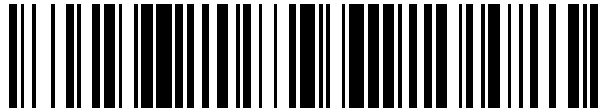


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 978**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2007 E 11195439 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2437067**

54 Título: **Procedimiento para el diagnóstico diferencial de demencias**

30 Prioridad:

17.11.2006 EP 06023954
05.12.2006 EP 06025097

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.05.2015

73 Titular/es:

**FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT
ERLANGEN-NÜRNBERG (50.0%)**
Schlossplatz 4
91054 Erlangen, DE y
GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT GÖTTINGEN
(50.0%)

72 Inventor/es:

BIBL, MIRKO;
MOLLENHAUER, BRIT;
WILTFANG, JENS;
ESSELMANN, HERMANN;
LEWCZUK, PIOTR y
KORNHUBER, JOHANNES

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 535 978 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

Procedimiento para el diagnóstico diferencial de demencias

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un procedimiento *ex vivo* para el diagnóstico diferencial de degeneraciones del lóbulo frontotemporal que comprenden las características del preámbulo de la reivindicación 1 independiente. Particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento tal que es adecuado para discriminar degeneraciones del lóbulo frontotemporal de demencias relevantes del diagnóstico diferencial, tales como enfermedad de Alzheimer, y trastornos demenciales, tales como depresión. La invención también se refiere a diferenciar entre degeneraciones del lóbulo frontotemporal y demencias vasculares. Además, la invención se refiere a un uso de ciertos componentes para el diagnóstico diferencial de demencias.

15 Abreviaturas usadas

En esta descripción se usan las siguientes abreviaturas: péptidos A β = péptidos beta amiloides; A β -SDS-PAGE/inmunotransferencia = electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida de amiloide beta con inmunotransferencia Western; EA = enfermedad de Alzheimer; PPA = proteína precursora de beta-amiloide; cámara CCD = cámara con dispositivo de carga acoplada; LCR = líquido cefalorraquídeo; CD = control depresivo; DGN = Deutsche Gesellschaft für Neurologie; DFT = demencia frontotemporal; DLFT = degeneración del lóbulo frontotemporal; MMSE = miniexamen del estado mental; NINCDS-ADRDA = Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y de la Comunicación y Accidente cerebrovascular-Asociación de la Enfermedad de Alzheimer y Trastornos relacionados; SDS = dodecilsulfato de sodio; %T = porcentaje de acrilamida; DV = demencia vascular.

25 Técnica anterior

El diagnóstico diferencial entre las dos formas más comunes de demencias, la enfermedad de Alzheimer (EA) y las demencias vasculares (DV), es crucial, ya que influye en la estrategia terapéutica. Hasta ahora, los diagnósticos de demencia neuroquímicos basados en LCR multiparamétricos (LCR-DDN) pueden respaldar el diagnóstico diferencial de EA y DV midiendo A β 1-42, tau total y fosfo-tau.

Van Oijen y col., 2006, informaron que los péptidos A β en plasma pueden tener valor diagnóstico en EA incipiente.

35 Gurol y col., 2006, informaron que la concentración en plasma de las especies de péptidos A β A β 1-40 mostraron relación con la carga de lesiones vasculares en deterioro cognitivo leve, EA y angiopatía amiloide cerebral. Particularmente, se ha encontrado que la concentración en plasma de A β 1-40 se asocia a lesiones de la sustancia blanca cerebral independientemente de posibles factores de confusión.

40 Un quinteto de especies de péptidos A β , es decir, A β 1-37/38/39/40/42, se ha caracterizado como constituyentes regulares de LCR humano (Wiltfang y col., 2002; Lewczuk y col., 2004).

En seres humanos por debajo de la edad de 65 años, la DLFT es la segunda causa más común de demencia después de la enfermedad de Alzheimer.

45 La EA es una enfermedad degenerativa progresiva del cerebro que produce deterioro de la memoria y demencia manifestada por confusión, desorientación visuoespacial, incapacidad para calcular, deterioro del criterio, trastornos del pensamiento y alucinaciones. Esta enfermedad cerebral degenerativa más común constituye el 70 % de todos los casos de demencia en seres humanos. La aparición es normalmente en la edad madura tardía, y la muerte normalmente se produce en 5 a 10 años.

El grupo heterogéneo de DLFT y EA comparten rasgos neuroquímicos y clínicos, aunque el aspecto temporal de los síntomas durante la evolución de la enfermedad y hallazgos neuropatológicos se diferencian sorprendentemente entre estos dos síndromes de demencia.

55 La deposición extracelular de péptidos beta amiloides (A β) agregados, principalmente A β 1-42 total, como placas de amiloide es un distintivo neuropatológico de enfermedad de Alzheimer (Glennner y Wong, 1984), mientras que las placas de amiloide se encuentran raramente en DLFT (Arnold y col., 2000). Los niveles de A β 1-42 en fluidos corporales tales como líquido cefalorraquídeo (LCR) son significativamente reducidos en EA y a un menor grado en DLFT (Hulstaert y col., 1999).

65 Los péptidos A β se derivan de una proteína precursora de amiloide (PPA) transmembrana, después de la escisión por dos enzimas, β - y β -secretasa (Haas y Selkoe, 1993). A β consiste predominantemente de A β 1-38, A β 1-40 y A β 1-42. Se supone que las distintas actividades de β -secretasa son responsables de la generación de tanto péptidos A β truncados del extremo carboxi (truncados en Ct) como alargados (alargados en Ct) como se refiere a A β 1-40 (Citron y col., 1984). Así, puede asumirse que la medición de las diferentes especies de péptidos A β en fluidos

corporales representa más adecuadamente cambios específicos de enfermedad del metabolismo de PPA en vez de los simples niveles de A β -42 absolutos (Wiltfang y col., 2001, Bibl y col., 2006).

Hasta la fecha se han documentado tres conjuntos de criterios clínicos para el diagnóstico diferencial de DLFT. El conjunto de criterios más reciente se sugirió por McKhann y colaboradores (McKhann y col., 2001), principalmente como una ayuda al diagnóstico clínico rutinario. Los criterios clínicos de Neary y colaboradores (Neary y col., 1998) son más útiles cuando se basan en los tres subtipos prototípicos de DLFT, demencia frontotemporal (DFT), afasia progresiva primaria (APP) y demencia semántica (DS). Sin embargo, el diagnóstico clínico frecuentemente sigue siendo crucial en un caso determinado y biomarcadores para pruebas de diagnóstico aplicables están todavía en intensa investigación. La constelación de A β ₁₋₄₂ reducidos en fluidos corporales, acompañado de una elevación de niveles de proteína tau, puede encontrarse en tanto DFT como EA (Blennow, 2004). Hasta la fecha se han publicado datos incoherentes sobre el rendimiento de estas proteínas como biomarcador aplicable para el diagnóstico diferencial de DFT y EA (Sjögren y col., 2000; Riemenschneider y col., 2002). El diagnóstico clínico de enfermedades neurodegenerativas es todavía muy difícil, específicamente con respecto a la diferenciación de EA de DFT y DFT de APP.

Se ha sugerido que las formas de A β pueden usarse conjuntamente con diagnóstico clínico para respaldar un diagnóstico diferencial. Los biomarcadores para ayudar en el diagnóstico clínico, tales como beta amiloide 1-42 (A β ₁₋₄₂), tau y tau fosforilada se han investigado sistemáticamente en DFT, pero no en APP.

El documento WO 2004/001421 A2 desvela un método para el diagnóstico diferencial en un mamífero de enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewy, demencia vascular y/o depresión. El procedimiento conocido incluye detectar, en dicho mamífero, el nivel de al menos una de las siguientes proteínas: Apo-E, α -1-antitripsina, α -1- β -glucoproteína, antitrombina III, Apo A-I, Apo A-IV, Apo J, gelsolina, haptoglobina, hemopexina, región C de la cadena de Ig α -1 (pesada), quinínogeno, prostaglandina-H2 D-isomerasa, transtiretina, proteína de unión a vitamina D, Zn- α -2-glucoproteína, o de una isoforma de las mismas como biomarcador.

El documento EP 1 270 592 A1 desvela un anticuerpo monoclonal llamado mAb 1E8 que es específico para los dos primeros aminoácidos del extremo N de péptidos β amiloide y que es útil para determinar péptidos β amiloide A β _{1-x} o A β _{2-x} o sAPP α en una muestra del cuerpo seleccionada de líquido, homogeneizados de cerebro y plasma. Por ejemplo, el anticuerpo mAb 1E8 puede usarse para determinar una relación entre una concentración de A β ₁₋₃₈ y una concentración de A β ₁₋₄₀ en una muestra de líquido corporal tal. Se informa que los pacientes con enfermedad de Alzheimer se caracterizaron por un enorme aumento de A β ₁₋₄₂ y A β ₂₋₄₂ en comparación con controles no dementes y pacientes con degeneraciones del lóbulo frontotemporal.

Vitali y col.: Soluble amyloid β -protein is increased in frontotemporal dementia with tau gene mutations, Journal of Alzheimer's Disease 6 (2004), 45-51, informan de un aumento de A β ₄₂ y A β ₄₀ soluble en casos con demencia frontotemporal con parkinsonismo producido por mutaciones del gen tau (FTDP-17) en comparación con normales y cerebros en casos de demencia frontotemporal que carecen de histopatología distintiva (DLDH), ambos de los cuales tuvieron niveles comparables de especies A β . Además, la inmunorreactividad de A β ₄₂ intracelular aumentó significativamente en las neuronas corticales de sujetos afectados con FTDP-17.

Problema de la invención

Es el problema de la presente invención proporcionar un procedimiento *ex vivo* de ayuda para el diagnóstico diferencial de demencias, que incluyen demencias vasculares y/o degeneraciones del lóbulo frontotemporal, que muestre buena sensibilidad y especificidad de manera que permita particularmente discriminar demencias vasculares y/o degeneraciones del lóbulo frontotemporal de otros tipos de demencia como, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer.

Solución

El problema de la invención se resuelve mediante un procedimiento que comprende los rasgos de la reivindicación 1 independiente. Realizaciones preferidas de este nuevo procedimiento se definen en las reivindicaciones 1 a 7 dependientes. La reivindicación 8 se refiere al uso de ciertos componentes en el nuevo procedimiento. Las reivindicaciones 9 a 15 dependientes definen realizaciones preferidas del nuevo uso.

Descripción de la invención

Los inventores encontraron el mismo quinteto de especies de péptidos A β , es decir, A β _{1-37/38/39/40/42}, que se han caracterizado como constituyentes regulares de LCR humano antes (Wiltfang y col., 2002; Lewczuk y col., 2004), en plasma. Sin embargo, los péptidos A β en plasma se caracterizaron por otras especies truncadas en el extremo amino A β ₂₋₄₀. La última especie de péptidos no puede diferenciarse de A β ₁₋₄₀ por los procedimientos de ELISA actualmente disponibles.

Adicionalmente y sorprendentemente, los inventores encontraron que las concentraciones en plasma de las especies de péptidos A β individuales muestran variaciones características en caso de demencia vascular y degeneraciones del lóbulo frontotemporal.

5 Particularmente, en caso de demencias vasculares, además de un aumento de A β 1-40, las concentraciones de A β 1-37, A β 1-38, A β 1-39, A β 1-42 y A β 2-40 disminuyen. La disminución de estas especies de péptidos A β es característica de demencias vasculares porque no se muestra con otros trastornos demenciales relevantes de diagnóstico diferencial tales como enfermedad de Alzheimer y depresión. Sin embargo, esta disminución, excepto la
10 disminución en A β 1-42, y el aumento en A β 1-40, también se muestran con degeneraciones del lóbulo frontotemporal.

Las especies de péptidos A β que muestran disminuciones particularmente altas en su concentración en plasma con demencias vasculares y frontotemporales son A β 1-37, A β 1-38, A β 1-42 (no con demencia frontotemporal), y A β 2-40, siendo mostrada la disminución más característica por A β 1-38.

15 Así, la presente invención proporciona un procedimiento *ex vivo* de ayuda para el diagnóstico diferencial de degeneraciones del lóbulo frontotemporal, que comprende la etapa de determinar en un fluido corporal obtenido de un paciente al menos una concentración relativa seleccionada del grupo que consiste en

- 20 - la relación de la concentración absoluta de A β 1-38 con respecto a la concentración de β amiloide total (A β 1-38 %),
- la relación de la concentración absoluta de A β 1-38 con respecto a la concentración absoluta de especies de β amiloide A β 1-40 (A β 1-38/A β 1-40), y
- 25 - la relación de la concentración absoluta de A β 1-38 con respecto a la concentración absoluta de especies de β amiloide A β 1-42 (A β 1-38/A β 1-42).

En una realización, el fluido corporal usado en la presente invención es LCR (líquido cefalorraquídeo).

30 Particularmente, sin embargo, una concentración de A β 1-38 se determina en una muestra de sangre tomada del paciente, y, normalmente, la concentración de A β 1-38 y todas las otras especies de péptido β amiloide que se determinarán en el nuevo procedimiento son concentraciones en plasma, es decir, las concentraciones se determinarán en una muestra de plasma sanguíneo. Como el plasma es un componente de la sangre, y como una muestra de plasma sanguíneo es una fracción de una muestra de sangre tomada de un paciente, las concentraciones de las especies de péptidos A β determinadas en el nuevo procedimiento también pueden
35 relacionarse con la muestra de sangre total, o incluso pueden determinarse directamente en la muestra de sangre.

A partir del plasma o la muestra de sangre total, los péptidos A β se enriquecen preferentemente usando un anticuerpo específico para péptidos A β , y luego se analiza adicionalmente con respecto a la concentración de las especies de péptidos A β individuales. El uso de un anticuerpo del extremo N específico para enriquecer los péptidos A β demostró ser particularmente satisfactorio.

40 Las concentraciones absolutas de A β 1-38 pueden mostrar una variación considerable que no es debida a la aparición de demencias vasculares o degeneraciones del lóbulo frontotemporal. Las concentraciones relativas de A β 1-38, sin embargo, muestran una variación mucho más pequeña sin la aparición de estas enfermedades. Así, en el nuevo procedimiento se determina una concentración relativa de A β 1-38 para discriminar más claramente demencia vascular y degeneraciones del lóbulo frontotemporal de otros tipos de demencias.

45 Por ejemplo, la concentración relativa de A β 1-38 puede determinarse como una fracción de la concentración de péptido A β total, que aquí se indicará A β 1-38 %, o como una relación de la concentración absoluta de A β 1-38 y la concentración absoluta del péptido A β adicional A β 1-40 o A β 1-42, que aquí se indicará A β 1-38/1-40 y A β 1-38/1-42, respectivamente.

Para discriminar en realidad ciertas demencias, la concentración de A β 1-38 se compara con un valor umbral.

55 El valor umbral real para A β 1-38 puede obtenerse comparando los niveles del biomarcador en el paciente con aquellos en controles no dementes (como, por ejemplo, en controles depresivos no dementes) y/o en pacientes con otras demencias (como, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer).

Una concentración de la al menos una especie de péptido β amiloide truncada del extremo carboxi seleccionada del grupo de concentraciones que consiste en

- la concentración absoluta de la al menos una especie de péptido β amiloide truncada del extremo carboxi,
- la concentración relativa de la al menos una especie de péptido β amiloide truncada del extremo carboxi determinada como una fracción de la concentración de péptido β amiloide total, y
- 65 - la concentración relativa de la al menos una especie de péptido β amiloide truncada del extremo carboxi determinada como una relación de la concentración absoluta de la al menos una especie de péptido β amiloide

truncada del extremo carboxi y la concentración absoluta de la especie de péptido β amiloide truncada del extremo carboxi $A\beta$ 1-40 adicional, por encima del valor umbral para la especie de péptido β amiloide truncada del extremo carboxi respectiva se toma como una indicación de no demencia vascular en el paciente.

5 Si se determina la fracción de la concentración de péptido $A\beta$ total en plasma de las especies de péptidos $A\beta$ $A\beta$ 1-38, un valor umbral adecuado para diagnosticar demencias vasculares está en un intervalo del 7,6 % al 8,6 %. Preferentemente, este valor umbral está en un intervalo del 8,29 % al 8,43 %. Un valor umbral dentro del último intervalo es el más adecuado para discriminar DV de EA.

10 Si se determina la relación de la concentración absoluta en plasma de las especies de péptidos $A\beta$ $A\beta$ 1-38 y la concentración absoluta en plasma de las especies de péptidos $A\beta$ $A\beta$ 1-40, un valor umbral adecuado para diagnosticar demencias vasculares está en un intervalo de 0,116 a 0,156. Preferentemente, este valor umbral es aproximadamente 0,136.

15 En una realización particular del nuevo procedimiento, una concentración de $A\beta$ 1-38 seleccionada del grupo de concentraciones que consiste en

- 20 - la concentración relativa de la al menos una especie de péptido β amiloide truncada del extremo carboxi determinada como una fracción de la concentración de péptido β amiloide total, y
- la concentración relativa de la al menos una especie de péptido β amiloide truncada del extremo carboxi determinada como una relación de la al menos una especie de péptido β amiloide truncada del extremo carboxi y la concentración absoluta de al menos una especie de péptido β amiloide adicional seleccionada del grupo que consiste en $A\beta$ 1-40 y $A\beta$ 1-42,
- 25 por encima del valor umbral para la especie de péptido β amiloide truncada del extremo carboxi respectiva se toma como una indicación de no degeneración del lóbulo frontotemporal en el paciente.

30 Particularmente, al contrario puede deducirse que dicho mamífero está padeciendo DLFT dado que la concentración de $A\beta$ 1-38 es inferior a un valor umbral para $A\beta$ 1-38 que, cuantificada como un porcentaje, es al menos el 20 % menos y preferentemente oscila del 20 % al 40 % menos con respecto a la concentración de la especie de péptido β amiloide truncada del extremo carboxi respectiva en pacientes con enfermedad de Alzheimer y en controles no dementes.

35 En una realización más particular, el procedimiento de la presente invención incluye obtener muestras de fluido corporal (por ejemplo, sangre o LCR) de un mamífero (por ejemplo, humano) y determinar la relación de péptidos $A\beta$ truncados en el extremo carboxi $A\beta$ 1-38 a $A\beta$ 1-40 en el que la relación inferior a 0,22 indica que el mamífero es susceptible a, o tiene, DLFT.

40 En incluso otra realización particular del nuevo procedimiento, una concentración de $A\beta$ 1-38 seleccionada del grupo de concentraciones que consiste en

- la concentración relativa de la al menos una especie de péptido β amiloide truncada del extremo carboxi determinada como una fracción de la concentración de péptido β amiloide total, y
- 45 - la concentración relativa de $A\beta$ 1-38 determinada como una relación de la concentración absoluta de $A\beta$ 1-38 y la concentración absoluta de la otra especie de péptido β amiloide truncado en el extremo carboxi $A\beta$ 1-40,

por debajo del valor umbral para $A\beta$ 1-38 se toma como una indicación de una demencia vascular o una degeneración del lóbulo frontotemporal en el paciente.

50 Particularmente en la última realización, la concentración relativa de $A\beta$ 1-38 determinada como una relación de $A\beta$ 1-38 y la concentración absoluta de la otra especie de péptido β amiloide $A\beta$ 1-42 puede usarse para diferenciar entre una demencia vascular y una degeneración del lóbulo frontotemporal en el paciente, indicando una concentración relativa por debajo del valor umbral para $A\beta$ 1-38 una degeneración del lóbulo frontotemporal en el paciente. Particularmente, este valor umbral estará en el intervalo de 1,2 a 1,4, preferentemente aproximadamente 1,3, si el fluido corporal es, por ejemplo, plasma sanguíneo.

55 Además, una concentración relativa de $A\beta$ 1-38 determinada como una fracción de la concentración de péptido β amiloide total por debajo del valor umbral para $A\beta$ 1-38 puede tomarse como una indicación de una demencia frontotemporal en el paciente para distinguir una demencia tal de, por ejemplo, una afasia progresiva primaria (APP) que también pertenece al grupo de degeneraciones del lóbulo frontotemporal.

60 El paciente del que va a examinarse el fluido corporal en el nuevo procedimiento se obtiene de cualquier mamífero; en una realización particular de la presente invención el mamífero es un ser humano.

65 En una realización, la metodología usada para la cuantificación del biomarcador es una medida de interacción inmunológica del biomarcador con anticuerpo(s) o molécula(s) que imita(n) anticuerpos, que incluyen

específicamente anticuerpos monoclonales específicos para biomarcador de péptido A β . Un ejemplo tal de la metodología usada para la cuantificación del biomarcador es electroforesis en gel o A β -SDS-PAGE/inmunotransferencia.

5 En una realización, el biomarcador puede comprender una forma modificada de la especie de péptido β amiloide truncado en el extremo carboxi de interés: dicho péptido A β puede estar presente en una forma oxidada, en una forma fosforilada o una forma truncada en el extremo N (o amino).

10 Un kit para el diagnóstico diferencial de demencias que incluyen demencias vasculares y/o degeneraciones del lóbulo frontotemporal según el nuevo procedimiento comprenden todos los componentes necesarios para ejecutar el nuevo procedimiento en tanto que estos componentes no sean componentes convencionales disponibles en cualquier laboratorio bien equipado. Así, el kit comprende al menos componentes para determinar una concentración de al menos un péptido β amiloide truncado del extremo carboxi seleccionado del grupo que consiste en A β 1-38, A β 1-37 y A β 1-39 en un fluido corporal obtenido de un paciente.

15

Breve descripción de los dibujos y tablas

A continuación, la invención se describirá adicionalmente y se explicará por medio de ejemplos de realización y con referencia a los dibujos y tablas adjuntos.

20

Fig. 1 es una gráfica que muestra la media y el intervalo de confianza (IC) del 95 % de la relación A β 1-38/1-40 para tres grupos de diagnóstico del Ejemplo I que consisten en pacientes con CD, EA y DV.

25

Fig. 2 muestra curvas de operación de las relaciones A β 1-38/1-40, A β 1-42/1-40 y A β 2-40/1-40, respectivamente, para la detección de DV entre todos los otros pacientes en el Ejemplo I.

30

Fig. 3 pertenece al Ejemplo II y muestra (a) una A β -SDS-PAGE/inmunotransferencia basada en urea, y (b) SDS-PAGE convencional de LCR (carril 1-3) y péptidos A β 1-37, A β 1-38, A β 1-39, A β 1-40 y A β 1-42 sintéticos (carril 4). Diez microlitros de un LCR sin concentrar se aplicaron a cada carril. La figura muestra una transferencia de LCR de pacientes con DLFT (carril 2), controles de enfermedad no demente (CND) (carril 3) y EA (carril 4), respectivamente.

35

Fig. 4 es una gráfica que muestra la media y el intervalo de confianza (IC) del 95 % de A β 1-38/ A β 1-40 para CND, EA y DLFT en el Ejemplo II.

40

Fig. 5 es un diagrama de dispersión de pacientes con DLFT, EA y CND del Ejemplo II dividido entre la relación de A β 1-38/ A β 1-40 y A β 1-42 [ng/ml]. El mejor corte para diferenciar DLFT de EA y CND usando A β 1-38/ A β 1-40 es 0,215.

45

Fig. 6 es un diagrama de dispersión de pacientes con DFT, EA, APP y CND del Ejemplo III dividido entre su porcentaje de abundancia de A β 1-42 y A β 1-38, respectivamente, con respecto a la suma de todos los péptidos A β investigados.

50

Fig. 7 es una gráfica de A β 1- 38 % en LCR de controles de enfermedad no demente (CND), enfermedad de Alzheimer (EA), demencias frontotemporales (DFT), afasia progresiva primaria (APP) y otras demencias del Ejemplo III.

55

Fig. 8 es una gráfica que muestra la media y el intervalo de confianza (IC) del 95 % de la relación plasma A β 1-38/1-40 para cada grupo de diagnóstico del Ejemplo IV.

Fig. 9 es una gráfica que muestra la media y el intervalo de confianza (IC) del 95 % de la relación plasma A β 1-38/1-42 para cada grupo de diagnóstico del Ejemplo IV.

Fig. 10 es una gráfica que muestra la media y el intervalo de confianza (IC) del 95 % de la relación plasma A β 1-40/1-42 para cada grupo de diagnóstico del Ejemplo IV.

Tabla 1 representa patrones de péptidos A β en plasma, A β 1-42 y tau en LCR y datos demográficos de los grupos de diagnóstico del Ejemplo I.

60

Tabla 2 representa relaciones de A β 1-38/ A β 1-40 para los siguientes grupos de diagnóstico del Ejemplo II: pacientes con DLFT frente a CND y EA (Tabla 1a); DLFT frente a EA (Tabla 2b); DLFT frente a CND (Tabla 2c).

Tabla 3 representa la relación de A β 1-37/ A β 1-40 para los siguientes grupos de diagnóstico del Ejemplo II: pacientes con DLFT frente a CND y EA (Tabla 3a); DLFT frente a EA (Tabla 3b); DLFT frente a CND (Tabla 3c).

65

Tabla 4 representa la relación de $A\beta_{1-24}/A\beta_{1-38}$ para los siguientes grupos de diagnóstico del Ejemplo II: pacientes con DLFT frente a CND y EA (Tabla 4a); DLFT frente a EA (Tabla 4b); DLFT frente a CND (Tabla 4c); EA frente a CND (Tabla 4d).

5 **Tabla 5** representa la relación de $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-37}$ para los siguientes grupos de diagnóstico del Ejemplo II: pacientes con DLFT frente a CND y EA (Tabla 4a); DLFT frente a EA (Tabla 4b); DLFT frente a CND (Tabla 4c); EA frente a CND (Tabla 4d).

10 **Tabla 6** representa patrones de péptidos $A\beta$, $A\beta_{1-42}$ y tau en el LCR de los grupos de diagnóstico CND, EA y DLFT del Ejemplo II.

15 **Tabla 7** representa patrones de péptidos $A\beta$, $A\beta_{1-42}$ y tau en el LCR de los grupos de diagnóstico del Ejemplo III: CND (n=71), EA (n=71), DFT (n=36), demencia con cuerpos de Lewy (DCL, n=32), otras demencias (OD, n=93).

Tabla 8 representa las precisiones del diagnóstico de patrones de péptidos $A\beta$ en DLFT, EA y CND del Ejemplo II.

20 **Tabla 9** representa las precisiones del diagnóstico de patrones de péptidos $A\beta$ en EA, DFT, APP, entre otras demencias, y CND como se describe en Ejemplo III.

Tabla 10 representa abundancias absolutas y en porcentaje de especies de péptidos $A\beta$ en plasma, $A\beta_{1-42}$, tau en LCR y datos demográficos de los grupos de diagnóstico del Ejemplo IV.

Descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención

25 **Definiciones**

En esta descripción, el uso de los términos demencia vascular y enfermedad de Alzheimer se basa en los criterios de NINCDS-AIREN y NINCDS-ARDA, respectivamente. También es posible la aplicación de otros criterios como, por ejemplo, los criterios de ADDTC, y conduce a resultados comparables.

35 El término "biomarcador" es una característica que es objetivamente medida y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. El biomarcador puede describir, por ejemplo, una sustancia cuya detección indica un estado de enfermedad particular. El biomarcador puede ser un péptido que produce enfermedad o está asociado a susceptibilidad a enfermedad.

40 El término "fluidos corporales" incluye cualquier fluido que pueda obtenerse de un cuerpo de mamífero. Así, el término "fluidos corporales" también incluye homogeneizados de cualquier tejido y otra sustancia del cuerpo. Más particularmente, sin embargo, el término "fluidos corporales" incluye fluidos que son normalmente o anormalmente secretados por o eliminados del cuerpo. Los fluidos respectivos pueden incluir, pero no se limitan a: sangre, plasma, linfa, orina y líquido cefalorraquídeo, siendo sangre, plasma y líquido cefalorraquídeo los de más interés aquí.

45 El término "cuantificar el nivel" o "cuantificación de" puede referirse a medición absoluta o relativa del biomarcador. Puede usarse cualquier procedimiento para cuantificar el (los) nivel(es) de biomarcador en el fluido corporal. Por ejemplo, análisis cuantitativos pueden implicar técnicas tales como ELISA, SDS-PAGE/inmunotransferencia, o técnicas basadas en inmunocaptura (Lewczuk y col., 2004b). También pueden usarse otras técnicas, tales como inmunoensayos, usando marcado enzimático, marcado fluorescente y electroquimioluminiscencia para validar la medición de péptidos $A\beta$. Tales técnicas pueden implicar el uso de anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el biomarcador de interés. En un procedimiento, la cuantificación puede representar la relación de formas $A\beta$ truncadas del extremo carboxi con respecto a $A\beta_{1-42}$ total. En otro procedimiento, la cuantificación puede representar la relación de formas $A\beta$ truncadas del extremo carboxi con respecto a $A\beta_{1-40}$ truncadas del extremo carboxi. Las formas $A\beta$ truncadas también pueden incluir, pero no se limitan a, formas modificadas tales como la forma helicoidal oxidada de $A\beta_{1-40}^{ox}$.

55 Las dos notaciones $A\beta_{n-x}$ y $A\beta_n-x$ usadas en esta descripción no pretenden indicar diferentes especies de péptido β amiloide, sino la misma. Asimismo, no hay diferencia entre péptido β amiloide, péptido beta amiloide y $A\beta$.

60 El término "molécula que imita anticuerpo" se refiere a cualquier molécula que pueda unirse al epítipo del biomarcador de péptido $A\beta$. La molécula puede ser una forma sintética que comprende todas las características de un anticuerpo monoclonal.

65 El término "sensibilidad" se refiere a la capacidad de un biomarcador para identificar un porcentaje sustancial de mamíferos (por ejemplo, seres humanos) con la enfermedad. Una sensibilidad del 100 % significaría que un marcador puede identificar el 100 % de mamíferos con la enfermedad. La expresión matemática de la sensibilidad es el número de casos positivos verdaderos de enfermedad dividido entre el número de casos positivos verdaderos más el número de casos negativos falsos.

El término “especificidad” se refiere a la capacidad de un biomarcador para identificar un porcentaje sustancial de mamíferos (por ejemplo, seres humanos) sin la enfermedad. Una especificidad del 100 % significaría que un mamífero está sano. La expresión matemática de la especificidad es el número de casos positivos verdaderos dividido entre número de casos negativos verdaderos más el número de casos positivos falsos.

El término “control” se refiere a mamíferos sanos o mamíferos (por ejemplo, seres humanos) que padecen enfermedad mental que puede incluir, pero no se limita a, inestabilidad afectiva o emocional, desregulación conductual y/o disfunción o deterioro cognitivo. En un aspecto de la presente divulgación, control se refiere a un quejica cognitivo psiquiátrico (QCP) e incluye mamíferos que padecen cualquier trastorno psiquiátrico que pueda conducir a deficiencias cognitivas reclamadas por el individuo enfermo. Esto puede no necesariamente tener que verificar prueba cognitiva e incluye muchos trastornos psiquiátricos tales como esquizofrenia, depresión o trastornos del sueño de cualquier tipo. En otro aspecto de la presente divulgación, el control se refiere a controles de enfermedad no demente (CND). En general, se indican que los controles no tienen signos clínicos de ninguna forma de demencia. En detalle estos son (i) quejicas cognitivas psiquiátricas (QCP): pacientes que padecen algún trastorno psiquiátrico y se quejan sobre el deterioro cognitivo durante la evolución de la enfermedad, (ii) controles de enfermedad no demente (CND): pacientes que padecen algún tipo de enfermedad neurológica o psiquiátrica sin ningún síndrome de demencia, (iii) quejicas cognitivas depresivas (QCD): pacientes con quejas cognitivas en la evolución de depresión.

Ejemplo I

Se investigaron 13 pacientes con DV (7 hombres, 6 mujeres) en comparación con EA (n=10; 7 hombres, 3 mujeres) y controles depresivos (n=13; 6 hombres, 7 mujeres). El diagnóstico clínico se hizo según DSM-IV y los actuales criterios de consenso respectivos (Blacker y col., 1994; Roman y col., 1993). Además, los pacientes con DV se caracterizaron por signos típicos de enfermedad cerebrovascular en diagnóstico cerebral por imágenes (TAC o RMN), mientras que los pacientes con EA mostraron leves lesiones de la sustancia blanca como máximo. Los pacientes con EA se caracterizaron adicionalmente por bajos niveles de A β 1-42 y altos de tau en LCR usando la función lineal (A β 1-42=240+1,18xtau) de un estudio de validación grande de estos biomarcadores (Hulstaert y col., 1999). Los pacientes con enfermedad cerebrovascular relevante o atrofia focal clara en el diagnóstico cerebral por imágenes, puntuación de MMSE inferior a 26 o anamnesis de empeoramiento cognitivo persistente durante al menos seis meses se excluyeron del grupo de control depresivo.

Se tomaron muestras de plasma de todos los pacientes entre 2000 y 2004. La manipulación de las muestras siguió un protocolo normalizado según datos previamente publicados, excepto el periodo de tiempo hasta la congelación que osciló hasta 48 horas (Lewczuk y col., 2004). Para la cuantificación, los péptidos A β se enriquecieron de plasma usando inmunoprecipitación específica del extremo N (o amino) por el anticuerpo monoclonal 1E8, y la A β -SDS-PAGE/inmunotransferencia sirvió de análisis como se ha publicado en cualquier parte (Wiltfang y col., 2002; Bibl y col., 2004; Lewczuk y col., 2004). Las muestras se ejecutaron por triplicado como mínimo con respecto a las series de dilución de A β 1-37, A β 1-38, A β 1-39, A β 1-40, A β 1-42 y A β 2-40 sintético en cada gel. La sensibilidad de la detección de la A β -SDS-PAGE/inmunotransferencia fue 0,6-1 pg (Wiltfang y col., 2002; Bibl y col., 2004), los coeficientes de variaciones de las concentraciones de péptidos A β oscilaron entre el 14,0 y el 18,5 % (Lewczuk y col., 2004). Las cuantificaciones de péptidos A β en plasma se obtuvieron de transferencias individuales y los grupos de pacientes se caracterizaron por la media y desviación estándar. Estos datos se enumeran en la Tabla 1.

Los valores de péptido en plasma se indican como valores absolutos (pg/ml) o en porcentaje (cantidad de cada péptido con respecto a la suma de todos los péptidos A β investigados individuales) y de relación (cantidad de cada péptido con respecto a A β 1-40), respectivamente. Las diferencias significativas de grupos se evaluaron en la prueba de la U de Mann-Whitney. El nivel de significancia bilateral se tomó como p<0,05. Se usó el análisis de la curva característica de operación del receptor para determinar los puntos de corte al índice de Youden máximo. El coeficiente kappa se usó para la medición de acuerdo entre el diagnóstico clínico y la prueba neuroquímica. La transformación Z de Fisher sirvió de comparación de valores de kappa. Para los cálculos se usó el paquete de software estadístico SPSS, versión 10.0.

El grupo de CD fue significativamente más joven que el de EA (p=4,9x10⁻²) y DV (p=7x10⁻³). La puntuación de edad y MMSE no se diferenció significativamente entre DV (media \pm DE) y EA (media \pm DE). El tiempo promedio hasta la congelación no se diferenció entre los grupos de diagnóstico. La hipertensión fue predominante en el 23 %, 30 % y el 38 % de CD, EA y DV, respectivamente. La hipercolesterolemia fue predominante en el 31 %, 20 % y 15 % de CD, EA y DV, respectivamente.

Ninguno de los péptidos A β investigados, ninguno en absoluto, ni en términos de porcentaje, se correlacionó con la edad, MMSE o la aparición de hipertensión. La hipercolesterolemia predominante se correlacionó débilmente con mayor porcentaje de niveles de A β 1-38 (p=4,3x10⁻²). El tiempo hasta la congelación se correlacionó fuertemente con menores niveles de péptidos A β totales (p<0,01), pero lo más interesante no con ningún porcentaje de cantidad de péptidos A β . El sexo femenino se correlacionó débilmente con mayores niveles de A β 1-39, A β 1-40 y A β 1-42 (p<0,05).

CD y EA no mostraron diferencias significativas en ninguno de los péptidos investigados, ninguna en absoluto, ni en términos de porcentaje. A diferencia, A β 1-42 ($p=1,2 \times 10^{-2}$) y A β 2-40 ($p=8 \times 10^{-3}$) absolutos disminuyeron en DV con respecto a un grupo combinado de CD y EA. En términos de porcentaje, hubo una disminución de A β 1-37 ($p=8 \times 10^{-3}$), A β 1-38 ($p=6,9 \times 10^{-5}$), A β 1-39 ($p=8,7 \times 10^{-4}$), A β 1-42 ($p=8,2 \times 10^{-5}$) y A β 2-40 ($p=6,9 \times 10^{-5}$), igualado por elevadas cantidades de A β 1-40 ($p=4,6 \times 10^{-3}$) en DV con respecto a un grupo combinado de CD y EA.

Los péptidos más pronunciadamente disminuidos A β 1-38, A β 1-42 y A β 2-40 se combinaron cada uno con A β 1-40 a las relaciones A β 1-38/ A β 1-40, A β 1-42/ A β 1-40 y A β 2-40/ A β 1-40, respectivamente. La **Fig. 1** visualiza la relación A β 1-38/ A β 1-40 para los tres grupos de diagnóstico. El análisis de curvas de ROC como se representa en la **Fig. 2** reveló áreas bajo la curva (ABC) del siguiente modo: 0,92, 0,87 y 0,89 para A β 1-38/ A β 1-40, A β 1-42/ A β 1-40 y A β 2-40/ A β 1-40, respectivamente. Usando un punto de corte de 0,136, la relación A β 1-38/ A β 1-40 presentó una sensibilidad del 92 % para la detección de DV a una especificidad del 87 % en un grupo combinado de EA y CD. La potencia discriminativa de A β 1-38/ A β 1-40 entre DV y EA fue incluso mayor, dando una sensibilidad y especificidad del 92 % y 90 %, respectivamente, en el mismo punto de corte.

Cuando la DV se probó para A β 1-40 absoluta en comparación con un grupo combinado de EA y CD, el coeficiente kappa dio un valor de 0,386. A diferencia, el coeficiente kappa dio un valor de 0,767 para la relación A β 1-38/ A β 1-40. Después de la transformación Z de Fischer, la diferencia fue significativa al nivel de 0,05.

Discusión

Los resultados presentados sobre la caracterización detallada de especies de péptidos A β en plasma de DV en comparación con EA y controles depresivos están de acuerdo con estudios previos (Irizarry, 2004) respecto a A β 1-40 y A β 1-42. Lo más interesante, una publicación reciente por Gurol y col. (2006) informó de una elevada correlación de A β 1-40 con la carga de lesiones de la sustancia blanca en DCL, EA y AAC. Este efecto resultó ser independiente de posibles factores de confusión, tales como edad, sexo, hipertensión, diabetes mellitus, estado de APO-E, homocisteína, folato y B12. A β 1-40 elevada se interpretó como un posible factor de riesgo cerebrovascular, y combinado con los resultados de los presentes inventores, puede ser un posible biomarcador para distinguir EA pura de demencia por EA/DV mixta o DV pura, respectivamente. La función específica de A β 1-40 en DV está enfatizada por el hecho de que este péptido comprende el principal componente de placas de amiloide vascular, pero es menos abundante en placas de EA seniles (Gravina y col., 1995). Sigue sin respuesta la cuestión de si la reducción de péptidos A β en plasma distinto de A β 1-40 también puede o no estar estrechamente relacionada con la patología de amiloide cerebrovascular. Sin embargo, la potencia de diagnóstico de este efecto puede aumentarse cuando A β 1-40 se evalúa en relación con otros péptidos A β en plasma.

Ejemplo II

Un total de 90 pacientes, cuyas muestras de LCR se habían obtenido para análisis neuroquímico entre 2000 y 2004, se dividieron en 3 grupos de diagnóstico según su diagnóstico clínico: degeneración del lóbulo frontotemporal (DLFT), enfermedad de Alzheimer (EA) o controles de enfermedad no demente (CND). Las muestras de LCR se analizaron por A β -SDS-PAGE/inmunotransferencia para patrones de péptidos A β , y A β ₁₋₄₂ y proteína tau total se determinaron por ELISA.

Los pacientes se seleccionaron de salas y la clínica ambulatoria de demencia de la Universidad de Göttingen (Göttingen, Alemania). Cinco pacientes con EA procedieron de la clínica ambulatoria de demencia de la Universidad de Erlangen-Nuremberg (Erlangen, Alemania). Ambos centros especializados siguieron un protocolo normalizado de manipulación de muestras. Todas las mediciones y cuantificaciones neuroquímicas se realizaron en el laboratorio de neurobiología de la Universidad de Göttingen por dos asistentes técnicos con mucha experiencia cegados al diagnóstico clínico. El diagnóstico se estableció por un neurólogo, un psiquiatra y un neuropsicólogo, todos con mucha experiencia en el diagnóstico diferencial clínico de demencias basándose en anamnesis metódica, examen clínico, resultados de evaluación neuropsicológica, registros clínicos de los pacientes y el mejor criterio clínico. Los tres investigadores estuvieron cegados a los resultados del desenlace neuroquímico. Las investigaciones se llevaron a cabo con el consentimiento informado de todos los pacientes, o, para pacientes con demencia grave, su familiar más cercano. Si es posible, se realizó evaluación neuropsicológica por la mini-evaluación del estado mental (MMSE o prueba corta del rendimiento cognitivo (SKT) como mínimo) en pacientes que padecían deterioros cognitivos en el momento de la punción lumbar.

El estudio se realizó bajo las pautas de la Declaración de Helsinki (Organización Médica Mundial 1996) y autorizado por el comité ético de las Universidades de Göttingen y Erlangen-Nuremberg.

Pacientes con degeneración del lóbulo frontotemporal:

Los 30 pacientes (21 hombres y 9 mujeres) de este grupo cumplieron el diagnóstico y los criterios del Manual Estadístico de Trastornos Mentales, cuarta edición (DSM IV) y los criterios de consenso más recientes para DLFT (McKhann y col., 2001). Los criterios de consenso de Neary y col. (Neary y col., 1998) se aplicaron al diagnóstico clínico de DFT ($n = 24$), afasia progresiva primaria (APP, $n = 5$) y demencia semántica (DS, $n=1$), respectivamente.

La prueba neuropsicológica, que incluye MMSE, dibujo de reloj, la batería neuropsicológica del Consorcio para Establecer un Registro para Enfermedad de Alzheimer (CERAD) y examen más detallado por neurofisiólogos con experiencia se llevó a cabo en 24 pacientes. La MMSE estuvo disponible para 26 pacientes, la puntuación de MMSE media fue $20,7 \pm 8,9$ (media \pm DE (desviación estándar)). La evaluación neuropsicológica se dificultó en 4 pacientes debido a deficiencias lingüísticas o afásicas graves. La edad de este grupo era $61,6 \pm 11,5$ años (media \pm DE).

Todos los pacientes enrolados se sometieron a tomografía computerizada (TAC) o resonancia magnética nuclear (RMN) del cerebro. Las obtención de imágenes funcionales usando tanto tomografía computerizada de emisión de un único fotón (SPECT) con de 99mTc -hexametilpropilenoamina oxima o investigación de TEP con $[18\text{F}]$ fluorodesoxiglucosa de la circulación sanguínea cerebral regional estuvo disponible para 22 pacientes. Los pacientes incluidos presentaron atrofia focal frontal, frontotemporal o temporal anterior o marcado hipometabolismo. Los resultados de ELISA de $\text{A}\beta_{1-42}$ estuvieron disponibles para 22 pacientes, y ELISA de tau para 25 pacientes.

Pacientes con enfermedad de Alzheimer:

Los 30 pacientes (13 hombres y 17 mujeres) de este grupo cumplieron los criterios de DSM IV para EA y los criterios de NINCDS-ADRDA para diagnóstico clínico de EA probable (McKhann y col., 1984). La edad media de este grupo fue $65,4 \pm 7,3$ años (media \pm DE). La prueba neuropsicológica, que incluye MMSE, dibujo de reloj, CERAD y examen más detallado por neurofisiólogos con experiencia se llevó a cabo en 29 pacientes. MMSE no fue posible en un paciente debido a deficiencia cognitiva grave. La puntuación de MMSE media fue $19,3 \pm 5,4$ (media \pm DE) en este grupo. Todos los pacientes se sometieron a diagnóstico cerebral por imágenes estructurales por TAC o RMN. Los pacientes incluidos presentaron atrofia cortical global o atrofia focal temporal, parietotemporal, frontotemporal o se observó marcado hipometabolismo de estas regiones en 27 pacientes. No hubo resultados para diagnóstico cerebral por imágenes de tres pacientes. Los resultados de ELISA de $\text{A}\beta_{1-42}$ y ELISA de tau estuvieron disponibles para 26 pacientes.

Controles de enfermedad no demente (CND):

Este grupo consistió en 30 pacientes no dementes (10 hombres y 20 mujeres) que se sometieron a punción lumbar para el diagnóstico diferencial de demencia u otros motivos de diagnóstico diferencial. Los pacientes con empeoramiento cognitivo persistente durante más de seis meses, una puntuación de MMSE inferior a 26 o atrofia focal clara en diagnóstico cerebral por imágenes (TAC o RMN) se excluyeron del estudio.

La edad media de este grupo fue $61,5 \pm 11,1$ años (media \pm DE). El grupo incluyó pacientes que padecían depresión ($n=16$), ataques de pánico con vértigo ($n=1$), parálisis nerviosa facial periférica con borreliosis sin manifestación central ($n=1$), hemispasmo facial ($n=1$), síndrome antifosfolípidos ($n=1$), síndrome paraneoplásico ($n=2$), esquizofrenia ($n=1$), psicosis polimórfica ($n=1$), manía ($n=3$), trastorno bipolar afectivo ($n=1$), enfermedad de las neuronas motoras sin demencia ($n=1$) o insomnio ($n=1$). Para evaluar el estado mental cognitivo, todos los pacientes con síntomas cognitivos ($n=22$) se evaluaron por MMSE (mini-examen del estado mental). La puntuación de MMSE media fue $28,5 \pm 1,5$ (media \pm DE). El deterioro cognitivo de todos los pacientes depresivos mejoró después de la medicación antidepressora. El diagnóstico cerebral por imágenes (TAC o RMN) estuvo disponible para 21 pacientes. Los resultados de ELISA de $\text{A}\beta_{1-42}$ y ELISA de tau estuvieron disponibles para 23 pacientes.

$\text{A}\beta$ -SDS-PAGE/inmunotransferencia:

Un volumen de $10 \mu\text{l}$ de LCR se hirvió en tampón de muestra antes del análisis de péptidos $\text{A}\beta$ por SDS-PAGE. La $\text{A}\beta$ -SDS-PAGE/inmunotransferencia se realizó como se describe en cualquier parte (Wiltfang y col., 2002, Bibl y col., 2004).

Muestras de LCR de cada paciente se ejecutaron por triplicado, y cada gel se llevó a una serie de cuatro veces de dilución de los péptidos sintéticos $\text{A}\beta_{1-37}$, $\text{A}\beta_{1-38}$, $\text{A}\beta_{1-39}$, $\text{A}\beta_{1-40}$ y $\text{A}\beta_{1-42}$. Los péptidos sintéticos $\text{A}\beta_{1-38}$, $\text{A}\beta_{1-40}$, $\text{A}\beta_{1-42}$ se obtuvieron de Bachem (Bubendorf, Suiza), $\text{A}\beta_{1-37}$ y $\text{A}\beta_{1-39}$ se sintetizaron automáticamente según Janek y col. (Janek y col., 2001). Las series de dilución de péptidos $\text{A}\beta$ sintéticos se crearon como se ha descrito previamente (Bibl y col., 2004). En detalle, la disolución madre de péptidos $\text{A}\beta$ sintéticos ($0,5 \text{ mg/ml}$) se diluyó a 24 ng/ml ($\text{A}\beta_{1-40}$), 12 ng/ml ($\text{A}\beta_{1-38}$ y $\text{A}\beta_{1-42}$) y 6 ng/ml ($\text{A}\beta_{1-37}$ y $\text{A}\beta_{1-39}$). Los péptidos se mezclaron para crear la primera etapa de dilución de las series de dilución de péptidos $\text{A}\beta$ sintéticos y la mezcla se diluyó 1:2 tres veces más.

El anticuerpo monoclonal de ratón selectivo para el extremo amino 1E8 (Schering, Berlín, Alemania) se aplicó durante la noche a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para la detección del antígeno (extremo N con los dos primeros aminoácidos de péptidos $\text{A}\beta_{1-X}$). Se realizaron más incubaciones de 1 hora con un anticuerpo policlonal anti-ratón biotinilado (Vector Laboratories, Burlingame, California, EE.UU.) y estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano picante (Amersham Pharmacia Biotech, Hertfordshire, RU). Se realizaron etapas de lavado entre cada incubación. La visualización de las bandas resultantes fue por quimioluminiscencia potenciada (ECL). Se usó una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD) para cuantificar las bandas comparando con las series de dilución de péptidos $\text{A}\beta$ patrón.

La sensibilidad de detección de 1E8 en este procedimiento de inmunotransferencia optimizado fue 0,6 pg ($A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-40}$) y 1 pg ($A\beta_{1-37}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-42}$), respectivamente (Bibl y col., 2004). Los coeficientes de variación interanalítica e intranalítica fueron inferiores al 10 % para 80 y 20 pg de los péptidos $A\beta$ sintéticos (Wiltfang y col., 2002; Bibl y col., 2004).

5

DetECCIÓN DE ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA DE $A\beta_{1-38}$

Se aplicó la novedosa tecnología de detección de electroquimioluminiscencia (MSD) para determinar niveles de $A\beta_{1-38}$ en LCR independientemente de $A\beta$ -SDS-PAGE/inmunotransferencia. Se realizó según las recomendaciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). En resumen, placas de 96 pocillos Multi-Spot 4 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.), previamente recubiertas con el anticuerpo anti- $A\beta$ específico del extremo N 6E10, se bloquearon con disolución A durante una hora. Las placas se incubaron entonces durante una hora cada una con series de dilución de péptidos o muestras de LCR de 100 μ l, seguido de anticuerpo de detección de $A\beta$ 1-38 con SULFO-TAG del extremo C (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.) y tampón de lectura. El lavado con 1xtampón Tris se realizó entre todas las etapas de incubación. La luz emitida se leyó a una longitud de onda de - 620nm.

10

15

ELISA DE PROTEÍNA TAU Y ELISA DE $A\beta$ 1-42:

Los ensayos comercialmente disponibles INNOTEST[®] hTAU Antigen e INNOTEST[®] β -Amiloid (₁₋₄₂), Innogenetics (Gante, Bélgica) se usaron para la cuantificación de niveles de proteína tau y $A\beta$ 1-42, respectivamente, en LCR. Los ensayos se realizaron según procedimientos convencionales previamente publicados (Hulstaert y col., 1999).

20

La variabilidad interanalítica e intranalítica del ELISA de $A\beta$ 1-42 fue inferior al 10 %, la sensibilidad de detección para $A\beta$ 1-42 fue 50 pg/ml (Hulstaert y col., 1999).

25

Análisis estadístico:

Los niveles de péptidos $A\beta$ se expresaron como valores absolutos (ng/ml). Los datos de los niveles de péptidos se obtuvieron de transferencias individuales de cada muestra de paciente. Los grupos de pacientes se caracterizaron por media y desviación estándar (DE).

30

Se aplicó la prueba de la U de Mann-Whitney para evaluar diferencias de grupos significativas. Se usó la prueba del orden con signo de Wilcoxon para calcular diferencias significativas de dos muestras relacionadas. No se realizaron comparaciones múltiples.

35

El nivel de significancia bilateral se tomó como $p < 0,05$. Un valor de p inferior a 0,01 se consideró altamente significativo.

Se usó análisis de curvas características de operación del receptor (ROC) para determinar puntos de corte. Adicionalmente, el nivel de corte óptimo para dicotomizar valores se seleccionó como la situación que maximizaba el índice de Youden. Solo se presentan los valores de corte de mejor discriminación solos o en combinación.

40

Los cálculos se realizaron usando el paquete de software estadístico SPSS, versión 10.0.

45

Resultados:

La edad media de los grupos de diagnóstico no se diferenció significativamente ($p > 0,05$).

La puntuación de MMSE media entre DLFT y EA no se diferenció significativamente ($p > 0,05$), pero fue significativamente mayor para el grupo de CND ($p = 1,5 \times 10^{-7}$ y $1,5 \times 10^{-6}$, respectivamente).

50

La distribución por sexo estuvo desequilibrada entre los grupos de diagnóstico. Sin embargo, no se encontró correlación de ninguno de los péptidos $A\beta$ investigados con el sexo.

55

Patrones de péptidos $A\beta$ en $A\beta$ -SDS-PAGE/inmunotransferencia:

En presencia de urea, la $A\beta$ -SDS-PAGE/inmunotransferencia permitió la separación electroforética y posterior análisis de $A\beta_{1-37}$, $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$ y $A\beta_{1-40}$, además de $A\beta_{1-42}$. Todos los péptidos $A\beta$ migran como una banda única, si la urea está ausente en geles de separación de otro modo sin cambiar (**Fig. 3**).

60

La cantidad total de péptidos $A\beta$ no se diferenció significativamente entre los grupos de diagnóstico ($p > 0,05$). Ambos grupos de demencia, DLFT y EA, mostraron niveles absolutos disminuidos de $A\beta_{1-42}$ con respecto al grupo de CND como se mide por la $A\beta$ -SDS-PAGE/inmunotransferencia. Sin embargo, esta disminución fue mucho más pronunciada en EA ($p = 3,3 \times 10^{-4}$, para grupo de DLFT, y $p = 8,5 \times 10^{-10}$, para grupo de EA, respectivamente). A diferencia, los péptidos $A\beta$ truncados en Ct $A\beta_{1-37}$ y $A\beta_{1-38}$ se redujeron selectivamente en DLFT con respecto a

65

CND ($p=2,7 \times 10^{-4}$ y $p=4,2 \times 10^{-5}$) y EA ($p=2,5 \times 10^{-3}$ y $p=1,2 \times 10^{-3}$), respectivamente. A β 1-40 fue ligeramente elevado en DLFT y EA, mientras que se encontró que A β 1-39 se aumentaba solo en EA y disminuía en DLFT. Ninguna de estas alteraciones fue significativa. A diferencia, el porcentaje de concentración de A β 1-40 con respecto a la suma de todos los péptidos A β medidos (A β 1-40 %) aumentó significativamente en DLFT ($p=2,2 \times 10^{-7}$). Las abundancias absolutas y en porcentaje de péptidos A β de cada grupo de diagnóstico se resumen en la Tabla 6.

La disminución de niveles de A β 1-38 en DLFT permitió una distinción de EA con una sensibilidad del 77 % y especificidad del 67 %. La disminución menos pronunciada de A β 1-42 en DLFT permitió la discriminación de EA con una sensibilidad del 87 % y una especificidad del 70 %. De todos los péptidos investigados, estos dos péptidos mostraron la mayor precisión como marcador individual para diferenciar entre DLFT y EA. Esto motivó a los presentes inventores a investigar la precisión del diagnóstico de una combinación de ambos péptidos. La relación de A β 1-42 con A β 1-38 presentó una especificidad del 97 % y sensibilidad del 93 % para diferenciación de DLFT de EA.

A pesar de alteraciones similares de los dos péptidos en DLFT con respecto a CND, la relación de A β 1-42/ A β 1-38 no mostró precisión razonable en la diferenciación de DLFT de CND o en un grupo combinado de EA y CND.

Con una sensibilidad del 77 % y una especificidad del 73 %, la reducción de A β 1-38 en DLFT alcanzó la máxima precisión de diagnóstico entre los valores absolutos de cada péptido A β individual para diferenciar DLFT de CND.

Tomados conjuntamente con los niveles de A β 1-40 ligeramente elevados en DLFT, la relación de A β 1-38 con A β 1-40 mejoró la discriminación de DLFT y CND a una sensibilidad del 87 % y una especificidad del 90 %. Adicionalmente, esta relación proporcionó una sensibilidad del 87 % y una especificidad del 87 % para diferenciación de DLFT de EA.

Además, la relación de A β 1-38 con A β 1-40 alcanzó la mejor discriminación de DLFT entre tanto CND como EA, dando una sensibilidad y especificidad del 87 % y 88 %, respectivamente.

Los puntos de corte, sensibilidades y especificidades para cada procedimiento de prueba de diagnóstico diferencial se resumen en la Tabla 8.

Determinación de proteína tau y A β 1-42 por ELISA

La proteína tau se elevó significativamente en el grupo de EA ($p=3,6 \times 10^{-7}$), pero solo marginalmente en DLFT ($p>0,05$), con respecto a CND. Este ensayo alcanzó una sensibilidad del 91 % y una especificidad del 81 % para la discriminación de DLFT y EA. La sensibilidad y especificidad de la detección de DLFT entre CND fue del 50 % y 61 %, respectivamente.

Los grupos de DLFT y de EA mostraron valores absolutos reducidos de A β 1-42 en comparación con el grupo de CND como se mide por ELISA ($p=3 \times 10^{-3}$ y $9,7 \times 10^{-8}$, respectivamente). Los niveles absolutos de A β 1-42 discriminaron DLFT y EA con una sensibilidad del 91 % y una especificidad del 89 %. DLFT podría distinguirse de CND con una sensibilidad del 68 % y una especificidad del 70 %.

Combinando niveles de proteína A β 1-42 y tau en una relación de A β 1-42/tau, la potencia de diagnóstico de la prueba para la detección de DLFT entre EA aumentó a una sensibilidad del 86 % y una especificidad del 100 %. La sensibilidad y especificidad por detección de DLFT entre pacientes con CND fue del 81 % y 61 %, respectivamente. La detección de DLFT entre tanto CND como EA dio una sensibilidad del 100 % y especificidad del 45 %.

Los valores absolutos para A β 1-42 y tau como se mide por ELISA, y los puntos de corte, sensibilidades, especificidades e índice de Youden máximo para cada procedimiento de prueba de diagnóstico diferencial se resumen en las Tablas 6 y 8, respectivamente.

Niveles de A β 1-42 medidos por diferentes procedimientos

A β 1-42 se midió por tanto el ELISA comercialmente disponible como A β -SDS-PAGE/inmunotransferencia. La comparación de valores reveló mayores niveles de A β 1-42 cuando se determinó por A β -SDS-PAGE/inmunotransferencia. En un total de 71 muestras de paciente, la diferencia fue altamente significativa ($p=2,8 \times 10^{-12}$). Se encontró que el grado de diferencia por grupo de diagnóstico era del siguiente modo: $p=4,6 \times 10^{-6}$ para el grupo de CND ($n=23$), $2,1 \times 10^{-5}$ para EA ($n=26$) y $1,2 \times 10^{-4}$ para DLFT ($n=22$).

Ejemplo III

303 muestras de pacientes de LCR consecutivas obtenidas entre 1999 y 2004 se investigaron prospectivamente. Setenta y cuatro de estos pacientes habían sido investigados en estudios previos bajo otro objetivo y los resultados se han publicado. Estos pacientes se agruparon por diagnóstico del siguiente modo: CND ($n=15$), EA ($n=21$), DCL ($n=20$) y OD ($n=18$).

5 LCR de pacientes diagnosticados como que tienen EA, DFT y otras demencias, además de tres pacientes con depresión, se obtuvieron de la clínica de memoria de la Universidad de Goettingen, y muestras de otros controles de enfermedad no demente se obtuvieron de pacientes ambulatorios. Muestras de 7 pacientes con EA procedieron de la clínica ambulatoria de demencia de la Universidad de Erlangen-Nuremberg. Las muestras de LCR de pacientes hospitalizados con enfermedad de Parkinson (EP), demencia asociada a enfermedad de Parkinson (DEP) y DCL se recogieron en la clínica Paracelsus-Elena, Kassel, Alemania, que está especializada en el diagnóstico y tratamiento de trastornos del movimiento.

10 Los diagnósticos fueron hechos por un psiquiatra, un neurólogo y un neuropsicólogo, todos con mucha experiencia en el diagnóstico diferencial clínico de demencias basándose en anamnesis meticulosa, examen clínico, resultados de evaluación neuropsicológica, registros clínicos y mejor criterio clínico. Los tres investigadores estuvieron cegados a los resultados de las mediciones del desenlace neuroquímico. Las investigaciones se llevaron a cabo con el consentimiento informado de los pacientes o su cuidador autorizado. Si es posible, se realizó evaluación neuropsicológica (MMSE como mínimo) en pacientes que padecían deterioros cognitivos en el momento de la punción lumbar. El estudio se realizó bajo las pautas de la Declaración de Helsinki y autorizado por los comités éticos de las Universidades de Goettingen, Erlangen-Nuremberg y Hessen.

Controles de enfermedad no demente (CND):

20 Se excluyeron pacientes con una historia de empeoramiento cognitivo persistente durante más de seis meses, puntuación de MMSE inferior a 26 o atrofia focal clara en el diagnóstico cerebral por imágenes.

El grupo de CND consistió en tres subgrupos:

25 Enfermedades neurológicas periféricas sin afección orgánica cerebral (ENP):

30 Veinte pacientes (13 hombres y 7 mujeres) se sometieron a punción lumbar para exclusión de afección nerviosa central en casos de polineuropatía (n=11), parálisis nerviosa facial periférica (n=3), vértigo postural paroxístico benigno (n=2), hernia de disco intervertebral (n=1), hemiespasma facial (n=1), parálisis espinal espástica hereditaria dominante autosómica (n=1) y enfermedad de Lyme sin afección nerviosa central (n=1). La edad media de este subgrupo fue $63,0 \pm 10,3$ años (media \pm DE).

Enfermedades neurodegenerativas sin demencia (EN):

35 Veinticinco pacientes (14 hombres y 11 mujeres) se sometieron a punción lumbar para excluir enfermedad nerviosa central inflamatoria crónica en casos de enfermedad de Huntington genéticamente reconfirmada (n=10), enfermedad de Parkinson (n=7), atrofia multisistémica (n=5), ataxia espinocerebelosa (n=2) y esclerosis lateral amiotrófica (n=1). La puntuación de MMSE en pacientes con síntomas cognitivos (n=9) fue $28,2 \pm 1,6$ (media \pm DE). Ninguno de estos pacientes mostró rasgos clínicos de demencia. La edad media de este subgrupo fue $62,3 \pm 9,5$ años (media \pm DE).

40 Quejicas cognitivos depresivos (QCD):

45 Veintiséis pacientes depresivos (8 hombres y 18 mujeres) se sometieron a punción lumbar para diagnóstico diferencial de síntomas cognitivos durante la evolución de la enfermedad. El diagnóstico de depresión se hizo según los criterios de DSM IV y el deterioro cognitivo se evaluó por MMSE como mínimo. La puntuación de MMSE media fue $28,6 \pm 1,4$ (media \pm DE). La edad media de este subgrupo fue $62,9 \pm 10,3$ años (media \pm DE).

Pacientes con enfermedad de Alzheimer:

50 Setenta y un pacientes (29 hombres y 42 mujeres) cumplieron los criterios de DSM IV y los criterios de NINCDS-ADRDA para diagnóstico clínico de AD⁹. El diagnóstico cerebral por imágenes estructurales (TAC o RMN) o funcionales (SPECT o TEP), respectivamente, mostró atrofia cortical global; atrofia focal temporal, parietotemporal o frontotemporal; o hipometabolismo marcado de estas regiones.

55 Pacientes con demencia con cuerpos de Lewy (DCL):

Treinta y dos pacientes (19 hombres y 13 mujeres) cumplieron los criterios de DSM IV para demencia y los criterios de McKeith para diagnóstico clínico de DLB¹⁰.

60 Los pacientes presentaron al menos dos rasgos centrales según los criterios y parkinsonismo durante menos de un año antes de la aparición de demencia. Los pacientes enrolados se hospitalizaron durante varios días para evaluar cognición fluctuante, síntomas extrapiramidales y alucinaciones visuales.

Pacientes con demencias frontotemporales (DFT):

Los 36 pacientes (22 hombres y 14 mujeres) de este grupo cumplieron los criterios de DSM IV y de consenso para DFT. La prueba neuropsicológica detallada adicional a MMSE, que incluye dibujo de reloj y CERAD, se llevó a cabo en 23 pacientes. La evaluación neuropsicológica se dificultó en 5 pacientes por deficiencias lingüísticas y cognitivas graves. El diagnóstico cerebral por imágenes estructurales (TAC o RMN) o funcionales (SPECT o TEP) reveló atrofia focal frontal o frontotemporal o marcado hipometabolismo.

Pacientes con otras demencias (OD):

Noventa y tres pacientes (57 hombres y 36 mujeres) cumplieron los criterios de DSM IV para demencia.

Los pacientes con afasia progresiva primaria (APP) (n=10) cumplieron los criterios de consenso de Neary y col. El diagnóstico cerebral por imágenes estructurales o funcionales (SPECT o TEP) reveló atrofia focal temporal anterior izquierda o marcado hipometabolismo.

El diagnóstico de demencia vascular (DV) se hizo en 27 pacientes según criterios de NINDS-AIREN. Todos los pacientes presentaron signos de enfermedad vascular relevante en el diagnóstico cerebral por imágenes estructurales (TAC o RMN).

La demencia asociada a enfermedad de Parkinson (DEP) se diagnosticó en 21 pacientes según los criterios de diagnóstico clínico del Banco de Cerebros de la Sociedad de la Enfermedad de Parkinson del Reino Unido para enfermedad de Parkinson idiopática y los criterios de consenso. Todos los pacientes presentaron parkinsonismo al menos un año antes de la aparición de la demencia.

Se diagnosticó hidrocefalia de tensión normal según los criterios propuestos de Ishikawa en nueve pacientes. Todos estos pacientes presentaron al menos dos síntomas de la tríada típica y mejoraron después de punción lumbar.

Seis pacientes cumplieron los criterios de parálisis supranuclear progresiva probable según criterios de NINDS-SPSP establecidos.

Se diagnosticó que seis pacientes tenían degeneración corticobasal según los criterios establecidos.

Se evaluaron siete pacientes que padecían enfermedad de Creutzfeld-Jakob (ECJ) esporádica según criterios establecidos en la unidad de vigilancia nacional para encefalopatías espongiiformes transmisibles en Goettingen, Alemania.

Se evaluaron siete pacientes con síndrome de Korsakow según los criterios de Oslin y colaboradores.

La edad media y puntuación de MMSE de cada grupo de pacientes se facilitan en la Tabla 7.

MÉTODOS DE ENSAYO

La manipulación pre-analítica de muestras de LCR siguió un protocolo normalizado según datos previamente publicados.

A β -SDS-PAGE/inmunotransferencia

Para análisis de péptidos A β , 10 μ l de LCR se hirvieron en tampón de muestra de SDS-PAGE, se separaron sobre geles de SDS-PAGE de N,N-bis-(2-hidroxietil)-glicina/bis-Tris/Tris/sulfato que contienen urea y la A β -SDS-PAGE/inmunotransferencia se realizó como se ha publicado en cualquier parte.

Muestras de LCR de cada paciente individual se ejecutaron por triplicado. Las bandas se cuantificaron a partir de transferencias individuales de cada paciente con respecto a una serie de dilución de cuatro puntos de péptidos A β sintéticos usando una cámara con dispositivo de carga acoplada. La sensibilidad de detección fue 0,6 pg (A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₄₀) y 1 pg (A β ₁₋₃₇, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₂), respectivamente. Los coeficientes de variación interanalítica e intranalítica para 20 a 80 pg de péptidos A β sintéticos fueron inferiores al 10 %.

Todas las mediciones y cuantificaciones neuroquímicas se realizaron en el laboratorio de neurobiología de la Universidad de Goettingen entre 2003 y 2006 por dos asistentes técnicos con mucha experiencia cegados al diagnóstico clínico.

DetECCIÓN DE ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA DE A β 1-38

Se aplicó la novedosa tecnología de detección de electroquimioluminiscencia (MSD) para determinar niveles de A β ₁₋₃₈ en LCR independientemente de A β -SDS-PAGE/inmunotransferencia. Se realizó según las recomendaciones del

fabricante (Meso Scale Discovery). En resumen, placas de 96 pocillos Multi-Spot 4, previamente recubiertas con el anticuerpo anti-A β específico del extremo N 6E10, se bloquearon con disolución A durante una hora. La placa se incubó entonces con series de dilución de péptidos o muestra de LCR de 100 μ l, seguido de anticuerpo de detección de A β ₁₋₃₈ con SULFO-TAG del extremo C y tampón de lectura, cada uno durante una hora. El lavado con 1x tampón Tris se realizó entre las etapas de incubación. La medición de la luz emitida se realizó a - 620 nm.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los grupos de pacientes se caracterizaron por media y desviación estándar. Los valores de péptidos A β se administran en valores absolutos (ng/ml) y en porcentaje con respecto a la suma de todos los péptidos A β investigados (A β _{1-x} %). Se empleó la prueba de la U de Mann-Whitney para determinar diferencias significativas de grupos de diagnóstico (muestras de datos independientes). Las comparaciones de múltiples grupos (edad, MMSE) se evaluaron por la prueba de Kruskal-Paredis. Las correlaciones de valores medidos se estimaron por rho de Spearman. El nivel de significancia bilateral se tomó como $p < 0,05$. Las precisiones del diagnóstico global se evaluaron por el área bajo la curva (ABC) de la curva característica de operación del receptor (ROC). Los puntos de corte se determinaron al índice de Youden máximo, proporcionando una sensibilidad del ≥ 85 %. Los paquetes de software estadístico SPSS, versión 10.0, y SAS, versión 8.2 sirvieron para los cálculos.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS

La edad media de DFT y CND fue significativamente menor que la de todos los otros grupos de pacientes. La puntuación de MMSE media no se diferenció significativamente entre los grupos de demencia. La A β -SDS-PAGE/inmunotransferencia reveló un patrón abundante regular de seis péptidos: A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₄₂, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₃₇ y A β ₁₋₄₀^{ox}.

No se encontró correlación de los péptidos A β investigados con la edad en ninguno de los grupos de diagnóstico.

Fenotipo neuroquímico en CND

No hubo diferencia significativa entre ENP y EN. A diferencia, QCD presentó mayores niveles absolutos de A β ₁₋₃₇ ($p=1,3 \times 10^{-3}$), A β ₁₋₃₈ ($p=4,9 \times 10^{-2}$) y A β ₁₋₄₂ ($p=4,0 \times 10^{-3}$) que un grupo combinado de ENP y EN. En términos de porcentaje, A β ₁₋₃₇ % ($p=2,9 \times 10^{-4}$) y A β ₁₋₄₂ % ($p=1,5 \times 10^{-3}$) aumentaron, igualado por valores disminuidos de A β ₁₋₄₀ % ($p=3,3 \times 10^{-3}$) y A β ₁₋₄₀^{ox} % ($p=1,4 \times 10^{-2}$) en QCD.

Fenotipo neuroquímico en EA

EA frente a CND:

EA presentó niveles de A β ₁₋₄₂ claramente disminuidos en términos absolutos ($p=7,4 \times 10^{-19}$) y de porcentaje ($p=3,8 \times 10^{-24}$), mientras que los niveles de A β ₁₋₄₀^{ox} aumentaron en términos absolutos ($p=1,1 \times 10^{-2}$) y de porcentaje ($p=1,8 \times 10^{-5}$). Adicionalmente, hubo un aumento en porcentaje de todos los péptidos con truncación del extremo C que fueron más cortos que A β ₁₋₄₂, que pasa el nivel de significancia para A β ₁₋₃₇ % y A β ₁₋₃₈ %. La elevación de A β ₁₋₃₈ % fue altamente significativa en comparación con el grupo de ND ($p=4,6 \times 10^{-3}$).

EA frente a otras demencias

Una disminución específica de A β ₁₋₄₂ fue evidente en EA, mientras que otras demencias con bajos niveles de A β ₁₋₄₂ mostraron una disminución global de todos los péptidos A β . Correspondientemente, A β ₁₋₄₂ se redujo en términos absolutos ($p=4,1 \times 10^{-7}$) y de porcentaje ($p=7,6 \times 10^{-22}$). A diferencia, los niveles absolutos de A β ₁₋₃₇ ($p=2,5 \times 10^{-2}$), A β ₁₋₃₈ ($p=5,0 \times 10^{-5}$), A β ₁₋₃₉ ($p=2,4 \times 10^{-3}$) y A β ₁₋₄₀ ($p=6,3 \times 10^{-3}$) fueron elevados. En términos de porcentaje, las alteraciones anteriormente mencionadas solo estuvieron presentes para A β ₁₋₃₈ %, A β ₁₋₃₉ % y A β ₁₋₄₂ %, respectivamente.

Fenotipo neuroquímico en DFT

DFT frente a CND

DFT mostró menores niveles de A β ₁₋₃₇ ($p=2,3 \times 10^{-4}$), A β ₁₋₃₈ ($p=9,6 \times 10^{-7}$) y A β ₁₋₄₂ ($p=6 \times 10^{-5}$). En términos de porcentaje, hubo un aumento adicional de valores de A β % ($p=7 \times 10^{-10}$).

DFT frente a otras demencias:

DFT presentó menores niveles de A β ($p=2,1 \times 10^{-2}$) y A β ^{ox} ($p=5,0 \times 10^{-3}$), mientras que los niveles de A β fueron elevados ($p=3,8 \times 10^{-3}$). En términos de porcentaje, hubo dos disminuciones en A β ₁₋₃₇ % ($p=2,5 \times 10^{-4}$), A β ₁₋₃₈ % ($p=3,5 \times 10^{-15}$), A β ₁₋₃₉ % ($p=1,0 \times 10^{-2}$) y A β ₁₋₄₀^{ox} % ($p=2,6 \times 10^{-4}$), igualado por niveles elevados para A β ₁₋₄₀ % ($p=1,9 \times 10^{-5}$) y A β ₁₋₄₂ % ($p=6,2 \times 10^{-4}$). En comparación con APP, hubo disminución de niveles absolutos de A β ₁₋₃₇ ($p=1,1 \times 10^{-2}$), A β ₁₋₃₈ ($p=1 \times 10^{-2}$) y A β ₁₋₃₉ ($p=1,8 \times 10^{-2}$) en DFT. Los niveles de significancia fueron del siguiente modo (para A β ₁₋₃₈

% también véase la Fig. 7):

	A β 1-37 (ng/ml)	A β 1-38 (ng/ml)	A β 1-37 %	A β 1-38 %
valor de p	,043	,003	,011	,010

Adicionalmente, A β ₁₋₄₀ % fue elevado ($p=1,8 \times 10^{-3}$) en DFT.

5

A β ₁₋₃₈ en la A β -SDS-PAGE/inmunotransferencia y detección de electroquimioluminiscencia (MSD)

Se reevaluó un total de 150 pacientes usando la novedosa tecnología de detección de electroquimioluminiscencia (MSD). Los diagnósticos fueron CND (n=37), EA (n=31), DCL (n=2), OD (n=47) y DFT (n=33). Los niveles absolutos observados de concentración de péptido fueron considerablemente menores usando MSD en comparación con la A β -SDS-PAGE/inmunotransferencia (véase la tabla 7). En cambio, hubo una fuerte correlación de valores entre los dos procedimientos de medición independientes (ρ de Spearman= 0,45, $p=7,9 \times 10^{-9}$) (véase la Fig. 4).

10

CÁLCULOS ESTIMADOS

15

Diagnóstico diferencial neuroquímicamente soportado

Diagnóstico de EA

20

La notable disminución de A β ₁₋₄₂ % permitió contrastes más allá del 85 % para la discriminación de EA entre el total de todos los pacientes investigados. Una sensibilidad del 85 % dio una especificidad del 81 % para exclusión de todas las demencias de no Alzheimer. Debido a los valores reducidos de A β ₁₋₃₈ y una disminución menos marcada de A β ₁₋₄₂ en demencias distintas de EA, la relación de A β ₁₋₃₈ con A β ₁₋₄₂ (A β ₁₋₄₂/ A β ₁₋₃₈) mejoró la prueba ligeramente para contrastes del 85 % o más allá para todas las cuestiones de diagnóstico diferencial investigadas. De otro modo, los únicos valores absolutos de A β ₁₋₄₂ dieron una especificidad del 50 % para exclusión de demencias de no Alzheimer, cuando la sensibilidad para detección de EA se fijó a un mínimo del 85 %.

25

Diagnóstico de DFT

30

El pronunciado porcentaje de reducción de A β ₁₋₃₈ % en DFT presentó precisiones satisfactorias superiores al 85 % para discriminación entre todas las otras demencias y CND. La combinación de niveles de A β ₁₋₃₈ disminuidos y de A β ₁₋₄₀ elevados (A β ₁₋₃₈/A β ₁₋₄₀) fracasó precisamente en cumplir los requisitos para diferenciación de DFT y otras demencias, pero todavía presentó contrastes de más allá del 85 % para diferenciación de DFT de CND. La pérdida de precisión de la relación de A β ₁₋₃₈/A β ₁₋₄₀ con respecto a A β ₁₋₃₈ % fue principalmente debida a elevados niveles de A β ₁₋₄₀ en pacientes con EA, DCL y APP individuales.

35

EJEMPLO IV

40

Este ejemplo tuvo como objetivo obtener conocimiento detallado sobre los patrones de péptidos A β en plasma en DV y DFT.

45

Se investigaron 28 muestras de plasma obtenidas entre 2000 y 2005. Las muestras de plasma y de LCR de pacientes con EA, DV, DFT y con depresión procedieron de la clínica de memoria del Departamento de Psiquiatría, Universidad de Goettingen, o de pacientes hospitalizados. Todos los pacientes, excepto pacientes con DFT y uno con demencia vascular, se han investigado en un estudio previo y los resultados se han publicado (Bibl y col., 2007a)

50

Un psiquiatra y un neurólogo, ambos con mucha experiencia en diagnóstico diferencial clínico de demencias, hicieron diagnósticos basándose en anamnesis meticulosa, examen clínico, resultados de evaluación neuropsicológica, registros clínicos y el mejor criterio clínico. Estos investigadores se cegaron a las medidas del desenlace neuroquímico. Las investigaciones se llevaron a cabo con el consentimiento informado de los pacientes o su cuidador autorizado. Si es posible, se realizó evaluación neuropsicológica (MMSE como mínimo) en pacientes que padecían deterioros cognitivos en el momento de la punción lumbar. El estudio se realizó bajo las pautas de la Declaración de Helsinki (Organización Médica Mundial 1996) y autorizado por el comité ético de la Universidad de Goettingen, Erlangen-Nuremberg y Hessen.

55

Controles depresivos no dementes (CD):

60

Los 7 pacientes con depresión (2 hombres y 5 mujeres) se sometieron a punción lumbar para diagnóstico diferencial de síntomas cognitivos durante la evolución de la enfermedad. El diagnóstico de depresión se hizo según los criterios de DSM IV y el deterioro cognitivo se evaluó por MMSE como mínimo. Se excluyeron pacientes con historia de empeoramiento cognitivo persistente durante más de seis meses, puntuación de MMSE inferior a 26, atrofia focal clara o con signos de enfermedad vascular relevante en el diagnóstico cerebral por imágenes.

Pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA):

Estos 7 pacientes (2 hombres y 5 mujeres) cumplieron los criterios de DSM IV y los criterios de NINCDS-ADRDA para diagnóstico clínico de EA (McKhann y col. 1984). Los pacientes con EA no mostraron signos de enfermedad cerebrovascular relevante en ninguno de TAC o RMN.

Pacientes con demencias vasculares (DV) y EA con ECV:

Los presentes inventores investigaron 7 pacientes con DV (3 hombres y 4 mujeres) según los criterios de DSM IV y de NINDS-AIREN (Roman y col. 1993). Los pacientes se caracterizaron adicionalmente por la escala isquémica de Hachinski en su versión modificada según Fischer y col. (1991) y se excluyeron los pacientes con una puntuación inferior a seis. Todos los pacientes incluidos presentaron signos típicos de enfermedad cerebrovascular relevante en el diagnóstico por neuroimagen (tomografía computerizada, resonancia magnética nuclear). La Tabla 10 muestra las características de los pacientes de cada grupo de pacientes.

Pacientes con demencia frontotemporal (DFT):

Los 7 pacientes (5 hombres y 2 mujeres) de este grupo cumplieron los criterios de DSM IV y de consenso para DFT (Neary y col. 1998). El diagnóstico cerebral por imágenes estructurales (TAC o RMN) o funcionales (SPECT o TEP) reveló atrofia focal frontal o frontotemporal o marcado hipometabolismo.

MÉTODOS DE ENSAYO

Se extrajeron LCR y plasma de pacientes por punción lumbar y venosa, respectivamente, en el mismo día. La manipulación preanalítica de muestras siguió un protocolo normalizado según datos previamente publicados, excepto que el periodo de tiempo hasta la congelación de plasma osciló hasta 12 horas (Lewczuk y col. 2004).

No se realizó ninguna etapa de temperatura intermedia, ni congelación rápida. No hubo ciclo de congelación y descongelación adicional antes del análisis. El LCR se muestreó en viales de polipropileno y se centrifugó (1000 g, 10 min y 4 °C). Alícuotas de 200 µl de LCR se mantuvieron a +4 °C y se analizaron en el plazo de 48 horas.

Dos asistentes técnicos con experiencia cegados al diagnóstico clínico realizaron todas las mediciones y cuantificaciones neuroquímicas en el laboratorio del Departamento de Psiquiatría, Universidad de Goettingen.

Inmunoprecipitación y Aβ-SDS-PAGE/inmunotransferencia de plasma

Para inmunoprecipitación, Dynabeads M-280 de oveja magnéticas anti-IgG de ratón (Dyna, Hamburgo, Alemania) se incubaron durante la noche a +4 °C con el anticuerpo monoclonal selectivo para el extremo amino de Aβ, 1E8 (proporcionado por Schering, Berlín, Alemania) según el protocolo del fabricante. Quinientos µl de plasma se añadieron a 200 µl de tampón de detergente RIPA concentrado cinco veces (Wiltfang y col. 2002), 25 µl de Dynabead magnéticas activadas (1 µg de mAb 1E8/1,68 x 10⁷ perlas) y 300 µl de H₂O. Entonces, las muestras se incubaron durante la noche a +4 °C bajo rotación, siguiendo lavado de las perlas cuatro veces con PBS/0,1 % de albúmina de suero bovino y una vez con Tris/HCl 10 mM, pH 7,4. Para Aβ-SDS-PAGE/inmunotransferencia, péptidos Aβ unidos se eluyeron calentando las muestras a 95 °C durante 5 min con 25 µl de tampón de muestra de SDS-PAGE (Wiltfang y col. 2002).

Para la separación de péptidos Aβ, la versión de urea de SDS-PAGE de glicina/bis-Tris/Tris/sulfato se usó como se describe por Wiltfang y col. (2002). Brevemente, plasma inmunoprecipitado (5 µl de inmunoprecipitado) en tampón de muestra de SDS-PAGE se aplicó a una ranura de gel. Después de ejecutar los geles a una corriente constante de 24 mA por gel a temperatura ambiente durante 1 h, se realizó transferencia Western semiseca según el protocolo de Wiltfang y col. (2002). Para detección inmunológica de péptidos Aβ sobre membranas de PVDF, el anticuerpo monoclonal de ratón selectivo para el extremo amino 1E8 (proporcionado por Schering, Berlín, Alemania; disolución madre: 0,25 mg/ml) se diluyó 4000 veces y se aplicó durante la noche a 4 °C. Las membranas se incubaron adicionalmente con un anticuerpo policlonal anti-ratón biotinilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.) y estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano picante (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) durante 1 h cada una. Entremedias se realizaron etapas de lavado y la visualización quimioluminiscente se hizo por ECL-Plus solution (Amersham Pharmacia).

Se ejecutaron muestras de plasma y patrones de péptido sobre el mismo gel por triplicado como mínimo. Cada gel llevó una serie de disolución de cinco puntos de péptidos Aβ sintéticos Aβ1-37, Aβ1-38, Aβ1-39, Aβ1-40 y Aβ1-42. Aβ2-40 solo se aplicó en las dos concentraciones inferiores, debido a que las bandas de Aβ2-40 y Aβ1-42 tendieron a difundir en una única banda cuando se aplicaron mayores concentraciones. Así, las tres mayores concentraciones de series de dilución de Aβ1-42 se usaron para complementar la fila patrón de Aβ2-40. Los péptidos sintéticos Aβ1-38, Aβ1-40, Aβ1-42 y Aβ2-40 se obtuvieron de Bachem (Bubendorf, Suiza), Aβ1-37 y Aβ1-39 se sintetizaron automáticamente según Janek y col. (Janek K y col. 2001). Las preparaciones patrón de mezcla de péptidos Aβ sintéticos se crearon como se ha descrito previamente (Bibl M y col. 2004) y las bandas se cuantificaron a partir de

transferencias individuales de cada paciente con respecto a esta serie de dilución usando una cámara con dispositivo de carga acoplada (cámara CCD) y el software Quantity-ONE (FluorSMax Multilmager, Bio-Rad)

5 La sensibilidad de detección de la A β -SDS-PAGE/inmunotransferencia fue 0,6-1 pg (Wiltfang y col. 2002, Bibl y col. 2004). Los coeficientes de variación de las concentraciones de péptidos A β oscilaron entre el 14,0 y el 18,5 % (Lewczuk y col. 2004).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

10 Se caracterizaron grupos de pacientes por media y desviación estándar. Se administran niveles de péptidos en LCR en valores absolutos (pg/ml). Los valores de péptidos en plasma se administran en valores absolutos (pg/ml) o de porcentaje (cantidad de cada péptido con respecto a la suma de todos los péptidos A β investigados individuales), respectivamente. Se evaluaron diferencias significativas de grupos con la prueba de la U de Mann-Whitney. Se evaluaron comparaciones de múltiples grupos por la prueba de Kruskal-Paredis. Se usó rho de Spearman para análisis de correlación. Los presentes inventores usaron el coeficiente de correlación biserial para determinar la relación entre diagnóstico clínico y prueba neuroquímica. La transformación Z de Fisher sirvió para la comparación de coeficientes de correlación biserial. El nivel bilateral de significancia se tomó como $p < 0,05$. Las precisiones del diagnóstico globales se evaluaron por el área bajo la curva (ABC) de la curva característica de operación del receptor (ROC). Los puntos de corte se determinaron al índice de Youden máximo, proporcionando una sensibilidad ≥ 85 %. El paquete de software estadístico SPSS, versión 10.0, se usó para cálculos.

RESULTADOS

Diferencias de grupos

25 La edad no se diferenció significativamente entre los grupos de diagnóstico. El tiempo promedio hasta la congelación y puntuación de MMSE, respectivamente, no se diferenció significativamente entre EA, DFT o DV (media \pm DE).

Péptidos A β en plasma en EA

30 Los péptidos A β en plasma en CD y EA no se diferenciaron significativamente.

Péptidos A β en plasma en DV

35 La comparación de DV con un grupo combinado de CD y EA reveló altos valores absolutos de A β 1-40 ($p=5,6 \times 10^{-3}$) y A β 1-39 ($p=3,1 \times 10^{-3}$) en DV. Por consiguiente, la suma de todos los A β investigados fue superior en DV ($p=4,2 \times 10^{-3}$). En términos de porcentaje, éste se expresó por una disminución de A β 1-38 ($p=1 \times 10^{-2}$), A β 1-42 ($p=1,6 \times 10^{-3}$) y A β 2-40 ($p=4,6 \times 10^{-2}$), igualado por elevadas cantidades de A β 1-40 ($p=1,6 \times 10^{-2}$) en DV.

Péptidos A β en plasma en DFT

40 La comparación de DFT con un grupo combinado de CD y EA no reveló diferencia significativa en ninguno de los péptidos A β investigados en términos absolutos. En cambio, las cantidades en porcentaje de A β 1-37 ($p=5,6 \times 10^{-3}$) y A β 1-38 ($p=1,1 \times 10^{-3}$) disminuyeron significativamente en DFT, mientras que los niveles en porcentaje de A β 1-40 aumentaron en DFT ($p=4,6 \times 10^{-2}$).

Péptidos A β en plasma en DFT frente a DV

50 De forma interesante, DFT y DV mostraron similitudes en elevados niveles en porcentaje de A β 1-40 y disminuidos niveles en porcentaje de A β 1-38 con respecto a CD y EA. En cambio, los niveles en porcentaje de A β 1-42 y A β 2-40 solo disminuyeron en DV, pero no en DFT.

55 La comparación directa de DFT y DV reveló niveles pronunciadamente disminuidos de niveles absolutos de A β 1-37 ($p=3,8 \times 10^{-2}$) y A β 1-38 ($p=3,8 \times 10^{-2}$) en DFT. De otro modo, los niveles en porcentaje de niveles de A β 1-42 bajan en DV ($p=7,0 \times 10^{-3}$)

EXACTITUD DE LOS ENSAYOS

Diagnóstico de DV

60 El diagnóstico positivo de DV entre CD y EA podría respaldarse más eficazmente por niveles elevados de A β 1-40 acompañados por niveles reducidos de A β 1-38 y A β 1-42, respectivamente. Ambas relaciones A β 1-38/A β 1-40 y A β 1-40/A β 1-42 dieron un ABC de 0,92.

65

Diagnóstico de DFT

El diagnóstico positivo de DFT entre CD y EA podría respaldarse más eficazmente por niveles elevados de A β 1-40 acompañados por niveles reducidos de A β 1-38 y A β 1-37, respectivamente. Las relaciones A β 1-38/A β 1-40 y A β 1-37/A β 1-40 dieron un ABC de 0,95 y 0,90, respectivamente.

Diagnóstico diferencial de DFT y DV

El diagnóstico positivo de DFT entre DV podría respaldarse más eficazmente por niveles elevados de A β 1-42 acompañados por niveles reducidos de A β 1-38 y A β 1-37, respectivamente. Las relaciones A β 1-38/A β 1-42 y A β 1-37/A β 1-42 dieron un ABC de 0,96 y 0,90, respectivamente. De forma interesante, cuando los valores disminuidos de A β 1-42 en DV se combinaron con niveles de A β 1-40 (A β 1-40/A β 1-42) pudo alcanzarse un ABC de 0,94.

DISCUSIÓN*Péptidos A β en plasma en el diagnóstico de DFT y DV*

Se presenta una caracterización detallada de especies de péptidos A β en plasma de DFT en comparación con DV, EA y controles depresivos (CD). Con respecto a A β 1-40 y A β 1-42 en EA, los resultados están en línea con estudios previos de otros (Irizarry 2004, Mehta y Pirttila 2005). En línea con el Ejemplo I, se encontró un importante aumento en el porcentaje de A β 1-40 en plasma (A β 1-40 %) en DV con respecto a EA y CD, que se igualó por disminuciones de A β 1-38 %, A β 1-42 % y A β 2-40 %. Lo más interesante, DFT reveló alteraciones similares a DV con respecto a A β 1-40 % y A β 1-38 %. A diferencia, DFT mostró menores niveles absolutos de A β 1-37 y mayores niveles en porcentaje de A β 1-42 que DV.

Recientemente, se informó de niveles de LCR de péptidos A β 1-37 y 1-38 disminuían en DFT, mientras que el porcentaje de A β 1-40 fue elevado con respecto a controles no dementes y EA (Bibl y col., 2007b; Bibl y col., 2007c). Es de notar que podría mostrarse un patrón muy similar de locura en el presente análisis basado en sangre de péptidos A β en DFT. Sin embargo, esto es más sorprendente, ya que la disminución específica de EA de A β 1-42 en LCR podría retroceder en plasma y todavía no se ha aclarado la relación de LCR con respecto a A β en plasma.

De cualquier forma, se trata que los factores genéticos desempeñan una función importante para la etiopatogénesis de DFT, en vez de para la mayoría de casos de EA esporádicos. Recientemente, se ha mostrado que las mutaciones de presenilina1 se asocian a fenotipos clínicos similares a DFT, uno de los cuales produce una tauopatía tipo Pick sin el desarrollo de placas de amiloide en confirmación neuropatológica (Dermaut y col., 2004). Bajo este aspecto, puede especularse que ciertas alteraciones genéticas del metabolismo de PPA pueden predisponer a un individuo para que desarrolle DFT. Estos cambios posteriores del metabolismo de PPA pueden reflejarse por una disminución de péptidos A β truncados en el extremo carboxi en LCR, además de en plasma, no importa si estas alteraciones representan o no un evento causal en la patogénesis de la neurodegeneración o solo un epifenómeno. Para explicación adicional de este aspecto, especialmente con respecto a fenotipos neuroquímicos en LCR y plasma, los presentes inventores proponen investigar patrones de péptidos A β en familias afectadas y modelos de cultivo celular transgénico.

En concordancia con los resultados de los presentes inventores sobre péptidos A β en plasma en DV, una reciente publicación por Gurol y colaboradores (2006) informó de una correlación entre A β 40 elevado y la carga de lesiones de la sustancia blanca en DCL, EA y AAC. Este efecto resultó ser independiente de posibles factores de confusión, tales como edad, sexo, hipertensión, diabetes mellitus, estado de APO-E, homocisteína, folato y B12. Elevado A β 40 fue interpretado como un posible factor de riesgo cerebrovascular y se tomó conjuntamente con los resultados de los presentes resultados, también puede ser un posible biomarcador, que indica el impacto de lesión cerebrovascular en un proceso de demencia.

En cambio, el estudio de Rotterdam considerablemente mayor encontró un comparable riesgo de desarrollar EA o DV, respectivamente, como se ha juzgado a partir de los niveles de A β 40 y A β 42 preclínicos. Sin embargo, una comparación directa de A β 40 y A β 42 entre EA prevalente y DV no fue informada en su estudio y no midieron niveles de A β 1-38. Además, el ELISA que usaron no permitió separar la medición de formas truncadas del extremo N de A β (por ejemplo, A β 2-40). Estos factores pueden haber contribuido a las discrepancias entre los dos estudios.

La función específica de enfermedad de A β 1-40 en DV está realizada por el hecho de que este péptido comprende el principal componente de placas de amiloide vasculares, pero es menos abundante en placas de EA seniles (Gravina y col. 1995). Sin embargo, sigue sin respuesta la cuestión de si la reducción relativa de péptidos A β en plasma distintos de A β 1-40 (es decir, A β 1-38, A β 1-42 y A β 2-40 en comparación CD) también puede relacionarse o no con patología de amiloide cerebrovascular. Sin embargo, a partir del análisis anterior, la potencia diagnóstica de niveles de A β 1-40 en plasma se aumentará si se evalúa en relación con A β 1-38 o A β 1-42, respectivamente.

Observación

Para aplicar los hallazgos a las pruebas de diagnóstico rutinario tienen que investigarse muestras de plasma siguiendo un protocolo de pretratamiento normalizado. El objetivo debe ser particularmente el efecto del almacenamiento de muestras bajo distintas condiciones (por ejemplo, tiempo y temperatura de almacenamiento) antes de los análisis.

Conclusiones

Los péptidos β amiloides truncados en el extremo carboxi seleccionados como partes del patrón de péptidos A β en plasma globales son un biomarcador para el diagnóstico diferencial mejorado de DFT y DV. Tanto DFT como DV pueden diferenciarse de otros pacientes no dementes y otras demencias, tales como EA, por concentraciones en plasma de A β 1-40, A β 1-38 y A β 1-37. Sin embargo, la discriminación entre DFT y DV debe considerar adicionalmente niveles de A β 1-42 en plasma.

Referencias

Arnold SE, Han LY, Clark CM, Grossman M, Trojanowski JQ. Quantitative neurohistological features of frontotemporal degeneration. *Neurobiol Aging* 2000; 21: 913-919

Bibl M, Esselmann H, Otto M, Lewczuk P, Cepek L, R  ther E, Kornhuber J. Cerebrospinal fluid (CSF) amyloid beta (A β) peptide patterns in Alzheimer's disease (AD) patients and non-demented controls depend on sample pre-treatment: Indication of carrier-mediated epitope masking of A β peptides. *Electrophoresis* 2004; 25:2912-2918.

Bibl M, Mollenhauer B, Esselmann H, Lewczuk P, Klafki HW, Sparbier K, Smirnov A, Cepek L, Trenkwalder C, R  ther E, Kornhuber J, Otto M, Wiltfang J. CSF amyloid-beta-peptides in Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia. *Brain* 2006; 129: 1177-1187.

Bibl M, Esselmann H, Mollenhauer B, Weniger G, Welge V, Liess M, Lewczuk P, Otto M, Schulz JB, Trenkwalder C, Kornhuber J, Wiltfang J. Blood based neurochemical diagnosis of vascular dementia: a pilot study. *J Neurochem* 2007a; 103:467-74.

Bibl M, Mollenhauer B, Lewczuk P, Esselmann H, Wolf S, Trenkwalder C, Otto M, Stiens G, R  ther E, Kornhuber J, Wiltfang J. Validation of amyloid- β peptides in CSF diagnosis of neurodegenerative dementias. *Mol Psy* 2007b; 12:671-80.

Blacker D, Albert MS, Bassett SS, Go RC, Harrell LE, Folstein MF. Reliability and validity of NINCDS-ARDA criteria for Alzheimer's disease. The National Institute of Mental Health Genetics Initiative. *Arch Neurol* 1994; 51: 1198-204.

Blennow K. Cerebrospinal Fluid Protein Biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx* 2004; 1, 213-225.

Citron M, Vigo-Pelfrey C, Teplow DB, Miller C, Schenk D, Johnston J, Winblad B, Venizelos N, Lannfelt L, Selkoe DJ. Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11993-11997.

Dermaut B, Kumar-Singh S, Engelborghs S, Theuns J, Rademakers R, Saerens J, Pickut BA, Peeters K, van den Broeck M, Vennekens K, Claes S, Cruts M, Cras P, Martin JJ, Van Broeckhoven C, De Deyn PP. A novel presenilin 1 mutation associated with Pick's disease but not β -amyloid plaques. *Ann Neurol*. 2004; 55:617-626.

Fischer P, Jellinger K, Gatterer G, Danielczyk W. Prospective neuropathological validation of Hachinski's ischaemic score in dementias. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991; 7, 580-583.

Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 120: 885-890.

Gravina SA, Ho L, Eckman CB, Long KE, Otvos L, Younkin L, Suzuki N, Younkin SG. Amyloid β protein in Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 1995; 270: 7013-7016.

Gurol ME, Irizarry MC, Smith EE, Raju S, Diaz-Arrastia R, Bottiglieri T, Rosand J, Growdon JH, Greenberg SM. Plasma β -amyloid and white matter lesions in AD, MCI and cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 2006; 66:23-29.

Haass C, Selkoe DJ. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-

peptide. *Cell* 1993; 75: 1039-1042.

Hulstaert F, Blennow K, Ivanoiu A, Schoonderwald HC, Riemenschneider M, De Deyn PP, Bancher C, Cras P, Wiltfang J, Mehta PD, Iqbal K, Pottel H, Vanmechelen E, Vanderstichele H. Improved discrimination of AD-patients using β -amyloid (1-42) and tau levels in CSF. *Neurology* 1999; 52:1555-1562.

Irizarry MC. Biomarkers of Alzheimer disease in plasma. *NeuroRX* 2004; 1:226-234.

Janek K, Rothemund S, Gast K, Beyermann M, Zipper J, Fabian H, Bienert M, Krause E. Study of the conformational transition of A beta(1-42) using D-amino acid replacement analogues. *Biochemistry* 2001; 40, 5457-5463.

Lewczuk P, Esselmann H, Bibl M, Paul S, Svitek J, Miertschischk J, Meyrer R, Smirnov A, Klein C, Bleich S, Sperling W, Kornhuber J, R  ther E, Wiltfang J. Electrophoretic separation of amyloid β (A β) peptides in plasma. *Electrophoresis* 2004(a); 25: 3336-3343.

Lewczuk P, Esselmann H, Groemer TW, Bibl M, Maler JM, Steinacker P, Otto M, Kornhuber J, Wiltfang J. Amyloid beta peptides in cerebrospinal fluid as profiled with surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: evidence of novel biomarkers in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 2004b; 55 (5):524-30 55: 524-530.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzmann R, Price D, Stadlan E M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984; 34, 939-944.

McKhann GM, Albert MS, Grossman M, Miller B, Dickson D, Trojanowski JQ. Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia. Report of the work group on frontotemporal dementia and Pick's disease. *Arch Neurol* 2001; 58:1803-1809.

Mehta P D, Pirttila T. Increased cerebrospinal fluid A beta38/A beta42 in Alzheimer disease. *Neurodegener Dis.* 2005; 2, 242-245.

Neary D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S, Freedman M, Kertesz A, Robert PH, Albert M, Boone K, Miller BL, Cummings J, Benson DF. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 1998; 51: 1546-1554.

Pomara N, Doraiswamy PM, Willoughby LM, Roth AE, Mulsant BH, Sidtis JJ, Mehta PD, Reynolds CF 3rd, Pollock BG. Elevation in plasma Abeta42 in geriatric depression: a pilot study. *Neurochem Res* 2006; 31:341-9

Roman GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, Cummings JL, Masdeu JC, Garcia JH, Amaducci L, Orgogozo JM, Brun A, Hofmann A. Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies: report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology* 1993; 43:243-245.

Riemenschneider M, Wagenpfeil S, Diehl J, Lautenschlager N, Theml T, Heldmann B, Drzezga A, Jahn T, Forstl H, Kurz A. Tau and Abeta42 protein in CSF of patients with frontotemporal degeneration. *Neurology* 2002; 58: 1622-1628.

Sjogren M, Minthon L, Davidsson P, Granerus A-K, Clarberg A, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Wallin A, Blennow K. CSF levels of tau, beta-amyloid(1-42) and GAP-43 in frontotemporal dementia, other types of dementia and normal aging. *J Neural Transm* 2000; 107: 563-579.

Van Oijen M, Hofmann A, Soares HD, Koudstaal PJ, Breeteler MMB. Plasma A β 1-40 and A β 1-42 and the risk of dementia: a prospective case-cohort study. *Lancet Neurol* 2006; 5:655-660.

Vollmann J, Winau R. Informed consent in human experimentation before the Nuremberg code. *BMJ* 1996; 313: 1445-1449.

Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, Smirnov A, Otto M, Paul S, Schmid B, Klafki H-W, Maler M, Dyrks T, Bienert M, Beyermann M, R  ther E, Kornhuber J. Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated Abeta peptides 1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in Alzheimer's disease and patients with chronic neuroinflammation. *J Neurochem* 2002; 81: 481-496.

Wiltfang J, Esselmann H, Cupers P, Neumann M, Kretschmar H, Beyermann M, Schleuder D, Jahn H, R  ther E, Kornhuber J, Annaert W, De Strooper B, Saftig P. Elevation of Abeta peptide 2-42 in sporadic and familial Alzheimer's disease and its generation in PS1 knockout cells. *J Biol Chem* 2001.

World Medical Organisation. Declaration of Helsinki. *British Medical Journal* 1996; 313:1448-1449.

Tabla 1

Diagnóstico	CD (n=13)		EA (n=10)		DV (n=13)	
	MW	± DE	MW	± DE	MW	± DE
Edad	62,62	7,68	69,60	8,86	71,00	6,73
MMSE	27,83	2,86	15,90	4,93	17,91	9,20
ELISA de tau en LCR (ng/ml)	0,29	0,22	0,91	0,69	0,31	0,20
ELISA de Aβ1-42 en LCR (ng/ml)	0,94	0,46	0,33	0,11	0,48	0,21
Aβ1-37 (pg/ml)	25,30	7,33	23,60	5,40	21,10	7,07
Aβ1-38 (pg/ml)	33,79	13,18	32,57	12,18	30,53	11,95
Aβ1-39 (pg/ml)	28,04	7,57	29,58	8,24	27,29	9,83
Aβ1-40 (pg/ml)	223,6	88,3	219,4	111,3	272,2	118,1
Aβ-42 (pg/ml)	26,49	7,10	24,41	4,82	18,65	8,29
Aβ2-40 (pg/ml)	20,09	5,62	21,20	3,70	15,22	5,70
Aβ total (pg/ml) ¹	378,0	124,2	370,0	144,5	410,6	152,9
Aβ1-37 % ²	6,89	1,07	6,76	1,28	5,46	1,49
Aβ1-38 % ²	8,84	1,12	8,82	0,38	7,43	0,85
Aβ1-39 % ²	7,63	1,12	8,35	1,21	6,73	0,69
Aβ1-40 % ²	57,64	6,54	56,89	7,36	64,74	6,12
Aβ1-42 % ²	7,24	0,99	7,17	1,89	4,65	1,69
Aβ2-40 % ²	5,52	1,15	6,32	1,92	3,82	1,02
Relación Aβ1-38/1-40	0,155	0,027	0,158	0,022	0,116	0,019
Relación Aβ1-42/1-40	0,128	0,030	0,132	0,051	0,074	0,032
Relación Aβ2-40/1-40	0,099	0,031	0,117	0,052	0,060	0,020

¹concentración de péptido Aβ total como se mide por la suma de todos los péptidos Aβ investigados,
²porcentaje de abundancia de péptidos Aβ con respecto a la suma de todos los péptidos Aβ investigados.

Tabla 2a

corte	sensibilidad	especificidad	youden
0,0000	0,0000	1,0000	1,0000
0,1050	0,0330	1,0000	1,0330
0,1250	0,0670	1,0000	1,0670
0,1350	0,1000	1,0000	1,1000
0,1450	0,2000	1,0000	1,2000
0,1550	0,2670	1,0000	1,2670
0,1627	0,3330	1,0000	1,3330
0,1677	0,3330	0,9830	1,3160
0,1750	0,4330	0,9670	1,4000
0,1850	0,5670	0,9670	1,5340
0,1950	0,6670	0,9670	1,6340
0,2021	0,7670	0,9330	1,7000
0,2071	0,7670	0,9170	1,6840
0,2150	0,8670	0,8830	1,7500
0,2250	0,8670	0,8170	1,6840
0,2307	0,9000	0,6830	1,5830
0,2357	0,9000	0,6670	1,5670
0,2402	0,9000	0,5830	1,4830
0,2452	0,9000	0,5670	1,4670
0,2550	0,9330	0,5000	1,4330
0,2650	0,9670	0,4170	1,3840
0,2750	0,9670	0,4000	1,3670
0,2819	0,9670	0,3000	1,2670
0,2869	0,9670	0,2830	1,2500
0,3000	0,9670	0,2500	1,2170
0,3150	1,0000	0,2000	1,2000
0,3250	1,0000	0,1170	1,1170
0,3350	1,0000	0,0830	1,0830
0,3450	1,0000	0,0670	1,0670
0,3600	1,0000	0,0500	1,0500
0,4050	1,0000	0,0330	1,0330
0,5050	1,0000	0,0170	1,0170
1,0000	1,0000	0,0000	1,0000

Tabla 2b

corte	sensibilidad	especificidad	youden
0,0000	0,0000	1,0000	1,0000
0,1050	0,0330	1,0000	1,0330
0,1250	0,0670	1,0000	1,0670
0,1350	0,1000	1,0000	1,1000
0,1450	0,2000	1,0000	1,2000
0,1550	0,2670	1,0000	1,2670
0,1627	0,3330	1,0000	1,3330
0,1677	0,3330	0,9670	1,3000
0,1750	0,4330	0,9670	1,4000
0,1850	0,5670	0,9670	1,5340
0,1950	0,6670	0,9670	1,6340
0,2021	0,7670	0,9000	1,6670
0,2071	0,7670	0,8670	1,6340
0,2150	0,8670	0,8670	1,7340
0,2250	0,8670	0,8330	1,7000
0,2307	0,9000	0,6330	1,5330
0,2357	0,9000	0,6000	1,5000
0,2402	0,9000	0,5330	1,4330
0,2452	0,9000	0,5000	1,4000
0,2550	0,9330	0,4670	1,4000
0,2650	0,9670	0,4000	1,3670
0,2750	0,9670	0,3670	1,3340
0,2819	0,9670	0,3000	1,2670
0,2869	0,9670	0,2670	1,2340
0,3000	0,9670	0,2330	1,2000
0,3150	1,0000	0,2330	1,2330
0,3250	1,0000	0,1330	1,1330
0,3500	1,0000	0,0670	1,0670
0,4050	1,0000	0,0330	1,0330
1,0000	1,0000	0,0000	1,0000

Tabla 2c

corte	sensibilidad	especificidad	youden
0,0000	0,0000	1,0000	1,0000
0,1050	0,0330	1,0000	1,0330
0,1250	0,0670	1,0000	1,0670
0,1350	0,1000	1,0000	1,1000
0,1450	0,2000	1,0000	1,2000
0,1550	0,2670	1,0000	1,2670
0,1650	0,3330	1,0000	1,3330
0,1750	0,4330	0,9670	1,4000
0,1850	0,5670	0,9670	1,5340
0,1950	0,6670	0,9670	1,6340
0,2050	0,7670	0,9670	1,7340
0,2150	0,8670	0,9000	1,7670
0,2250	0,8670	0,8000	1,6670
0,2350	0,9000	0,7330	1,6330
0,2450	0,9000	0,6330	1,5330
0,2550	0,9330	0,5330	1,4660
0,2700	0,9670	0,4330	1,4000
0,2850	0,9670	0,3000	1,2670
0,3000	0,9670	0,2670	1,2340
0,3150	1,0000	0,1670	1,1670
0,3300	1,0000	0,1000	1,1000
0,3450	1,0000	0,0670	1,0670
0,4600	1,0000	0,0330	1,0330
1,0000	1,0000	0,0000	1,0000

Tabla 3a

corte	sensibilidad	especificidad	youden
0,0000	0,0000	1,0000	1,0000
0,0650	0,0330	1,0000	1,0330
0,0750	0,1670	1,0000	1,1670
0,0850	0,3000	0,9830	1,2830
0,0933	0,4330	0,9500	1,3830
0,0983	0,4330	0,9330	1,3660
0,1036	0,6000	0,8670	1,4670
0,1086	0,6000	0,8500	1,4500
0,1107	0,7000	0,7670	1,4670
0,1148	0,7000	0,7500	1,4500
0,1191	0,7000	0,7330	1,4330
0,1250	0,8330	0,6670	1,5000
0,1338	0,8670	0,6170	1,4840
0,1388	0,8670	0,6000	1,4670
0,1450	0,9000	0,5670	1,4670
0,1550	0,9000	0,4670	1,3670
0,1650	0,9000	0,3500	1,2500
0,1750	0,9670	0,3000	1,2670
0,1850	1,0000	0,2330	1,2330
0,1950	1,0000	0,1670	1,1670
0,2050	1,0000	0,1000	1,1000
0,2150	1,0000	0,0830	1,0830
0,2400	1,0000	0,0670	1,0670
0,2700	1,0000	0,0500	1,0500
0,2850	1,0000	0,0330	1,0330
0,3100	1,0000	0,0170	1,0170
1,0000	1,0000	0,0000	1,0000

Tabla 3b

corte	sensibilidad	especificidad	youden
0,0000	0,0000	1,0000	1,0000
0,0650	0,0330	1,0000	1,0330
0,0750	0,1670	1,0000	1,1670
0,0850	0,3000	1,0000	1,3000
0,0933	0,4330	0,9670	1,4000
0,0983	0,4330	0,9330	1,3660
0,1036	0,6000	0,8670	1,4670
0,1086	0,6000	0,8330	1,4330
0,1107	0,7000	0,7000	1,4000
0,1148	0,7000	0,6670	1,3670
0,1191	0,7000	0,6330	1,3330
0,1250	0,8330	0,6000	1,4330
0,1338	0,8670	0,5670	1,4340
0,1388	0,8670	0,5330	1,4000
0,1450	0,9000	0,5330	1,4330
0,1550	0,9000	0,4330	1,3330
0,1650	0,9000	0,3000	1,2000
0,1750	0,9670	0,2330	1,2000
0,1850	1,0000	0,1670	1,1670
0,1950	1,0000	0,1330	1,1330
0,2650	1,0000	0,0330	1,0330
1,0000	1,0000	0,0000	1,0000

5

Tabla 3c

corte	sensibilidad	especificidad	youden
0,0000	0,0000	1,0000	1,0000
0,0650	0,0330	1,0000	1,0330
0,0750	0,1670	1,0000	1,1670
0,0850	0,3000	0,9670	1,2670
0,0950	0,4330	0,9330	1,3660
0,1050	0,6000	0,8670	1,4670

ES 2 535 978 T3

corte	sensibilidad	especificidad	youden
0,1150	0,7000	0,8330	1,5330
0,1250	0,8330	0,7330	1,5660
0,1350	0,8670	0,6670	1,5340
0,1450	0,9000	0,6000	1,5000
0,1550	0,9000	0,5000	1,4000
0,1650	0,9000	0,4000	1,3000
0,1750	0,9670	0,3670	1,3340
0,1850	1,0000	0,3000	1,3000
0,1950	1,0000	0,2000	1,2000
0,2050	1,0000	0,1670	1,1670
0,2150	1,0000	0,1330	1,1330
0,2400	1,0000	0,1000	1,1000
0,2700	1,0000	0,0670	1,0670
0,2850	1,0000	0,0330	1,0330
1,0000	1,0000	0,0000	1,0000

Tabla 4a

Positivo si es superior a o igual a	Sensibilidad	1 - Especificidad
-,8500	1,000	1,000
,1600	1,000	,983
,1750	1,000	,967
,1880	1,000	,933
,2030	1,000	,917
,2150	1,000	,900
,2250	1,000	,883
,2350	1,000	,867
,2450	1,000	,850
,2550	1,000	,833
,2750	1,000	,783
,2910	1,000	,767
,2960	1,000	,750
,3050	1,000	,733
,3150	1,000	,717
,3250	1,000	,650
,3315	1,000	,600
,3365	1,000	,583
,3450	,967	,583
,3650	,967	,567
,3850	,967	,550
,4000	,933	,550
,4150	,933	,533
,4300	,933	,517
,4550	,933	,500
,4750	,900	,483
,5050	,900	,467
,5400	,900	,450
,5550	,867	,433
,5650	,867	,417
,5750	,833	,417
,5850	,833	,400
,6000	,833	,367
,6250	,800	,367
,6500	,767	,367
,6650	,733	,367
,6750	,733	,350
,6850	,700	,350
,6950	,667	,350
,7100	,600	,333
,7250	,567	,333
,7350	,533	,317

Tabla 4b

Positivo si es superior a o igual a	Sensibilidad	1 - Especificidad
-,8500	1,000	1,000
,1600	1,000	,967
,1750	1,000	,933
,1880	1,000	,867
,2030	1,000	,833
,2150	1,000	,800
,2250	1,000	,767
,2350	1,000	,733
,2450	1,000	,700
,2550	1,000	,667
,2750	1,000	,567
,2910	1,000	,533
,2960	1,000	,500
,3050	1,000	,467
,3150	1,000	,433
,3250	1,000	,300
,3315	1,000	,200
,3365	1,000	,167
,3450	,967	,167
,3650	,967	,133
,3850	,967	,100
,4000	,933	,100
,4150	,933	,067
,4450	,933	,033
,5100	,900	,000
,5600	,867	,000
,5900	,833	,000
,6250	,800	,000
,6500	,767	,000
,6700	,733	,000
,6850	,700	,000
,6950	,667	,000
,7100	,600	,000
,7250	,567	,000
,7350	,533	,000
,7450	,500	,000
,7650	,433	,000
,8100	,400	,000
,8450	,367	,000
,8600	,300	,000
,8900	,233	,000
,9450	,200	,000

ES 2 535 978 T3

,7450	,500	,300
,7550	,433	,300
,7700	,433	,267
,7850	,400	,267
,8000	,400	,250
,8150	,400	,233
,8300	,400	,217
,8450	,367	,217
,8600	,300	,217
,8900	,233	,200
,9250	,200	,183
,9500	,200	,150
,9700	,200	,133
,9950	,167	,117
1,0350	,133	,117
1,0650	,133	,100
1,0750	,133	,083
1,1000	,100	,067
1,1300	,100	,050
1,1500	,067	,050
1,2000	,067	,033
1,3150	,067	,017
1,4000	,033	,017
1,4500	,000	,017
2,4900	,000	,000

,9950	,167	,000
1,0450	,133	,000
1,1100	,100	,000
1,2650	,067	,000
1,4000	,033	,000
2,4100	,000	,000

Tabla 4c

Positivo si es superior a o igual a	Sensibilidad	1 - Especificidad
-,6600	,000	,000
,3650	,033	,000
,4150	,067	,000
,4550	,067	,033
,4750	,100	,033
,5050	,100	,067
,5400	,100	,100
,5550	,133	,133
,5650	,133	,167
,5750	,167	,167
,5850	,167	,200
,6000	,167	,267
,6250	,200	,267
,6500	,233	,267
,6650	,267	,267
,6750	,267	,300
,6850	,300	,300
,6950	,333	,300
,7100	,400	,333
,7250	,433	,333
,7350	,467	,367
,7450	,500	,400
,7550	,567	,400
,7700	,567	,467
,7850	,600	,467
,8000	,600	,500
,8150	,600	,533
,8300	,600	,567
,8450	,633	,567
,8600	,700	,567
,8900	,767	,600
,9250	,800	,633
,9500	,800	,700
,9700	,800	,733
,9950	,833	,767

Positivo si es superior a o igual a	Sensibilidad	1 - Especificidad
1,0350	,867	,767
1,0650	,867	,800
1,0750	,867	,833
1,1000	,900	,867
1,1300	,900	,900
1,1500	,933	,900
1,2000	,933	,933
1,3150	,933	,967
1,4000	,967	,967
1,4500	1,000	,967
2,4900	1,000	1,000

Tabla 4d

Positivo si es inferior a o igual a	Sensibilidad	1 - Especificidad
-,8500	,000	,000
,1600	,033	,000
,1750	,067	,000
,1880	,133	,000
,2030	,167	,000
,2150	,200	,000
,2250	,233	,000
,2350	,267	,000
,2450	,300	,000
,2550	,333	,000
,2750	,433	,000
,2910	,467	,000
,2960	,500	,000
,3050	,533	,000
,3150	,567	,000
,3250	,700	,000
,3315	,800	,000
,3415	,833	,000
,3650	,867	,000
,3950	,900	,000
,4150	,933	,000
,4300	,967	,000
,4550	,967	,033
,4750	1,000	,033
,5050	1,000	,067
,5400	1,000	,100
,5550	1,000	,133
,5700	1,000	,167
,5850	1,000	,200
,6300	1,000	,267
,6850	1,000	,300
,7150	1,000	,333
,7350	1,000	,367
,7500	1,000	,400
,7750	1,000	,467
,8000	1,000	,500
,8150	1,000	,533
,8450	1,000	,567
,8900	1,000	,600
,9250	1,000	,633
,9500	1,000	,700
,9700	1,000	,733
1,0200	1,000	,767
1,0650	1,000	,800
1,0750	1,000	,833
1,1000	1,000	,867
1,1400	1,000	,900
1,2000	1,000	,933

Positivo si es inferior a o igual a	Sensibilidad	1 - Especificidad
1,3650	1,000	,967
2,4900	1,000	1,000

Tabla 5a

Positivo si es superior a o igual a	Sensibilidad	1 - Especificidad
-,7300	1,000	1,000
,2900	1,000	,983
,3350	1,000	,967
,3625	1,000	,950
,3725	1,000	,933
,3850	1,000	,917
,4060	1,000	,900
,4260	1,000	,883
,4350	1,000	,867
,4550	1,000	,850
,4750	1,000	,817
,4850	1,000	,800
,5000	1,000	,767
,5150	1,000	,750
,5250	1,000	,733
,5350	1,000	,717
,5450	1,000	,700
,5550	1,000	,683
,5655	1,000	,633
,5865	1,000	,617
,6110	1,000	,600
,6310	1,000	,583
,6460	1,000	,567
,6650	1,000	,550
,7050	1,000	,533
,7550	1,000	,517
,7850	,967	,517
,8200	,933	,517
,8550	,933	,467
,8650	,933	,450
,8900	,933	,433
,9150	,900	,417
,9250	,900	,400
,9350	,867	,400
,9500	,833	,400
,9650	,800	,400
,9850	,800	,383
1,0150	,800	,367
1,0600	,767	,367
1,1050	,733	,367
1,1500	,667	,367
1,1850	,667	,350
1,1950	,633	,350
1,2200	,567	,350
1,2450	,533	,350
1,2600	,533	,317
1,2850	,533	,300
1,3150	,533	,283
1,3400	,500	,283
1,3600	,500	,267
1,3750	,500	,250
1,3950	,500	,233
1,4150	,467	,217
1,4350	,433	,217
1,4700	,400	,217

Tabla 5b

Positivo si es superior a o igual a	Sensibilidad	1 - Especificidad
-,7300	1,000	1,000
,2900	1,000	,967
,3350	1,000	,933
,3625	1,000	,900
,3725	1,000	,867
,3850	1,000	,833
,4060	1,000	,800
,4260	1,000	,767
,4350	1,000	,733
,4550	1,000	,700
,4750	1,000	,633
,4850	1,000	,600
,5000	1,000	,533
,5150	1,000	,500
,5250	1,000	,467
,5350	1,000	,433
,5450	1,000	,400
,5550	1,000	,367
,5655	1,000	,267
,5865	1,000	,233
,6110	1,000	,200
,6310	1,000	,167
,6460	1,000	,133
,6650	1,000	,100
,7050	1,000	,067
,7550	1,000	,033
,7850	,967	,033
,8200	,933	,033
,8550	,933	,000
,8650	,900	,000
,8900	,867	,000
,9150	,833	,000
,9250	,800	,000
,9350	,767	,000
,9500	,733	,000
,9650	,667	,000
,9850	,633	,000
1,0150	,567	,000
1,0600	,533	,000
1,1050	,500	,000
1,1500	,467	,000
1,1850	,433	,000
1,1950	,400	,000
1,2200	,367	,000
1,2450	,333	,000
1,2600	,300	,000
1,2850	,267	,000
1,3150	,233	,000
1,3400	,167	,000
1,3600	,133	,000
1,3750	,100	,000
1,3950	,067	,000
1,4150	,033	,000
1,4350	,000	,000
3,2400	,000	,000

1,5250	,400	,200
1,5750	,367	,167
1,6000	,333	,167
1,6250	,300	,167
1,6550	,267	,167
1,6750	,233	,150
1,7200	,167	,150
1,7650	,167	,133
1,7850	,167	,117
1,8350	,167	,100
1,8850	,167	,083
1,9350	,167	,067
2,0300	,133	,067
2,1050	,133	,050
2,1250	,100	,033
2,1350	,100	,017
2,1650	,067	,017
2,2150	,033	,017
2,2600	,000	,017
3,2800	,000	,000

Tabla 5c

Positivo si es superior a o igual a	Sensibilidad	1 - Especificidad
-,2200	,000	,000
,7850	,033	,000
,8200	,067	,000
,8550	,067	,067
,8650	,067	,100
,8900	,067	,133
,9150	,100	,167
,9250	,100	,200
,9350	,133	,200
,9500	,167	,200
,9650	,200	,200
,9850	,200	,233
1,0150	,200	,267
1,0600	,233	,267
1,1050	,267	,267
1,1500	,333	,267
1,1850	,333	,300
1,1950	,367	,300
1,2200	,433	,300
1,2450	,467	,300
1,2600	,467	,367
1,2850	,467	,400
1,3150	,467	,433
1,3400	,500	,433
1,3600	,500	,467
1,3750	,500	,500
1,3950	,500	,533
1,4150	,533	,567
1,4350	,567	,567
1,4700	,600	,567
1,5250	,600	,600
1,5750	,633	,667
1,6000	,667	,667
1,6250	,700	,667
1,6550	,733	,667
1,6750	,767	,700
1,7200	,833	,700
1,7650	,833	,733

Tabla 5d

Positivo si es inferior a o igual a	Sensibilidad	1 - Especificidad
-,7300	,000	,000
,2900	,033	,000
,3350	,067	,000
,3625	,100	,000
,3725	,133	,000
,3850	,167	,000
,4060	,200	,000
,4260	,233	,000
,4350	,267	,000
,4550	,300	,000
,4750	,367	,000
,4850	,400	,000
,5000	,467	,000
,5150	,500	,000
,5250	,533	,000
,5350	,567	,000
,5450	,600	,000
,5550	,633	,000
,5655	,733	,000
,5865	,767	,000
,6110	,800	,000
,6310	,833	,000
,6460	,867	,000
,6650	,900	,000
,7050	,933	,000
,7900	,967	,000
,8550	1,000	,067
,8650	1,000	,100
,8900	1,000	,133
,9150	1,000	,167
,9450	1,000	,200
,9850	1,000	,233
1,0900	1,000	,267
1,2150	1,000	,300
1,2600	1,000	,367
1,2850	1,000	,400
1,3250	1,000	,433
1,3600	1,000	,467

1,7850	,833	,767
1,8350	,833	,800
1,8850	,833	,833
1,9350	,833	,867
2,0300	,867	,867
2,1050	,867	,900
2,1250	,900	,933
2,1350	,900	,967
2,1650	,933	,967
2,2150	,967	,967
2,2600	1,000	,967
3,2800	1,000	1,000

1,3750	1,000	,500
1,3950	1,000	,533
1,4500	1,000	,567
1,5250	1,000	,600
1,6150	1,000	,667
1,7150	1,000	,700
1,7650	1,000	,733
1,7850	1,000	,767
1,8350	1,000	,800
1,8850	1,000	,833
1,9950	1,000	,867
2,1050	1,000	,900
2,1250	1,000	,933
2,2050	1,000	,967
3,2800	1,000	1,000

Tabla 6

Diagnóstico	CND (n=30)		EA (n=30)		DLFT (n=30)	
	MW	± DE	MW	± DE	MW	± DE
edad	61,5	11,09	65,43	7,29	61,6	11,48
MMSE	28,5	1,47	19,31	5,44	20,37	8,96
ELISA de tau	0,23	0,13	0,73	0,41	0,32	0,26
ELISA de Aβ ₁₋₄₂	0,86	0,28	0,37	0,13	0,70	0,20
Aβ ₁₋₄₂ / tau ¹	4,82	2,81	0,65	0,34	3,49	1,81
Aβ ₁₋₃₇ (ng/ml)	1,36	0,49	1,21	0,47	0,90	0,42
Aβ ₁₋₃₈ (ng/ml)	2,26	0,60	2,17	0,81	1,60	0,72
Aβ ₁₋₃₉ (ng/ml)	1,27	0,38	1,28	0,44	1,17	0,46
Aβ ₁₋₄₀ (ng/ml)	8,42	1,98	8,27	2,81	8,67	2,43
Aβ ₁₋₄₂ (ng/ml)	1,89	0,72	0,60	0,23	1,23	0,58
Aβ total (ng/ml) ²	15,32	3,55	13,68	4,45	13,67	4,25
Aβ ₁₋₃₇ % ³	8,71	1,88	8,80	1,88	6,47	1,49
Aβ ₁₋₃₈ % ³	14,79	2,09	15,74	2,09	11,49	2,09
Aβ ₁₋₃₉ % ³	8,23	1,39	9,35	1,63	8,41	1,53
Aβ ₁₋₄₀ % ³	55,36	6,28	60,58	5,18	64,04	4,45

¹relación de niveles absolutos de Aβ 1-42 y tau como se mide por ELISA;

²concentración de péptido Aβ total como se mide por la suma de todos los péptidos Aβ investigados;

³porcentaje de abundancia de péptidos Aβ con respecto a la suma de todos los péptidos Aβ investigados.

Tabla 7

Diagnóstico	CND (n=71)		EA (n=71)		DCL (n=32)		DFT (n=36)		OD (n=93)	
	MW	± DE	MW	± DE	MW	± DE	MW	± DE	MW	± DE
edad	62,70	9,89	70,14	8,91	69,94	7,43	61,58	10,33	68,86	8,96
MMSE	28,59	1,42	18,19	6,42	18,15	5,42	19,10	10,29	17,05	8,85
Aβ ₁₋₃₇	1,15	0,51	1,01	0,49	0,75	0,39	0,78	0,37	0,90	0,45
Aβ ₁₋₃₈	2,12	0,72	1,93	0,71	1,34	0,69	1,36	0,62	1,62	0,72
Aβ ₁₋₃₈ (MSD)	0,81	0,27	0,90	0,29	0,71	0,02	0,67	0,21	0,69	0,24
Aβ ₁₋₃₉	1,22	0,48	1,20	0,47	0,87	0,48	1,03	0,54	1,05	0,50
Aβ ₁₋₄₀	8,15	2,58	7,80	2,55	5,83	2,54	7,55	2,57	6,81	2,62
Aβ ₁₋₄₀ ^{ox}	0,11	0,09	0,13	0,07	0,20	0,19	0,10	0,06	0,13	0,11
Aβ ₁₋₄₂	1,59	0,74	0,56	0,22	0,69	0,48	1,02	0,54	1,01	0,61
Aβ ² total	14,34	4,66	12,63	4,19	9,67	4,58	11,83	4,40	11,52	4,74
Aβ ₁₋₃₇ ³	7,84	1,76	7,70	2,12	7,51	1,32	6,54	1,48	7,64	1,34
Aβ ₁₋₃₈ ³	14,74	1,72	15,20	1,71	13,66	1,64	11,24	1,86	13,91	1,52
Aβ ₁₋₃₉ ³	8,44	1,56	9,43	1,66	8,80	1,16	8,36	1,79	9,00	1,45
Aβ ₁₋₄₀ ³	57,39	5,33	62,12	3,96	61,43	4,13	64,63	4,79	59,81	3,81
Aβ ₁₋₄₀ ^{ox3}	0,75	0,46	1,10	0,64	1,88	0,87	0,82	0,44	1,17	0,72
Aβ ₁₋₄₂ ³	10,84	3,14	4,45	0,96	6,72	2,26	8,43	2,40	8,49	2,67

¹ Detección de electroquimioluminiscencia (MSD), subgrupo de pacientes: CND (n=37), EA (n=31), DCL (n=2), OD (n=47) y DFT (n=33).

² Concentración de péptido Aβ total; ³ porcentaje de abundancia de péptidos Aβ con respecto a la concentración de péptido Aβ total.

Tabla 8

Diagnóstico diferencial	Parámetro	Corte	Sensibilidad	Especificidad	Índice de Youden
EA frente a CND	A β ₁₋₄₂ / tau por ELISA	1,383	100 %	96 %	1,96
	A β ₁₋₄₂ / A β ₁₋₃₈	0,475	100 %	97 %	1,97
DLFT frente a CND	A β ₁₋₄₂ / tau por ELISA	4,188	81 %	61 %	1,42
	A β ₁₋₃₈ / A β ₁₋₄₀	0,215	87 %	90 %	1,77
DLFT frente a EA	A β ₁₋₄₂ / tau por ELISA	1,612	86 %	100 %	1,86
	A β ₁₋₃₈ / A β ₁₋₄₀	0,215	87 %	87 %	1,74
DLFT frente a CND y EA	A β ₁₋₄₂ / tau por ELISA	0,978	100 %	45 %	1,45
	A β ₁₋₃₈ / A β ₁₋₄₀	0,215	87 %	88 %	1,75

Tabla 9

Diagnóstico diferencial	Parámetro	Corte	Sensibilidad	Especificidad	Índice de Youden	ABC	IC del 95 %
EA (n=71) frente a todos los otros pacientes (n=232)	A β ₁₋₄₂ %	5,57	87 %	85 %	0,72	0,925	0,897-0,954
	A β ₁₋₄₂ / 1-38	0,39	90 %	87 %	0,77	0,938	0,913-0,963
EA (n=71) frente a CND (n=71)	A β ₁₋₄₂ %	5,81	90 %	97 %	0,87	0,993	0,984-1,00
	A β ₁₋₄₂ / 1-38	0,39	90 %	97 %	0,87	0,989	0,976-1,00
EA (n=71) frente a todas las otras demencias (n=161)	A β ₁₋₄₂ %	5,55	85 %	81 %	0,66	0,895	0,856-0,935
	A β ₁₋₄₂ / 1-38	0,38	85 %	85 %	0,70	0,915	0,880-0,950
DFT (n=36) frente a todos los otros pacientes (n=267)	A β ₁₋₃₈ %	12,7	86 %	90 %	0,76	0,923	0,868-0,978
	A β ₁₋₃₈ / 1-40	0,21	86 %	79 %	0,65	0,907	0,855-0,960
DFT (n=36) frente a CND (n=71)	A β ₁₋₃₈ %	12,7	86 %	96 %	0,82	0,951	0,901-1,00
	A β ₁₋₃₈ / 1-40	0,21	89 %	87 %	0,76	0,950	0,91-0,99
DFT (n=36) frente a todas las otras demencias (n=196)	A β ₁₋₃₈ %	12,7	86 %	87 %	0,73	0,913	0,854-0,972
	A β ₁₋₃₈ / 1-40	0,21	86 %	76 %	0,62	0,892	0,832-0,951
APP (n=10) frente a CND (n=71)	A β ₁₋₃₈ %	13,54	80 %	75 %	0,55	0,866	0,765-0,967
	A β ₁₋₃₈ / 1-40	0,22	70 %	82 %	0,52	0,817	0,699-0,935
APP (n=10) frente a todas las otras demencias (n=222)	A β ₁₋₃₈ %	13,51	70 %	63 %	0,33	0,723	0,625-0,821
	A β ₁₋₃₈ / 1-40	0,22	70 %	58 %	0,28	0,600	0,459-0,740
APP (n=10) frente a todos los otros pacientes (n=293)	A β ₁₋₃₈ %	13,51	80 %	65 %	0,45	0,758	0,663-0,852
	A β ₁₋₃₈ / 1-40	0,22	70 %	64 %	0,34	0,652	0,521-0,783

ABC: Área bajo la curva; IC: Intervalo de confianza

5

Tabla 10

Diagnóstico	CD (n=7)	CD (n=7)	EA (n=7)	EA (n=7)	DV (n=7)	DV (n=7)	DFT (n=7)	DFT (n=7)
	Media	± DE	Media	± DE	Media	± DE	Media	± DE
edad	64,0	11,11	67,6	5,71	71,3	8,06	63,0	2,94
MMSE	27,17	3,6	19,4	9,61	18,4	11,01	24,5	1,91
A β ₁₋₃₇ (ng/ml)	0,025	0,003	0,019	0,006	0,026	0,006	0,019	0,006
A β ₁₋₃₈ (ng/ml)	0,034	0,008	0,029	0,011	0,039	0,007	0,029	0,007
A β ₁₋₃₉ (ng/ml)	0,031	0,005	0,026	0,007	0,039	0,005	0,032	0,010
A β ₁₋₄₀ (ng/ml)	0,226	0,051	0,185	0,087	0,326	0,091	0,246	0,078
A β ₁₋₄₂ (ng/ml)	0,027	0,004	0,020	0,007	0,024	0,006	0,028	0,011
A β ₂₋₄₀ (ng/ml)	0,023	0,002	0,018	0,005	0,022	0,004	0,021	0,006
A β total (ng/ml) ¹	0,365	0,065	0,297	0,122	0,477	0,100	0,375	0,113

ES 2 535 978 T3

Aβ1-37 %²	6,945	1,220	6,819	1,105	5,681	1,397	5,117	1,198
Aβ1-38 %²	9,269	0,802	9,896	0,860	8,239	0,828	7,877	0,907
Aβ1-39 %²	8,725	1,660	9,055	1,330	8,470	1,923	8,555	1,642
Aβ1-40 %²	61,314	3,353	60,689	5,492	67,600	5,329	65,468	2,124
Aβ1-42 %²	7,396	0,905	7,013	1,815	5,129	1,165	7,276	0,931
Aβ2-40 %²	6,350	1,140	6,528	2,034	4,880	1,704	5,707	0,489
Relación Aβ1-38/1-40	0,151	0,009	0,164	0,022	0,123	0,020	0,121	0,017
Relación Aβ1-38/1-42	1,274	0,218	1,483	0,360	1,665	0,354	1,099	0,194
Relación Aβ1-40/1-42	8,414	1,218	9,143	2,239	13,851	3,689	9,115	1,120

¹concentración de péptido Aβ total como se mide por la suma de todos los péptidos Aβ investigados;
²porcentaje de abundancia de péptidos Aβ con respecto a la suma de todos los péptidos Aβ investigados.
 (*) y (**) indican alteraciones significativas (p<0,05) y altamente significativas (p<0,01) con respecto a CD.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento *ex vivo* para ayudar en el diagnóstico diferencial de degeneraciones del lóbulo frontotemporal, que comprende la etapa de determinar, en un fluido corporal obtenido de un paciente, al menos una concentración relativa seleccionada del grupo que consiste en
 - 10 - la relación de la concentración absoluta de Aβ1-38 con respecto a la concentración de β amiloide total (Aβ1-38 %),
 - la relación de la concentración absoluta de Aβ1-38 con respecto a la concentración absoluta de especies de β amiloide Aβ1-40 (Aβ1-38/Aβ1-40), y
 - la relación de la concentración absoluta de Aβ1-38 con respecto a la concentración absoluta de especies de β amiloide Aβ1-42 (Aβ1-38/Aβ1-42).
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho fluido corporal es una muestra de sangre.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicha muestra de sangre es una muestra de plasma sanguíneo.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además la etapa de enriquecer péptidos β amiloides del fluido corporal usando un anticuerpo para péptido β amiloide.
- 20 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha concentración relativa de Aβ1-38 seleccionada del grupo que consiste en
 - 25 - Aβ1-38 %, y
 - Aβ1-38/Aβ1-40,
 - que es superior a un valor umbral, es indicativa de no degeneración del lóbulo frontotemporal en el paciente.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que
 - 30 - Aβ1-38 % que es inferior a un valor umbral o Aβ1-38/Aβ1-40 que es inferior a un valor umbral, y
 - la concentración absoluta de Aβ1-38 que es inferior a un valor umbral, o Aβ1-38/Aβ1-42 que es inferior a un valor umbral, o la relación de la concentración absoluta de Aβ1-40 con respecto a la concentración absoluta de especies de β amiloide Aβ1-42 (Aβ1-40/Aβ1-42) que es inferior a un valor umbral, o la relación de la concentración absoluta de Aβ1-42 con respecto a la concentración total de β amiloide (Aβ1-42 %) que es superior a un valor umbral,
 - 35 es indicativo de degeneración del lóbulo frontotemporal en el paciente.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que
 - 40 - Aβ1-38/Aβ1-42 que es inferior a un valor umbral, y
 - Aβ1-40 % que es superior a un valor umbral, o Aβ1-37 % que es inferior a un valor umbral, o Aβ1-37/Aβ1-42 que es inferior a un valor umbral, o Aβ1-37/Aβ1-40 que es inferior a un valor umbral, o la concentración absoluta de Aβ1-37 que es inferior a un valor umbral,
 - 45 es indicativo de degeneración del lóbulo frontotemporal en el paciente.
8. Un uso de componentes para determinar la concentración de Aβ1-38 en un fluido corporal para ayudar en el diagnóstico diferencial *ex vivo* de degeneraciones del lóbulo frontotemporal.
9. El uso según la reivindicación 8, en el que dichos componentes para determinar la concentración de Aβ1-38 son anticuerpos.
10. El uso según las reivindicaciones 8 o 9, que comprende además el uso de un anticuerpo para péptidos β amiloides para enriquecer péptidos β amiloides del fluido corporal.
- 55 11. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dichos componentes para determinar la concentración de Aβ1-38 permiten determinar la concentración de Aβ1-38 como una concentración relativa.
12. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que dichos componentes para determinar la concentración de Aβ1-38 permiten determinar al menos un concentración relativa de Aβ1-38 seleccionada del grupo que consiste en
 - 60 - la relación de la concentración absoluta de Aβ1-38 con respecto a la concentración de péptido β amiloide total en el fluido corporal (Aβ1-38 %),
 - la relación de la concentración absoluta de Aβ1-38 con respecto a la concentración absoluta de las especies de péptido β amiloide Aβ1-40 en el fluido corporal (Aβ1-38/Aβ1-40), y
 - 65 - la relación de la concentración absoluta de Aβ1-38 con respecto a la concentración absoluta de las especies

de péptido β amiloide A β 1-42 en el fluido corporal (A β 1-38/A β 1-42).

13. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, que comprende el uso de componentes para determinar al menos una concentración adicional seleccionada del grupo que consiste en:

- 5
- la concentración absoluta de A β 1-37,
 - la concentración absoluta de A β 1-38,
 - la concentración absoluta de A β 1-40,
 - la concentración absoluta de A β 1-42,
- 10
- la relación de la concentración absoluta de A β 1-37 con respecto a la concentración total de β amiloide (A β 1-37 %),
 - la relación de la concentración absoluta de A β 1-40 con respecto a la concentración total de β amiloide (A β 1-40 %),
 - la relación de la concentración absoluta de A β 1-42 con respecto a la concentración total de β amiloide (A β 1-42 %)
- 15
- la relación de la concentración absoluta de A β 1-37 con respecto a la concentración absoluta de especies de β amiloide A β 1-40 (A β 1-37/A β 1-40),
 - la relación de la concentración absoluta de A β 1-37 con respecto a la concentración absoluta de especies de β amiloide A β 1-42 (A β 1-37/A β 1-42), y
- 20
- la relación de la concentración absoluta de A β 1-40 con respecto a la concentración absoluta de especies de β amiloide A β 1-42 (A β 1-40/A β 1-42).

14. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, que comprende el uso de componentes para indicar que la concentración seleccionada del grupo que consiste en:

- 25
- la concentración absoluta de A β 1-38,
 - la relación de la concentración absoluta de A β 1-38 con respecto a la concentración total de β amiloide (A β 1-38 %),
 - la relación de la concentración absoluta de A β 1-38 con respecto a la concentración absoluta de especies de β amiloide A β 1-40 (A β 1-38/A β 1-40),
 - la relación de la concentración absoluta de A β 1-38 con respecto a la concentración absoluta de especies de β amiloide A β 1-42 (A β 1-38/A β 1-42),
- 30
- la concentración absoluta de A β 1-37,
 - la relación de la concentración absoluta de A β 1-37 con respecto a la concentración total de β amiloide (A β 1-37 %),
 - la relación de la concentración absoluta de A β 1-37 con respecto a la concentración absoluta de especies de β amiloide A β 1-40 (A β 1-37/A β 1-40),
 - la relación de la concentración absoluta de A β 1-37 con respecto a la concentración absoluta de especies de β amiloide A β 1-42 (A β 1-37/A β 1-42),
- 35
- la relación de la concentración absoluta de A β 1-40 con respecto a la concentración total de β amiloide (A β 1-40 %), y
 - la relación de la concentración absoluta de A β 1-40 con respecto a la concentración absoluta de especies de β amiloide A β 1-42 (A β 1-40/A β 1-42),

45 es superior o inferior a un valor umbral.

15. El uso según las reivindicaciones 13 o 14, en el que dichos componentes para determinar al menos una concentración adicional son anticuerpos.

Fig. 1

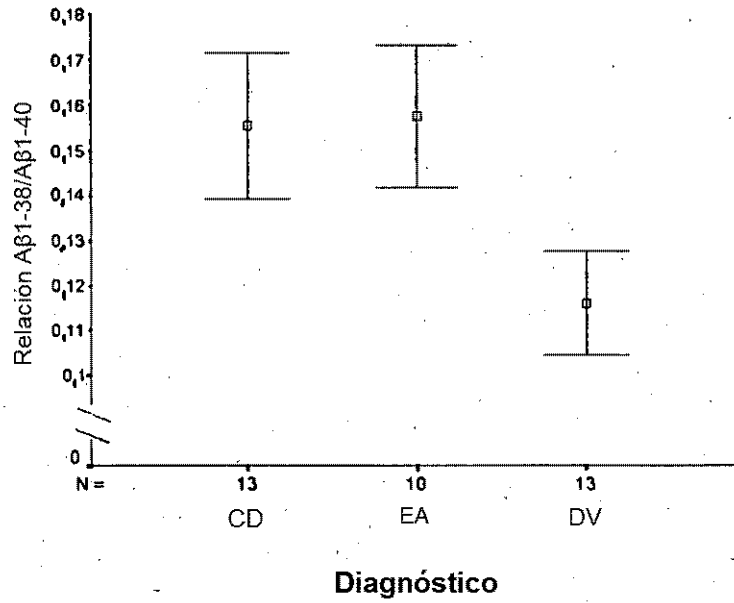


Fig. 2

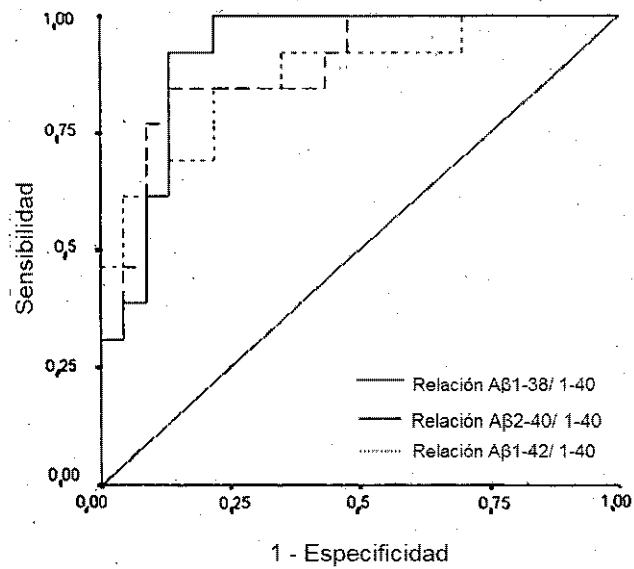


Fig. 3

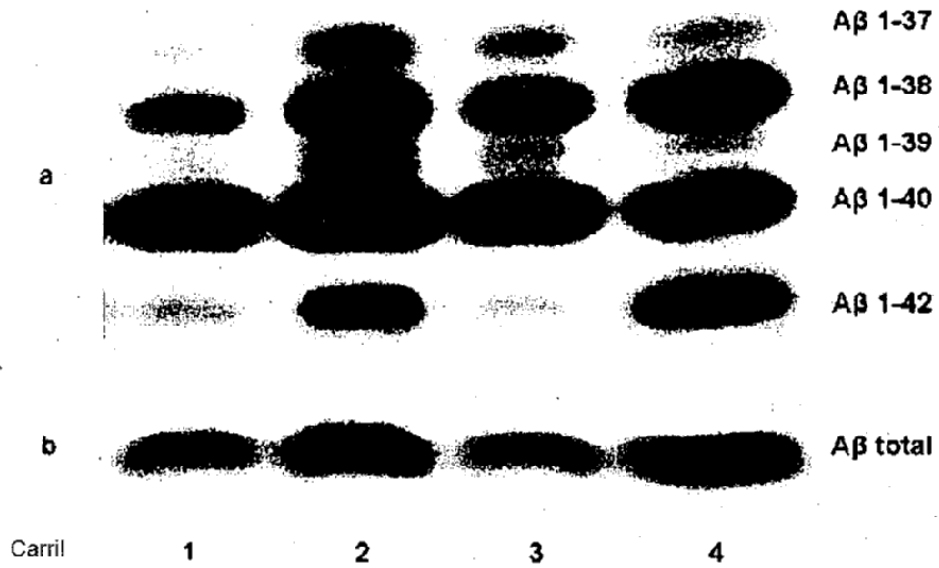


Fig. 4

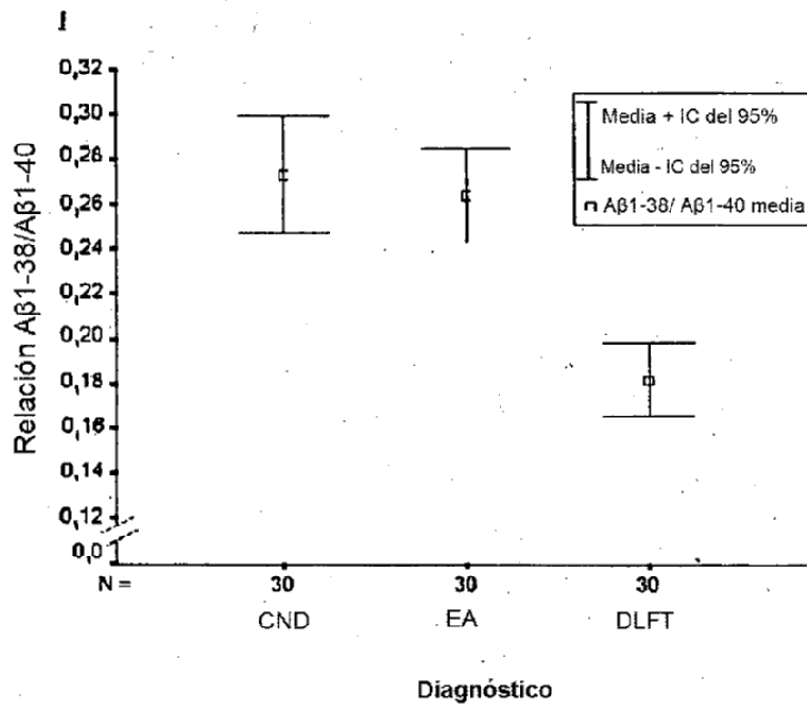


Fig. 5

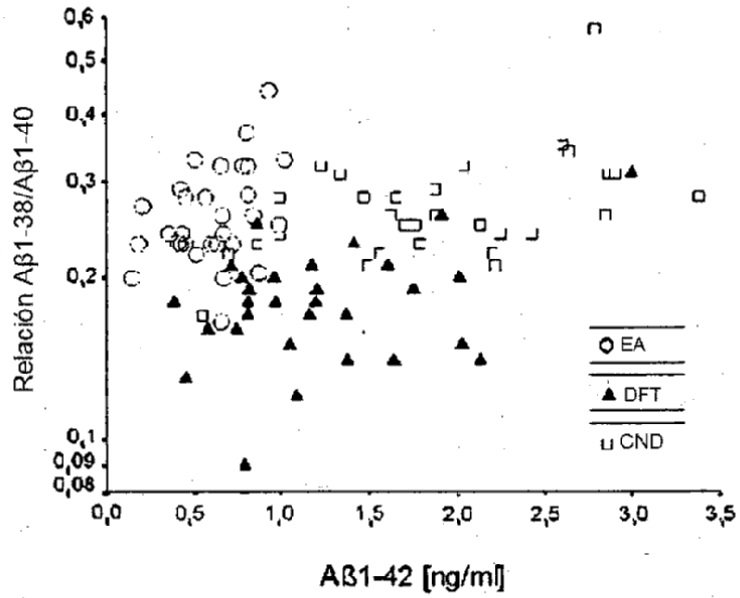


Fig. 6

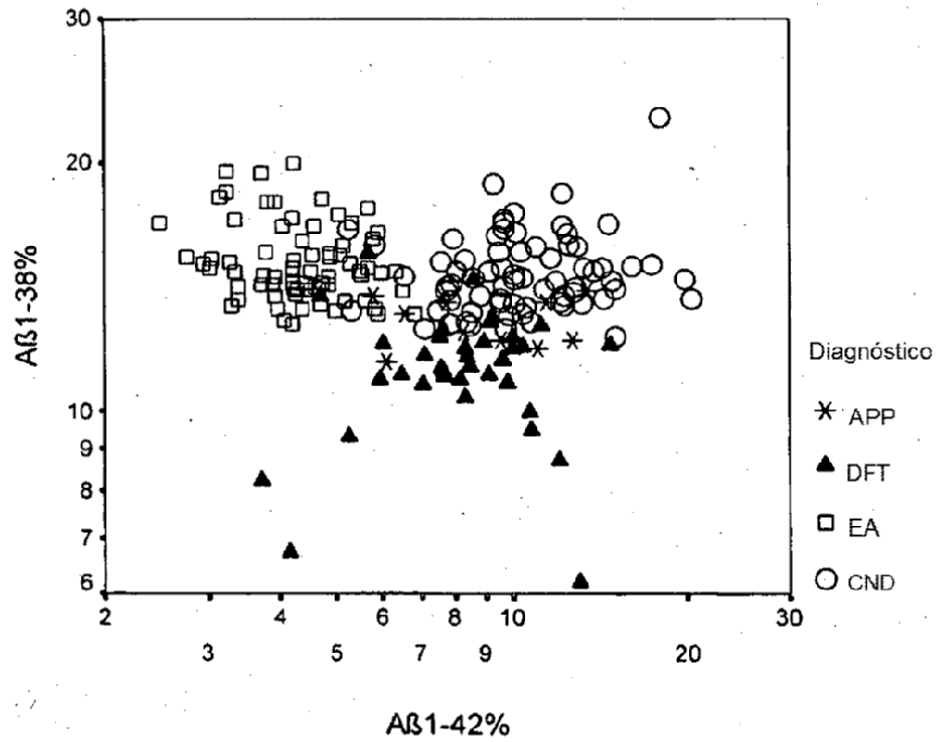


Fig. 7

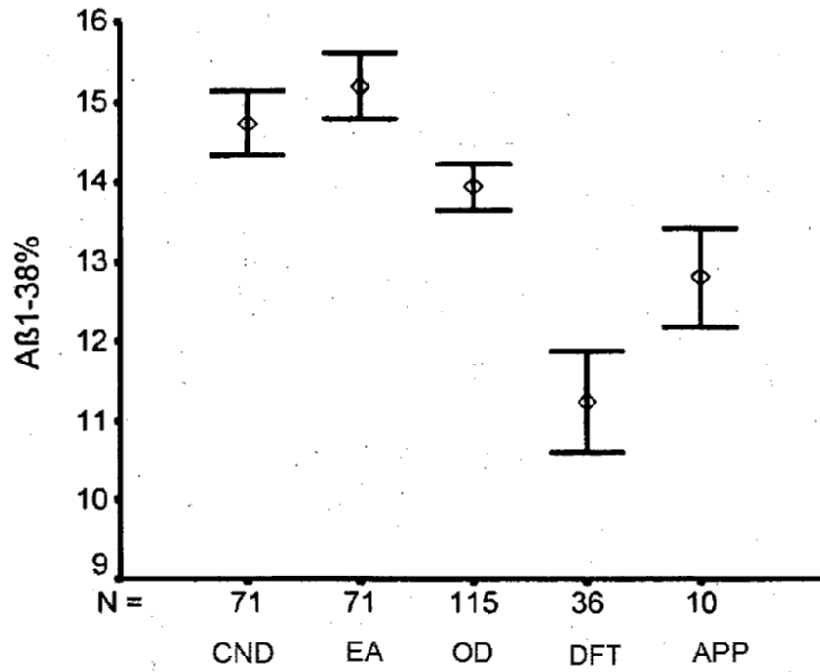


Fig. 8

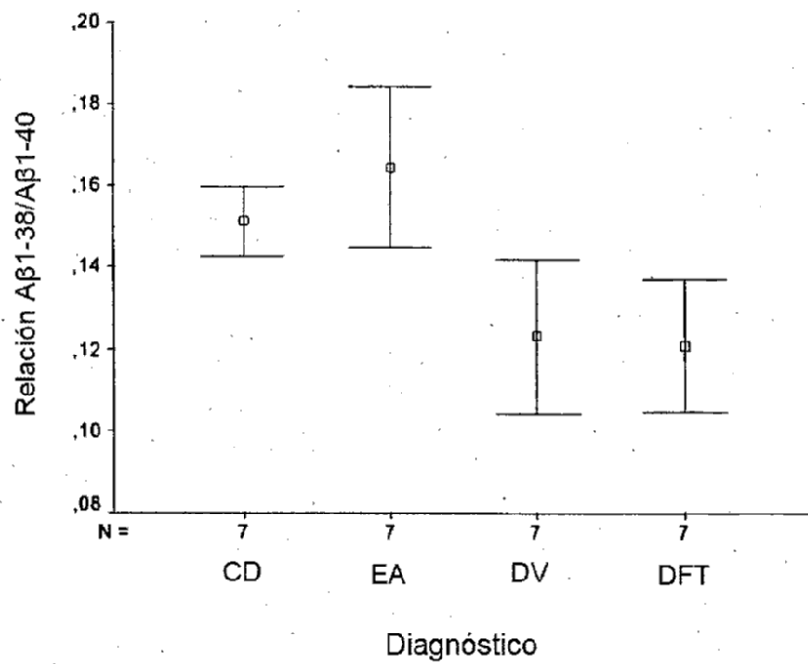


Fig. 9

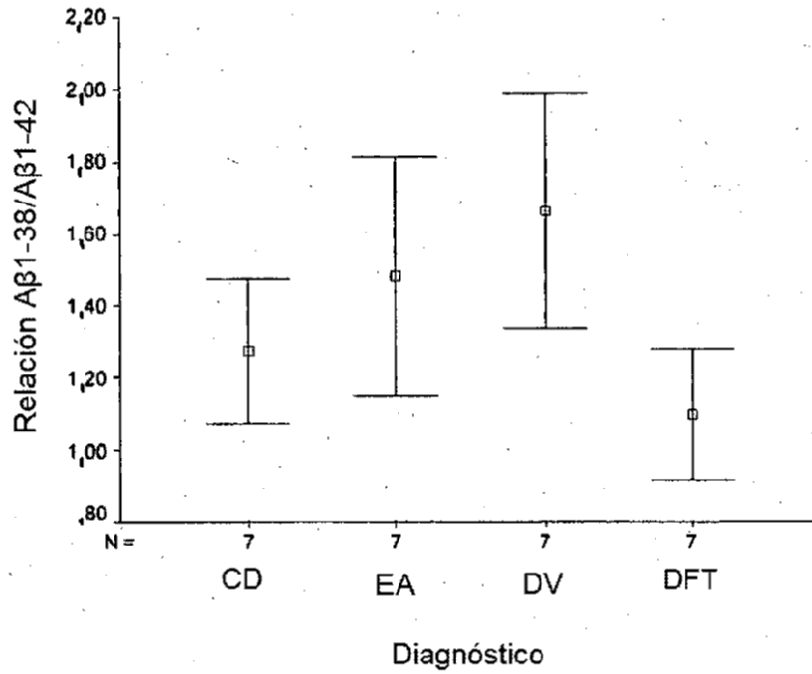


Fig. 10

