

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 817 417**

51 Int. Cl.:

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2015 PCT/US2015/025432**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2015 WO15157704**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2015 E 15776737 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3129779**

54 Título: **Métodos y composiciones para la detección de proteínas mal plegadas**

30 Prioridad:

10.04.2014 US 201461978158 P

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

07.04.2021

73 Titular/es:

**YALE UNIVERSITY (100.0%)
Two Whitney Avenue
New Haven, CT 06511, US**

72 Inventor/es:

**BUHIMSCHI, IRINA;
BUHIMSCHI, CATALIN S.;
CHOMA, MICHAEL;
TAGARE, HEMANT y
JONAS, STEPHAN MICHAEL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 817 417 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

Métodos y composiciones para la detección de proteínas mal plegadas

CAMPO

Aspectos de la presente divulgación se refieren a los campos del diagnóstico y pronóstico.

5 ANTECEDENTES

La preeclampsia (PE) es un trastorno hipertensivo específico del embarazo y la principal causa de morbilidad y muerte materna y perinatal en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 16 % de la mortalidad materna global (~63.000 muertes maternas anuales) es debida a PE únicamente. En los EE. UU., la preeclampsia afecta a 5-8 % de todos los embarazos o 270.000 mujeres y es responsable del 18 % de las muertes maternas cada año y la aparición está aumentando. Los lactantes también están en riesgo; 10.500 bebés mueren cada uno año debido a la preeclampsia en los EE. UU. La preeclampsia se diagnostica basándose en los síntomas observados. No hay producto de diagnóstico preciso para la preeclampsia.

El riesgo de muerte materna es mucho más alto en entornos de recursos limitados. El factor generalmente reconocido responsable de la principal morbilidad materna y fetal es el fallo en reconocer la preeclampsia de manera oportuna. Esto es un obstáculo importante debido a que no se permite la transferencia de la mujer con preeclampsia a una instalación sanitaria de nivel más alto donde se pueda tratar con magnesio, terapia con esteroides y/o parto urgente antes de la eclampsia, accidente cerebrovascular hipertensivo materno o muerte fetal debido a aborto. La preeclampsia es una afección evolutiva. Por tanto, el mejorar la detección de la preeclampsia en mujeres que son clínicamente asintomáticas o cuestionablemente sintomáticas para la preeclampsia será de importancia clínica significativa. Esta estrategia se conoce como prevención secundaria de la preeclampsia, y tiene el potencial de reducir la mortalidad y la morbilidad relacionadas con el embarazo, previniendo la eclampsia y el daño a los sistemas de órganos terminales debido a convulsiones, accidente cerebrovascular, edema pulmonar, insuficiencia hepática y/o renal y muerte materna.

Una vez se diagnostica preeclampsia grave (PEg), sulfato de magnesio, fármacos antihipertensores y el parto médicamente indicado son las estrategias eficaces que ya han demostrado que salvan vidas (estrategias conocidas como prevención terciaria de la preeclampsia). Para embarazos prematuros, también se conoce el momento exacto del parto médicamente indicado para permitir el tratamiento conservador (por ejemplo, esteroides) para mejorar los desenlaces neonatales. El uso de estrategias terapéuticas para la prevención de la complicación de la preeclampsia está condicionado por el diagnóstico preciso de esta afección.

30 SUMARIO

La preeclampsia es un síndrome proteinúrico hipertensivo único al embarazo humano. Un problema con el diagnóstico de la preeclampsia es que ni la hipertensión ni la proteinuria son sensibles o específicos, especialmente en mujeres con presentaciones atípicas. La orina de mujeres preeclámpticas está altamente enriquecida en proteínas mal plegadas. Debido a este enriquecimiento en proteínas mal plegadas, se puede usar una simple prueba con colorante, usando un colorante con una afinidad por las proteínas mal plegadas como herramienta de diagnóstico y pronóstico clínico para la preeclampsia. Un ejemplo de dicha prueba con colorante es la prueba del punto de rojo Congo, que incluye el uso de un colorante azoico, el rojo Congo, con una afinidad por (por ejemplo, capacidad para unirse a) proteínas mal plegadas.

La invención proporciona métodos de determinación de que una muestra de orina de una mujer embarazada contiene o no contiene proteínas mal plegadas como se define en las reivindicaciones. En otro aspecto, la invención proporciona métodos de determinación de si una mujer embarazada tiene o está en riesgo de preeclampsia.

En el presente documento se describen enfoques científicos y tecnológicos para tratar las limitaciones de la tira reactiva de orina típica para la evaluación de la proteinuria. Se describe un método basado en papel (denominado, en algunos casos, el kit Congo Red Dot Simple) que permite resultados semicuantitativos en un corto periodo de tiempo (por ejemplo, 2 minutos). También se describe un método basado en teléfono inteligente (denominado, en algunos casos, el kit Congo Red Dot Quant) para el análisis de imágenes, que permite una evaluación cuantitativa y no sesgada de proteínas mal plegadas en orina en un corto periodo de tiempo (por ejemplo, 7 minutos) con potencial, por ejemplo, para tratar la incapacidad para completar una evaluación de proteinuria de 24 horas en instalaciones sanitarias, tales como instalaciones limitadas de recursos limitados.

Se debe entender que el rojo Congo es un ejemplo no limitante de un colorante que se puede usar según la presente divulgación. Por simplicidad, las pruebas y los kits descritos en el presente documento se refieren con referencia específica al rojo Congo (por ejemplo, el kit Congo Red Dot Simple); sin embargo, en algunas realizaciones, se puede usar un colorante, distinto del rojo Congo, con una afinidad por proteínas mal plegadas y, como se explica más adelante, celulosa. Similarmente, se hace referencia a "congofilia en la orina", que se refiere a orina con proteínas mal plegadas que se unen al rojo Congo. Se debe entender que este término no pretende ser limitante. Las proteínas que

son congófilas también pueden tener una afinidad por otros colorantes que se pueden usar como sustitutos del rojo Congo.

5 Como se describe en el presente documento, las condiciones en las que el colorante se une a las proteínas mal plegadas y un material que contiene grupos hidroxilo libres incluyen condiciones de temperatura ambiente (por ejemplo, ~25 °C) durante 30 minutos a 3 horas, o más (por ejemplo, 30 minutos, 1 hora, 2 horas o 3 horas). Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además comparar el grado al que la disolución (por ejemplo, de orina y colorante) difunde (por ejemplo, difunde radialmente) desde el punto sobre la superficie hasta el punto al que difunde un control positivo, y determinar que la muestra (por ejemplo, muestra de orina) contiene proteínas mal plegadas si el grado al que la disolución (por ejemplo, de orina y colorante) difunde (por ejemplo, difunde radialmente) desde el punto sobre la superficie es comparable al grado al que ocurre la difusión en un control positivo.

10 Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además comparar el grado al que la disolución (por ejemplo, de orina y colorante) difunde (por ejemplo, difunde radialmente) desde el punto sobre la superficie hasta el punto al que difunde un control negativo, y determinar que la muestra (por ejemplo, muestra de orina) no contiene proteínas mal plegadas si el grado al que la disolución (por ejemplo, de orina y colorante) difunde (por ejemplo, difunde radialmente) desde el punto sobre la superficie es comparable al grado al que ocurre la difusión en un control negativo.

15 Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además (e) diluir una muestra adicional (por ejemplo, muestra de orina) de la mujer embarazada, produciendo así una muestra diluida (por ejemplo, una muestra diluida de orina); (f) combinar la muestra diluida (por ejemplo, muestra de orina) con un colorante que se une a proteínas mal plegadas y una superficie que comprende un material que contiene grupos hidroxilo libres (por ejemplo, celulosa), produciendo así una disolución (por ejemplo, de orina y el colorante); (g) aplicar la disolución de (f) a una superficie que comprende celulosa, en condiciones en las que el colorante se une a proteínas mal plegadas, se une a una superficie que comprende un material que contiene grupos hidroxilo libres, o se une a proteínas mal plegadas y una superficie que comprende un material que contiene grupos hidroxilo libres, produciendo así un punto sobre la superficie; (h) mantener el punto sobre la superficie en condiciones en las que ocurre la difusión de una disolución (por ejemplo, de orina que comprende proteínas mal plegadas y colorante); y (i) determinar que la muestra diluida (por ejemplo, una muestra diluida de orina) contiene proteínas mal plegadas si difunde el colorante (por ejemplo, difunde radialmente) desde el punto sobre la superficie de la etapa (h) o determinar que la muestra (por ejemplo, muestra de orina) no contiene proteínas mal plegadas si el colorante no difunde (por ejemplo, difunden radialmente) desde el punto sobre la superficie mantenida en (h).

20 25 30 En algunos casos, la muestra adicional (por ejemplo, la muestra de orina) se diluye hasta el punto necesario para las condiciones en las que el método se lleva a cabo, tal como 5 veces a 15 veces (por ejemplo, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces o 15 veces).

35 En algunos casos, el sujeto es una mujer embarazada. En algunos casos, el sujeto es una mujer embarazada que se sospecha que tiene preeclampsia. En algunos casos, el sujeto es una mujer embarazada en riesgo de desarrollar (por ejemplo, tiene predisposición genética a, o ha tenido previamente) preeclampsia. En algunos casos, los métodos comprenden además diagnosticar la mujer embarazada con que tiene preeclampsia, o que es probable que desarrolle preeclampsia, si la muestra (por ejemplo, muestra de orina) contiene proteínas mal plegadas o si se detectan proteínas mal plegadas.

En algunos casos, el colorante es rojo Congo.

40 En algunos casos, la concentración del colorante en la disolución es 0,05 % a 0,2 %. Por ejemplo, la concentración del colorante en la disolución puede ser 0,1 %.

En algunos casos, el material que contiene grupos hidroxilo libres es celulosa. En algunas realizaciones, la superficie es papel o contiene papel.

En algunos casos, la superficie comprende además un reverso adhesivo.

45 Algunos aspectos de la presente divulgación describen métodos de determinación de que una muestra (por ejemplo, una muestra de orina) obtenida de un sujeto (por ejemplo, una mujer embarazada) contiene o no contiene proteínas mal plegadas. En algunos casos, los métodos comprenden (a) combinar una muestra (por ejemplo, una muestra de orina) obtenida de un sujeto (por ejemplo, una mujer embarazada) con un primer colorante que se une a proteínas mal plegadas y un material que contiene grupos hidroxilo libres (por ejemplo, celulosa) y un segundo colorante que es un color diferente del primer colorante y no se une a proteínas mal plegadas y un material que contiene grupos hidroxilo libres (por ejemplo, celulosa), produciendo así una disolución (por ejemplo, de orina y dos colorantes); (b) aplicar la disolución a una superficie que comprende un material que contiene grupos hidroxilo libres (por ejemplo, celulosa), en condiciones en las que el primer colorante se une a proteínas mal plegadas, se une a la superficie que comprende material que contiene grupos hidroxilo libres (por ejemplo, celulosa), o se une a proteínas mal plegadas y la superficie que comprende material que contiene grupos hidroxilo libres, produciendo así un punto sobre la superficie; (c) mantener el punto sobre la superficie en condiciones en las que ocurre la difusión de una disolución (por ejemplo, de orina que comprende proteínas mal plegadas y colorante); y (d) determinar que la muestra (por ejemplo, muestra de orina) contiene proteínas mal plegadas si el primer colorante y el segundo colorante difunden (por ejemplo,

radialmente) a un grado apreciable desde el punto sobre la superficie, o determinar que la muestra (por ejemplo, muestra de orina) no contiene proteínas mal plegadas si el segundo colorante, pero no el primer colorante, difunde (por ejemplo, radialmente) a un grado apreciable desde el punto sobre la superficie.

5 Algunos aspectos de la presente divulgación describen métodos de detección de proteínas mal plegadas en un sujeto (por ejemplo, una mujer embarazada). En algunos casos, los métodos comprenden (a) combinar una muestra (por ejemplo, una muestra de orina) obtenida de un sujeto (por ejemplo, una mujer embarazada) con (i) un primer colorante que se une a proteínas mal plegadas y un material que contiene grupos hidroxilo libres (por ejemplo, celulosa) y (ii) un segundo colorante que es un color diferente del primer colorante y no se une a proteínas mal plegadas y un material que contiene grupos hidroxilo libres (por ejemplo, celulosa), produciendo así una disolución (por ejemplo, de orina y dos colorantes); (b) aplicar la disolución a una superficie que comprende celulosa, en condiciones en las que el primer colorante se une a proteínas mal plegadas y celulosa, produciendo así un punto sobre la superficie; (c) mantener el punto sobre la superficie en condiciones en las que ocurre la difusión de una disolución (por ejemplo, de orina que comprende proteínas mal plegadas y colorante); y (d) detectar proteínas mal plegadas en la muestra (por ejemplo, muestra de orina) si el primer colorante y el segundo colorante difunden (por ejemplo, difunden radialmente) a un grado apreciable desde el punto sobre la superficie, o no detectar proteínas mal plegadas en la muestra (por ejemplo, muestra de orina) si el segundo colorante, pero no el primer colorante, difunde (por ejemplo, radialmente) a un grado apreciable desde el punto sobre la superficie.

20 En algunos casos, los métodos comprenden además comparar el grado al que la disolución (por ejemplo, de orina y dos colorantes) difunde (por ejemplo, difunde radialmente) desde el punto sobre la superficie hasta el punto al que ocurre la difusión en un control positivo, y determinar que la muestra (por ejemplo, muestra de orina) contiene proteínas mal plegadas si el grado al que la disolución (por ejemplo, de orina y dos colorantes) difunde radialmente desde el punto sobre la superficie es comparable al grado al que ocurre la difusión en el control positivo.

25 En algunos casos, los métodos comprenden además comparar el grado al que difunde la disolución (por ejemplo, de orina y dos colorantes) (por ejemplo, difunde radialmente) desde el punto sobre la superficie hasta el punto al que ocurre la difusión en un control negativo, y determinar que la muestra (por ejemplo, muestra de orina) contiene proteínas mal plegadas si el grado al que la disolución (por ejemplo, de orina y dos colorantes) difunde radialmente desde el punto sobre la superficie es comparable al grado al que ocurre la difusión en el control negativo.

En algunos casos, los métodos comprenden además adquirir una imagen del punto sobre la superficie. Se puede adquirir una imagen, por ejemplo, usando un teléfono móvil.

30 En algunos casos, los métodos comprenden además cuantificar la diferencia entre el grado al que difunde el primer el colorante radialmente desde el punto sobre la superficie y el grado al que difunde el segundo colorante radialmente desde el punto sobre la superficie. Se pueden usar dos colorantes diferentes, por ejemplo, en el procedimiento de calibración, como se proporciona en el presente documento.

35 En algunos casos, los métodos comprenden además calcular un coeficiente de correlación entre el grado al que difunde el primer colorante radialmente desde el punto sobre la superficie y el grado al que difunde el segundo colorante radialmente desde el punto sobre la superficie. Por ejemplo, se puede calcular un coeficiente de correlación usando un algoritmo (por ejemplo, algoritmo que evalúa el coeficiente de correlación (ρ) entre la señal en canales de color diferente de imágenes tomadas con un teléfono inteligente).

En algunos casos, el primer colorante es rojo Congo.

40 En algunos casos, el segundo colorante es erio Glaucina.

En algunos casos, la concentración del primer colorante en la disolución es 0,05 % a 0,2 %. Por ejemplo, la concentración del primer colorante en la disolución puede ser 0,1 %.

En algunos casos, la concentración del segundo colorante en la disolución es 0,05 % a 0,2 %. Por ejemplo, la concentración del segundo colorante en la disolución puede ser 0,1 %.

45 En algunos casos, los métodos comprenden además (e) diluir una muestra adicional (por ejemplo, muestra de orina) de la mujer embarazada, produciendo así una muestra diluida (por ejemplo, muestra de orina), (f) combinar la muestra (por ejemplo, muestra de orina) con un primer colorante que se une a proteínas mal plegadas y un material que contiene grupos hidroxilo libres (por ejemplo, celulosa) y un segundo colorante que es diferente del primer colorante y no se une a proteínas mal plegadas y un material que contiene grupos hidroxilo libres (por ejemplo, celulosa), produciendo así una disolución (por ejemplo, de orina y dos colorantes); (g) aplicar la disolución de (f) a una superficie que comprende un material que contiene grupos hidroxilo libres (por ejemplo, celulosa) en condiciones en las que el primer colorante se une a proteínas mal plegadas y un material que contiene grupos hidroxilo libres (por ejemplo, celulosa), produciendo así un punto sobre la superficie; (h) mantener el punto sobre la superficie de la etapa (g) en condiciones en las que ocurre la difusión de una disolución (por ejemplo, de orina que comprende proteínas mal plegadas y colorante); y (i) determinar que la muestra diluida (por ejemplo, muestra de orina) contiene proteínas mal plegadas si el primer colorante y el segundo colorante difunden (por ejemplo, difunden radialmente) desde el punto sobre la superficie de (h), o determinar que la muestra (por ejemplo, muestra de orina) no contiene proteínas mal

plegadas si el segundo colorante, pero no el primer colorante, difunde (por ejemplo, difunde radialmente) desde el punto sobre la superficie de (h).

En algunos casos, la muestra adicional (por ejemplo, muestra de orina) se diluye 5 veces a 15 veces.

5 También se describen en el presente documento kits para determinar que una muestra (por ejemplo, una muestra de orina) obtenida de un sujeto (por ejemplo, mujer embarazada) contiene o no contiene proteínas mal plegadas. Se describen kits para detectar proteínas mal plegadas en una muestra (por ejemplo, una muestra de orina) obtenida de un sujeto (por ejemplo, mujer embarazada). Los kits descritos comprenden (a) un colorante que se une a proteínas mal plegadas y celulosa, (b) una superficie que comprende un material que contiene grupos hidroxilo libres (por ejemplo, celulosa) y, opcionalmente, un aplicador.

10 En algunos casos, la superficie que comprende un material que contiene grupos hidroxilo libres (por ejemplo, celulosa) está fijada a una superficie adicional.

En algunos casos, el colorante está en una disolución acuosa (por ejemplo, precargada dentro de un aplicador). Una disolución acuosa puede comprender, por ejemplo, agua u otro tampón (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato). En algunos casos, una disolución acuosa no contiene un alcohol (por ejemplo, etanol, metanol, isopropanol).

15 En algunos casos, la concentración del colorante en la disolución acuosa es 0,2 % a 1,0 %. Por ejemplo, la concentración del colorante en la disolución acuosa puede ser 0,5 %.

En algunos casos, el volumen de la disolución acuosa es 1 μL a 10 μL . Por ejemplo, el volumen de la disolución acuosa puede ser 5 μL .

20 En algunos casos, el kit comprende además un aplicador (por ejemplo, una pipeta, tal como una pipeta desechable). En algunos casos, el aplicador se precarga con el colorante.

En algunos casos, el kit comprende además un control positivo, un control negativo, o ambos, un control positivo y un control negativo.

En algunos casos, el kit comprende además imágenes de resultados positivos y negativos para comparación para probar resultados para determinar si la muestra es positiva o negativa para la presencia de proteínas mal plegadas.

25 En el presente documento también se describen kits para determinar que una muestra (por ejemplo, muestra de orina) obtenida de un sujeto (por ejemplo, mujer embarazada) contiene o no contiene proteínas mal plegadas. Se describen kits para detectar proteínas mal plegadas en una muestra (por ejemplo, muestra de orina) obtenidas de un sujeto (por ejemplo, mujer embarazada). En algunos casos, los kits comprenden (a) un primer colorante que se une a proteínas mal plegadas y un material que contiene grupos hidroxilo libres (por ejemplo, celulosa), (b) un segundo colorante que es un color diferente del primer colorante y no se une a proteínas mal plegadas y un material que contiene grupos hidroxilo libres (por ejemplo, celulosa), (c) una superficie que comprende un material que contiene grupos hidroxilo libres (por ejemplo, celulosa), y (d) opcionalmente, un aplicador.

30 En algunos casos, el primer colorante es rojo Congo. En algunos casos, el segundo colorante es erio Glaucina.

En algunos casos, la superficie es papel.

35 En algunos casos, el primer colorante y el segundo colorante se combinan en una disolución acuosa, produciendo así una disolución acuosa de dos colorantes.

En algunos casos, la concentración de los dos colorantes en la disolución acuosa es 0,2 % a 1,0 %. Por ejemplo, la concentración de los dos colorantes en la disolución acuosa puede ser 0,5 %.

40 En algunos casos, el volumen de la disolución acuosa es 1 μL a 10 μL . Por ejemplo, el volumen de la disolución acuosa puede ser 7,5 μL .

En algunos casos, el aplicador se precarga con la disolución acuosa de dos colorantes.

En algunos casos, el aplicador es una pipeta (por ejemplo, una pipeta desechable).

En algunos casos, los kits comprenden además un control positivo, un control negativo, o ambos, un control positivo y un control negativo.

45 En el presente documento también se describen composiciones que comprenden orina (por ejemplo, obtenida de una mujer embarazada), un colorante que se une a proteínas mal plegadas y celulosa, y una superficie que comprende celulosa.

En el presente documento se describe además un aparato que comprende uno cualquiera de los kits descritos en el presente documento y una muestra de orina obtenida de una mujer embarazada.

Los métodos descritos pueden comprender además tratar el sujeto para preeclampsia (por ejemplo, administrar medicación para reducir la tensión arterial, administrar un corticosteroide, administrar una medicación anticonvulsiva).

5 Algunos aspectos de la presente divulgación se refieren a métodos de determinación de si una mujer embarazada tiene, o está en riesgo de, preeclampsia, comprendiendo el método (a) combinar una muestra de orina de una mujer embarazada con rojo Congo, produciendo así una disolución de orina y rojo Congo; (b) aplicar la disolución a una superficie que comprende celulosa, produciendo así un punto sobre la superficie; (c) mantener el punto sobre la superficie en condiciones en las que ocurre la difusión de una disolución de orina que comprende colorante; y (d) determinar que la mujer embarazada tiene, o está en riesgo de, preeclampsia si el rojo Congo difunde a un grado apreciable desde el punto sobre la superficie.

10 Algunos aspectos descritos en el presente documento proporcionan métodos de detección de proteínas mal plegadas en una muestra de orina obtenida de una mujer embarazada, que comprenden (a) aplicar, a una superficie sobre la que se adsorbe rojo Congo, una muestra de orina obtenida de una mujer embarazada, produciendo así una superficie que contiene orina y rojo Congo, y (b) someter la superficie que contiene orina y rojo Congo a isoelectroenfoque, y (c) determinar el grado de, o la tasa de, migración del rojo Congo. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además comparar el grado de, o la tasa de, migración de rojo Congo con un control positivo o negativo apropiado, en donde una diferencia en el grado de, o la tasa de, migración del rojo Congo con respecto al control apropiado es indicativo de proteínas mal plegadas en la muestra de orina. "Isoelectroenfoque" se refiere a una técnica para separar diferentes moléculas por diferencias en su punto isoeléctrico (pI). El isoelectroenfoque es un tipo de electroforesis de zona, normalmente realizada sobre proteínas en un gel (u otro sustrato poroso), que se aprovecha del hecho de que la carga total sobre la molécula de interés es una función del pH de sus alrededores.

En algunos casos, la superficie es una superficie porosa que permite el movimiento (por ejemplo, migración, por ejemplo, hacia un electrodo positivo o negativo) de proteínas y colorante. Por ejemplo, la superficie puede ser un gel de agarosa o perlas de agarosa. Se contemplan otras superficies porosas en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La FIG. 1 muestra una comparación de los ejemplos de métodos de la presente divulgación usando papel "normal" con muestras de orina obtenidas de tres sujetos de prueba diferentes: una mujer embarazada con preeclampsia grave (Caso 1); una mujer embarazada con preeclampsia (Caso 2); y una mujer embarazada sin preeclampsia. "Blanco" representa el colorante rojo Congo mezclado con agua; "Muestra" (dos adyacentes entre sí) representa el colorante rojo Congo mezclado con la muestra de orina designada.

30 La FIG. 2 muestra una comparación de los ejemplos de un papel de prueba "Bueno", un papel de prueba "Aceptable" y un papel de prueba "Malo". Los ejemplos mostrados sirven de base para un algoritmo que evalúa el coeficiente de correlación (ρ) entre la señal en canales de color diferente, en este caso particular, los canales rojo y azul, de imágenes tomadas con un teléfono inteligente. El cálculo de ρ_{Norm} se basa en una muestra de una mujer embarazada sin preeclampsia; el cálculo de ρ_{PE} se basa en una muestra de una mujer embarazada con preeclampsia.

Las FIGS. 3A-3C muestran fotografías de los ejemplos de tres kits de diagnóstico diferentes de la presente divulgación. La FIG. 3A representa un kit Congo Red Simple; la FIG. 3B representa un kit Congo Red Quant; y la FIG. 3C representa una matriz Congo Red Quant.

La FIG. 4 muestra fotografías de cada etapa de un ejemplo de un análisis de la matriz Congo Red Quant.

40 La FIG. 5 muestra un diagrama de flujo del diseño del estudio y mujeres que donaron muestras de orina para una prueba del punto de rojo Congo del Ejemplo 2.

Las FIGS. 6A-6I muestran ejemplos de características espectrales de la agregación de proteínas y congofilia en orina de mujeres con preeclampsia grave (PEg).

Las FIGS. 7A-7F muestra ejemplos de características de diagnóstico y de pronóstico de congofilia en la orina.

45 Las FIGS. 8A-8D muestran ejemplos de la inmunorreactividad oligomérica de orina y relaciones con la intensidad de la preeclampsia.

Las FIGS. 9A-9K muestran ejemplos de características microscópicas e inmunorreactivas de agregados congófilos aislados de orina de mujeres con preeclampsia grave (PEg).

50 Las FIGS. 10A-10F muestran ejemplos de proteoformas de la proteína precursora de amiloide (APP) en orina de mujeres con preeclampsia grave.

Las FIGS. 11A-11C muestran ejemplos de la expresión de ARNm de enzimas de procesamiento de proteína precursora de amiloide y proteína precursora de amiloide prototipo en placenta humana. La Fig. 11D muestra la cuantificación relativa de transcritos encontrados estadísticamente invariables.

Las FIG. 12A-12P muestran ejemplos de inmunolocalización de enzimas de procesamiento de proteína precursora de amiloide y proteína precursora de amiloide prototipo en placenta humana.

La FIG. 13 muestran ejemplos de relaciones cuantitativas de congofilia en la orina con proteinuria en la orina de 24 horas.

5 La FIG. 14 muestra un ejemplo de una validación de transferencia Western de identidades de proteína asociadas al plegoma erróneo de preeclampsia.

Las FIGS. 15A-15F muestran un ejemplo de una predicción de agregación comparativa de las isoformas de proteína 6-16 inducible por interferón (G1P3). Isoforma A (SEQ ID NO: 1); isoforma B (SEQ ID NO: 2); e isoforma C (SEQ ID NO: 3).

10 Las FIGS. 16A-16D muestran ejemplos de patrones de inmunorreactividad de proteína precursora de amiloide en orina de una mujer embarazada con preeclampsia: efecto de la reducción de albúmina (FIG. 16A, 16B) y patrones de inmunorreactividad de APP (FIG. 16C, 16D).

Las FIGS. 17A-17D muestran ejemplos de inmunolocalizaciones de epítopes ALZ90 y G1P3 en placas calcificadas de tipo enfermedad de Alzheimer en placenta preecláptica.

15 Las FIGS. 18A-18J muestran ejemplos de patrones de inmunorreactividad para las β -secretasas BACE1 y BACE2 en placenta de una mujer con preeclampsia.

Las FIGS. 19A-19C muestran un ejemplo de un perfil proteómico de la orina de preeclampsia (PE) con componentes de biomarcador que se mapean con una secuencia de SERPINA1 (SEQ ID NO: 4). FIG. 19C: fragmentos del extremo C de SERPINA1 (proteoformas) - SEQ ID NO: 5 (arriba) y SEQ ID NO: 6 (abajo).

20 Las FIGS. 20A-20F muestran una comparación de un ejemplo de los algoritmos de cálculo automatizados de la retención de rojo Congo durante la etapa 1 del estudio descrito en el Ejemplo 3.

La FIG. 21 muestra un diagrama de flujo de trabajo de un ejemplo de una prueba del punto de rojo Congo y rutina de procesamiento de imágenes.

25 Las FIGS. 22A-22C muestran la evaluación y prueba de equivalencia de un ejemplo de un cálculo de retención de rojo Congo asistido por teléfono inteligente en la etapa 2 del estudio descrito en el Ejemplo 3.

La FIG. 23 muestra un flujo de trabajo pantalla por pantalla de un ejemplo de una aplicación de teléfono inteligente de matriz de prueba del punto de rojo Congo.

La FIG. 24 muestra un ejemplo de una plantilla de posicionamiento de muestras para un análisis de matrices.

30 Las FIGS. 25A-25B representan un ejemplo de un kit Congo Red Dot Simple de la presente divulgación. La FIG. 25A muestra la parte delantera de un kit configurado tres veces. La FIG. 25B muestra la parte posterior de un kit configurado tres veces.

Las FIGS. 26A-26B representan un ejemplo de un Congo Red Dot Quant Kit de la presente divulgación. La FIG. 26A muestra la parte delantera de un kit configurado tres veces. La FIG. 26B muestra la parte posterior de un kit configurado tres veces.

35 La FIG. 27A muestra ejemplos de difusión de gotas de orina de control con relación creciente de rojo Congo/colorante alimentario de izquierda a derecha. La FIG. 27B muestra ejemplos de difusión de gotas de orina preeclápticas con relación creciente de rojo Congo/colorante alimentario de izquierda a derecha.

40 La FIG. 28 muestra una imagen que contiene muestras de orina no preecláptica (carriles 1 y 3) y orina preecláptica (carriles 4 y 5) aplicada a un gel de agarosa que contiene rojo Congo (por ejemplo, adsorbido sobre la superficie del gel). Cuando el gel se sometió a isoelectroenfoque, las proteínas en la orina se abren paso a través del gel y cuando llegan al colorante rojo Congo adsorbido, las proteínas intercalan con el colorante. El rojo Congo asociado a proteínas congófilas (en orina preecláptica) migra a través del gel a una tasa (o a un grado) diferente del rojo Congo no asociado a proteína congófila.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 Un reto significativo han sido que los pilares del diagnóstico de la preeclampsia (PE), la hipertensión y la proteinuria se basan en mediciones cuantitativas de la tensión arterial (TA) y proteínas en la orina, que son sintomáticas de, pero no específicas de, la preeclampsia. Además, estas mediciones son difíciles de lograr en entornos de bajos recursos. Además, el diagnóstico de la preeclampsia sigue siendo un reto para los especialistas en la medicina materno-fetal, incluso en instalaciones de altos recursos, cuando la preeclampsia coexiste con hipertensión crónica (HTNcr) (por ejemplo, caso conocido como PEsp) o enfermedades renales crónicas. Se plantean otros retos por manifestaciones clínicas "atípicas", tales como síntomas neurológicos aislados, dolor del cuadrante superior derecho, aumento de

enzimas hepáticas y oliguria que algunas veces se manifiesta con hipertensión mínima o ausente o proteinuria. En entornos de altos recursos, estas mujeres son ingresadas en hospitales de nivel terciario y se realizan extensos análisis de sangre y orina cada 4-6 horas junto con la monitorización continua de la tensión arterial y fetal. En muchos entornos de bajos recursos y países subdesarrollados, esto es prácticamente inalcanzable.

5 Según el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF), en el mundo en desarrollo, el 80 % de las mujeres reciben asistencia prenatal (AP) de un profesional sanitario especializado, al menos una vez durante el embarazo. Sin embargo, la calidad y el número de visitas AP siguen siendo inferiores al óptimo para la detección eficaz de la preeclampsia. Como la práctica de la asistencia prenatal sola ha demostrado ser ineficaz en la prevención de la eclampsia, el dejar de medir la tensión arterial y la proteinuria en cada visita de asistencia prenatal representa una
10 oportunidad perdida. En realidad, durante las visitas de asistencia prenatal, parece que a más mujeres se les mide su tensión arterial que se les analiza su orina para proteínas. Evidentemente, sin evaluar la proteinuria, no se puede hacer un reconocimiento o diagnóstico diferencial apropiado de la preeclampsia a partir de las afecciones hipertensivas más benignas asociadas al embarazo, tales como HTNcr e hipertensión gestacional (HTgest). La mejora de la evaluación de la proteinuria para la detección de la preeclampsia en instalaciones de bajos recursos tiene el potencial de llenar un vacío.
15

Para que sea significativo para determinar o descartar la preeclampsia en la configuración clínica, la proteinuria se puede evaluar cuantitativamente. Los cambios fisiológicos con la hidratación, postura y el propio embarazo cambian la cantidad de proteínas presentes en la orina. Por estos motivos, el método de referencia para la evaluación de la proteinuria en el embarazo es una obtención de una muestra de orina cronometrada (24 hora). En los EE. UU. y
20 Canadá, la mayoría de las mujeres con presunta preeclampsia se hospitaliza durante la recogida, aunque algunas pueden ser tratadas como pacientes ambulatorios y se les indica que recojan la muestra de orina de 24 horas en casa. La carga de recoger una muestra completa, y el requisito de refrigeración entre cada vaciado, conduce al incumplimiento e inexactitud de la prueba. Un estudio en Canadá que probó la completitud de las recogidas de 24 horas encontró que hasta el 60 % de los especímenes de mujeres evaluadas para preeclampsia fueron volumétricamente inadecuados. Por todos los motivos anteriores, y aunque se sabe que es menos preciso que la proteinuria de 24 horas, la tira reactiva de orina sigue siendo un método popular para la detección de la preeclampsia.
25

Varios estudios han mostrado que las tiras reactivas de orina están asociadas con abundantes positivos y negativos falsos hasta tal punto que hace que no sean fiables para detectar o excluir proteinuria en mujeres embarazadas. Un estudio prospectivo de más de 900 mujeres mostró que cuando se aplicó en una población de bajo riesgo, la tira reactiva en ausencia de hipertensión es un mal factor pronóstico del desarrollo de preeclampsia (por ejemplo, alta tasa de positivos falsos). Aproximadamente el 40 % de las mujeres en el estudio tuvieron al menos un resultado de +1 o más durante el embarazo. Sin embargo, solo el 4 % desarrolló preeclampsia. Las infecciones urinarias, la contaminación de la orina con secreciones vaginal, sangre o semen son casi siempre las causas de las altas cifras de positivos falsos. Se encontró además que la autoevaluación por el paciente de las lecturas de las tiras reactivas sobreestimó la positividad cuando se compararon con las lecturas de las enfermeras. Las tiras reactivas también requieren un almacenamiento, manipulación y lectura visual subjetiva apropiados que se han citado como importantes fuentes de error incluso entre el personal cualificado. Además, es bien reconocido que el reactivo colorimétrico usado por las tiras reactivas (por ejemplo, azul de tetrabromofenol) solo detecta una fracción de las proteínas secretadas en la orina con preeclampsia. Por ejemplo, dos tipos de proteínas, cadenas ligeras de IgG análoga a la proteína de Bence-Jones y albúmina fragmentada, están asociadas patógenamente a la preeclampsia y dan reacción cero de la tira reactiva. Esto sugiere que la tira reactiva puede subestimar la cantidad total, y carecer de datos cualitativos importantes relacionados con el tipo de proteínas presentes en la orina en el momento de la detección.
30
35
40

En el presente documento se describen métodos y composiciones (por ejemplo, kits) que: (1) son aceptados para la clínica de asistencia prenatal de primer nivel; (2) son al menos tan fáciles de usar como la tira reactiva, pero más específicos para la proteinuria de preeclampsia; (3) son más reproducibles a escala cuantitativa; y (4) tienen el potencial de predecir el resultado.
45

En algunos casos, los métodos y composiciones de la presente divulgación están de acuerdo con los criterios ASSURED (Affordable (asequible económicamente) para aquellos en riesgo de infección, Sensitive (sensible) y Specific (específico), User-Friendly (sencillo de realizar), Rapid and Robust (rápido y robusto), Equipment-free (sin instrumental) y Delivered to those in need (accesible a quien los necesiten)) para diagnósticos ideales. Sorprendentemente, las mujeres que tienen preeclampsia secretan en la orina altos niveles de proteínas mal plegadas. Esto aumenta la intensidad y precede hasta 10 semanas antes de la aparición de manifestaciones clínicas. En principio, este fenómeno clasifica la preeclampsia como un trastorno conformacional de las proteínas similar a la enfermedad de Alzheimer y priónica. Además, la presencia de proteínas mal plegadas se puede detectar en orina y, en algunos casos, en sangre obtenida de mujeres con preeclampsia usando ciertos colorantes (por ejemplo, el colorante azoico rojo Congo). El rojo Congo, por ejemplo, tiene una propiedad de autoensamblaje y puede iniciar la formación de grandes oligómeros insolubles después de la unión a proteínas de amiloide que tienen una amplia estructura de lámina β. El rojo Congo se puede intercalar con estructuras de la lámina β si está presente en proteínas en muestras (por ejemplo, muestras de orina). En el presente documento se describe una simple prueba de diagnóstico de orina colorimétrica para preeclampsia, denominada la prueba del punto de rojo Congo. La detección de proteínas mal plegadas en la orina tiene valor diagnóstico y pronóstico para la preeclampsia, aunque se evalúa en una muestra que es un vaciado aleatorio individual. Los motivos para esto, y a diferencia de los métodos actualmente empleados
50
55
60

(por ejemplo, tira reactiva y turbidimetría en recogidas de orina de 24 horas), es, como se muestra en el presente documento, que la presencia de las proteínas mal plegadas está más estrechamente asociada a la fisiopatología de la preeclampsia que a la presencia de proteinuria no específica. Por tanto, en algunos casos, cuando se considera un diagnóstico de preeclampsia, un resultado positivo de proteínas mal plegadas en orina sugiere que las proteínas responsables de la proteinuria clínicamente significativa también están mal plegadas. Este hallazgo cualitativo de la presencia de proteinuria mal plegada es una característica única de la preeclampsia que no acompaña a otras afecciones hipertensivas que ocurren durante la gestación.

Basándose, en parte, en esta evaluación, en el presente documento se proporcionan métodos y composiciones (por ejemplo, kits) para, por ejemplo, establecer un diagnóstico de preeclampsia con un alto grado de certeza basándose en proteínas mal plegadas en la orina. Los métodos y las composiciones proporcionan una ventaja clínica significativa para el personal sanitario debido a que permiten una rápida detección diagnóstica suficientemente fiable de manera que se puedan emplear intervenciones apropiadas.

Algunos aspectos de la presente divulgación se refieren a métodos de determinación de que una muestra de orina obtenida de un sujeto (por ejemplo, una mujer embarazada) contiene o no contiene proteínas mal plegadas. Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a métodos de detección de proteínas mal plegadas en una muestra (por ejemplo, muestra de orina) obtenida de un sujeto (por ejemplo, una mujer embarazada). El plegamiento de proteínas es el proceso por el que una proteína asume su configuración de mínima energía. Cada proteína existe como un polipéptido desplegado o espiral aleatoria cuando se traduce de una secuencia de ARNm en una cadena de aminoácidos lineal. Durante el plegamiento de proteínas, un polipéptido se pliega en su estructura tridimensional característica y funcional a partir de la espiral aleatoria. Pueden resultar proteínas mal plegadas cuando una proteína sigue la vía de plegamiento errónea o embudo minimizador de energía, y el mal plegamiento puede ocurrir espontáneamente. Las proteínas mal plegadas también pueden resultar de degradación aberrante, mecanismos de eliminación o multitud de proteínas. Las proteínas mal plegadas normalmente son, pero no siempre, insolubles, y tienden a formar agregados lineales o fibrilares largos denominados depósitos de amiloide (Dobson C. M. Nature 426, 884-890, 2003). Los ejemplos de proteínas mal plegadas que se pueden detectar individualmente, o como agregados heterólogos, incluyen, sin limitación, serpina-1, albúmina, cadena ligera libre de IgG κ (kFLC), ceruloplasmina, proteína 6-16 inducible por interferón (IFI6 también conocida como G1P3), proteína precursora de amiloide (APP). En algunos casos, las proteínas mal plegadas son proteínas congófilas o agregados de proteínas congófilas. Las proteínas mal plegadas, en algunos casos, pueden ser proteínas de amiloide o agregados de lámina beta. En algunos casos, las proteínas mal plegadas son agregados de fragmentos de escisión no aleatoria de serpina-1 y albúmina. En algunos casos, las proteínas mal plegadas son proteínas amiloidogénicas y pueden mostrar epítopes, que incluyen, por ejemplo, oligómeros prefibrilares y protofibrillas anulares.

Se puede recoger una muestra de orina por cualquier medio habitual, tal como, por ejemplo, pero no se limitan a, usando un método de recogida limpia, que utiliza un vaso (por ejemplo, un vaso estéril) con una tapa. En algunos casos, se recoge una muestra de orina cuando la orina ha estado en la vejiga de un sujeto durante 1 a 5 horas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 horas). En algunos casos, se recoge una muestra de orina cuando la orina ha estado en la vejiga de un sujeto durante menos de una hora, o más de 5 horas. Se debe entender que toda la muestra de orina recogida de un sujeto no se usa necesariamente en el método de la presente divulgación. En algunos casos, una "muestra de orina" para su uso en un método de la presente divulgación (por ejemplo, una muestra que se combina con un colorante) es 10 μ L a 1 mL, o más. En algunos casos, una muestra de orina es 50 μ L a 500 μ L. En algunos casos, una muestra de orina es 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L, 40 μ L, 50 μ L, 60 μ L, 70 μ L, 80 μ L, 90 μ L, 100 μ L, 110 μ L, 120 μ L, 130 μ L, 140 μ L, 150 μ L, 160 μ L, 170 μ L, 180 μ L, 190 μ L o 200 μ L. En algunos casos, una muestra de orina es 100 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 400 μ L o 500 μ L.

Un sujeto puede ser cualquier sujeto que se sospecha que tiene proteínas mal plegadas en su orina. En algunos casos, un sujeto es una mujer, tal como una mujer embarazada. En algunos casos, un sujeto es una mujer embarazada que se sospecha que tiene y/o está en riesgo de desarrollar preeclampsia. Se puede obtener una muestra de orina de la presente divulgación de una mujer que está de 1 a 20 semanas, 20 a 40 semanas, o 1 a 40 semanas, de gestación, o después. En algunos casos, se obtiene una muestra de orina de una mujer embarazada que está de 1 a 5, 1 a 10, 1 a 15, 5 a 10, 5 a 15, 5 a 20, 10 a 15, 10 a 20, o 15 a 20 semanas de gestación. En algunos casos, se obtiene una muestra de orina de una mujer embarazada que está de 15 a 20, 15 a 25, 15 a 30, 15 a 35, 15 a 40, 20 a 30, 20 a 35, 20 a 40, 25 a 25, o 25 a 40 semanas de gestación. En algunos casos, una muestra de orina puede ser de una mujer embarazada que está de menos de 1 semana de gestación (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días de gestación). En algunos casos, se obtiene una muestra de orina de una mujer que está en el primer trimestre, segundo trimestre o tercer trimestre de embarazo. En algunos casos, se obtiene una muestra de orina de una mujer que no está embarazada y que está considerando quedarse embarazada (por ejemplo, para evaluar una nivel basal de congofilia). En algunos casos, se obtiene una muestra de orina de una mujer puerperal.

En algunos casos, se obtiene una muestra de orina de una mujer embarazada en cualquier o todas las revisiones prenatales y puerperales con un profesional sanitario. Por ejemplo, se puede obtener una muestra de orina en la primera visita prenatal, cada 4 semanas hasta la semana 28 de embarazo; cada 2 a 3 semanas hasta la semana 36 de embarazo; al menos cada semana durante el último mes de embarazo; después del parto; al recibir el alta de un centro sanitario y/o en cualquier revisión puerperal. La orina se puede obtener más frecuentemente de mujeres con

un problema médico preexistente, mujeres que desarrollan complicaciones durante el embarazo, o adolescentes embarazadas.

Diversas enfermedades neurodegenerativas y no neurológicas se provocan por, o se caracterizan por, la presencia de proteínas mal plegadas. Por ejemplo, la enfermedad neurodegenerativa más predominante provocada por la acumulación de proteínas mal plegadas es la enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington tienen orígenes de amiloide similares. Otro ejemplo más es la esclerosis lateral amiotrófica. Así, en algunos casos, un sujeto no es una mujer embarazada. En algunos casos, un sujeto es uno que se sospecha que tiene y/o está en riesgo de desarrollar un trastorno neurológico (por ejemplo, neurodegenerativo). En algunos casos, un sujeto es uno que se sospecha que tiene y/o está en riesgo de desarrollar un trastorno no neurológico.

Algunos aspectos de la presente divulgación incluyen combinar una muestra de orina de un sujeto (por ejemplo, una mujer embarazada) con un colorante que se une a proteínas mal plegadas (por ejemplo, se une preferencialmente) y también se une a celulosa o cualquier material que comprenda grupos hidroxilo libres, produciendo así una disolución de orina y colorante. Se considera que una muestra de orina y un colorante (o más de un colorante) están "combinados" si están en el mismo recipiente (por ejemplo, si la muestra de orina se añade a un recipiente que contiene el colorante, o si el colorante se añade a un recipiente que contiene la muestra de orina o si la muestra de orina y el colorante se combinan simultáneamente. Así, una "disolución de orina y colorante" se refiere a orina que contiene colorante. Se debe entender que la disolución puede o puede no contener componentes adicionales, tales como, por ejemplo, agua o tampón. En algunos casos, una muestra de orina de un sujeto se diluye (por ejemplo, con agua o tampón) antes de combinarla con el colorante. En algunos casos, una muestra de orina permanece sin diluir.

Un colorante que se une a proteínas mal plegadas es uno que tiene una afinidad por (por ejemplo, se intercala con) proteínas mal plegadas. Un ejemplo no limitante de un colorante que se une a proteínas mal plegadas es el rojo Congo. El rojo Congo es la sal de sodio de ácido 3,3'-([1,1'-bifenil]-4,4'-diil)bis(4-aminonaftaleno-1-sulfónico). Es un colorante diazoico secundario que es soluble en agua, dando una disolución coloidal roja. Se debe entender que según la presente divulgación se pueden usar otros colorantes que se unen a proteínas mal plegadas que incluyen, sin limitación, otros colorantes sustantivos (también conocidos como colorantes directos debido a que normalmente no requieren un mordiente y actúan mediante enlace de hidrógeno) tales como, por ejemplo, los originalmente extraídos de plantas o desarrollados para teñir algodón y después se encontró que tenían amiloides. Los ejemplos de dichos colorantes sustantivos para su uso como se proporciona en el presente documento incluyen, sin limitación, rojo sirio F3B (CI 35780), benzo scarlet 4BNS (CI 29200), sirius scarlet GG (CI 40270), naranja G y cristal violeta. Los ejemplos adicionales de colorantes para su uso como se proporciona en el presente documento incluyen, sin limitación, colorantes fluorescentes tales como tioflavina T y tioflavina S. En algunos casos, un colorante para su uso como se proporciona en el presente documento es azul de Evans, azul de tripano, sulfonato de amino-8-naftaleno (ANS) o bis-azo ANS.

Un colorante que se une a celulosa es uno que tiene una afinidad por (por ejemplo, se intercala con) fibras de celulosa. Los ejemplos de colorantes que se unen a fibras de celulosa que se pueden usar según la presente divulgación incluyen, sin limitación, rojo Congo, rojo sirio F3B (CI 35780), benzo scarlet 4BNS (CI 29200), sirius scarlet GG (CI 40270), naranja G, cristal violeta, tioflavina S, tioflavina T, azul de Evans, azul de tripano, ANS y bis-azo ANS.

Algunos aspectos de la presente divulgación incluyen aplicar una disolución de orina y colorante a una superficie que comprende celulosa, produciendo así un punto sobre la superficie. La celulosa es un compuesto orgánico con la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$, un polisacárido que incluye una cadena lineal de varios cientos hasta más de diez mil unidades de D-glucosa unidas por $\beta(1\rightarrow4)$. El término "celulosa" excluye la nitrocelulosa. Así, una superficie que comprende celulosa no comprende nitrocelulosa. Es decir, una superficie que comprende celulosa está sin (está libre de) nitrocelulosa. En algunos casos, sin embargo, una superficie que comprende celulosa puede comprender además nitrocelulosa, dependiendo del tipo de superficie y del colorante que se use.

Parece que los colorantes, tales como, por ejemplo, rojo Congo, tienen una afinidad no covalente por la celulosa y, así, se unen a la celulosa. Con respecto a la celulosa, se cree que el rojo Congo se adsorbe por enlace de hidrógeno entre grupos hidroxilo de las cadenas de polisacárido y los grupos amino del colorante. Los ejemplos de superficies que comprenden celulosa incluyen superficies de papel (por ejemplo, papel normal, etiquetas de papel con reversos adhesivos), aunque las superficies que comprenden celulosa para su uso en el presente documento no están tan limitadas. Otras superficies que comprenden celulosa incluyen algodón, lino, o superficies que contienen elastina. Las superficies que comprenden celulosa a las que se une, por ejemplo, el rojo Congo se pueden denominar superficies compatibles con el colorante o superficies compatibles con el rojo Congo. Las superficies usadas en el presente documento se consideran "compatibles" con un colorante específico que se usa si el colorante se puede unir a la superficie en ausencia de proteínas mal plegadas. Sorprendentemente, la presente divulgación demuestra que no todas las superficies que contienen celulosa (denominadas superficies celulósicas) son adecuadas para su uso en los métodos y las composiciones proporcionadas en el presente documento. Incluso dentro de los tipos individuales de superficies celulósicas, la idoneidad varía. Por ejemplo, entre los 50 tipos diferentes de papel probado, los resultados demostraron que solo tipos seleccionados de papel eran adecuados. La idoneidad de la superficie celulósica (por ejemplo, papel) se basa en varios factores, que incluyen, por ejemplo, el ángulo de contacto de la superficie, la porosidad de la superficie, la fluorescencia de la superficie (que es una reflexión del aditivo) y el clima (por ejemplo, la temperatura y la humedad del entorno en que se está realizando un método de la presente divulgación). Así, las

condiciones en las que un colorante se une a las proteínas mal plegadas y la celulosa y posteriormente difunde a lo largo de una superficie que comprende celulosa (o el colorante no difunde) depende de uno cualquiera o más de los factores anteriores. Se considera que una superficie celulósica es adecuada para su uso como se proporciona en el presente documento si, cuando se aplica a la superficie, (1) una disolución de orina que comprende proteínas mal plegadas y difunde el colorante (por ejemplo, difunde radialmente) desde un punto de aplicación de la disolución hasta la superficie celulósica (por ejemplo, como se muestra en la FIG. 1, Caso 1, "Muestra"); y (2) una disolución de orina que comprende colorante (y no proteínas mal plegadas), el colorante no difunde radialmente desde un punto de aplicación de la disolución hasta la superficie celulósica (por ejemplo, como se muestra en la FIG. 1, Caso 1, "Blanco"), o si una disolución de orina que comprende colorante (y no proteínas mal plegadas), el colorante difunde (por ejemplo, difunde radialmente) a un menor grado con respecto a una disolución que comprende proteínas mal plegadas y colorante.

En algunos casos, se usa un coeficiente de correlación, ρ , para distinguir entre papel adecuado y papel inadecuado. El corte exacto del coeficiente de correlación, ρ , entre el papel adecuado y el papel inadecuado se define determinando la relación de ρ con el ángulo de contacto, θ , en diferentes tipos de papel "normal". En algunos casos, un coeficiente de correlación, ρ , de 0,5 o menos (por ejemplo, 0,1 a 0,5) es indicativo de papel adecuado. Por ejemplo, un ρ de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5 es indicativo de papel adecuado.

"Un punto sobre una superficie" se refiere al punto detectable (por ejemplo, observable, visible) formado sobre una superficie después de la aplicación de una disolución, por ejemplo, la disolución de orina y colorante (con o sin proteínas mal plegadas en la orina). Sin desear quedar ligado a teoría, las fibras de celulosa en la superficie y las proteínas mal plegadas en la orina "compiten" por la unión con el colorante. Si una muestra de orina contiene proteínas mal plegadas, el colorante (por ejemplo, rojo Congo) se une a las proteínas mal plegadas, y se reduce proporcionalmente la cantidad de colorante no unido (por ejemplo, colorante que no se une a las proteínas mal plegadas). Cuando la disolución con orina que comprende las proteínas mal plegadas y el colorante se aplica a una superficie celulósica adecuada (por ejemplo, papel normal), difunde la disolución con orina que comprende proteínas mal plegadas y el colorante (por ejemplo, difunde radialmente) desde el punto de aplicación visible (denominado el punto sobre la superficie), y es detectable la difusión del colorante. Por ejemplo, cuando se aplican 100 μL de una disolución de muestra (por ejemplo, orina) que comprende proteínas mal plegadas y colorante a una superficie celulósica adecuada, difunde la disolución de muestra que comprende las proteínas mal plegadas y el colorante, por ejemplo, radialmente hasta una distancia de 5-7 mm desde el punto de aplicación, y es detectable la difusión de colorante. Este grado de difusión de colorante es un ejemplo de "difundir a un grado apreciable" o "difundir radialmente a un grado apreciable". Así, cuando difunde radialmente, el círculo homogéneo más grande característico (como se muestra, por ejemplo, en la FIG. 1, Caso 1, "Muestra") formado por la difusión de la disolución con orina que comprende proteínas mal plegadas y colorante es indicativo de la presencia de proteínas mal plegadas en la muestra de orina. Es decir, la muestra de orina contiene proteínas mal plegadas.

Por el contrario, si una muestra (por ejemplo, una muestra de orina) no contiene proteínas mal plegadas, el colorante (por ejemplo, rojo Congo) en la disolución está libre para unirse a las fibras de celulosa de la superficie celulósica. Cuando la disolución que contiene, por ejemplo, orina y colorante, y no proteínas mal plegadas, se aplica a una superficie celulósica adecuada (por ejemplo, papel normal), el colorante se une a las fibras de celulosa de la superficie en o cerca del punto de aplicación y mientras que la orina en la disolución difunde (por ejemplo radialmente) desde el punto de aplicación, el colorante no difunde desde el punto de aplicación, o el colorante difunde a un menor grado con respecto al colorante en disolución con orina que comprende proteínas mal plegadas. Por ejemplo, cuando 100 μL de una disolución con orina que comprende colorante (y no proteínas mal plegadas) se aplica a una superficie celulósica adecuada, la muestra puede difundir (por ejemplo, radialmente) a una distancia de 5-7 mm desde el punto de aplicación, mientras que el colorante puede difundir (por ejemplo, radialmente) a una distancia de solo 1-3 mm desde el punto de aplicación. Este grado de difusión del colorante es un ejemplo de "no difusión a un grado apreciable" o "no difusión radialmente a un grado apreciable". Así, el círculo heterogéneo más pequeño característico (como se muestra, por ejemplo, en la FIG. 1, Caso 1, "Blanco") formado por la ausencia de difusión apreciable de colorante es indicativo de ausencia de proteínas mal plegadas en la muestra. Es decir, la muestra (por ejemplo, muestra de orina) no contiene proteínas mal plegadas.

Se debe entender que los métodos de detección de las proteínas mal plegadas de la presente divulgación se basan, en parte, en principios de cromatografía y, en algunos casos, en la evaluación visual de resultados cromatográficos. Un experto habitual en la técnica entendería lo que se indica por un "grado apreciable" de difusión, particularmente en vista de las químicas de las proteínas y los colorantes descritos en el presente documento. Se considera que un colorante difunde un grado apreciable desde un punto central de una superficie si se puede determinar que el colorante se ha dispersado (por ejemplo, radialmente) lejos del punto central. Esta extensión resulta debido a que el colorante se une a proteínas mal plegadas y así no se puede unir a la superficie. Por comparación, se considera que un colorante no difunde a un grado apreciable si se puede determinar que el colorante no se ha dispersado (por ejemplo, radialmente) lejos del punto central (sin embargo, puede difundir a un grado limitado del punto central, tal como de 1-3 mm). Esta extensión limitada resulta debido a que el colorante no está unido a proteínas mal plegadas y se puede unir a la superficie y entonces lo hace rápidamente cuando se aplica a la superficie.

En algunos casos, una muestra (por ejemplo, orina) puede ser "fuertemente positiva" para proteína mal plegada (por ejemplo, contiene suficiente proteína mal plegada para unirse a todo o la mayoría del colorante en disolución). En

tales casos, puede resultar un círculo homogéneo característico de los métodos de la presente divulgación, como se muestra, por ejemplo, en la figura 1, Caso 1, "Muestra". En otros casos, una muestra puede ser "débilmente positiva" para la proteína mal plegada (por ejemplo, contiene proteína mal plegada, pero no suficiente para unirse a todo o la mayoría del colorante en disolución). En tales casos, puede resultar un punto central característico con un "halo" homogéneo de los métodos de la presente divulgación, como se muestra, por ejemplo, en la figura 1, Caso 2, "Muestra". El halo resulta normalmente de la difusión de la porción del colorante que está unida a proteínas mal plegadas y, por tanto, no se unen a la celulosa en el área del punto central.

Algunos aspectos de la presente divulgación incluyen mantener un punto sobre una superficie que comprende, por ejemplo, celulosa en condiciones en las que ocurre la difusión de una disolución de orina (u otra muestra) que comprende proteínas mal plegadas y colorante. Una ventaja de los métodos de la presente divulgación, en algunos casos, es que el tiempo necesario para obtener un resultado es corto. En algunos casos, una disolución, o un punto, se mantiene sobre una superficie durante 1 a 5 minutos, o más. Por ejemplo, se puede mantener un punto durante 1 a 3 minutos, o 1 a 2 minutos. En algunos casos, se mantiene un punto sobre una superficie durante menos de 1 minuto. Se debe entender que el mantenimiento también se refiere, en algunos casos, a mantener el clima (por ejemplo, temperatura y humedad) durante el periodo de tiempo de evaluación de una muestra particular (por ejemplo, 1 a 5 minutos) que apoya la difusión de una disolución. También se debe entender que el periodo de tiempo para completar una prueba de diagnóstico de la presente divulgación puede variar, dependiendo del clima y el tipo de superficie (por ejemplo, superficie celulósica).

Algunos aspectos de la presente divulgación incluyen determinar que la muestra de orina contiene proteínas mal plegadas si la disolución que pasa a través de la superficie es coloreada, o determinar que la muestra de orina no contiene proteínas mal plegadas si la disolución que pasa a través de la superficie es incolora. Por ejemplo, si el colorante es rojo Congo, la disolución que pasa a través de la superficie se verá de color rojo, rosa o púrpura (debido a que la disolución contiene rojo Congo) si las proteínas mal plegadas están presentes en la muestra de orina. Sin desear quedar ligado a teoría, esto es debido a que el rojo Congo, que se ha unido a las proteínas mal plegadas y que no se puede unir a la superficie (por ejemplo, como resultado de la saturación por unión de las proteínas mal plegadas), pasará a través de la superficie. Por el contrario, la disolución que pasa a través de la superficie se verá incolora (debido a que la disolución no contiene rojo Congo) si las proteínas mal plegadas no están presentes en la muestra de orina. Sin desear quedar ligado a teoría, esto es debido a que el rojo Congo libre se ha unido a la superficie, que actúa de filtro, permitiendo que lo atraviese solo la disolución carente de proteínas mal plegadas y, por tanto, carente de rojo Congo.

En algunos casos, una superficie que comprende celulosa es una superficie de papel normal. El papel normal incluye papel que no tiene un recubrimiento. Los papeles recubiertos se pueden dividir en mate, semimate o seda, y brillo (por ejemplo, recubierto sobre una o ambas caras con una fina capa de carbonato cálcico o caolín). Así, el papel sin un recubrimiento mate, semimate o seda, o de brillo, está dentro de la definición de "papel normal". El papel para imprimir sin recubrir es un ejemplo no limitante de papel normal. También está incluido dentro de la definición de "papel normal" el papel sin aditivos (por ejemplo, caliza o caolín). El papel, en algunos casos, se puede caracterizar en peso. El peso asignado a un papel es el peso de una resma (por ejemplo, 500 hojas, en donde 1 hoja es igual a 17" x 22") de papel. En algunos casos, el papel normal tiene un peso de 20 lbs, 24 lbs o 32 lbs. El papel se puede caracterizar, en algunos casos, por la densidad. En algunos casos, el papel normal tiene una densidad de 800 kg/m³ (50 lb/ft³).

En algunos casos, una superficie que comprende celulosa comprende además un reverso adhesivo. En algunos casos, una superficie que comprende celulosa con un reverso adhesivo es una etiqueta (por ejemplo, una etiqueta autoadhesiva comercialmente disponible). Los resultados proporcionados en el presente documento muestran que, en algunos casos, un reverso adhesivo previene que se arrugue la superficie de un papel y, así, proporciona resultados más precisos. Sin embargo, las superficies que comprenden celulosa no requieren un reverso adhesivo.

En algunos casos, una concentración de colorante (o una concentración de una combinación de dos o más colorantes) en una disolución (por ejemplo, una disolución que comprende orina y colorante) es 0,01 % a 1,0 %, o más. Por ejemplo, una concentración de colorante (o una concentración de una combinación de dos o más colorantes) en una disolución puede ser 0,01 % a 0,1 %, 0,01 % a 0,2 %, 0,01 % a 0,3 %, 0,01 % a 0,4 %, 0,05 % a 0,1 %, 0,05 % a 0,2 %, 0,05 % a 0,3 %, 0,05 % a 0,4 %, 0,05 % a 0,5 %, 0,05 % a 0,6 %, 0,05 % a 0,7 %, 0,05 % a 0,8 %, o 0,05 % a 0,9 %. En algunos casos, una concentración de colorante (o una concentración de una combinación de dos o más colorantes) en una disolución es 0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,15 %, 0,2 %, 0,25 %, 0,3 %, 0,35 %, 0,4 %, 0,45 %, 0,5 %, 0,55 %, 0,6 %, 0,65 %, 0,7 %, 0,75 %, 0,8 %, 0,85 %, 0,9 %, 0,95 % o 1,0 %. En algunos casos, una concentración de colorante (o una concentración de una combinación de dos o más colorantes) en una disolución es 0,1 %.

En algunos casos, una concentración de colorante (o una concentración de una combinación de dos o más colorantes) en una disolución acuosa (por ejemplo, agua o un tampón acuoso que comprende colorante) es 0,2 % a 1,0 %, o más. Por ejemplo, una concentración de colorante (o una concentración de una combinación de dos o más colorantes) en una disolución puede ser 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 % o 1,0 %.

En algunos casos, un volumen de una disolución acuosa (por ejemplo, agua o un tampón acuoso que comprende colorante) es 1 µL a 10 µL, o más. Por ejemplo, un volumen de una disolución acuosa puede ser 1 µL, 1,5 µL, 2 µL, 2,5 µL, 3 µL, 3,5 µL, 4 µL, 4,5 µL, 5 µL, 5,5 µL, 6 µL, 6,5 µL, 7 µL, 7,5 µL, 8 µL, 8,5 µL, 9 µL, 9,5 µL o 10 µL.

Los controles positivos de la presente divulgación se producen a partir de muestras (por ejemplo, muestras de orina) que se conoce que contienen proteínas mal plegadas. Asimismo, los controles negativos de la presente divulgación se obtienen de muestras (por ejemplo, muestras de orina) que se conoce que no contienen proteínas mal plegadas o de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS) u otra disolución de sal que no contiene proteínas mal plegadas. Las condiciones en las que se produce un control positivo y/o negativo son similares a las condiciones en las que se realiza un método de la presente divulgación para la muestra de orina particular que se compara con el control positivo o negativo. Por ejemplo, se compara una muestra de orina de prueba de una mujer embarazada con una muestra de orina con proteínas mal plegadas de una mujer embarazada (control positivo) y/o con una muestra de orina sin proteínas mal plegadas de una mujer embarazada (control negativo). Si los resultados obtenidos con la muestra de prueba son comparables a los resultados obtenidos con un control positivo, entonces se determina que la muestra de prueba contiene proteínas mal plegadas. Si los resultados obtenidos con la muestra de prueba son comparables a los resultados obtenidos con un control negativo, entonces se determina que la muestra de prueba no contiene proteínas mal plegadas. Además, el tipo de superficie que comprende celulosa (por ejemplo, papel normal) usado en un método de producción de un control positivo y/o negativo es el mismo que el tipo de superficie que comprende celulosa usada en un método de evaluación de una muestra de orina de prueba. También se debe entender que el volumen de disolución, así como el tipo (por ejemplo, rojo Congo) y la concentración de colorante (o colorantes) usado en un método de producción de un control positivo y/o negativo, es el mismo que el volumen de disolución, así como el tipo y la concentración de colorante (o colorantes) usado en un método de evaluación de una muestra de orina de prueba.

En algunos casos, los resultados positivos y negativos para la comparación con los resultados de la muestra de prueba se proporcionan como imágenes en el kit de prueba.

Algunos métodos de la presente divulgación incluyen etapas adicionales para confirmar si una muestra (por ejemplo, muestra de orina) de un sujeto (por ejemplo, una mujer embarazada) contiene o no proteínas mal plegadas. Por ejemplo, después de identificar que una muestra de orina de un sujeto contiene proteínas mal plegadas, se puede evaluar similarmente una muestra de orina diluida adicional. Esto se puede hacer de al menos dos formas. En un caso, se obtiene una primera muestra de orina (por ejemplo, usando recogida limpia) obtenida de un sujeto, y se evalúa una primera porción de esa primera muestra de orina para la presencia de proteínas mal plegadas. Entonces, se evalúa similarmente una segunda porción de esa primera muestra para la presencia de proteínas mal plegadas. La segunda porción se puede diluir, luego se evalúa similarmente para la presencia de proteínas mal plegadas. Una determinación de que tanto la primera como la segunda porciones (diluidas o sin diluir) de orina de la primera muestra de orina tiene proteínas mal plegadas puede servir de confirmación de que el sujeto tiene orina con proteínas mal plegadas. Alternativamente, se obtiene una primera muestra de orina (por ejemplo, usando recogida limpia), y se evalúa una porción de esa primera muestra de orina para la presencia de proteínas mal plegadas. Entonces, después de un periodo de tiempo (por ejemplo, un par de horas), se recoge una segunda muestra de orina del mismo sujeto, y se evalúa similarmente una porción de esa segunda muestra de orina para la presencia de proteínas mal plegadas. La segunda porción se puede diluir, luego se evalúa similarmente para la presencia de proteínas mal plegadas. Una determinación de que tanto la primera como la segunda muestras de orina (diluidas o sin diluir) del mismo sujeto tiene proteínas mal plegadas puede servir de confirmación de que el sujeto tiene orina con proteínas mal plegadas.

Algunos aspectos de la presente divulgación incluyen combinar una muestra (por ejemplo, una muestra de orina) de una mujer embarazada con un primer colorante que se une a proteínas mal plegadas y, por ejemplo, celulosa y un segundo colorante que es un color diferente del primer colorante y no se une a proteínas mal plegadas y celulosa, produciendo así una disolución de orina y dos colorantes. Normalmente, el color de un colorante es visualmente distinto del color del otro colorante. Por ejemplo, el primer colorante puede ser rojo y el segundo colorante puede ser azul. En algunos casos, el primer colorante es rojo Congo. En algunos casos, el segundo colorante es un colorante soluble en agua tal como erio Glaucina (también denominado FD & C Blue No. 1, un colorante alimentario). Se pueden usar otros colorantes solubles en agua (por ejemplo, otros colores FD & C) como segundo colorante que no se une a proteínas mal plegadas y celulosa, que incluyen, sin limitación, FD & C Red No. 40, FD & C Yellow No. 5, FD & C Yellow No. 6, FD & C Blue No. 2, FD & C Red No. 3, o FD & C Green No. 3.

En algunos casos, se usa un coeficiente de correlación, ρ , para distinguir entre muestras no con preeclampsia (por ejemplo, muestras de orina) y muestras de preeclampsia (por ejemplo, muestras de orina). El corte exacto del coeficiente de correlación, ρ , que discrimina mejor muestras de orina no con preeclampsia de muestras de orina con preeclampsia se define probando un gran conjunto de muestras de orina de mujeres embarazadas sin preeclampsia, mujeres embarazadas con preeclampsia y mujeres embarazadas con otras afecciones del embarazo. En algunos casos, un coeficiente de correlación, ρ , de 0,5 o mayor (por ejemplo, 0,5 a 1,0) es indicativo de preeclampsia. Por ejemplo, un ρ de 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 es indicativo de papel adecuado.

En algunos casos, el coeficiente de correlación se calcula usando un algoritmo. El algoritmo, en algunos casos, se programa como aplicación del teléfono móvil o de la tableta. El algoritmo, en algunos casos, compensa la iluminación, resta el fondo blanco y luego calcula el coeficiente de correlación entre los canales de color diferente (por ejemplo, canales rojo y azul) de la imagen de color del fondo difundido. El coeficiente de correlación entre los canales es significativamente diferente entre muestra no preecláptica (por ejemplo, muestra de orina) y muestra preecláptica (por ejemplo, muestra de orina). Esta información se puede usar, por ejemplo, en las aplicaciones de calibración y de detección (por ejemplo, aplicaciones de software) del siguiente modo.

Calibración: El objetivo de la aplicación de calibración es ayudar al usuario a elegir una superficie, tal como una superficie celulósica (por ejemplo, papel), y elegir las concentraciones de colorantes (por ejemplo, rojo Congo y colorante alimentario azul) para la robusta discriminación entre muestra normal y preecláptica (por ejemplo, muestra de orina). Se pueden usar dos criterios: (1) señal suficiente en ambos canales de color de manera que el ruido de la cámara no influya en el cálculo de la correlación; y (2) estructura de la fibra de la superficie (por ejemplo, papel), que debe permitir que el segundo colorante (por ejemplo, el colorante alimentario azul) se extienda uniformemente, mientras se permite que se una el primer colorante cuando no se une a proteínas mal plegadas (por ejemplo, el colorante rojo Congo). Así, la elección de la superficie apropiada (por ejemplo, papel) y la concentración de colorante dan una señal equilibrada en ambos canales de color (por ejemplo, canales rojo y azul), así como una gran diferencia en los coeficientes de correlación entre muestras no preeclápticas y preeclápticas (por ejemplo, muestras de orina).

El procedimiento de calibración funciona, en algunos casos, introduciendo cuidadosamente diferentes concentraciones del primer colorante (por ejemplo, rojo Congo) y el segundo colorante (por ejemplo, colorante alimentario azul) en muestras no preeclápticas y preeclápticas (por ejemplo, muestras de orina), aplicando gotas de las mezclas sobre diferentes superficies (por ejemplo, papel), dejando que difundan las muestras y haciendo fotografías de las muestras difundidas (véanse las FIGS. 27A y 27B). El software de calibración mide el porcentaje de diferencia de las señales de los dos canales (por ejemplo, canal rojo y azul) y el coeficiente de correlación entre los dos canales. Un gráfico del coeficiente de correlación y el porcentaje de diferencia de señales revela que las concentraciones y las superficies (por ejemplo, papeles) son adecuadas para su uso. En las Figuras 27A y 27B, por ejemplo, se usaron diferentes relaciones entre el colorante rojo Congo/azul para probar orina no preecláptica (a) y orina con preeclampsia (b) y cualquiera de los resultados del colorante rojo Congo/azul de la muestra 2 a la muestra 7 son aceptables debido a que la diferencia de señales entre los canales rojo y azul es inferior a la diferencia de señales, por ejemplo, en las muestras 8 y 9, y los coeficientes de correlación entre el canal rojo-canal azul son suficientemente diferentes para orina no preecláptica y orina preecláptica.

Detección: Una vez se calibran la superficie (por ejemplo, papel) y las concentraciones de colorante, se pueden usar el kit y que incluye opcionalmente la aplicación de software ("app") para detectar proteínas mal plegadas. Después de que la orina se mezcle con el primer y segundo colorante, por ejemplo, y una gota de la mezcla difunda sobre una superficie celulósica, se captura una foto de la muestra difundida (por ejemplo, gota) por, por ejemplo, una cámara del teléfono inteligente o de la tableta. La aplicación de software usa entonces el fondo blanco para estimar y compensar el color de iluminación. A continuación, se resta el fondo de la imagen de manera que solo sobrevivan los píxeles correspondientes a la muestra. Entonces se calcula el coeficiente de correlación entre los dos canales de color (por ejemplo, canales rojo y azul) y se compara con un umbral para indicar la presencia de proteínas mal plegadas. En algunos casos, un coeficiente de correlación umbral de 0,5 a 1,0 (por ejemplo, 0,85) distingue entre orina normal y preecláptica, como se ejemplifica en las Figuras 27A y 27B.

Algunos aspectos de la presente divulgación proporcionan composiciones y kits para detectar proteínas mal plegadas en muestras (por ejemplo, muestras de orina). Dichas composiciones y kits se pueden usar, en algunos casos, para diagnosticar preeclampsia. Los ejemplos no limitantes de kits de la presente divulgación se muestran en las Figuras 25A y 25B y en las Figuras 26A y 26B.

Las Figuras 25A y 25A representan el interior de un ejemplo de un kit Congo Red Dot Simple de configuración tres veces plegada y un Congo Red Dot Quant Kit, respectivamente, con un panel superior, panel central y panel inferior hecho de, por ejemplo, cartulina. Cuando está en la configuración "plegada", se forma una bolsa con el panel central cubierto por los paneles superior e inferior. Se sitúa una ranura curvada en el panel inferior (representada por una línea de puntos curvada) y se dimensiona para recibir la solapa plegada que cierra la bolsa.

El panel superior de la Figura 25A muestra una pipeta desechable que se puede proporcionar en el kit. La pipeta puede estar precargada con colorante (por ejemplo, 5 μ L de una disolución al 0,5 % de rojo Congo, o 5 μ L de una disolución al 5 % de rojo Congo + 2,5 μ L de una disolución al 0,1 % de erioflavina) y se cierra. Entonces, la pipeta se puede sujetar en el panel central por ranuras preformadas (representadas por dos líneas de puntos rectas). Las ranuras están situadas de forma que la punta de la pipeta con el colorante precargado (o dos colorantes) siga dentro del bolsillo y protegido de la luz. En algunos casos, con el kit se proporciona un dispositivo para cortar el extremo sellado de la pipeta (por ejemplo, un cortaúñas o unas tijeras pequeñas).

Por debajo de la pipeta está un área que proporciona una superficie que comprende celulosa para el muestreo de las pruebas. La superficie se puede fijar (por ejemplo, una etiqueta de papel autoadhesiva) al kit tres veces. En algunos casos, la superficie está provista del kit. En otros casos, la superficie se proporciona por separado. Para cada sitio clínico, la superficie puede requerir validación separada para idoneidad, considerando, por ejemplo, diferencias en las condiciones medioambientales, tales como la humedad y la temperatura.

El panel inferior contiene una serie de imágenes de controles para una muestra fuertemente positiva, una muestra débilmente positiva y una muestra negativa. La muestra de prueba se puede comparar con uno cualquiera o más de los controles para determinar el resultado de la muestra.

El kit representado en la Figura 26A adicional incluye escalas de calibración de color (representadas por barras graduadas que flanquean a la izquierda y derecha la superficie de prueba diseñada para orientar la imagen y corregir

cualquier gradiente de luz. El exceso de verde (representado por barras flanqueantes en la superficie superior e inferior de la superficie de prueba) compensa cualquier tendencia de una cámara a ajustar el color.

Un ejemplo de un kit de matriz se representa en las Figuras 3C y en la Figura 4(1). En algunos casos, un kit Congo Red Dot Quant Array es una extensión del kit Congo Red Dot Quant en el que el kit es básicamente el mismo con la excepción que proporciona la evaluación de múltiples muestras de prueba sobre una única superficie (por ejemplo, superficie celulósica).

Así, la presente divulgación describe métodos de diagnóstico y kits que se pueden usar para la eficiente y precisa detección de proteínas mal plegadas en orina (u otra muestra), que, en algunos casos, es indicativa de ciertos trastornos (por ejemplo, preeclampsia en casos en los que la muestra de prueba es orina obtenida de una mujer embarazada).

Ejemplos

Ejemplo 1

Los experimentos presentados en este ejemplo se refirieron al desarrollo de métodos de diagnóstico simples y composiciones (por ejemplo, kits) para la rápida y precisa identificación de proteínas mal plegadas en, por ejemplo, orina. En mujeres embarazadas, la presencia de proteínas mal plegadas en orina se puede usar como una indicación de preeclampsia. La prueba existente del punto de rojo Congo es una prueba eficaz que se puede usar como una herramienta de diagnóstico y de pronóstico para preeclampsia. Sin embargo, la prueba del punto de rojo Congo, que normalmente utiliza reactivos relativamente caros tales como nitrocelulosa y lavados de alcohol, necesita aproximadamente 5 horas para completarse. Uno de los objetivos de este estudio era producir métodos de diagnóstico simplificados, de bajo coste y eficientes, y composiciones que se pudieran implementar, por ejemplo, en el consultorio médico, por ejemplo, en la revisión del embarazo con un profesional sanitario y que también fueran adecuados para un entorno de bajos recursos. Hacia este objetivo, en algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos simplificados basados en papel y composiciones que proporcionan resultados semicuantitativos y de bajo coste, por ejemplo, en el plazo de 2 minutos, o resultados cuantitativos, por ejemplo, en el plazo de 7 minutos.

Como etapa inicial hacia el desarrollo de un método basado en papel simplificado para el diagnóstico de preeclampsia, se analizó la "idoneidad" de más de cincuenta tipos diferentes de papel. Sorprendentemente, no todo el papel es adecuado para su uso como una superficie para detectar proteínas mal plegadas unidas por, por ejemplo, rojo Congo. Los análisis en el presente documento mostraron que las superficies celulósicas, tales como, por ejemplo, papel normal, participan activamente en la química de la prueba del punto de rojo Congo. La química detrás de esta cromatografía en papel es compleja. El rojo Congo se une a fibras de celulosa mediante enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo libres celulósicos. Debido a su configuración molecular plana, el rojo Congo se intercala entonces entre las fibras de la celulosa. El mismo principio se aplica a proteínas mal plegadas que, debido a la abundancia de láminas β , tienen disposición espacial similar con las fibras de celulosa. La nitrocelulosa, a diferencia, tiene grupos hidroxilo que se han esterificado mediante reacción con ácido nítrico. Estando ya ocupados, los grupos hidroxilo ya no se unen al rojo Congo y, así, la nitrocelulosa no se une a rojo Congo – es en gran medida inerte. Sin desear quedar ligado a teoría, una superficie celulósica (por ejemplo, papel normal) compite con las proteínas mal plegadas de una muestra de orina por la unión al rojo Congo. En muestras de orina que no contienen proteínas mal plegadas, el rojo Congo está libre en disolución. Cuando se deposita sobre una superficie celulósica porosa, este rojo Congo libre forma enlaces de hidrógeno con la celulosa, ralentizando así su flujo a través de la superficie (denominado en el presente documento el "retardo del rojo Congo").

La idoneidad del papel se basa, al menos en parte, en el ángulo de contacto del papel, la fluorescencia del papel, que es una reflexión de los aditivos, y la porosidad del papel, el clima (por ejemplo, la temperatura y la humedad del entorno/región). Como el flujo de líquido sobre las superficies porosas (por ejemplo, el papel) es un complejo proceso gobernado por las leyes de la física (por ejemplo, ley de Fick y relación de Stokes-Einstein), se diseñó una rutina de software para determinar la "idoneidad" del papel para la prueba del punto de rojo Congo basándose en un coeficiente de correlación (Rho , ρ) entre papel adecuado y papel no adecuado. El corte exacto del coeficiente de correlación, ρ , entre papel adecuado y papel no adecuado se define determinando la relación de ρ con el ángulo de contacto, θ , en diferentes tipos de papel "normal". Las concentraciones de electrolito y de proteína varían *in vitro*. Es probable que el ángulo de contacto, θ , sea un determinante significativo de ρ y esté menos afectado por la concentración de electrolito y de proteína. En algunas realizaciones, un ρ de 0,5 o menos (por ejemplo, 0,1 a 0,5) es indicativo de papel adecuado. Por ejemplo, un ρ de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5 es indicativo de papel adecuado.

Método y kit Congo Red Dot Simple

Después del análisis de cincuenta tipos diferentes de papel, se eligió un tipo particular con un reverso adhesivo, en parte debido a que los resultados obtenidos usando el papel particular eran más coherentes con respecto a otros tipos de papel probados, posiblemente debido a la ausencia de arrugado cuando estaban húmedos. Primero se mezclaron con rojo Congo muestras de orina de una mujer embarazada con preeclampsia grave (PEg) (FIG. 1, "Muestra," Caso 1), de una mujer embarazada con preeclampsia (FIG. 1, "Muestra," Caso 2) y de una mujer embarazada sin

preeclampsia (FIG. 1, "Muestra," Caso 3, control) y luego se aplicaron a papel normal. Se usó como control agua mezclada con rojo Congo (FIG. 1, "Blanco," Casos 1-3). En la muestra de agua (FIG. 1, "Blanco," Caso 3) y en las muestras de control sin preeclampsia (FIG. 1 "Muestra," Caso 3), el rojo Congo permaneció fuertemente centrado alrededor del punto de aplicación, mientras que el fluido claro se extendió lentamente. En muestras de la mujer con preeclampsia (FIG. 1, "Muestra," Caso 2), el rojo Congo se extendió junto con el fluido claro, que genera un halo alargado rosa que rodea el punto de aplicación visible en el centro (FIG. 1, "Muestra," Caso 2). En muestras de la mujer con preeclampsia grave (por ejemplo, "altamente positive" muestras) (FIG. 1, "Muestras, Caso 1), el rojo Congo y la muestra formaron un punto alargado homogéneo intensamente rosa que se extendía más allá del punto de aplicación de la muestra inicial. En los experimentos (n=78), se observó una correlación significativa entre el rojo Congo y una puntuación visual de nivel 3 ($P < 0,001$). Los resultados de este ejemplo mostraron marcadas diferencias en las químicas entre la orina con preeclampsia tratada con rojo Congo y la orina sin preeclampsia tratada con rojo Congo con respecto a sus interacciones con el papel normal.

Como todos los enlaces son saturables, el tamaño del círculo formado depende de muchos factores, que incluyen, por ejemplo, la humectabilidad del papel (por ejemplo, medida por el ángulo de contacto θ) y la concentración de rojo Congo. Sin desear quedar ligado a teoría, si el papel tiene un bajo ángulo de contacto (por ejemplo, toalla de papel), no existe tiempo suficiente para el enlace de hidrógeno y, así, la muestra se extiende demasiado rápido y el retardo del rojo Congo no es evidente (datos no mostrados). A diferencia, si el papel tiene un alto ángulo de contacto (por ejemplo, papel recubierto brillante), la muestra no se extiende y se seca en el punto (datos no mostrados). Si la muestra contiene proteínas mal plegadas (por ejemplo, agregados de proteína mal plegada), entonces el rojo Congo se intercala proporcionalmente a la concentración de proteínas mal plegadas. Cuando dicha muestra se aplica a una superficie celulósica, existe poco o ningún rojo Congo disponible para la unión a celulosa, ya que la mayoría se ha unido con las proteínas mal plegadas mientras estaban en disolución. El resultado es la formación de un círculo rosa amplio característico, que resulta de la extensión de las proteínas mal plegadas (FIG. 1, "Muestra," Caso 1). Aparece un círculo homogéneamente rosa si todo el rojo Congo se acopla en proteínas mal plegadas (FIG. 1, "Muestra," Caso 1) y aparece un círculo central apretado dentro de un halo rosa homogéneo si el rojo Congo libre está disponible para unión a la celulosa (FIG. 1, "Muestra," Caso 2).

Basándose en los resultados proporcionados en el presente documento, se diseñaron dos kits de diagnóstico simplificados para preeclampsia. El primer kit, denominado el Congo Red Dot Simple Kit (para el rápido (por ejemplo, 1 a 3 minutos)), se puede usar para la evaluación subjetiva de la congofilia en la orina. El segundo kit, denominado el Congo Red Dot Quant Kit, se puede usar para la cuantificación objetiva de resultados y se habilita por un algoritmo de software que mide la "homogeneidad de puntos". Se describen más adelante el desarrollo del método y kit Congo Red Dot Quant.

Método y kit Congo Red Dot Quant

La mayoría de las muestras de orina de mujeres embarazadas sin preeclampsia se secan claras (o casi claras) cuando se aplican a una superficie celulósica tal como papel normal y así no existe medida de cuánto se habría dispersado sobre dicha superficie. Para tratar este problema, se diseñó el kit Congo Red Dot Quant con una mezcla de colorante doble usando colorantes rojos y azules. Se seleccionó el color azul como complementario al color del rojo Congo en el espacio de color RGB (Rojo Verde Azul, del inglés "Red Green Blue"). El modelo de color RGB está relacionado con la fisiología del ojo y el cerebro humano y no con colores colorimétricamente definidos. También es la salida típica de las cámaras del teléfono móvil (por ejemplo, teléfono inteligente). De los varios colorantes azules probados, se seleccionó la erio glucina (FD&C blue 1, colorante no tóxico, McCormick & Co.) para la cuantificación de la extensión / retardo de rojo Congo por análisis de imágenes y así la discriminación de casos de preeclampsia de casos de no preeclampsia. El colorante azul migra con la fase acuosa, marcando la máxima área de dispersión (véase, por ejemplo, FIG. 2, "Normal," fila superior). Se determinó que la composición óptima del colorante doble era una mezcla 2:1 de 5 % de rojo Congo:10 % de erio glucina, con 3 μL de la mezcla de colorante dual añadida por 100 μL de volumen de orina.

A continuación, se creó un algoritmo de análisis de imágenes (por ejemplo, en MATLAB), que extrae el coeficiente de correlación (Rho, ρ) entre la señal en los canales rojo y azul de una imagen adquirida por teléfono móvil o una imagen adquirida por tableta (FIG. 2). El coeficiente de correlación se calcula después del procesamiento previo para compensar el iluminante y el color del papel. El corte exacto del coeficiente de correlación, ρ , que discrimina mejor las muestras de orina no de preeclampsia de las muestras de orina de preeclampsia, se define probando un gran conjunto de muestras de orina de mujeres embarazadas sin preeclampsia, mujeres embarazadas con preeclampsia y mujeres embarazadas con otras afecciones del embarazo. Para este fin, se usan muestras de orina conservadas recuperadas de mujeres con diagnóstico y desenlaces del embarazo bien caracterizados (por ejemplo, están disponibles 824 muestras de orina de 662 mujeres, conservadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$). Se realiza un análisis de exactitud comparativo con respecto a la relación P/C (estuvieron disponibles resultados para todas las muestras) y la prueba de la tira reactiva, que se lee tanto visualmente como objetivamente usando el lector Siemens Clinitek Status. Además, se usan algoritmos, tales como algoritmos de lectura por máquina (por ejemplo, máquinas de vectores de soporte), análisis variacional y/o una técnica bayesiana no paramétrica, para determinar si otros parámetros del análisis de imágenes (por ejemplo, aparte del coeficiente de correlación de píxeles rojos y azules en el espacio de extensión) pueden mejorar más la clasificación de pacientes. Además, se puede llevar a cabo el procesamiento de imágenes en un servidor remoto en lugar del teléfono móvil o tableta y los resultados se informan al usuario.

Ejemplo 2

Mujeres con preeclampsia grave (PEg) presentan congofilia en la orina con características espectrales de agregados de tipo amiloide

5 Se empleó un diseño riguroso del estudio, que implicó una fase de *factibilidad* y una de *validación* (FIG. 5). Como estudio preliminar de eficacia (*factibilidad*), se probaron muestras de orina de mujeres embarazadas (n=80) con clasificaciones clínicas precisas y resultados conocidos: 40 mujeres con preeclampsia grave (PEg) requirieron parto médicamente indicado por preeclampsia (MIDPE) y 40 mujeres embarazadas de control sanas (P-CRL) que tuvieron una gestación sin complicaciones y dieron a luz a término. Sus características clínicas se incluyen en la Tabla 1.

10 Tabla 1. Características demográficas, clínicas y del desenlace de mujeres cuyas muestras de orina se usaron en la fase de factibilidad (n=80).

Variable	Preeclampsia grave (PEg, n=40)	Control de embarazo (P-CRL, n=40)	Valor P
Características maternas en el reclutamiento			
Edad, años †	28 ± 1	27 ± 1	0,373
Raza no caucásica, n (%) §	20 (50)	24 (55)	0,500
Peso, kg †	89 ± 3	84 ± 4	0,380
Nuliparidad, n (%) §	25 (63)	19 (48)	0,261
Edad gestacional, semanas †	30 ± 1	30 ± 1	0,817
Tensión arterial sistólica, mmHg ‡	165 ± 3	113 ± 3	<0,001
Tensión arterial diastólica, mmHg ‡	99 ± 2	66 ± 1	<0,001
Manifestaciones neurológicas, n (%) §	21 (53)	0(0)	<0,001
Proteinuria, tira reactiva urinaria ‡	3 [2-4]	0 [0-0]	<0,001
Proteína de 24 h completada, n (%)	27 (68)	NA	NA
Eliminación de proteína de 24 h, gramos/24 h ‡	2,6 [1,5-3,6]	NA	NA
Características del desenlace			
HELLP, n (%) §	8 (20)	0 (0)	0,005
RCFIU, n (%) §	11 (28)	0 (0)	<0,001
Edad gestacional en el parto, semanas †	30 ± 1	39 ± 1	<0,001
Parto <34 semanas, n (%) §	39 (98)	0 (0)	<0,001
Parto indicado por PE, n (%) §	40 (100)	0 (0)	<0,001
Peso al nacer, gramos, n (%) §	1,217 ± 78	3,318 ± 80	<0,001
Parto por cesárea, n (%) §	37 (93)	16 (40)	<0,001
† Datos presentados como media ± error estándar y analizados por las pruebas de la t de Student.			
‡ Datos presentados como la mediana del [intervalo intercuartílico] y analizados por pruebas de Mann-Whitney.			
§ Datos presentados como n (%) y analizados por las pruebas exactas de Fisher.			

15 Se depositó la orina que se había mezclado con rojo Congo (CR) sobre una membrana de nitrocelulosa no soportada, y luego se lavó con concentraciones crecientes de metanol (FIG. 6A). El fundamento de este experimento se basó en la propiedad de autoensamblado de CR y su capacidad para iniciar la formación de grandes oligómeros insolubles después de la unión a proteínas de amiloide que tienen una amplia estructura de lámina β. Como se muestra, puntos de mujeres con PEg pero no P-CRL siguieron siendo rojos después del lavado con metanol, que indica que las mujeres

- con PE muestran congofilia urinaria. Se diseñó además un protocolo normalizado para permitir una cuantificación objetiva de cada tendencia de la muestra de orina para retener CR, mientras que se minimizaban las variaciones debidas a diferencias en el estado de proteinuria e hidratación (la prueba de punto de rojo Congo [CRD]). Se obtuvieron dos índices mediante el análisis de imágenes: Retención de CR (CRR, medida congofilia) e incorporación de CR (CRI, referencia interna). En comparación con P-CRL, CRR aumentó significativamente en orina de PEg ($P < 0,001$, FIG. 6B). No hubo diferencias en CRI entre los dos grupos (FIG. 6C). En el análisis de la curva de eficacia diagnóstica (ROC), un valor de corte de CRR de 15 % tuvo 100 % [IC del 95 %: 92-100] de sensibilidad y 100 % [IC del 95 %: 92-100] de especificidad para discriminar casos de PEg de P-CRL. En la cohorte de *factibilidad*, todos los pacientes con PEg tuvieron valores de CRR > 15 %. Basándose en este resultado, CRR ≥ 15 % se consideró "no reconfortante" (NR-CRR).
- Los amiloides unidos a CR presentan fluorescencia roja brillante cuando se iluminan con luz UV, junto con un desplazamiento en la absorbancia desde aproximadamente 490 hasta 540 nm. Tras la iluminación de la membrana de nitrocelulosa con UV de longitud de onda larga pero no corta, se observó fluorescencia roja característica de CR unido a amiloide (FIG. 6D). Inmediatamente después de la adición de disolución madre de CR, 30 % (12/40) de las muestras de orina con PEg (pero no P-CRL) cambiaron visiblemente de color de naranja-rojizo a magenta (FIG. 6E), de acuerdo con el desplazamiento espectral batocrómico descrito para la oligomerización de β -amiloides (agregación), *in vitro*. La determinación espectrofotométrica de absorbancias a 403 nm (punto isosbético) y 541 nm (punto de máximo desplazamiento) confirmó la presencia de agregados de tipo amiloide en la orina de PEg (FIG. 6F). Entre las mujeres con PEg, el grado de desplazamiento espectral se correlacionó con el índice CRR ($r = 0,664$, $P < 0,001$). Aunque, como grupo, las mujeres con PEg tuvieron mayor concentración de agregados de tipo amiloide, 20 % (8/40) de las orinas de PEg no presentaron un desplazamiento espectral detectable (visual y/o espectrofotométrico) a pesar de NR-CRR en la prueba de CRD (FIG. 6G). Ocurrió un desplazamiento espectrofotométricamente detectable solo para muestras con CRR > 50 %, que implica que en comparación con la prueba de CRD (corte de CRR 15 %), la espectrofotometría directa tiene una sensibilidad más baja (80 % [IC del 95 %: 64-91]) en identificar PE ($P = 0,007$, cohorte de *factibilidad*). Además, las mujeres con PEg presentaron elevada fluorescencia inducida por tioflavina T (ThT) en orina (FIG. 6H), $P < 0,001$). Este es otro indicador más de las estructuras de tipo amiloide presentes en la orina de mujeres con PE. Similar a la espectrofotometría directa, solo un subgrupo de especímenes de PEg (42 %) mostró un aumento significativo en la fluorescencia a 485 nm tras la unión a ThT (FIG. 6I). En comparación con la prueba de CRD, la unión a ThT de orina tuvo una menor sensibilidad (82 % [IC del 95 %: 65-92]) en identificar PE ($P < 0,001$, cohorte de *factibilidad*).
- La congofilia en la orina se diferencia entre trastornos hipertensivos del embarazo y aumenta con la intensidad de PE
- Para entender más la importancia clínica de la congofilia en la orina durante el embarazo, se probaron muestras de orina de 582 mujeres adicionales, esta vez no seleccionadas con respecto a la categoría de reclutamiento (FIG. 5, *fase de validación*). Se diseñaron una cohorte *transversal* ($n = 526$) y una *longitudinal* ($n = 56$). Las mujeres en la cohorte *transversal* participaron con una única muestra de orina. Los resultados se agruparon y se analizaron basándose en la clasificación clínica en la recogida de muestras y el desenlace del embarazo (MIDPE u otra). Las características clínicas de las mujeres incluidas en la cohorte *transversal* se presentan en la Tabla 2. Las mujeres en la cohorte *longitudinal* fueron asintomáticas para PE en la entrada en el estudio, y se siguió longitudinalmente durante toda la gestación.

Tabla 2. Características demográficas, clínicas y del desenlace de mujeres embarazadas cuyas muestras de orina se usaron en la fase de validación transversal (n=516).

Variable	P-CRL n=18	Otros		HTgest n=28	HTNcr n=63	PEI n=53	PEg n=135	PEsp n=57	Valor P
		Tipo 1 n=37	Tipo 2 n=125						
Características demográficas y clínicas en la recogida de muestras									
Edad, años ‡	29 [25-32]	26 [22-32]	28 [23-32]	30 [22-36]	34 [30-37] ^a	27 [21-32]	26 [21-33]	31 [26-35] ^a	<0,001
Raza no caucásica, n (%) §	10 (56)	18 (49)	64 (51)	18 (64)	47 (75)	26 (49)	86 (64)	41 (72)	0,009
Peso, kg ‡	85 [59-91]	73 [58-131]	82 [70-86]	92 [70-116]	107 [84-117]	85 [73-124]	81 [69-100]	94 [78-115]	0,059
Nuliparidad, n (%) §	7 (39)	24 (65) ^a	52 (42)	16 (57)	15 (24) ^a	33 (62) ^a	84 (62) ^a	20 (35) ^a	<0,001
Gestación múltiple, n (%) §	0 (0)	4(11)	15 (12)	3(10)	4(6)	4(8)	9(7)	1(2)	0,270
Edad gestacional, semanas ‡	30 [12-37]	27 [25-32] ^a	29 [25-32] ^a	37 [35-38] ^a	32 [25-35]	36 [34-38] ^a	34 [30-37]	33 [27-36]	<0,001
Intervalos de edad gestacional, n (%)									<0,001
< 20 semanas	5 (28)	1 (3)	2 (2)	0 (0)	5 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
20-34 ^{6/7} semanas	5 (28)	28 (76)	118 (94)	6 (21)	37 (59)	9 (17)	59 (44)	29 (51)	
34-36 ^{6/7} semanas	4 (22)	6 (16)	2 (2)	7 (25)	12 (19)	21 (40)	38 (28)	22 (39)	
≥ 37 semanas	4 (22)	2 (5)	3 (2)	15 (54)	9 (14)	23 (43)	38 (28)	6 (10)	
Tensión arterial sistólica, mmHg ‡	110 [99-120] ^a	113 [109-131] ^a	113 [109-122] ^a	150 [143-159] ^a	150 [132-168] ^a	148 [140-158] ^a	160 [150-170] ^a	162 [150-176]	<0,001
Tensión arterial diastólica, mmHg ‡	65 [60-70] ^a	72 [65-81] ^a	64 [60-71] ^a	95 [89-101] ^a	90 [78-100] ³	90 [87-98] ^a	98 [90-104] ^a	99 [92-104] ^a	<0,001
Manifestaciones neurológicas, n (%) §	0 (0) ^a	2 (5) ^a	1 (1) ^a	11 (39) ^a	13 (21) ^a	8 (15) ^a	21 (53) ^a	63 (47) ^a	<0,001
Proteinuria, tira reactiva urinaria ‡	0 [0-0] ^a	0 [0-1] ^a	0 [0-0] ^a	0 [0-0] ^a	0 [0-1] ^a	2 [1-2] ^a	3 [1-3] ^a	2 [1-3] ^a	<0,001
Eliminación de proteína de 24 h, gramos/24 h ‡	NA	0,32 [0,08-1,97] ^a	NA	0,16 [0,10-0,19] ^a	0,25 [0,14-0,45] ^a	0,72 [0,34-1,61]	2,01 [0,39-5,14]	1,49 [0,55-3,57]	<0,001
Evolución clínica y desenlace del embarazo									
Desenlace del embarazo conocido, n (%) §	18 (100)	36 (97)	123 (98)	28(100)	58 (92)	53 (100)	135(100)	57 (100)	0,023
HELLP, n (%) §	0(0) ^a	2(6) ^a	0 (0) ^a	0(0) ^a	1 (2) ^a	0(0) ^a	28 (21)	6 (11)	<0,001
RCFIU, n (%) §	0(0) ^a	19 (54)	0 (0) ^a	0(0) ^a	4 (7)	0(0) ^a	18 (13)	9 (16)	<0,001
MFIU, n (%) §	0(0)	1 (3)	5 (4)	0 (0)	4 (7)	0(0) ^a	4(3)	1(2)	0,432
Edad gestacional en el parto, semanas ‡	37 [36-39]	31 [27-37] ^a	33 [28-36] ^a	37 [36-38] ^a	35 [30-38]	37 [36-39] ^a	35 [30-37]	33 [28-36] ^a	<0,001
Parto <34 semanas, n (%) §	3(19)	21 (58) ^a	80 (66) ^a	4 (14) ^a	21 (36)	6 (11) ^a	57 (42)	29 (51) ^a	<0,001
Parto indicado por PE, n (%) §	1 (6) ^a	3 (9) ^a	0(0) ^a	4 (14) ^a	17 (29) ^a	41 (77) ^a	132 (98) ^a	56 (98) ^a	<0,001
Peso al nacer, gramos, ‡	2.799 [1.321-4.205]	1.150 [673-2.695]	1.833 [963-2.5331]	2.280 [1.815-3.200]	2.040 [1.240-2.644]	2.891 ^a [1.800-3.440]	1.908 [1.050-2.493]	1.395 [894-2.548]	0,011
Parto por cesárea, n (%) §	7 (39)	22 (60)	28 (22) ^a	12 (43)	24 (41)	20 (38)	50 (59)	35 (61)	<0,001

‡ Datos presentados como la mediana del [intervalo intercuartílico] y analizados por ANOVA de Kruskal-Wallis, seguido por comparaciones a posteriori usando la prueba de Dunn

§ Datos presentados como n (%) y analizados por las pruebas exactas de la prueba de la chi al cuadrado.

^a p<0,05 frente al grupo de P-CRL; ^b p<0,05 frente al grupo de PEG

Abreviaturas: P-CRL, control de embarazo; HTgest, hipertensión gestacional; HTNcr, hipertensión crónica; PEI, preeclampsia leve; PEG, preeclampsia grave; PEG, preeclampsia superpuesta; RCFIU, restricción del crecimiento uterino; MFIU, muerte fetal intrauterina; HELLP, enzimas hepáticas elevadas hemolíticas, plaquetas bajas;

5 Cuando casos reclutados en la corte *transversal* se agruparon por diagnóstico clínico en el momento de la recogida de muestras, tanto las mujeres con PEG como con PE superpuesta (PEsp) tuvieron niveles de CRR más altos en comparación con todos los otros grupos (FIG. 7A, P<0,001). A continuación, los presentes inventores analizaron la

proporción de mujeres que presentaron valores de NR-CRR en orina. Los presentes inventores encontraron que 75 % (40/53), 89 % (120/135) y 91 % (52/57) de las mujeres ingresadas con un diagnóstico de PE leve (PEI), PEG y PESP tuvieron, respectivamente, valores de NR-CRR (FIG. 7B). Estas proporciones fueron significativamente superiores a en todos los otros grupos ($P < 0,05$). De las mujeres con hipertensión crónica (HTNcr) descartadas por PESP basándose en los criterios clínicos y de laboratorio en el momento del reclutamiento, 35 % (22/63) presentaron niveles de NR-CRR. Esto fue significativamente más alto en comparación con P-CRL (6 %, 1/18, $P = 0,017$) o mujeres con patologías no relacionadas con PE (Tipo-1: 13 %, 16/125, $P < 0,001$). De acuerdo con la naturaleza progresiva de PE, se revisó el diagnóstico de 27 % (17/63) de las mujeres clasificadas como HTNcr en el reclutamiento para PESP y, por último lugar, MIDPE requerida (FIG. 7C). De estas, 53 % (9/17) tuvieron congofilia en la orina en la evaluación inicial, que implicó que la prueba de CRD puede ser útil para predecir rápidamente PESP cuando esta afección no se puede diagnosticar basándose en los actuales criterios clínicos solo. La relación entre el índice de CRR y MIDPE en la cohorte *longitudinal* basada en EG en la parto se presenta en la FIG. 7D. Las mujeres que requirieron MIDPE tuvieron CRR significativamente más alta en todos los periodos de EG (MIDPE: $P < 0,001$, EG: $P = 0,008$). Los niveles de CRR en PE antes de término fueron significativamente más altos en comparación con la PE a término acompañados por una significativa interacción entre EG y MIDPE (ANOVA bilateral, $P < 0,018$). Esta observación se puede explicar por la proporción más alta de mujeres que presentaron PEI a término que se trata por el método de referencia por MIDPE sin demora. Además, los casos con altos valores de CRR ($CRR \geq 60$ %) estuvieron menos representados en mujeres con MIDPE a término en comparación con las que requirieron MIDPE en < 34 semanas (29 % frente a 58 %, $P = 0,003$).

En la cohorte *longitudinal* (FIG. 7E), las mujeres que desarrollaron PE que requirieron MIDPE ($n = 9$, todas del grupo de reclutamiento de alto riesgo) tuvieron niveles de CRR significativamente más altos antes de la manifestación clínica de la enfermedad ($P < 0,001$ para tanto MIDPE como intervalo hasta el parto). Es interesante señalar que el 78 % (7/9) de estas mujeres tuvieron valores de NR-CRR en la entrada en el estudio que era superior a 10 semanas antes de la PE clínicamente abierta. Esto sugiere que el mecanismo subyacente de la congofilia en la orina ocurre probablemente pronto en la fase asintomática y empeora progresivamente. En general, 4 mujeres de alto riesgo presentaron congofilia en la orina en EG < 20 semanas y todas tuvieron MIDPE. Todas las mujeres de bajo riesgo ($n = 28$) tuvieron una evolución del embarazo sin complicaciones por PE, parto a término y todas excepto una siguió siendo no congófilas durante todo el embarazo. Este caso se volvió congófilo en el tercer trimestre y se sometió al parto indicado por hipertensión gestacional (HTgest) a término.

Entre las mujeres de riesgo bajo y alto que no desarrollaron PE, no hubo diferencia estadística en los niveles de CRR en la entrada en el estudio (bajo riesgo: $3,2 \pm 0,6$ % frente a alto riesgo: $7,0 \pm 2,8$ %, $P = 0,397$).

La prueba del punto de rojo Congo (CRD) es una modalidad simple para diagnosticar PEG y predecir MIDPE

El análisis de ROC de las muestras de orina de reclutamiento ($n = 563$) de las mujeres embarazadas incluidas en la cohorte de validación que tuvieron desenlaces del embarazo conocidos (sujetos de la cohorte transversal que no se perdieron de vista durante el seguimiento: $n = 508$ + sujetos de la cohorte longitudinal que no se perdieron de vista durante el seguimiento: $n = 55$) determinó que CRR solo (corte de ≥ 15 %) tuvo una sensibilidad de 85,9 % [IC del 95 %: 81,1-89,9], especificidad de 85,0 % [IC del 95 %: 80,4-88,8], relación de probabilidad (LR) positiva de 5,7 [IC del 95 %: 4,4-7,5] y LR negativa de 0,17 [IC del 95 %: 0,1-0,2] en la predicción de PE que requirió MIDPE (Tabla 3).

Tabla 3. Exactitud de pronóstico comparativa para la predicción del parto medicamente indicado por preeclampsia (MIDPE) entre los sujetos en la fase de validación con desenlaces del embarazo conocidos ($n = 563$)

Característica	ABC [IC de 95 %]	Valor P	Sens. (%) [IC del 95 %]	Espec. (%) [IC del 95 %]	+LR [IC de 95 %]	-LR [IC del 95 %]	PPV (%) [IC del 95 %]	NPV (%) [IC del 95 %]
CRR ≥ 15 %	0,894 [0,866-0,918]	$< 0,0001$	85,93 [81,1-89,9]	85,00 [80,4-88,8]	5,73 [4,4-7,5]	0,17 [0,1-0,2]	83,4 [78,4-87,6]	87,3 [83,0-90,9]
Tira reactiva $f \geq + 1$	0,825 * [0,789-0,856]	$< 0,0001$	81,89 [76,6-86,4]	83,09 [71,1-87,3]	4,84 [3,7-6,3]	0,22 [0,2-0,3]	81,9 [76,6-86,4]	83,1 [78,1-87,3]
TAS ≥ 140	0,810 * [0,775-0,842]	$< 0,0001$	87,83 [83,3-91,5]	74,33 [69,0-79,2]	3,42 [2,8-4,2]	0,16 [0,1-0,2]	75,0 [69,8-79,7]	87,5 [82,7-91,3]
TAD ≥ 90	0,782 * [0,746-0,816]	$< 0,0001$	77,19 [71,6-82,1]	79,33 [74,3-83,8]	3,73 [3,0-4,7]	0,29 [0,2-0,4]	76,6 [71,0-81,6]	79,9 [74,9-84,3]
TAS ≥ 140 y CRR ≥ 15	0,859 * [0,828-0,887]	$< 0,0001$	77,19 [71,6-82,1]	94,67 [91,5-96,9]	14,47 [8,9-23,4]	0,24 [0,2-0,3]	92,7 [88,4-95,8]	82,6 [78,1-86,4]
TAD ≥ 90 y CRR ≥ 15	0,831 * [0,797-0,861]	$< 0,0001$	69,58 [63,6-75,1]	96,67 [94,0-98,4]	20,87 [11,3-38,6]	0,31 [0,3-0,4]	94,8 [90,7-97,5]	78,4 [73,8-82,5]
Hipertensión y proteinuria (criterios del ACOG) ‡	0,850 * [0,818-0,879]	$< 0,0001$	77,22 [71,6-82,2]	92,93 [89,4-95,6]	10,92 [7,2-16,6]	0,25 [0,2-0,3]	90,5 [85,8-94,0]	82,4 [77,9-86,3]

Característica	ABC [IC de 95 %]	Valor P	Sens. (%) [IC del 95 %]	Espec. (%) [IC del 95 %]	+LR [IC de 95 %]	-LR [IC del 95 %]	PPV (%) [IC del 95 %]	NPV (%) [IC del 95 %]
Hipertensión y proteinuria (criterios de la OMS) §	0,772 * [0,733-0,807]	<0,0001	55,51 [49,2-61,7]	98,90 [96,8-99,8]	50,33 [16,2-100]	0,45 [0,4-0,5]	97,9 [94,0-19,6]	70,4 [65,6-75,0]

Resultados clínicos de la tira reactiva (Siemens 8SG Multistix) obtenidos con un lector electrónico

Abreviaturas: CRR: Retención de rojo Congo, TAS: tensión arterial sistólica, TAD: tensión arterial diastólica

* $P < 0,05$ frente a $CRR \geq 15\%$

5 ‡ Criterios de diagnóstico para preeclampsia recomendados por el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG): La hipertensión se definió como $TAS \geq 140$ o $TAD \geq 90$. La proteinuria se definió como ≥ 300 mg/24 h o una tira reactiva $\geq + 1$ (para casos que no tuvieron una medición de proteinuria de 24 h indicada o que no completaron la recogida de 24 h) (3).

§ Criterios de diagnóstico para preeclampsia recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS): La hipertensión se definió como $TAD \geq 90$. La proteinuria se definió como tira reactiva $\geq + 2$ (23).

10 Esto se comparó significativamente mejor con los criterios de detección clínicos actualmente reconocidos para el diagnóstico de PE (CRR frente a tensión arterial $P < 0,001$; CRR frente a tira reactiva de proteína $P < 0,001$). La CRR tuvo valor aditivo para tanto las tensiones arteriales sistólicas como diastólicas ($P < 0,001$). La CRR solo rindió significativamente mejor que la combinación de tensión arterial y proteinuria basándose en los cortes recomendados de tanto el ACOG ($P = 0,004$) (3) como la OMS ($P < 0,001$) (23). La asociación de CRR con MIDPE siguió siendo
15 significativa después de controlar la EG y las características demográficas maternas en regresión logística múltiple (oportunidad relativa de NR-CRR [IC del 95 %]: 30,6 [18,9-49,6]; oportunidad relativa de EG: 3,3 [2,0-5,4]). Se excluyeron la edad materna, raza y la paridad del modelo basado en $P > 0,1$.

A continuación, se analizó el grupo de mujeres que completaron las recogidas de proteína de 24 horas (considerado el actual método de referencia para proteinuria de PE, $n = 250$). Hubo una correlación significativa entre CRR y la
20 proteinuria de 24 h ($r = 0,788$, $P < 0,001$). De las mujeres con la proteinuria de 24 h ≥ 300 mg/24 h que requirieron MIDPE, 94 % (148/158) tuvieron $CRR \geq 15\%$ y 82 % (129/158) tuvieron $CRR \geq 30\%$ (FIG. 13). Varios casos de PE considerados "atípicos" basándose en la ausencia de o proteinuria o hipertensión presentaron congofilia en la orina. De los casos "atípicos" no proteinúricos, 58 % (23/40) fueron congófilos en el momento de la primera evaluación, que
25 sugiere la posible utilidad clínica de la prueba de CRD en dichas circunstancias clínicas. Las 23 mujeres congófilas con "PE atípica" tuvieron un parto médicamente indicado. En los 21 casos, la indicación de parto fue PEg con presentación atípica. En los 2 casos restantes, la indicación para el parto fue el trazado anormal de la frecuencia cardíaca fetal.

La CRR rindió significativamente mejor que la relación de tirosina cinasa-1 de tipo fms soluble en orina (sFlt-1)/ factor de crecimiento placentario (PlGF) [uFP, estadística $z = 4,5$, $P < 0,001$], concentración de sFlt-1 en orina normalizada para creatinina (estadística $z = 6,8$, $P < 0,001$), concentración de PlGF en orina normalizada para creatinina (estadística
30 $z = 9,2$, $P < 0,001$) y relación entre proteína y creatinina (P:C) (estadística $z = 13,9$, $P < 0,001$) (FIG. 7F). La CRR tuvo rendimiento similar en la predicción de MIDPE con la puntuación de proteómica de la orina previamente descrita por los presentes inventores (UPS, estadística $z = 0,4$, $P = 0,695$). La UPS fue el factor pronóstico más fuerte de la congofilia en la orina entre mujeres que requirieron MIDPE, independiente de EG o proteinuria total o albuminuria ($P < 0,001$).
35 Este hallazgo estuvo de acuerdo con la observación previa de que varios fragmentos de biomarcadores de péptido de la puntuación UPS tienen un alto potencial de mal plegamiento.

La congofilia en la orina se asocia con inmunorreactividad para epítopes oligoméricos de proteínas mal plegadas prototipo

Se usaron tres anticuerpos de estructura cuaternaria, previamente validados, para identificar epítopes mutuamente
40 excluyentes de proteínas amiloidogénicas conocidas. El anticuerpo policlonal A11 detecta epítopes genéricos conformacionales independientes de secuencia en oligómeros prefibrilares citotóxicos (PFO) que parecen ser estructuras de lámina β antiparalelas, que incluyen barriles β y cilindrinas β . El anticuerpo policlonal α APF reconoce epítopes genéricos independientes de secuencia en conformaciones anulares de protofibrillas (APF) que parecen ser
45 barriles β y son más maduros y así menos citotóxicos que los PFO genéricos. El anticuerpo OC detecta conformaciones de fibrillas paralelas alineadas de fibrillas maduras y oligómeros fibrilares solubles. Las transferencias puntuales normalizadas a proteína se realizaron en un subconjunto de 234 especímenes consecutivos de orina de P-CRL ($n = 57$), mujeres con HTNcr ($n = 16$), PEI ($n = 33$) y PEg ($n = 128$). Hubo inmunorreactividad de A11 más alta en mujeres con PEg en comparación con P-CRL y HTNcr ($P < 0,001$, FIG. 8A). En comparación con P-CRL y HTNcr, tanto las mujeres con PEg como PEI tuvieron orina niveles de inmunorreactividad significativamente elevados para α APF
50 en el reclutamiento (FIG. 8B). Como se muestra en la Figura 8C, hubo heterogeneidad significativa en la inmunorreactividad de A11 y α APF con algunos especímenes que reaccionaban igualmente con ambos anticuerpos (S3), mientras que otros predominantemente con uno (S2). Estos resultados se pueden explicar en vista de los

recientes resultados que sugirieron una función de PFO como precursores para la formación de APF. No se encontró reactividad significativa con el anticuerpo OC. Conjuntamente, estos resultados indicaron presencia de tanto PFO como APF, pero no oligómeros fibrilares o fibrillas maduras en la orina de mujeres con PE. Sin embargo, no todas las mujeres con PEg con congofilia en la orina presentaron inmunorreactividad de APF o PFO detectable. La Figura 8D muestra un gráfico 3D de la inmunorreactividad de A11 y α APF junto con el nivel de congofilia para cada espécimen de orina incluido en nuestro análisis. Mientras que la mayoría de las muestras no de MIDPE (n=73, círculos verdes) se agruparon juntas próximas al origen del gráfico, los especímenes de MIDPE (n=161, cuadrados rojos) se dispersaron sustancialmente a lo largo de los tres ejes, que ilustran la gran heterogeneidad entre PFO de orina, APF y congofilia. Dentro del grupo de MIDPE, la CRR se correlacionó significativamente con PFO ($r=0,268$, $P<0,001$), pero no con la inmunorreactividad de APF ($r=0,128$, $P=0,106$). Sorprendentemente, en comparación con las mujeres con inmunorreactividad de PFO en orina ausente, los pacientes que dieron positivo tuvieron tensiones arteriales sistólicas ($P=0,002$) y diastólicas ($P=0,020$) significativamente más altas y manifestaciones clínicas más intensas del síndrome hipertensivo ($P<0,001$). Todos los análisis siguieron siendo significativos después de la corrección para EG y proteinuria total (relación P/C en orina).

El material congófilo aislado de orina de PE contiene estructuras a escala nanométrica redondas y fibrilares con características microscópicas de tipo amiloide

Se desarrolló el protocolo para precipitación asistida por CR de muestras de orina para caracterizar adicionalmente la congofilia de PE. Cuando se visualizó el precipitado de PEg por microscopía polarizada (FIG. 9A), se observaron partículas redondas o alargadas birrefringentes verdes (véase el recuadro). En la microscopía electrónica de transmisión (TEM, FIGS. 9B, 9C), las estructuras redondas variaron en tamaño de 30-300 nm mientras que las conformaciones fibrilares fueron más largas, arborescentes y enmarañadas juntas en novedosas estructuras electrodonasas más grandes. Estas estructuras estuvieron ausentes en especímenes de P-CRL procesados y se obtuvieron imágenes en paralelo (FIG. 9D). La TEM de tinción negativa (FIGS. 9E, 9F) mostró las monofibrillas como filamentos alargados de ~50-60 nm de diámetro con extremos suaves redondos (asterisco). Excepto por el diámetro más grueso, este aspecto microscópico global del precipitado congófilo de la orina con PEg se pareció mucho al clásicamente informado para fibrillas extraídas de tejidos cargados con amiloide teñidos con CR.

Extracción de plegoma erróneo de PE: el análisis inmunológico y proteómico de material congófilo en orina de PE revela un componente de proteína heterogénea

El término "plegoma erróneo" describe cualquier conjunto de proteínas mal plegadas. Los biomarcadores discriminatorios de la puntuación de UPS representan fragmentos de escisión no aleatorios de SERPINA1 y albúmina. Basándose en la tendencia de la SERPINA1 a agregarse y al mal plegamiento de proteínas en PE, la siguiente etapa fue la búsqueda de huellas de SERPINA1 y albúmina en material congófilo de orina. La Figura 9G (panel izquierdo) muestra una transferencia Western de SERPINA1 representativa de dos muestras de orina con PEg (carriles U1-U2) y su precipitado de CR correspondiente (carriles P1-P2). Como se muestra, el sedimento de CR se enriqueció sorprendentemente en inmunorreactividad de SERPINA1 con el patrón de escalera indicativo de la predominancia de fragmentos de SERPINA1 con respecto a la del precursor intacto (~57 kDa, flecha negra). Una tinción no específica con Coomassie de las mismas muestras (FIG. 9G, panel derecho) ilustró que el proceso de precipitación asistido por CR da como resultado un cambio en el patrón de bandas, que implica que solo algunos péptidos en orina con PEg tienen afinidad por CR y los fragmentos de SERPINA1 son parte de esta familia. La Figura 9H (panel izquierdo) es una transferencia Western representativa para la albúmina que ilustra una muestra de orina con PEg antes (U1) y después (P1) de la precipitación asistida por CR. Como se muestra, pareció que el precursor de albúmina intacto (~66 kDa, flecha negra) y los agregados de peso molecular más alto eran predominantes con respecto a los fragmentos de albúmina. La posición del colorante CR migrando libremente en el gel tras la reducción se marca por la flecha roja. Estos experimentos confirmaron que los precipitados de CR de la orina con PEg tienen un componente de proteína que, aunque es heterogéneo, no parece aleatorio. El componente de proteína se validó adicionalmente por inmunomarcado de TEM con anti-albúmina (FIG. 9I) y anticuerpos anti-SERPINA1 (FIG. 9J). El patrón observado en la inmuno-TEM doble indicó que coexiste la SERPINA1 y la albúmina en los precipitados de CR, que apoya la idea de coagregación heteróloga.

Para determinar qué otras proteínas pueden estar representadas en el precipitado de CR, se aplicaron técnicas de proteómica en especímenes de casos de PEg bien caracterizados. Aparte de SERPINA1 y albúmina, que se confirmaron por espectrometría de masas en tándem, otras identidades representadas fueron cadena ligera libre de IgG κ (kFLC), ceruloplasmina y proteína 6-16 inducible por interferón (IFI6 también conocida como G1P3). Es interesante señalar que se encontró que muchos de los péptidos identificados por espectrometría de masas contenían restos oxidados de metionina, un resultado que estuvo de acuerdo con el resultado previo de los presentes inventores de fragmentos del extremo C oxidados en Met³⁶⁵ de SERPINA1 como biomarcadores de orina de PEg. Las identidades anteriores se validaron por transferencia Western de precipitados de CR aislados de 60 muestras diferentes de orina. Transferencias Western representativas para kFLC (~25-30 kDa), ceruloplasmina (~150 kDa), G1P3 (~30 kDa), SERPINA1 (~57 kDa) y albúmina (~66 kDa) en precipitados de CR de orina de 4 mujeres con PEg pretérmino se muestran en la FIG. 14. Conjuntamente, estos resultados sugieren que el material congófilo de mujeres con PEg contiene proteoformas derivadas de fragmentos y/o agregados de múltiples proteínas. Además, los pacientes con PEg comparten en sus agregados congófilos un patrón no aleatorio de proteoformas inmunorreactivas de al menos 5 proteínas diferentes. Debido a que kFLC, ceruloplasmina y G1P3 tuvieron su banda inmunorreactiva más

predominante al tamaño molecular esperado de la proteína intacta, esto apoya su tendencia de agregación intrínseca incluso en estado no fragmentado.

5 A diferencia de κ FLC y ceruloplasmina, que se ha informado previamente que experimentan agregación patológica con relevancia para varios trastornos conformacionales humanos, G1P3 no se ha investigado previamente para la participación en estructuras de amiloide. Los presentes inventores realizaron un análisis informático de las posibilidades amiloidogénicas de las tres isoformas de G1P3 resultantes del corte y empalme alternativo. Dentro de la secuencia de G1P3, los presentes inventores observaron un número inusualmente alto de segmentos propensos a la agregación ("puntos calientes"). El algoritmo AGGRESCAN predijo que G1P3 debe tener una tendencia a la agregación al menos si no superior a A β 42 con la isoforma más corta (G1P3a) que es la más amiloidogénica (Na4vSS: G1P3a: 13,6 frente a A β 42: 6,4, FIG. 15 y Tabla 4).

La orina con PE contiene proteoformas de APP agregadas

15 Las proteínas fibrilares de amiloide son resistentes a la proteólisis por tripsina. Esto condujo a los presentes inventores a considerar la posibilidad de que un enfoque de proteómica, que se basa en el análisis de huellas de los péptidos de escisión triptica, podría haber perdido identidades de proteína importantes en el material congófilo de la orina. Un candidato fue APP. El procesamiento celular de APP es un fenómeno patofisiológico bien reconocido asociado a enfermedad de Alzheimer.

Tabla 4. Parámetros de agregación para isoformas de la proteína 6-16 inducible por interferón (G1P3) y para dos secuencias prototipo con baja y alta tendencia para la agregación

<u>Parámetros de AGGRESCAN</u>	Definición	Isoformas de G1P3 (IFI6) [P19429]			Secuencias de prototipo	
		A	B	C	TNNI3 [P00912]†	A β 42 [P05067]‡
a3vSA	tendencia a la agregación por promedio de secuencias de <u>aminoácidos</u> (a3v)	0,13	0,10	0,08	-0,31	0,06
nHS	número de "puntos calientes"	6	6	6	3	2
NnHS	número normalizado de "puntos calientes"	4,62	4,48	4,35	1,43	4,76
AAT	área del perfil de agregación por encima del umbral de "puntos calientes"	37,50	37,50	37,50	7,10	13,85
THSA	área total de "puntos calientes"	36,80	36,80	36,80	5,24	13,73
TA	área total del perfil de agregación	20,80	17,59	14,34	-62,99	3,43
AATr	área normalizada del perfil de agregación por encima del umbral de "puntos calientes"	0,29	0,28	0,27	0,03	0,33
THSAr	área total normalizada de "puntos calientes"	0,28	0,28	0,27	0,03	0,33
Na4vSS	suma de secuencias promedio de la ventana a3v normalizada (a4v)	13,4	10,5	7,8	-32,3	6,4

† TNNI3 (troponina I tipo 3) es una proteína inherentemente estable nativamente no plegada

‡ A β 42 (amiloide beta 42) es un péptido amiloidogénico inherentemente inestable. Valores de parámetros de AGGRESCAN más altos indican mayor tendencia a la agregación, mientras que valores negativos implican tendencia a la agregación muy baja. Obsérvese el parecido de los parámetros de agregación de G1P3 con A β 42 y la diferencia de TNNI3. Además, el algoritmo AGGRESCAN fue capaz de determinar que las isoformas de G1P3 más cortas tienen potenciales de agregación teóricos más altos

20 La APP es una proteína expresada ubicuamente en 3 isoformas principales (APP770, APP751, APP695) generadas mediante corte y empalme alternativo del gen APP. En la vía metabólica normal, la APP se escinde primero por α -secretasa en vez de β -secretasas para liberar un fragmento del extremo N soluble (APPas). La APPas no es amiloidogénica y sirve de factor de crecimiento promoviendo la supervivencia, la proliferación y la migración celular. Sin embargo, la escisión de APP por β -secretasa y posteriormente por λ -secretasa (FIG. 10A) libera un péptido de amiloide- β (A β) corto, que es el principal constituyente de las placas seniles congófilas. Debido a su alta tendencia a la oligomerización y el autoensamblaje, A β tiene funciones patológicas directas en la inducción del estrés oxidativo y la neurodegeneración asociados a la enfermedad de Alzheimer.

Basándose en el conocimiento anterior, se analizó la presencia de fragmentos de APP en el precipitado de CR de muestras de orina recuperadas de mujeres con PEg. Usando el anticuerpo monoclonal ALZ90 que reconoce los restos 511-608 en un dominio específico para APP, se demostró la presencia de fragmentos de APP por transferencia Western (FIG. 10B, carriles P1-P3) en estas muestras. Las bandas más llamativas migraron entre 60-90 kDa con un patrón de bandas coherente entre casos de PEg. Este patrón estuvo ausente o se modificó en casos de PEsp (P4-P7), una observación que apoya la diferencia patógena entre estos dos síndromes clínicamente superpuestos asociados al embarazo. Debido a que todas las muestras mostradas en la Figura 10B tuvieron niveles de NR-CRR, es probable que la congofilia en la orina sume un conjunto de proteínas mal plegadas que también incluye fragmentos de APP.

La presencia de fragmentos de APP en especímenes de orina clara de mujeres sanas P-CRL (n=8) y con PEg (n=16) se investigó a continuación por transferencia Western usando anticuerpos monoclonales bien caracterizados producidos contra una matriz de epítopes en la secuencia de APP: ALZ90, DE2B4 (reactivo con un epítipo dentro de los restos 1-17 de la región A β), 22C11 (reactivo con un epítipo del extremo N de APP, APPs y la proteína estructuralmente relacionada APLP-2) (47) y el anticuerpo MAB5354 (reactivo con un epítipo en el dominio del inhibidor de la proteasa de Kunitz [KPI]) (43-45). La Figura 10C muestra que, similar al precipitado de CR, especímenes de orina clara con PEg (U3-U8) presentaron una intensa inmunorreactividad de ALZ90. DE2B4 detectó un patrón de inmunorreactividad similar con ALZ90, aunque menor intensidad. Como se descartó la reactividad cruzada no específica de la albúmina humana con los dos anticuerpos monoclonales anti-APP (FIG. 10D, mostrada para DE2B4), la única explicación posible para el patrón de bandas revelado por ALZ90 y DE2B4 en orina con PEg fue la fragmentación de APP y/o la coagregación de fragmentos de APP con otras proteínas. La última posibilidad se confirmó por la disminución en la intensidad de la banda destacada de 64 kDa tras el tratamiento de orina con PEg con azul Cibacron, FIGS. 16A, 16B). El anticuerpo 22C11 detectó proteínas inmunorreactivas en la orina en tanto P-CRL (U1-U2) como PEg (U3-U8) al peso molecular esperado para APPs madura (~130 kDa) (FIG. 10E). Sin embargo, la orina con PEg contuvo una banda adicional (~110 kDa) que representa probablemente APPs inmadura (carriles U4-U6). En particular, algunas mujeres con PEg con intensa inmunorreactividad de ALZ90 y DE2B4 (carriles U3, U7, U8) tuvieron bandas de APPs de 22C11 menos marcadas. Interpretados juntos, la ausencia de tinción significativa para 22C11 con la inmunorreactividad positiva de ALZ90 y DE2B4 sugiere que las mujeres con PEg eliminan cantidades significativas de fragmentos de APP que están tanto truncados en N como escindidos por α -secretasa. Usando un ELISA que detecta APPs total (APP α s y APP β s), se determinó que las mujeres con PEg (n=66) tienen eliminación fraccionaria más alta de APPs en comparación con P-CRL (n=44) (PEg: 0,27 % [0,05-0,90] frente a P-CRL: 0,09 % [0,01-0,42], $P=0,032$).

Las isoformas de APPs que contienen el dominio KPI (por ejemplo, APP770 y APP 751) sirven de antiproteasas y se denominan genéricamente proteasa nexina-II (APP-KPI/PN2). Similar a SERPINA1, APP-KPI/PN2 inhibe potentemente las serina proteasas que incluyen tripsina y factores de coagulación que actúan de sustratos suicida. Se conoce que los fragmentos de APP-KPI/PN2 que incluyen el dominio KPI son altamente amiloidogénicos (50, 51). La Figura 10F demuestra que los especímenes de orina de mujeres con PEg contienen un fragmento de APP (~47 kDa) detectado específicamente por el anticuerpo MAB5354 (dominio KPI). Sin embargo, en comparación con DE2B4, pareció que era pequeña la inmunorreactividad de MAB5354 y, por tanto, la contribución de la isoforma de APP751 (FIGS. 16C, 16D). En resumen, las proteoformas de APPs maduras son constituyentes de la orina normal en embarazos sanas. La APPs relativamente baja en suero, la eliminación fraccionaria alta de APPs y los niveles especialmente altos de proteoformas de APP fragmentada en la orina con PEg indican un posible desarreglo en la vía de procesamiento proteolítico de APP en PEg.

La placenta humana expresa ARNm para APP y para las α , β y γ -secretasas prototipo de las que ADAM10 y BACE2 se incrementan en PE

La placenta es fundamental para la fisiopatología de la PE. Como el procesamiento de APP celular es una secuencia bien caracterizada de escisiones enzimáticas, los presentes inventores investigaron la expresión de ARNm placentario de APP total y de enzimas de procesamiento de APP prototipo: α -secretasas (ADAM10, ADAM17), β -secretasas (BACE1, BACE2) y γ -secretasas (PSEN1, PSEN2). Por RT-PCR cuantitativa en tiempo real, los presentes inventores determinaron que la placenta humana expresa ARNm para APP y para α , β y γ -secretasas, con expresión más alta pretérmino frente a término para APP, ADAM10, ADAM17, BACE2, PSEN1 y PSEN2 (FIGS. 11A, 11B). La abundancia relativa de la α -secretasa ADAM10 fue significativamente superior a la de ADAM17, tanto pretérmino ($P=0,001$) como a término ($P=0,009$). La señal de amplificación para la β -secretasa BACE1 fue solo débilmente detectada en tanto placenta pretérmino como a término. Esto fue a diferencia de BACE2, que se expresó a niveles significativamente más altos especialmente en placenta pretérmino ($P<0,001$ frente a término). En comparación con α - y β -secretasas, las γ -secretasas tuvieron en general niveles más bajos de ARNm. El ARNm para PSEN1 fue significativamente más alto en comparación con el de PSEN2 pretérmino ($P<0,001$), pero no en placentas a término ($P=0,209$) donde ambas γ -secretasas se expresaron a bajos niveles. Los niveles de ARNm de los trofoblastos vellosos de ADAM10 ($P<0,001$) y BACE2 ($P<0,001$) fueron significativamente más altos en PEg en comparación con tejidos placentarios de la misma EG de mujeres con parto prematuro idiopático (PPi) (FIG. 11C). Una comparación entre los mismos grupos mostró disminución de los niveles de ARNm de BACE1 en PEg ($P=0,021$, FIG. 11C). No se observaron cambios significativos en la expresión de ARNm para ADAM17, PSEN1, PSEN2 o APP ($P>0,05$ para todos).

La preeclampsia grave se asocia con deposición de agregados extracelulares positivos para ALZ90 en la placenta que se parecen a placas de amiloide

Se identificó inmunorreactividad intensa de la APP 22C11 (extremo N) en la placa basal y las vellosidades coriónicas de las placentas de PPI (FIG. 12A). Las células deciduales se tiñeron más intensamente que los trofoblastos extravelosos, mientras que en las vellosidades placentarias las células endoteliales y los citotrofoblastos se tiñeron más visiblemente en comparación con el estroma circundante (FIG. 12A, inserto). Hubo notables diferencias en los patrones de tinción de 22C11 entre placentas de PEg y de PPI. En PEg, las células deciduales dieron tinción positiva a casi la misma intensidad en comparación con PPI, pero la distribución de las células deciduales 22C11 estuvo más dispersa y tuvieron una morfología distorsionada (FIG. 12B). Se observó la intensa tinción de agregados filamentosos acelulares en los espacios intervillosos maternos, con un número significativamente elevado en secciones de PEg (recuadro de la FIG. 12B, punta de flecha).

El patrón de la tinción con anticuerpo ALZ90 (específico para placas de amiloide A β) fue diferente del observado con 22C11. Las áreas positivas para ALZ90 fueron escasas en tejidos de PPI pretérmino y, cuando estuvieron presentes, se localizaron más frecuentemente hacia la decidua (FIG. 12C) en vez de hacia las vellosidades placentarias donde la inmunorreactividad histológica estuvo prácticamente ausente (FIG. 12C, recuadro). En cambio, en placentas con PEg, la tinción de ALZ90 fue más marcada tanto en la placa basal (FIG. 12D) como las áreas vellosas (FIG. 12E), dando un aspecto fragmentado global de la placenta. En particular, la positividad de ALZ90 se localizó hacia material acelular puntuado (FIG. 12E, recuadro) o escamoso agregado en placas (FIG. 12F). Se observaron más frecuentemente placas positivas de ALZ90 en áreas afectadas por la degeneración de tipo fibrinoide. Sin embargo, no todo el material de tipo fibrinoide fue positivo para ALZ90. En la tinción H&E, el material positivo para ALZ90 tuvo un aspecto proteináceo púrpura característico diferente del fibrinoide eosinófilo circundante (FIG. 12G). La incubación con IgG de ratón confirmó la especificidad de la tinción (FIG. 12H). El material endovascular positivo para ALZ90 fue inmunorreactivo para G1P3, y se observó frecuentemente en áreas tradicionalmente descritas morfológicamente como calcificaciones placentarias, que los presentes inventores confirmaron por tinción con alizarina S (FIGS. 17A-17D).

La placenta humana expresa inmunorreactividad para las α , β y γ -secretasas prototipo de las que ADAM10, BACE1, BACE2 y PSEN1 se incrementan en placentas de PE en modo específico de célula

En comparación con las placentas de PPI, las placentas con PEg expresaron más ADAM10 ($P=0,017$, FIGS. 12I, 12J) y BACE2 ($P=0,007$, FIGS. 12K, 12L). En PEg, la inmunorreactividad de ADAM10 en las vellosidades se localizó predominantemente hacia los citotrofoblastos (FIG. 8J), mientras que la β -secretasa BACE2 estuvo expresada más ubicuamente entre las poblaciones placentarias de células que incluyen citotrofoblastos vellosos, sincitiotrofoblasto y células vellosas del estroma (FIG. 8L). Se encontró que la placenta humana mostraba inmunotinción positiva para BACE1. En placentas de PPI, las células deciduales y citotrofoblastos mostraron la mayor parte de la tinción positiva (FIG. 8M). Se observó un cambio en el patrón de expresión de BACE1 en vellosidades de PEg con marcada presencia de BACE1 en la capa de sincitiotrofoblastos que pareció rodear el borde de las vellosidades (FIG. 8N). Es digno de mención que las plaquetas con PEg mostraron diferencias regionales en la intensidad de tinción de BACE1 (FIGS. 18A-18J). Se observó que las áreas en proximidad de infartos placentarios tenían la tinción de sincitiotrofoblastos más marcada. Con respecto a la γ -secretasa PSEN1, la placenta PPI tuvo tinción prácticamente ausente en citotrofoblastos vellosos o sincitiotrofoblasto (FIG. 12O, recuadro). En cambio, el sincitiotrofoblasto de PEg mostró una notable tinción de PSEN1 ($P=0,038$, FIG. 12P, inserto), que junto con BACE1 representan dos enzimas clave implicadas en el procesamiento de APP por la vía amiloidogénica.

Diseño del estudio

Se reclutaron mujeres embarazadas desde marzo de 2004 hasta diciembre de 2010 en el Yale-New Haven Hospital (New Haven, CT). Se reclutaron mujeres proteinúricas no embarazadas en Fletcher Allen Health Care Hospital (Burlington, VT). Los protocolos de investigación fueron autorizados por tanto los comités de la Universidad de Yale como el Programa de Protección de Investigación Humana de la Universidad de Vermont. Todas las mujeres proporcionaron consentimiento informado por escrito. Se investigaron 824 muestras de orina de 662 mujeres (FIG. 5). Para la investigación de congofilia en la orina, se realizó una fase de factibilidad en 80 muestras de orina recogidas de 40 pacientes con PEg y MIDPE, y 40 mujeres asintomáticas embarazadas sanas que dieron a luz a término en ausencia de complicaciones. Las características clínicas de los pacientes de la fase de factibilidad se presentan en Materiales suplementarios (Tabla 1). En una segunda fase del estudio, la congofilia en la orina se sometió a validación adicional en un estudio prospectivo de cohortes que consistía en 526 pacientes consecutivos estratificados basándose en su diagnóstico en el momento del reclutamiento en los siguientes grupos: (a) controles asintomáticos de embarazo (P-CRL, $n=18$); (b) hipertensión gestacional (HTNg, $n=28$); (c) hipertensión crónica (HTNcr, $n=63$); (d) PE leve (PEl, $n=53$); (e) PEg ($n=135$); (f) PE superpuesta (PEsp, $n=57$); (g) afecciones médicas asociadas al embarazo que no necesitaron pruebas diagnósticas de laboratorio para PE (Otros Tipo-1, $n=125$) (h) afecciones médicas asociadas al embarazo o enfermedades asociadas que se asocian frecuentemente con PE y se realizaron pruebas diagnósticas de laboratorio para confirmar o excluir PE (Otros Tipo-2, $n=37$) y (i) mujeres proteinúricas no embarazadas ($n=10$). Las características clínicas de los pacientes de la fase de validación se presentan en Materiales suplementarios (Tabla 2).

La cohorte longitudinal consistió en mujeres que fueron asintomáticas en la entrada en el estudio y contribuyeron con múltiples muestras durante toda la gestación (n=56). Estos pacientes fueron reclutados consecutivamente basándose en la disponibilidad del investigador y se valoraron como o de riesgo alto (n=28) o bajo (n=28) de PE.

Criterios de valoración clínicos y representativos

- 5 La PE es un síndrome caracterizado por manifestaciones clínicas heterogéneas con diferente patogénesis y diversos factores de riesgo. La definición de PE y los trastornos hipertensivos durante el embarazo es frecuentemente arbitraria. En ausencia de datos para apoyar la validez de diversas definiciones, el diagnóstico de la PE no es tan fácil como se podría creer. Existe una significativa dificultad en la identificación de pacientes que están en riesgo de desenlaces adversos del embarazo, en particular en mujeres con PE o diversos imitadores de la PE. Como resultado, además de 10 las categorías de diagnóstico clínico, que pueden variar con tanto la evolución de la enfermedad como el médico, se eligió un evento adverso potencial basado en intervención, que es MIDPE, como un mejor reflejo de las enfermedades verdaderas. Este enfoque se aplicó satisfactoriamente durante el estudio de descubrimiento de proteómica de la orina previo de los presentes inventores. Brevemente, se dedujo que una indicación de MIDPE pertenece a un equipo clínico, es el último recurso de tratamiento cuando han fallado todas las otras estrategias terapéuticas, su desenlace 15 resultante es definitivo, no se puede revocar, y así está menos sujeto a sesgo. Debido a que la gestión clínica de pacientes con PE (gestante frente a parto inmediato) puede variar basándose en la edad gestacional (EG) en el momento del diagnóstico, los resultados se analizaron según la EG en el parto. Se usaron los cortes de EG de <34, 34-36/7 y >37 semanas. El número de pacientes que dieron a luz por MIDPE u otra causa basada en la distribución de EG anterior, para tanto las cohortes transversal como longitudinal, se presentan en la Figura 5 y las Tablas 1 y 2.

20 Muestras biológicas

- Se recogieron muestras de orina. Brevemente, se recogió una muestra de orina aleatoria (5-10 mL) por uso habitual de recipientes estériles usando las técnicas estériles de "cateterismo directo" o "recogida limpia". A las mujeres con PEG se les puso una sonda de Foley para permitir la precisa monitorización de la diuresis. El setenta por ciento de las mujeres con PE pretérmino se reclutó antes de la profilaxis para convulsiones (sulfato de magnesio) y esteroides. Las 25 mujeres reclutadas en la cohorte longitudinal proporcionaron muestras en serie en un modo secuencial de tiempo. Se recogieron muestras de sangre por venopunción en un subconjunto de mujeres de la corte transversal (n=141) en el momento de obtención de una muestra de orina. Se dejó que la sangre coagulara. Se centrifugaron las muestras de suero y de orina a 3.000 g a 4 °C durante 20 minutos y o se analizaron o se conservaron en alícuotas a -80 °C. Se recogieron los tejidos placentarios inmediatamente después del parto de mujeres con PEG (n=8, EG: 31±1 semanas; percentil de crecimiento: 24±7 %). Se usaron como controles el parto prematuro idiopático espontáneo de la misma EG (n=8, el diagnóstico se basa en la ausencia de infección intraamniótica por amniocentesis, ausencia de corioamnionitis histológica, EG: 31±1 semanas; percentil de crecimiento: 31 %±7 %) y mujeres sanas que dieron a luz por cesárea programada a término en ausencia de periodo de dilatación (n=5, EG: 39±1 semanas, percentil de crecimiento: 36±10 %). Los tejidos o se congelaron en nitrógeno líquido o se fijaron en formalina.

35 Evaluación de congofilia en la orina sobre matrices de membrana de nitrocelulosa y el principio de la prueba del punto de rojo Congo (CRD)

- Se logró la evaluación de congofilia en la orina basándose en el protocolo por Halimi et al., que investigó esta propiedad en la orina de pacientes afectados por la enfermedad (priónica) de Creutzfeldt-Jakob. Este protocolo se optimizó para orina con PE en un formato de matriz de membrana siendo el resultado final la prueba CRD. Los detalles técnicos se 40 presentan a continuación. Brevemente, se mezclaron 100 µL de sobrenadante de orina con 2 µL de 5 mg/mL de disolución de CR. Después de 1 hora, se depositaron 5 µL de sobrenadante por duplicado sobre una membrana de nitrocelulosa y se dejó que se secaran al aire. La membrana se lavó sucesivamente en agua, seguido por concentraciones crecientes de metanol. Después del lavado, se retuvieron los agregados teñidos con CR en la membrana mientras que se retiró el CR libre (MW ~700 g/mol). Debido a que las muestras de orina de mujeres con 45 PE tienen amplias variaciones en la normalización de la concentración de proteína, se realizó la relación de proteína total/CR en esta parte inicial del estudio. El resultado de la prueba se expresó como % de retención de CR [(CRR), se midió el colorante retenido después del lavado con respecto a la cantidad de colorante añadida] y % de incorporación de CR [(CRI), se midió el colorante añadido a cada muestra y sirvió de control interno].

Evaluación de congofilia en la orina por espectrofotometría directa

- 50 La unión de CR a amiloides da como resultado un cambio del espectro de absorbancia del colorante en la luz visible (de naranja-rojizo a rosa-magenta), y este desplazamiento batocrómico se ha usado previamente para evaluar el nivel de oligomerización de β-amiloide (agregación) *in vitro* (22, 100). Todas las muestras de orina de PEG y P-CRL usadas en la fase de factibilidad se procesaron como para la prueba de CRD. Se diluyó 10 veces la mezcla de orina-CR y se examinó espectrofotométricamente para el desplazamiento espectral inducido por CR (véase más adelante). Se 55 obtuvo una concentración teórica de proteínas de tipo amiloide en cada muestra de orina de valores de absorbancia a 403, 504 y 541 nm usando la fórmula de Klunk. Se logró la normalización para absorbancia intrínseca y dispersión de la luz por resta de los valores obtenidos en muestras sin CR. La concentración determinada por el desplazamiento espectral de proteínas de tipo amiloide se correlacionó con el resultado de la prueba de CRR del sujeto.

Evaluación de la fluorescencia inducida por ThT en la orina

5 Se midió la fluorescencia de ThT después del protocolo descrito originalmente para el suero. Brevemente, se mezclaron muestras de orina centrifugadas (30 μ L) con ThT 80 μ M en solución salina tamponada con fosfato 100 mM (PBS) pH 7,4. Se obtuvieron mediciones de fluorescencia en un espectrofluorímetro (Clariostar, BMG Labtech, Cary NC) con longitudes de onda de excitación/emisión establecidas a 444/485 nm, respectivamente. Se logró la normalización para la fluorescencia intrínseca de la orina restando los valores en ausencia de ThT.

Prueba de la inmunorreactividad de estados oligoméricos

10 Los oligómeros de amiloide soluble son inductores citotóxicos y potentes de la muerte celular. Se han descrito varias variantes estructurales inmunológicamente distintas: oligómeros prefibrilares (PFO), oligómeros fibrilares (FO) y protofibrillas anulares (APF). Presencia de oligómeros de amiloide soluble en orina de cuatro grupos de mujeres (P-CRL, n=57; HTNcr, n=16; PEI, n=33, PEg, n=128) usando una técnica de transferencia puntual con los siguientes anticuerpos primarios: A11, OC y anti-APF que reconocen PFO, FO y APF, respectivamente (14-16). Se proporcionan detalles técnicos en Métodos suplementarios.

Precipitación asistida por CR

15 Se procesaron muestras de orina de 91 mujeres embarazadas en diferentes categorías clínicas (P-CRL, n=13; HTNcr, n=5; PEI, n=5; PEg, n=51; PEsp, n=9; condiciones proteinúricas sin PE, n=8) para precipitación asistida por CR como se describe en Métodos suplementarios. Se identificaron visiblemente los precipitados de CR en el fondo de la Microfuge en el 90 % de las muestras de PE, pero no en ninguna de los sujetos proteinúricos P-CRL, HTNcr o sin PE (precipitado negativo de CR).

20 Microscopía polarizada y microscopía electrónica de transmisión (TEM)

25 Se resuspendieron en agua precipitados de CR de orina con PEg (n=5), se secaron sobre un portaobjetos de microscopio y se visualizaron por microscopía óptica polarizada para la birrefringencia de CR verde característica como se describe más adelante. Alternativamente, se dispuso la suspensión sobre rejillas de níquel recubiertas con formvar/carbono de 200 de malla después de la tinción positiva o negativa con 2 % de acetato de uranilo. También se examinaron especímenes de tubos que intentaban preparar precipitados de CR de mujeres P-CRL (n=4).

Modelado de la identificación, validación y agregación de proteínas en material congófilo de orina

30 Se aislaron precipitados de CR de mujeres con PEg (n=4, EG: 28 \pm 2 semanas), se resuspendieron en tampón de Laemelli reductor (BioRad) y se hirvieron durante 10 min. Se cargaron muestras sobre 10 % de geles de SDS-PAGE que se tiñeron con azul de Coomassie. Se cortaron las bandas visibles y se procesaron para digestión trípica y espectrometría de masas en tándem (véase más adelante). Se estableció la identidad de las proteínas basándose en puntuaciones de MOWSE >53 (matrixscience.com). Se encontraron SERPINA1, albúmina, κ FLC, ceruloplasmina y proteína 6-16 inducible por interferón (G1P3), se representaron y se seleccionaron para la validación por transferencia Western en precipitados de CR aislados de 60 otros casos. Se determinó la tendencia a la agregación de G1P3 usando el algoritmo AGGRESKAN ejecutado en un servidor basado en web en <http://bioinf.uab.es/aggreskan/> (detalles a continuación).

Determinación de la inmunorreactividad de APP y ADAM-10 en orina, material congófilo de orina y/o suero materno

40 Se empleó transferencia Western en material congófilo representativo (n=38) y orina (n=16) de casos de PEg. Se usó orina de P-CRL (n=8) de casos de la misma EG para referencia. Se investigó la inmunorreactividad para la inmunorreactividad de APP soluble (APPs) y ADAM-10 en suero y orina por ELISA (protocolos descritos más adelante).

Investigación de α , β y γ -secretasas por PCR cuantitativa en tiempo real e inmunohistoquímica

45 Se realizó PCR en tiempo real en ARNm placentario y amniocoriónico usando la química TaqMan (Applied Biosystems) y se validó para cebador/sondas para APP y las siguientes enzimas que escinden APP: α -secretasas (ADAM 10, ADAM17), β -secretasas (BACE1, BACE2) y γ -secretasas [Presenilina-1 (PSEN1), Presenilina-2 (PSEN2)]. Se evaluó semicuantitativamente la intensidad de la tinción en vellosidades placentarias en una escala desde 0 (ausente) hasta +5 (intensa). Se usaron anticuerpos contra citoqueratina-7 y CD163 como marcadores celulares para trofoblastos y macrófagos, respectivamente. A continuación se proporcionan detalles técnicos.

Localización de placas de amiloide en placenta por inmunohistoquímica

50 La deposición aberrante de amiloide es una característica de Alzheimer, un trastorno de mal plegamiento de proteínas prototípicas. La evidencia patológica mostró que las fibrillas del péptido A β son un componente de amiloide básico. Se procesaron los portaobjetos incorporados en parafina para la detección de epítopes de A β que se sabía que estaban presentes en placas en cerebros de pacientes con Alzheimer. Se usaron dos monoclonales bien caracterizados (anti-ALZ90 y DE2B4). Se identificó el calcio conjuntamente depositado por tinción con alizarina S. A continuación se proporcionan detalles técnicos.

Detalles metodológicos sobre otras estimaciones bioquímicas, inmunológicas y moleculares

5 Se analizaron todas las muestras de orina para marcadores sustitutos de PE (usados o propuestos) tales como relación entre proteína y creatinina (relación P:C), relación entre la tirosina cinasa-1 de tipo fms soluble (sFlt-1) y el factor de crecimiento placentario (PIGF) (uFP) y puntuaciones de proteómica de la orina (UPSb y UPSr). A continuación se proporcionan detalles técnicos.

Análisis estadístico

10 Los datos se informaron o como la media con error estándar de la media (EEM) (para datos normalmente distribuidos) o como la mediana con intervalo intercuartílico (para datos no normalmente distribuidos). Se compararon los conjuntos de datos con la prueba de la t de Student, prueba de Mann-Whitney, ANOVA de Kruskal-Wallis unilateral, bilateral, o según convenga. Se realizó el análisis de correlación usando la correlación del orden de rangos de Pearson o Spearman. Se compararon proporciones con las pruebas exactas de Fisher o pruebas de la chi al cuadrado. Juntas, las muestras de orina de mujeres embarazadas reclutadas en las cohortes de factibilidad y transversal junto con la primera muestra de la cohorte longitudinal fueron representativas de una cohorte consecutiva de mujeres no sesgada con respecto al reclutamiento, así es adecuado para la característica de la curva de eficacia diagnóstica (ROC). Se midieron la exactitud de la prueba (casos correctamente clasificados/número total de casos), sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos, y relaciones de probabilidad (LR) en los gráficos de la característica de la curva de eficacia diagnóstica ROC usando el software estadístico MedCalc (Broekstraat, Bélgica). Se calcularon los intervalos de confianza (IC) usando el método de (re)muestreo con reposición. La comparación de las curvas ROC se realizó usando el método de De Long que usa un método no paramétrico para determinar la significación estadística de la diferencia entre las áreas bajo las curvas de ROC dependientes (derivadas de los mismos casos).

Definiciones clínicas

- Se estableció la edad gestacional (EG) usando criterios ultrasonográficos bien establecidos correlacionados con el día del último periodo menstrual, en todos los casos.
- 25 • La preeclampsia grave (PEg) se definió como tensión arterial sistólica de >160 mmHg o diastólica >110 mmHg en al menos 2 ocasiones separadas 6 horas, >5 gramos de eliminación de proteína / 24 h de obtención de una muestra de orina y/o proteinuria persistente +3 en la prueba de la tira reactiva. Se usaron restricción del crecimiento fetal intrauterino (RCFIU) < centil 10, síntomas neurológicos persistentes (cefalea, alteraciones visuales), dolor epigástrico, oliguria (inferior a 500 mL / 24 h), creatinina sérica >1,0 mg/dL o cualquier elemento del síndrome de HELLP: hemólisis, aumento de enzimas hepáticas (>2 veces la normalidad), bajo número de plaquetas (<100.000 células/ μ L) como parte de la definición para PEG por el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG).
- 30 • La PE leve (PEl) se definió como una tensión arterial diastólica de al menos 140/90 mmHg y eliminación de proteína urinaria de al menos 300 mg/24 horas de obtención de una muestra de orina (o al menos 1+ o más en la prueba en tira reactiva), cada uno en dos ocasiones separadas 4-6 horas en ausencia de signos o síntomas de acuerdo con un diagnóstico de o PEG o PEsp por ACOG.
- 35 • Se usó la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de PE diastólica \geq 90 mm Hg y proteinuria en tira reactiva 2+ o mayor) para análisis estadísticos seleccionados especificados.
- 40 • La hipertensión gestacional se definió como tensiones arteriales elevadas de acuerdo con PE en dos ocasiones separadas 4 horas a 1 semana, que se presenta de nuevo después de 20 semanas sin proteinuria o marcadores de PEG.
- La "PE atípica" se diagnosticó en el ámbito de:
 - 45 • Proteinuria ausente en hipertensión gestacional, más uno o más de los siguientes puntos: síntomas de preeclampsia (dolor epigástrico, cefalea intensa, oliguria, edema pulmonar), hemólisis, trombocitopenia (< 100.000/mm³), enzimas hepáticas elevadas (2 veces el valor del límite superior de la normalidad para aspartato aminotransferasa o alanina aminotransferasa).
 - Hipertensión gestacional ausente en proteinuria gestacional, más uno o más de los siguientes puntos: síntomas de preeclampsia, hemólisis, trombocitopenia, enzimas hepáticas elevadas.
- 50 • La preeclampsia superpuesta (PEsp) se definió como "proteinuria de nueva aparición" en una mujer con hipertensión crónica antes de 20 semanas de gestación, un aumento súbito en la proteinuria si ya estaba presente en la gestación previa, un aumento súbito en la hipertensión, o el desarrollo de síndrome de HELLP
- La hipertensión crónica (HTNcr) se definió como una elevación sostenida en la tensión arterial antes del embarazo o antes de 20 semanas de edad gestacional.

- La nefropatía crónica se diagnosticó después de la consulta a un nefrólogo si los pacientes tuvieron una enfermedad renal previa al embarazo o proteinuria persistente (>0,5 gramos/24 horas en al menos dos ocasiones) detectada antes de la EG de 20 semanas.
- La proteinuria en mujeres no embarazadas se determinó basándose en un corte de 150 mg/24 horas de obtención de una muestra de orina.
- Otros Tipo-1 (afecciones frecuentemente asociadas a PE, que no requirieron pruebas diagnósticas para PE). Los presentes inventores probaron además la congofilia en la orina en un grupo de pacientes embarazadas que basándose en la presentación clínica no necesitaron pruebas diagnósticas para PE (n=125). Sus diagnósticos clínicos en el reclutamiento fueron: rotura prematura pretérmino de membranas (PPROM, n=25), cuello uterino corto y/o periodo de dilatación pretérmino con membranas intactas (n=76), placenta previa (n=6), muerte fetal intrauterina (MFIU) de etiología desconocida en mujeres normotensoras no proteinúricas (n=5), desprendimiento en mujeres normotensoras no proteinúricas (n=2), trombofilia (n=3) y pielonefritis (n=8).
- Otros Tipo-2 (afecciones frecuentemente asociadas a alto riesgo de PE, que requirieron pruebas diagnósticas de laboratorio para confirmar o excluir la PE). Por relevancia clínica y para probar la robustez de la congofilia en la orina para discriminar entre pacientes con y sin PE, se incluyó en el análisis un grupo de pacientes clínicamente heterogéneo que requirió pruebas diagnósticas de laboratorio para el diagnóstico diferencial con PE (n=37). Este grupo consistió de casos que presentaron RCFIU (n=20), nefropatía preexistente (n=9), insuficiencia hepática y/o renal de etiología desconocida (n=4), síndrome antifosfolípidos (n=4).

Protocolo para la prueba del punto de rojo Congo (CRD) y cálculo de CRR en el ámbito de investigación

- Preparación de muestras: Se centrifugó la orina a 15.000 g durante 15 min a 4 °C. Se midió la proteína total/concentración usando el kit Pierce BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL) con albúmina como patrón. Todas las muestras de orina se normalizaron con agua destilada para medir 6,6-mg/mL de proteína total/concentración en el ensayo de BCA. Este valor se eligió basándose en experimentos preliminares que investigaron la linealidad del ensayo de BCA en función de CR y la proteína/concentración. Por relevancia práctica, las muestras que midieron >6,6-mg/mL en el ensayo de BCA se diluyeron con agua, mientras que las muestras que midieron <6,6-mg/mL se concentraron a sequedad en un SpeedVac (Thermo Scientific) y se resuspendieron con agua hasta la concentración anterior.
- Preparación de la matriz de membrana de nitrocelulosa para CRD: Se mezclaron 100 µL de orina normalizada con 2 µL de disolución acuosa de reserva de rojo Congo (5 mg/mL, Cat. de Sigma N° C6277, St Louis MO). Se preparó un blanco de muestra (BLC) añadiendo 2 µL de disolución madre de CR a 100 µL de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de 1 hora de mezcla con vórtex a temperatura ambiente, se depositaron 5 µL de mezcla por duplicado sobre una membrana de nitrocelulosa no soportada (0,22 µm, BioRad, LaJolla CA) y se dejó secar al aire (~15 min). Entonces se aclaró la membrana con agua durante 3 min y luego se fotografió usando una cámara digital (CoolPix 4500, Nikon, Tokyo, Japón) para adquirir la primera imagen (FOTO1: antes del lavado). A continuación, la membrana se lavó con concentraciones crecientes de metanol [50 % de metanol: 3 min, 70 % de metanol: 1 min, 90 % de metanol hasta que el rojo en las muestras de BLC desaparece completamente (~10 min). Durante este tiempo, el color rojo de las muestras no de PE desapareció a medida que se lavó el colorante CR libre. Si la orina contenía proteínas mal plegadas, se retuvo el CR por las proteínas mal plegadas inmovilizadas y los puntos siguieron siendo visiblemente rojos. Se tomó una segunda imagen a partir de aquí (FOTO2: después del lavado).
- Procesamiento de imágenes: Se procesaron FOTO1 y FOTO2 en Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA). Específicamente, cada imagen se convirtió manualmente en escala de grises, se recortó, se dividió en carriles y se ajustó de manera que los mismos puntos en FOTO1 se alinearan horizontalmente con aquellos en FOTO2. Se determinó la densidad óptica (DO) de cada punto usando el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Se restó manualmente el nivel basal y se extrajo el área bajo la curva del perfil. Los resultados de DO se exportaron a Excel y se calculó la relación FOTO2/FOTO1 x100 para cada punto y se promedió entre puntos duplicados por paciente. Este resultado de prueba (retención de CR: CRR) se usó en todo el presente estudio como medida cuantitativa de la congofilia en la orina y se analizó frente a variables clínicas relevantes para el diagnóstico y el pronóstico de PE. Se calculó una segunda variable, la incorporación de CR (CRI) solo a partir de FOTO1 como la relación de DO promedio de la muestra / DO promedio de BLC x100 y sirvió de control interno.

Evaluación de congofilia en la orina por espectrofotometría directa

Se realizó análisis espectrofotométrico para el desplazamiento espectral inducido por CR en disolución como se describe previamente para la unión de Aβ. Se normalizaron muestras de orina y se mezclaron con CR como se describe para la prueba CRD. Se aplicaron por duplicado 200 µL de mezclas de CR-orina diluidas 10 veces en placas de 96 pocillos junto con la misma dilución de orina sin CR. Las muestras de blanco fueron PBS con y sin CR. Se leyeron las placas en un lector de placas Spectramax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) equipado con el software SOFTmax Pro 4.0. Primero se tomaron mediciones en el modo de barrido de longitudes de onda (300-700 nm) seguido

de criterios de lectura 403 nm (punto isobéptico), 504 nm (punto de máxima absorción libre de CR) y 541 nm (punto de máxima diferencia entre CR libre y unido a amiloide). La corrección para la dispersión inherente de la luz se logró por resta de las lecturas de DO de la misma muestra de orina sin CR. Se obtuvo una concentración teórica de proteínas de tipo amiloide en cada muestra de orina a partir de los valores de absorbancia usando la fórmula de Klunk y el resultado se correlacionó con el resultado de la prueba de CRD del sujeto.

Otras estimaciones bioquímicas, inmunológicas y moleculares

Se midió la concentración de proteína en orina/concentración con el reactivo de ácido bicinónico/sulfato cúprico (kit BCA, Pierce, Rockford, IL) contra patrones de albúmina. Se usó un factor de dilución de 12 veces para la mayoría de las muestras de orina. Se hicieron mediciones repetidas en muestras sin diluir o diluidas 50 veces en muestras que se midieron por debajo o por encima de la curva patrón, respectivamente.

Se midió colorimétricamente la creatinina en orina (Stanbio Laboratory, Boerne, TX) contra curvas patrón obtenidas a partir de concentraciones conocidas.

Se midieron la tirosina cinasa de tipo fins soluble no unida a orina (sFlt-1) y el factor de crecimiento placentario (P1GF) por ELISA según las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN), como se describe previamente (24). Se ensayaron las muestras de orina por duplicado en una placa de 96 pocillos previamente recubierta con un anticuerpo de captura dirigido contra sFlt-1 libre y P1GF. Se realizaron los protocolos de incubación y de lavado seguido por la lectura a 450 nm. Las concentraciones detectables mínimas en los ensayos para sFlt-1 y P1GF fueron 5 y 7 pg/mL, respectivamente. Se informaron los datos y se representaron usando el software Softmax Pro 3.1.1 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los coeficientes de variación inter-ensayo e intra-ensayo variaron desde 3 hasta 10 %. Se normalizaron los niveles urinarios de sFlt-1 P1GF y proteínas a las concentraciones de creatinina urinaria. Como se informó previamente, se calculó uFP ($\log [sFlt/P1GF \times 100]$) como un mejor indicador de PE que cualquier analito solo.

Se obtuvieron puntuaciones de proteómica de la orina (UPS) a partir de los trazados de tiempo de vuelo por desorción-ionización láser potenciada en la superficie (SELDI-TOF) como se publicó previamente. Los presentes inventores ensayaron individualmente cada muestra de orina usando los chips H4 y H50 de superficies hidrófobas de fase inversa (BioRad, La Jolla, CA). Trece picos de biomarcadores (P1-P13) en la región de masa de 2,3-17,5 kDa componen el perfil de proteómica de la orina característico para PE. Para cada pico designado como biomarcador, se calcularon la masa experimental (indicador de identidad) y su relación entre la señal y el ruido (indicador de abundancia relativa). Se calcularon dos puntuaciones de proteómica de orina objetivo: UPSb (puntuación booleana) que representa la suma de indicadores booleanos (1: presente; 0: ausente) asignados a cada biomarcador y UPSr (puntuación de rangos) con información semicuantitativa combinada de presentes biomarcadores calculados como $UPSr = \sum(x(S/N)/10+1)$, donde "x" incluye los biomarcadores con indicadores booleanos de 1.

Prueba de inmunoreactividad del estado oligomérico

Se han desarrollado anticuerpos primarios empleados para la inmunodetección de oligómeros solubles y se caracterizaron en publicaciones previas por miembros del equipo de los presentes inventores. Se usaron los siguientes anticuerpos policlonales primarios: A11, OC y anti-APF que reconocen epítopes de estructura cuaternaria específica formados por proteínas amiloidogénicas.

- A11 reconoce oligómeros prefibrilares (PFO)
- OC detecta fibrillas maduras
- Anti-APF reacciona con protofibrillas anulares (APFa).

Se usó una técnica de transferencia puntual para optimizar para minimizar la unión no específica del anticuerpo secundario al componente de FLC de los agregados. Se aplicaron muestras de orina duplicadas normalizadas para contener 40 µg de proteína/punto a membranas de nitrocelulosa, se permitió que se secaran a temperatura ambiente, luego se bloquearon con 10 % de leche no grasa en solución salina tamponada con Tris (TBS) a temperatura ambiente durante 2 h. Se diluyeron los anticuerpos primarios en 5 % de leche a cualquiera de dilución 1:1.000 (A11) o 1:5.000 (OC y αAPF). Después de la incubación durante la noche a 4 °C, las membranas se lavaron 4 veces con TBS-T y luego se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con IgG (H+L) anti-conejo de cabra biotinilado (Fab'2) (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) diluido 1:5.000 en 5 % de leche/TBS-T. Se lavaron otra vez las membranas y luego se incubaron con estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) en TBS-T sin leche (1:8.000, GE Healthcare, Kings Park, NY). Finalmente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T y se revelaron con quimioluminiscencia ECL (GE Healthcare).

Protocolo para la precipitación asistida por CR

Dadas sus propiedades de autoensamblado y la afinidad por las asociaciones de polipéptidos metaestables, se conoce que el CR induce el crecimiento de oligómeros amiloides y la nucleación en disoluciones acuosas. A medida que crecen los agregados unidos a CR, precipitan en disolución y se pueden aislar por centrifugación. Basándose en estos

principios, los presentes inventores desarrollaron el protocolo para la precipitación de muestras de orina asistida por CR para caracterizar adicionalmente la congofilia y el plegoma erróneo de PE. Se centrifugaron primero 10 mL de volúmenes de orina a 15.000 g durante 15 min y 4 °C. El sobrenadante se mezcló con 200 µL de disolución madre de CR, se agitó con vórtex durante 1 hora como para la prueba CRD y se centrifugó otra vez después para sedimentar proteína agregada congófila. El sedimento se resuspendió en agua y se recogió 3 veces mediante centrifugación para retirar todo el CR no unido. Se resuspendió el precipitado de CR final en 50 µL de agua y o se obtuvieron imágenes inmediatamente o se guardó congelado a -80 °C para los análisis posteriores. Si el sedimento no fue visible, se consideró que el espécimen era negativo para el precipitado de CR, pero la Microfuge se procesó idénticamente a como para las muestras positivas para el precipitado de CR.

10 Microscopía polarizada, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y crio-TEM

Se resuspendieron precipitados de CR en agua, se secaron sobre un portaobjetos de microscopio y se obtuvieron imágenes bajo luz polarizada usando un microscopio Olympus U-STP equipado con una cámara digital Olympus OLY-200 (Olympus, Melville, NY). Alternativamente, se dispuso la suspensión sobre rejillas de níquel recubiertas con formvar/carbono de 200 de malla después de la tinción positiva o negativa con 2 % de acetato de uranilo. También se examinaron especímenes de tubos que intentaron preparar precipitados de CR en mujeres P-CRL. Para crio-TEM, se fijaron precipitados de CR en 4 % de paraformaldehído/0,1 % de glutaraldehído en HEPES 10 mM (pH 7,4) con 0,9 % de cloruro sódico durante 30 min, luego se aclararon, se centrifugaron y se resuspendieron en 10 % de gelatina. Entonces se procesaron las muestras como para ultracriotomía como se describe previamente. Se marcaron individualmente crio secciones ultrafinas con o anti-SERPINA1 de conejo (1:500, LabVision, Fremont, CA) o albúmina anti-humana de cabra (1:500, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) puenteado usando anticuerpo anti-cabra de conejo (1:200, Jackson ImmunoResearch) y proteína A acoplada a oro de 10 nm (Cell Microscopy Center, Utrecht, Países Bajos). Rejillas marcadas dobles usaron la anti-albúmina de cabra primaria 1: 500 y proteína A-oro de 5 nm, seguido por anti-SERPINA1 de conejo y proteína A-oro de 10 nm. Todas las muestras se visualizaron en un microscopio electrónico Tecnai 12 BioTWIN (FEI/Phillips, Hillsboro, Oregon) equipado con una cámara digital Morada y software de obtención de imágenes Olympus. FEI Tecnai Biotwin TEM a 80Kv. Se tomaron imágenes usando la CCD Morada y el software iTEM (Olympus).

Técnicas para la identificación y la validación de proteínas por transferencia Western

Se resuspendieron precipitados de CR en tampón reductor de Laemmli (BioRad) y se hirvieron durante 10 min. Se cargaron las muestras sobre geles al 10 % de SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie. Se cortaron las bandas visibles y se procesaron para digestión triptica en el Ettan TA Digester (GE Healthcare). Se adquirieron espectros automáticos de MALDI-MS/MS en el analizador de proteómica 4800 TOF/TOF (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se cargaron las secuencias de péptidos resultantes en la base de datos de expresión de proteínas de la Universidad de Yale accesible por web (YPED <http://medicine.yale.edu/keck/proteomics/yped/index.aspx>). Se consideraron indicativas de extensa homología las puntuaciones de probabilidad de Mowse >53. Se encontraron representadas las siguientes proteínas: SERPINA1, albúmina, ceruloplasmina, IgG κFLC y proteína 6-16 inducible por interferón (IF16-16 también conocida como G1P3). Se validaron estas identidades por transferencia Western en precipitados aislados de la orina de otros 60 casos. Se redujeron los precipitados con tampón de Laemmli y se sometieron a electroforesis en geles al 4-20 % de SDS-PAGE que se transfirieron a membranas de PVDF. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-SERPINA1 de conejo (1:1.000, LabVision), anti-albúmina de cabra (1:1.000, Bethyl Laboratories), anti-ceruloplasmina de ratón (clon 3B11, 1:1.000 Thermo Scientific, Rockford, IL), anti-κFLC de ratón (clon MEN09, 1:1.000 Novus Biologicals, Littleton, CO), anti-G1P3 de conejo (1:300, Proteintech, Chicago, IL). Las sondas se detectaron con anticuerpos secundarios biotinilados apropiados (1:5.000, Jackson ImmunoResearch), seguido por estreptavidina-HRP (1:8.000, GE Healthcare) y quimioluminiscencia de ECL (GE Healthcare).

Análisis para la tendencia de agregación de G1P3

Se analizaron las secuencias usando AGGRESCAN, un algoritmo basado en web para el cálculo y la visualización de la tendencia a la agregación. Se ha mostrado que este algoritmo anticipa en la agregación de segmentos de proteína implicados en varios trastornos conformacionales. También se ha mostrado que diferencian diversas clases de proteínas por sus propiedades de agregación y solubilidad. Se predijo que las proteínas nativamente no plegadas tenían la tendencia a la agregación más baja. En la salida de AGGRESCAN, los estiramientos de secuencia con la mayor tendencia a la agregación predicha aparecen como picos en los gráficos de perfil. Una secuencia de polipéptidos se considera un "punto caliente" si existen 5 o más restos secuencialmente continuos con un valor de tendencia a la agregación promedio (a4v) por aminoácido mayor que el umbral de puntos calientes (HST). Los parámetros de AGGRESCAN se enumeran en la Tabla 4.

Transferencia Western para epítopes de APP y Aβ

Se redujeron muestras de orina o de precipitado de CR con tampón de Laemmli y se sometieron a electroforesis sobre geles al 4-20 % de SDS-PAGE, que se transfirieron a membranas de PVDF. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: monoclonal anti-APP de ratón (1:1.000, MAB348, clon 22C11; contra los aminoácidos del epítipo del extremo N 66-81 de APP, Millipore); monoclonal anti-APP de ratón (1:259MAB5354, producido contra el dominio KPI de APP, Millipore), monoclonal anti-Alz90 de ratón (1:250, MAB349, producido contra un péptido sintético

correspondiente a los aminoácidos 511-608 de APP, Millipore, Billerica, MA) y monoclonal DE2B4 de ratón (1:1.000 producido contra los restos 1-17 de A β humano, Novus, Littleton, CO). Se expuso una sonda diferente para cada anticuerpo (no se eliminaron las sondas y se volvieron a sondar). Se usó albúmina humana (purificada de plasma) o recombinante expresada en arroz (Sigma) para descartar la posible reactividad cruzada no específica de anticuerpos anti-APP. Se usó lisado de tejido cerebral de Alzheimer (Novus, Littleton, CO) como control positivo. Se detectaron sondas con anticuerpo secundario anti-ratón de cabra biotilado (1:5.000, Jackson Immunoresearch) seguido por estreptavidina-HRP (1:8.000, GE Healthcare) y quimioluminiscencia de ECL (GE Healthcare).

Inmunoensayos para APP soluble (APPs) total y ADAM10

Se midió la APPs en orina y se emparejaron muestras de suero por ELISA (APPs: IBL International, Hamburgo, Alemania). Se dispusieron muestras apropiadamente diluidas (orina 2 veces, suero 50 veces) en placas de 96 pocillos previamente recubiertas con un anticuerpo de captura dirigido contra un epítoto común a tanto un APPas (producto de escisión de α -secretasa) como a APP β s (producto de escisión de β -secretasa). Para el ELISA de ADAM10 (CosmoBio USA, Carlsbad, CA), se diluyó 3 veces suero materno. Se realizaron protocolos de incubación y de lavado como se enseñó por los fabricantes, seguido por lectura a 450 nm con corrección de longitud de onda. Se informaron los datos y se representaron usando el software Softmax Pro 3.1.1 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

RT-PCR cuantitativa en tiempo real

Se extrajo ARN y se retrotranscribió en ADNc con cebadores de hexámero aleatorios usando procedimientos convencionales. Se realizó RT-PCR usando química de TaqMan (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) en 20 μ L de reacciones compuestas de 10 μ L de mastermix (TaqMan® Fast Universal PCR 2x Master Mix), 8 μ L de agua, 1 μ L de molde de ADNc normalizado a y 1 μ L de conjunto de sondas de PCR (ensayos de expresión génica TaqMan® por encargo). Las sondas (Applied Biosystems) usadas para el análisis fueron del siguiente modo: proteína precursora de amiloide/proteasa nexina-II (APP, Hs01552282_m1), A-desintegrina y metaloproteasa-10 (ADAM10, Hs00153853_m1), ADAM17 (Hs01041915_m1), BACE-1 (Hs00201573_m1), BACE-2 (Hs00273238_m1), presenilina-1 (PSEN1, Hs00240518_m1) y presenilina-2 (PSEN2, Hs00240982_m1). Se usaron beta-2 microglobulina (B2M; Hs99999907 m1) y proteína L30 ribosómica (RPL30, Hs00265497 m1) como controles endógenos. La combinación de estos dos ARNm de control endógeno (B2M y RPL30) se validó en experimentos preliminares usando conjuntos de ADNc de tejidos de PE o de CRL (placenta o amniocorió) amplificados en la placa de control endógena humana TaqMan® (Applied Biosystems). La selección de los dos genes de referencia se basó en bajos valores del ciclo umbral (Ct) que no fueron diferentes entre los seis conjuntos de ADNc. Para cada diana, se realizaron por duplicado reacciones de amplificación en un ciclo de 2 etapas (desnaturalización, 95 °C durante 15 segundos, hibridación/extensión a 62 °C durante 60 segundos) durante 40 ciclos. Los cálculos después del procesamiento se realizaron usando el software StepOne (v2.1). Los valores obtenidos se normalizaron a la media geométrica de los ARN de control endógeno usando cálculos de Δ Ct (deltaCt: Ct de la diana - media de Ct de controles endógenos). Un Δ Ct de 0 indica una relación de 1 entre los genes diana y de mantenimiento y se puede usar como indicación de abundancia relativa entre diferentes dianas y entre diferentes tejidos. El cálculo de $\Delta\Delta$ Ct (Δ Ct de muestra individual - Δ Ct de la misma diana en la muestra de referencia) añade una vista adicional dentro de la normalización diana y es una mejor estimación de abundancia relativa de ARNm entre diferentes grupos biológicos. Para los cálculos de $\Delta\Delta$ Ct, los presentes inventores usaron un conjunto de ARN de todas las muestras.

Inmunohistoquímica

Se desparafinaron en xileno secciones de parafina de 5 μ m de tejido veloso placentario y se rehidrataron con etanol graduado para solución salina tamponada con fosfato sódico, pH 7,2. Tras la recuperación del antígeno con tampón citrato, las secciones se pretrataron con 1 % de peróxido de hidrógeno durante 15 min, seguido de bloqueo, incubación durante la noche (a 4 °C) con los siguientes anticuerpos primarios: monoclonal anti-Alz90 de ratón (1:250), monoclonal DE2B4 de ratón (1:1.000), anti-ADAM10 de cabra (1:200, R&D Systems, Minneapolis, MN), anti-ADAM17 de cabra (1:50 R&D Systems), monoclonal anti-BACE1 de ratón (1:150, MO2, clon 2C13, Abnova, Taipei, Taiwán), anti-BACE2 de conejo (1:200, Novus, Littleton, CO) y monoclonal anti-PSEN1 de conejo (1:100, Abcam, Cambridge, MA) y monoclonal anti-PSEN2 de conejo (1:100, Abcam). Se identificaron células epiteliales trofoblastoicas y macrófagos placentarios en secciones seleccionadas como se describió previamente usando anticuerpos monoclonal anti-citoqueratina-7 de ratón (1:100, Zymed/Invitrogen, Carlsbad, CA) o monoclonal anti-CD163 de ratón Neomarkers, Fremont CA), respectivamente (110, 111). Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotilado apropiado (1:600, Jackson Immunochemicals), la detección se realizó usando tinción con avidina-biotina (Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA) con Vector NovaRed (Vector Laboratories) como cromógeno y hematoxilina como contratinción. Se deshidrataron las secciones de tejido en etanoles graduados, se aclararon y se montaron. Se incubaron portaobjetos de control negativo con IgG de isotipo de conejo o ratón según conviniera.

Referencias

1. K. S. Khan, D. Wojdyla, L. Say, A. M. Gulmezoglu, P. F. Van Look, WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. Lancet 367, 1066 (Apr 1, 2006).

2. A. H. Shennan, C. Redman, C. Cooper, F. Milne, Are most maternal deaths from pre-eclampsia avoidable? *Lancet* 379, 1686 (May 5, 2012).
3. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists. (2002).
- 5 4. B. M. Sibai, C. L. Stella, Diagnosis and management of atypical preeclampsia-eclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology* 200, 481 e1 (May, 2009).
5. B. Sibai, G. Dekker, M. Kupferminc, Pre-eclampsia. *Lancet* 365, 785 (Feb 26-Mar 4, 2005).
6. A. A. Shamshirsaz, M. Paidas, G. Krikun, Preeclampsia, hypoxia, thrombosis, and inflammation. *Journal of pregnancy* 2012, 374047 (2012).
- 10 7. B. M. Sibai, Biomarker for hypertension-preeclampsia: are we close yet? *American journal of obstetrics and gynecology* 197, 1 (Jul, 2007).
8. W. Ramma et al., The elevation in circulating anti-angiogenic factors is independent of markers of neutrophil activation in preeclampsia. *Angiogenesis* 15, 333 (Sep, 2012).
9. R. Boij et al., Biomarkers of coagulation, inflammation, and angiogenesis are independently associated with preeclampsia. *American journal of reproductive immunology* 68, 258 (Sep, 2012).
- 15 10. U. D. Anderson, M. G. Olsson, K. H. Kristensen, B. Akerstrom, S. R. Hansson, Review: Biochemical markers to predict preeclampsia. *Placenta* 33 Suppl, S42 (Feb, 2012).
11. I. A. Buhimschi et al., Proteomic profiling of urine identifies specific fragments of SERPINA1 and albumin as biomarkers of preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology* 199, 551 e1 (Nov, 2008).
- 20 12. J. A. Huntington, Serpin structure, function and dysfunction. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 9 Suppl 1, 26 (Jul, 2011).
13. P. Frid, S. V. Anisimov, N. Popovic, Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain research reviews* 53, 135 (Jan, 2007).
14. R. Kaye et al., Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. *The Journal of biological chemistry* 284, 4230 (Feb 13, 2009).
- 25 15. R. Kaye et al., Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300, 486 (Apr 18, 2003).
16. R. Kaye et al., Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Molecular neurodegeneration* 2, 18 (2007).
- 30 17. C. G. Glabe, Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiology of aging* 27, 570 (Apr, 2006).
18. M. A. Smith, P. L. Richey, R. N. Kalaria, G. Perry, Elastase is associated with the neurofibrillary pathology of Alzheimer disease: a putative link between proteolytic imbalance and oxidative stress. *Restorative neurology and neuroscience* 9, 213 (Jan 1, 1996).
- 35 19. M. A. Salameh et al., The amyloid precursor protein/protease nexin 2 Kunitz inhibitor domain is a highly specific substrate of mesotrypsin. *The Journal of biological chemistry* 285, 1939 (Jan 15, 2010).
20. M. Halimi et al., Prion urine comprises a glycosaminoglycan-light chain IgG complex that can be stained by Congo red. *Journal of virological methods* 133, 205 (May, 2006).
- 40 21. R. P. Linke, Highly sensitive diagnosis of amyloid and various amyloid syndromes using Congo red fluorescence. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 436, 439 (May, 2000).
22. W. E. Klunk, R. F. Jacob, R. P. Mason, Quantifying amyloid beta-peptide (A β) aggregation using the Congo red-A β (CR-A β) spectrophotometric assay. *Analytical biochemistry* 266, 66 (Jan 1, 1999).
23. R. J. Guidotti, D. (2005).
- 45 24. C. S. Buhimschi et al., Urinary angiogenic factors cluster hypertensive disorders and identify women with severe preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology* 192, 734 (Mar, 2005).

25. Y. Yoshiike, R. Kaye, S. C. Milton, A. Takashima, C. G. Glabe, Pore-forming proteins share structural and functional homology with amyloid oligomers. *Neuromolecular medicine* 9, 270 (2007).
26. Y. Yoshiike et al., Amyloid oligomer conformation in a group of natively folded proteins. *PloS one* 3, e3235 (2008).
- 5 27. E. Cerf et al., Antiparallel beta-sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid beta-peptide. *The Biochemical journal* 421, 415 (Aug 1, 2009).
28. A. Laganowsky et al., Atomic view of a toxic amyloid small oligomer. *Science* 335, 1228 (Mar 9, 2012).
29. T. Shirahama, A. S. Cohen, High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril. *The Journal of cell biology* 33, 679 (Jun, 1967).
- 10 30. J. D. Sipe, A. S. Cohen, Review: history of the amyloid fibril. *Journal of structural biology* 130, 88 (Jun, 2000).
31. H. Z. Malina, System in biology leading to cell pathology: stable protein-protein interactions after covalent modifications by small molecules or in transgenic cells. *Journal of biomedical science* 18, 7 (2011).
32. N. E. Hellman, S. Kono, H. Miyajima, J. D. Gitlin, Biochemical analysis of a missense mutation in aceruloplasminemia. *The Journal of biological chemistry* 277, 1375 (Jan 11, 2002).
- 15 33. P. G. Winyard et al., Effects of oxidative stress on some physicochemical properties of caeruloplasmin. *The Biochemical journal* 258, 435 (Mar 1, 1989).
34. S. Kumar et al., Serum immunoglobulin free light-chain measurement in primary amyloidosis: prognostic value and correlations with clinical features. *Blood* 116, 5126 (Dec 9, 2010).
- 20 35. J. M. Kelly et al., Characterization of a human gene inducible by alpha- and beta-interferons and its expression in mouse cells. *The EMBO journal* 5, 1601 (Jul, 1986).
36. M. G. Turri, K. A. Cuin, A. C. Porter, Characterisation of a novel minisatellite that provides multiple splice donor sites in an interferon-induced transcript. *Nucleic acids research* 23, 1854 (Jun 11, 1995).
37. F. Chiti, C. M. Dobson, Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual review of biochemistry* 75, 333 (2006).
- 25 38. O. Conchillo-Sole et al., AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. *BMC bioinformatics* 8, 65 (2007).
39. M. F. Knauer, B. Soreghan, D. Burdick, J. Kosmoski, C. G. Glabe, Intracellular accumulation and resistance to degradation of the Alzheimer amyloid A4/beta protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 7437 (Aug 15, 1992).
- 30 40. D. Goldgaber, M. I. Lerman, O. W. McBride, U. Saffiotti, D. C. Gajdusek, Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235, 877 (Feb 20, 1987).
41. J. Kang, B. Muller-Hill, Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochemical and biophysical research communications* 166, 1192 (Feb 14, 1990).
- 35 42. B. De Strooper, R. Vassar, T. Golde, The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nature reviews. Neurology* 6, 99 (Feb, 2010).
43. I. Caille et al., Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development* 131, 2173 (May, 2004).
- 40 44. A. Schmitz, R. Tikkanen, G. Kirfel, V. Herzog, The biological role of the Alzheimer amyloid precursor protein in epithelial cells. *Histochemistry and cell biology* 117, 171 (Feb, 2002).
- 45 45. J. Hoffmann, C. Twisselmann, M. P. Kummer, P. Romagnoli, V. Herzog, A possible role for the Alzheimer amyloid precursor protein in the regulation of epidermal basal cell proliferation. *European journal of cell biology* 79, 905 (Dec, 2000).
46. C. Haass, D. J. Selkoe, Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 75, 1039 (Dec 17, 1993).
47. H. J. Clarris, B. Key, K. Beyreuther, C. L. Masters, D. H. Small, Expression of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease in the developing rat olfactory system. *Brain research. Developmental brain research* 88, 87 (Aug 28, 1995).

48. V. Muresan, N. H. Varvel, B. T. Lamb, Z. Muresan, The cleavage products of amyloid-beta precursor protein are sorted to distinct carrier vesicles that are independently transported within neurites. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 3565 (Mar 18, 2009).
- 5 49. T. Oltersdorf et al., The secreted form of the Alzheimer's amyloid precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin-II. *Nature* 341 144 (Sep 14 1989).
50. L. Ho, K. Fukuchi, S. G. Younkin, The alternatively spliced Kunitz protease inhibitor domain alters amyloid beta protein precursor processing and amyloid beta protein production in cultured cells. *The Journal of biological chemistry* 271, 30929 (Nov 29, 1996).
- 10 51. M. Barrachina et al., Amyloid-beta deposition in the cerebral cortex in Dementia with Lewy bodies is accompanied by a relative increase in AbetaPP mRNA isoforms containing the Kunitz protease inhibitor. *Neurochemistry international* 46, 253 (Feb, 2005).
52. Rare Disease Act of 2002 (accessed January 10th, 2013 at <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/PLAW-107publ280/html/PLAW-107publ280.htm>).
53. E. F. Funai et al., Long-term mortality after preeclampsia. *Epidemiology* 16, 206 (Mar, 2005).
- 15 54. F. H. Harlow, M. A. Brown, The diversity of diagnoses of preeclampsia. *Hypertension in pregnancy : official journal of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy* 20, 57 (2001).
55. P. Zhang, M. Schmidt, L. Cook, Maternal vasculopathy and histologic diagnosis of preeclampsia: poor correlation of histologic changes and clinical manifestation. *American journal of obstetrics and gynecology* 194, 1050 (Apr, 2006).
- 20 56. R. J. Perrin, A. M. Fagan, D. M. Holtzman, Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *Nature* 461, 916 (Oct 15, 2009).
57. J. C. Morris et al., Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in "normal" aging: Evidence for presymptomatic and very mild Alzheimer's disease. *Neurology* 46, 707 (Mar, 1996).
- 25 58. P. V. Arriagada, K. Marzloff, B. T. Hyman, Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology* 42, 1681 (Sep, 1992).
59. P. T. Nelson et al., Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 71, 362 (May, 2012).
60. A. Serrano-Pozo et al., Stable size distribution of amyloid plaques over the course of Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 71, 694 (Aug, 2012).
- 30 61. E. A. Oliver et al., Activation of the receptor for advanced glycation end products system in women with severe preeclampsia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96, 689 (Mar, 2011).
62. X. Zhang, W. Le, Pathological role of hypoxia in Alzheimer's disease. *Experimental neurology* 223, 299 (Jun, 2010).
- 35 63. C. Ruiz de Almodovar, D. Lambrechts, M. Mazzone, P. Carmeliet, Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiological reviews* 89, 607 (Apr, 2009).
64. G. Eskici, P. H. Axelsen, Copper and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 51, 6289 (Aug 14, 2012).
65. P. Grammas, Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation* 8, 26 (2011).
- 40 66. E. Eiland, C. Nzerue, M. Faulkner, Preeclampsia 2012. *Journal of pregnancy* 2012, 586578 (2012).
67. R. Deane et al., RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nature medicine* 9, 907 (Jul, 2003).
68. L. F. Lue, S. D. Yan, D. M. Stern, D. G. Walker, Preventing activation of receptor for advanced glycation endproducts in Alzheimer's disease. *Current drug targets. CNS and neurological disorders* 4, 249 (Jun, 2005).
- 45 69. A. J. Howie, D. B. Brewer, Optical properties of amyloid stained by Congo red: history and mechanisms. *Micron* 40, 285 (Apr, 2009).
70. C. Wu, Z. Wang, H. Lei, W. Zhang, Y. Duan, Dual binding modes of Congo red to amyloid protofibril surface observed in molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society* 129, 1225 (Feb 7, 2007).

71. UNICEF-WHO, Antenatal Care in Developing Countries: Promises, Achievements and Missed Opportunities. World Health Organization, Geneva, Switzerland, (2003).
72. N. Murray et al., The clinical utility of routine urinalysis in pregnancy: a prospective study. *The Medical journal of Australia* 177, 477 (Nov 4, 2002).
- 5 73. S. Thangaratinam et al., Estimation of proteinuria as a predictor of complications of pre-eclampsia: a systematic review. *BMC medicine* 7, 10 (2009).
74. I. H. Hinberg, L. Katz, L. Waddell, Sensitivity of in vitro diagnostic dipstick tests to urinary protein. *Clinical biochemistry* 11, 62 (Apr, 1978).
- 10 75. V. Maisnar et al., The problems of proteinuria measurement in urine with presence of Bence Jones protein. *Clinical biochemistry* 44, 403 (Apr, 2011).
76. N. Parker, A. C. Porter, Identification of a novel gene family that includes the interferon-inducible human genes 6-16 and ISG12. *BMC genomics* 5, 8 (Jan 19, 2004).
77. M. Rosenzweig, H. Landau, Light chain (AL) amyloidosis: update on diagnosis and management. *Journal of hematology & oncology* 4, 47 (2011).
- 15 78. M. R. Hayden, S. C. Tyagi, M. M. Kerklo, M. R. Nicolls, Type 2 diabetes mellitus as a conformational disease. *JOP : Journal of the pancreas* 6, 287 (Jul, 2005).
79. J. H. Kang, K. S. Kim, S. Y. Choi, H. Y. Kwon, M. H. Won, Oxidative modification of human ceruloplasmin by peroxy radicals. *Biochimica et biophysica acta* 1568, 30 (Nov 7, 2001).
- 20 80. S. W. Griffiths, C. L. Cooney, Relationship between protein structure and methionine oxidation in recombinant human alpha 1-antitrypsin. *Biochemistry* 41, 6245 (May 21, 2002).
81. G. Joslin, R. J. Fallon, J. Bullock, S. P. Adams, D. H. Perlmutter, The SEC receptor recognizes a pentapeptide neodomain of alpha 1-antitrypsin-protease complexes. *The Journal of biological chemistry* 266, 11282 (Jun 15, 1991).
- 25 82. G. Joslin et al., Amyloid-beta peptide, substance P, and bombesin bind to the serpin-enzyme complex receptor. *The Journal of biological chemistry* 266, 21897 (Nov 15, 1991).
83. L. O. Tjernberg et al., Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *The Journal of biological chemistry* 271, 8545 (Apr 12, 1996).
84. R. T. Turner, 3rd et al., Subsite specificity of memapsin 2 (beta-secretase): implications for inhibitor design. *Biochemistry* 40, 10001 (Aug 28, 2001).
- 30 85. M. T. Gersbacher, D. Y. Kim, R. Bhattacharyya, D. M. Kovacs, Identification of BACE1 cleavage sites in human voltage-gated sodium channel beta 2 subunit. *Molecular neurodegeneration* 5, 61 (2010).
86. B. Bohrmann et al., Endogenous proteins controlling amyloid beta-peptide polymerization. Possible implications for beta-amyloid formation in the central nervous system and in peripheral tissues. *The Journal of biological chemistry* 274, 15990 (Jun 4, 1999).
- 35 87. P. A. Gollin, R. N. Kalaria, P. Eikelenboom, A. Rozemuller, G. Perry, Alpha 1-antitrypsin and alpha 1-antichymotrypsin are in the lesions of Alzheimer's disease. *Neuroreport* 3, 201 (Feb, 1992).
88. G. J. Howlett, K. J. Moore, Untangling the role of amyloid in atherosclerosis. *Current opinion in lipidology* 17, 541 (Oct, 2006).
- 40 89. R. E. Tanzi, R. D. Moir, S. L. Wagner, Clearance of Alzheimer's Aβ peptide: the many roads to perdition. *Neuron* 43, 605 (Sep 2, 2004).
90. R. W. Carrell, D. A. Lomas, Conformational disease. *Lancet* 350, 134 (Jul 12, 1997).
91. S. L. Cole, R. Vassar, The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Molecular neurodegeneration* 2, 22 (2007).
- 45 92. A. F. Haney, W. S. Trought, The sonolucent placenta in high-risk obstetrics. *Obstetrics and gynecology* 55, 38 (Jan, 1980).
93. V. A. Varma, K. M. Kim, Placental calcification: ultrastructural and X-ray microanalytic studies. *Scanning electron microscopy*, 1567 (1985).

94. O. Yokota et al., NACP/alpha-synuclein immunoreactivity in diffuse neurofibrillary tangles with calcification (DNTC). *Acta neuropathologica* 104, 333 (Oct, 2002).
95. T. Cornelis, A. Odutayo, J. Keunen, M. Hladunewich, The kidney in normal pregnancy and preeclampsia. *Seminars in nephrology* 31, 4 (Jan, 2011).
- 5 96. B. M. Sibai, Imitators of severe pre-eclampsia. *Seminars in perinatology* 33, 196 (Jun, 2009).
97. S. Hirai, K. Okamoto, Amyloid beta/A4 peptide associated with Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. *Internal medicine* 32, 923 (Dec, 1993).
98. R. C. Pattinson, M. Hall, Near misses: a useful adjunct to maternal death enquiries. *British medical bulletin* 67, 231 (2003).
- 10 99. S. f. M.-F. M. Publications Committee, B. M. Sibai, Evaluation and management of severe preeclampsia before 34 weeks' gestation. *American journal of obstetrics and gynecology* 205, 191 (Sep, 2011).
100. S. Lee, K. Carson, A. Rice-Ficht, T. Good, Hsp20, a novel alpha-crystallin, prevents Abeta fibril formation and toxicity. *Protein science : a publication of the Protein Society* 14, 593 (Mar, 2005).
- 15 101. M. D. Griffin et al., Thioflavin T fluorescence in human serum: correlations with vascular health and cardiovascular risk factors. *Clinical biochemistry* 43, 278 (Feb, 2010).
102. M. Sakono, T. Zako, Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *The FEBS journal* 277, 1348 (Mar, 2010).
103. C. P. Price, R. G. Newall, J. C. Boyd, Use of protein:creatinine ratio measurements on random urine samples for prediction of significant proteinuria: a systematic review. *Clinical chemistry* 51, 1577 (Sep, 2005).
- 20 104. F. Schoonjans, A. Zalata, C. E. Depuydt, F. H. Comhaire, MedCalc: a new computer program for medical statistics. *Computer methods and programs in biomedicine* 48, 257 (Dec, 1995).
105. B. Efron, R. J. Tibshirani, *An introduction to the bootstrap*. (CRC Press, Boca Raton, Florida, 1994).
106. E. R. DeLong, D. M. DeLong, D. L. Clarke-Pearson, Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 44, 837 (Sep, 1988).
- 25 107. J. D. Green, C. Goldsbury, J. Kistler, G. J. Cooper, U. Aebi, Human amylin oligomer growth and fibril elongation define two distinct phases in amyloid formation. *The Journal of biological chemistry* 279, 12206 (Mar 26, 2004).
- 30 108. J. Rybarska et al., Evidence that supramolecular Congo red is the sole ligation form of this dye for L chain lambda derived amyloid proteins. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* 39, 307 (2001).
109. J. W. Slot, H. J. Geuze, Cryosectioning and immunolabeling. *Nature protocols* 2, 2480 (2007).
110. M. J. Wehrum et al., Accreta complicating complete placenta previa is characterized by reduced systemic levels of vascular endothelial growth factor and by epithelial-to-mesenchymal transition of the invasive trophoblast. *American journal of obstetrics and gynecology* 204, 411 e1 (May, 2011).
- 35 111. Z. Tang et al., Decreased levels of folate receptor-beta and reduced numbers of fetal macrophages (Hofbauer cells) in placentas from pregnancies with severe pre-eclampsia. *American journal of reproductive immunology* 70, 104 (Aug, 2013).

Ejemplo 3

Diseño del estudio y especímenes

Existen dos partes para la prueba de CRD. La "parte húmeda" incluye la preparación de la mezcla orina-rojo Congo, depositando la mezcla como puntos sobre una hoja de nitrocelulosa (matriz de hoja de CRD), seguido por la adquisición y el almacenamiento de las dos imágenes en un teléfono inteligente (Foto1: capturada antes del lavado de la hoja y Foto2 capturada después del lavado hidrófobo). La "parte seca" incluye el procesamiento de las dos imágenes, seguido por el cálculo del resultado de la prueba de CRD [% de retención de rojo Congo (CRR)] para cada punto individualmente y para cada sujeto como el promedio de los puntos duplicados en la matriz después de la resta del resultado de CRR de la muestra de blanco (BLC, usa solución salina tamponada con fosfato [PBS] en lugar de orina humana). Este estudio se realizó en 3 etapas, cada una de las cuales busca simplificar sinérgicamente, acelerar y mejorar tanto la "parte húmeda" como la "parte seca" de la prueba de CRD.

- En la etapa 1 una versión preliminar de la herramienta de software de procesamiento de imágenes evaluó las imágenes guardadas que habían sido previamente procesadas en Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA) en la preparación para el análisis manual usando el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Los resultados de la etapa 1 condujeron al desarrollo de una plantilla normalizada para el coherente posicionamiento de los puntos de muestra durante la "parte húmeda" de la prueba y de una parte de herramienta de procesamiento de imágenes habilitada por teléfono móvil de la optimización de la "parte seca".
- En la etapa 2, estas mejoras se probaron en tiempo real en matrices de CRD normalizadas recién preparadas y los resultados se analizaron para acuerdo con el protocolo del manual y para la exactitud de la prueba frente a la norma de pronóstico relevante para la enfermedad (parto medicamente indicado por preeclampsia: MIDPE).
- En la etapa 3, se analizaron los resultados de la prueba a través de 4 operadores, que incluyen personal sin entrenar sin ninguna instrucción o conocimiento previo del sistema de los presentes inventores para comprobar la robustez y para mejorar la manipulación de errores y la retroalimentación del sistema. Además, la "parte húmeda" del protocolo se simplificó adicionalmente para modificar y/o eliminar sistemáticamente varias etapas para lograr la máxima simplificación posible sin pérdida en el rendimiento técnico.

Se recogieron los especímenes de orina incluidos en este estudio (Ejemplo 2) como parte del estudio que informó sobre la base molecular del principio de CRD. Durante la evaluación, la CRR calculada manualmente por un único experto (IAB) sirvió método de referencia técnico. Se eligió MIDPE (un evento adverso potencial relacionado con la preeclampsia) como el resultado de interés en los análisis de exactitud comparativos. Los métodos estadísticos se resumen a continuación.

Evaluación de algoritmos para la cuantificación de puntos

El conjunto de datos de la etapa 1 se originó a partir de las imágenes previamente adquiridas (antes y después del lavado, Nikon Coolpix 4500) que se han cuantificado manualmente como parte del estudio inicial. Este conjunto de datos consistió de 18 matrices de un total de 218 sujetos. Cada matriz mantuvo puntos duplicados de 12-15 sujetos (FIG. 20A). Basándose en el interés en la importancia de los puntos rojos con respecto a la de la hoja de fondo, se probaron dos algoritmos posibles, que potenciarían teóricamente el color del colorante: valor de píxeles del canal rojo dividido entre el canal verde (relación R/G, variando R y G de 0-255), para potenciar la información de rojez que reduce el color de fondo. Un segundo cálculo usó la información de canal rojo restada por el canal verde (diferencia R-G) con el mismo razonamiento. Se seleccionó el canal verde con respecto al canal azul debido a que el patrón de Bayer hace que los sensores de la cámara digital sean más sensibles al verde que al azul con el fin de igualar la elevada sensibilidad del sistema visual humano hacia el color verde. Finalmente, se usó una ecuación de conversión de luminancia para retener la intensidad de los colores mientras que se eliminó la información de color en sí (FIG. 20B). El algoritmo de luminancia (L) se pareció al empleado por la rutina de procesamiento manual. Los cálculos simulados realizados con una interfaz de línea de comandos de la aplicación de los presentes inventores (versión de la línea de comandos de la biblioteca de procesamiento ejecutada en un ThinkPad T500 con el sistema operativo Linux Ubuntu) determinó que los cálculos de R/G (FIG. 20C) y L (FIG. 20D) devolvieron valores de CRR que se correlacionaron significativamente mejor con la CRR manualmente derivada (prueba de z $P < 0,001$ para ambas comparaciones) en comparación con R-G (FIG. 20E). En el análisis de exactitud comparativa (FIG. 20F) no hubo diferencia entre el área bajo la curva de eficacia diagnóstica (ABC) de la CRR manualmente derivada [ABC=0,966; IC del 95 % [0,932-0,985]] y la CRR automáticamente calculada usando la conversión de L (0,962 [0,927-0,983], $P=0,579$). Hubo una pequeña disminución diferente aunque estadísticamente significativa en el ABC cuando el valor de CRR se calculó como R/G (0,962 [0,927-0,983], $P=0,042$) en comparación con la integración manual. Los presentes inventores atribuyeron esta diferencia al sutil desplazamiento batocrómico (de rojo a púrpura) presentado por los especímenes de orina seleccionados que afectaron la relación R/G significativamente más que la conversión L. Esto, además del tiempo de procesamiento general más corto necesario para las imágenes en escala de grises, condujo a los presentes inventores a elegir el algoritmo basado en L para el posterior desarrollo de proceso.

Normalización del tamaño de matriz de CRD y disposición

Para una rutina completamente automática, la detección automática de la hoja, así como la coherente posición de los puntos sobre las imágenes adquiridas, emergieron como un requisito durante la etapa 1. Además, se necesitan conocer la dimensión y la orientación de la hoja. Para lograr esto, se normalizó y se revisó la disposición de la matriz de CRD. También se normalizó y se revisó del siguiente modo la modalidad en que se adquirieron Foto1 y Foto2: i) se cortaron hojas de nitrocelulosa hasta un tamaño normalizado de 4,5 de ancho por 6 de largo que es proporcional al tamaño de la pantalla del iPhone; ii) se perforaron tres de los cuatro cuadrados de la esquina de la hoja usando un perforadora de cartulina manual; iii) se imprimió una plantilla de posicionamiento de muestras (FIG. 21) sobre la hoja de papel normal, que luego se puso dentro de un protector de hojas de plástico y debajo de la hoja de nitrocelulosa. Se incluyó la plantilla de tamaño real para la impresión, como se muestra en la Figura 24. La plantilla marca las posiciones de la muestra para hasta 41 sujetos (cada espécimen se deposita por duplicado en celdas adyacentes de dos columnas). Los puntos centrales negros en cada celda son visibles a través de la transparencia y sirven de guía para la colocación de muestras para garantizar el posicionamiento predecible de los puntos sobre la hoja. Se colocan los puntos de muestra correspondientes al blanco (BLC o PBS) en la primera esquina izquierda; iv) la adquisición de tanto las imágenes Foto1 como Foto2 se realiza con la hoja de matriz situada sobre una superficie negra, que da como resultado que los orificios perforados sirvan de marcadores de posición sin la necesidad de usar tinta que podría percolar durante el lavado u otros marcadores que podrían aumentar el coste de la hoja. Este formato normalizado de la matriz de la prueba de CRD toma prestados elementos de códigos QUICK RESPONSE® (QR), concretamente la hoja tiene una relación de aspecto conocida y tres de las cuatro esquinas están resaltadas. La detección de los tres marcadores en las esquinas izquierda y superior permite la rotación, enderezado y superposición perfecta de cada punto individual en Foto1 con su yo correspondiente (o posición donde el colorante se ha lavado) en Foto2. Esta última característica se logra mediante una secuencia de procesamiento de imágenes personalizada para ser ejecutada como una aplicación en el mismo teléfono inteligente que se usa para adquirir Foto1 y Foto2 (iPhone 4 en este caso).

Secuencia de procesamiento de imágenes de la matriz de CRD

Las secuencia encadena siete etapas de procesamiento de la obtención de imágenes del siguiente modo: i) adquisición de imágenes parte de la parte húmeda de la prueba de CRD; ii) detección de hojas; iii) extracción de hojas; iv) extracción de celdas; v) detección de puntos; vi) extracción de puntos y vii) cálculo de CRR. El flujo de trabajo del proceso se representa esquemáticamente en la Figura 21.

Adquisición de imágenes. Las imágenes se adquieren usando la cámara incorporada del teléfono inteligente. La resolución de la cámara del iPhone 4 es suficiente para capturar un punto de muestra con un número máximo de aproximadamente 40 píxeles por diámetro. Esto da como resultado aproximadamente 1.200 píxeles por punto de muestra. Para la velocidad de procesamiento y robustez, cada imagen se convierte en escala de grises de luminancia para todas las siguientes etapas.

Detección de hojas. Puesto que se desconoce la localización exacta y la deformación de la hoja debido a las variaciones en el ángulo fotográfico, primero se requiere el enderezado de la proyección perspectiva. Para lograr esto, se detectaron cuatro esquinas y luego se aplicó una interpolación simple entre las cuatro esquinas para enderezar la hoja en una imagen rectangular. Para encontrar las esquinas, se localizan la propia hoja y luego sus bordes. Los dos lados opuestos de la hoja deben ser de la misma longitud; las esquinas tienen un ángulo de 90 grados, y la relación de los lados vecinos es igual a la relación de la plantilla normalizada (0,75). Para la detección automática, se binariza la imagen de entrada en escala de grises usando el método Otsu. Debido a que el fondo de la imagen es negro (debido al fondo fotográfico negro visible a través de los orificios perforados) y la hoja es blanca, se calcula el umbral Otsu de la hoja para separar el primer plano (hoja) del fondo. Para suavizar más la imagen binaria resultante, todos los orificios en la parte del primer plano se llenan aplicando morfología matemática. A continuación, se aplica un filtro de gradiente para exponer los límites de la hoja sobre la imagen. En esta imagen en gradiente con límites sobreexpresados, las esquinas se detectan usando la transformada de la línea de Hough (un método de encuentro de líneas en una imagen). Se calcula primero una transformada de línea de Hough aproximada para encontrar holgadamente los cuatro bordes más notorios (límites de la hoja). A continuación, se extraen las 4 intersecciones de estas líneas. Debido a que estas posiciones no corresponden a las esquinas perfectamente, se realiza una segunda transformada de línea de Hough más fina por separado en regiones de interés alrededor de las esquinas previamente encontradas. En esta segunda serie, solo se extraen las dos líneas principales cerca de las esquinas e intersecan, que mejora la localización de los puntos de la esquina, mientras que se mantiene el uso de memoria a un mínimo.

Extracción de hojas. De los cuatro puntos de la esquina, se estiman las posiciones de los bordes más largos y los bordes más cortos y la hoja se transforma perspectivamente en una geometría rectangular usando interpolación bilineal. La corrección geométrica también reduce el número de píxeles por punto a aproximadamente 700 píxeles (reducción de escala). Para explicar la posible adquisición de paisaje frente a retrato, se detectan los tres marcadores de posición en las esquinas de la hoja calculando la intensidad promedio en cada esquina y seleccionando la esquina con la mayor intensidad (que corresponde a la esquina sin el marcador perforado) como punto de referencia. La hoja se transpone o rota en consecuencia, de forma que todos los marcadores se vuelvan a situar sobre las esquinas superior e inferior. La imagen normalizada contiene ahora la hoja, extendiéndose la hoja entre las cuatro esquinas de la imagen. Este proceso se hace individualmente en Foto1 y Foto2.

Extracción de celdas. Se extraen las posiciones de las celdas para cada paciente de la imagen normalizada sin procesamiento de imágenes adicional, puesto que la geometría de la matriz se define bien basándose en la plantilla de aplicación de la muestra normalizada. Sin embargo, cada celda contiene dos puntos en una posición aún desconocida. Este proceso se hace individualmente en Foto1 y Foto2.

5 Detección de puntos. Todos los posibles puntos de muestra están presentes en Foto1, pero algunos podrían desaparecer durante el lavado (muestras de prueba negativas). Así, solo se puede realizar la completa detección de puntos en Foto1. Para determinar las posiciones de puntos, se aplica un gradiente de filtro a cada celda extraída en Foto1 para detectar los bordes de puntos. Se estima el radio de cada punto. Entonces se realiza una transformada de círculo de Hough y se seleccionan las dos formas circulares más destacadas en cada celda. Debido a que la posición
10 relativa del punto no cambia durante el lavado, se usa la misma información de posición de Foto1 para el procesamiento de Foto2.

15 Extracción de puntos. Con las posiciones de los puntos conocidas, se extrae la intensidad de los píxeles correspondientes y se suman. Para tener en cuenta el balance de blancos y los leves cambios en la iluminación, se realiza una resta del fondo restando la luminancia promedio de la celda fuera del punto de la luminancia promedio dentro del punto, Tabla 5.

Tabla 5. Problemas de manipulación encontrados en la etapa 3 del estudio de los presentes inventores y soluciones

Problema *	Problema de la obtención de imágenes	Efecto	Remedio
1	Punto de vista extremo o perspectiva	Falla la interpolación lineal; localización errónea de celdas del paciente	Mensaje de advertencia si los bordes opuestos varían más de 10 % (ángulo de observación de 15°); protocolo de adquisición cambiado a fondo inclinado
2	Hoja no completamente capturada en la imagen	Detección de esquinas imposible	Mensaje de error sobre la esquina faltante; la posición y la orientación de la plantilla cubren la vista de la cámara
3	Iluminación y no uniformes	Clasificación errónea debido al primer plano oscuro	Mensaje de advertencia si se detecta alta variación en la iluminación
4	Reflexión de agua sobre o cerca de la hoja	Falla la detección del límite y la esquina	Mensaje de advertencia que sugiere superficie fotográfica inclinada para evitar la formación de charcos
5	Borrosidad/fuera de foco	La hoja está borrosa	Se despreció la borrosidad debido a un impacto menor (tolerada hasta el borrón gaussiano con sigma=5)
* Listados en el orden de frecuencia decreciente con la que se observaron			

20 Cálculo de CRR. Análogo a la fórmula manual, se calcula el resultado de la prueba (CRR) como la relación entre la intensidad promedio de los puntos en Foto1 y la intensidad promedio del punto en Foto2. El valor de la muestra de blanco (puntos en la posición de las celdas superiores izquierda) se resta de todos los otros valores calculados de CRR en la hoja.

Validación y pruebas de equivalencia/no inferioridad

25 En la etapa 2, se adquirieron imágenes y se procesaron con un iPhone 4 y una aplicación que ejecuta la secuencia anterior. Para repetibilidad, se usó la cámara del iPhone para la adquisición, pero las imágenes se transfirieron entonces a un ordenador donde el procesamiento se realizó en un simulador de iPhone. Se analizaron ocho matrices de CRD que contenían 328 especímenes de orina diferentes como parte de la etapa 2. Estas matrices se prepararon específicamente para este estudio a partir de alícuotas mantenidas congeladas a -80 °C. Los especímenes se originaron a partir de 273 mujeres diferentes (55 especímenes fueron recogidas posteriores en un momento posterior
30 en el embarazo). Todos los especímenes fueron consecutivos con respecto a la recogida de especímenes y el almacenamiento. No hubo solapamiento en los especímenes con la parte analizada de la etapa 1. La prevalencia del desenlace de interés (MIDPE) en el conjunto de datos de la etapa 2 fue 40 % entre especímenes (118/328) y entre sujetos (108/273).

Similar a la etapa 1, hubo un nivel significativo de acuerdo entre las mediciones de CRR manuales y las automáticas. El coeficiente de concordancia de Lin (ρ_c) de 0,968, IC del 95 % [0,961-0,974] se calificaron como "sustanciales"

basándose en un coeficiente de precisión de Pearson $\rho=0,973$ y un factor de corrección del sesgo $C_b=0,995$ (FIG. 22A). El procedimiento de dos pruebas bilaterales (TOST) determinó que el cálculo de CRR habilitado por el teléfono inteligente fue equivalente a la integración manual (FIG. 22B). Esto puede ser fácilmente visto mediante el solapamiento de intervalos de confianza del 90 % de las CRR calculadas con el procedimiento manual frente al automático independientemente de si los grupos se analizaron combinados o separados por desenlace. Únicamente para el análisis de TOST, los intervalos de confianza del 90 % corresponden al nivel de significancia $P=0,05$. El margen de equivalencia fue 10 % para el grupo MIDPE y 5 % para el grupo sin MIDPE y el conjunto de datos global. Un análisis de ROC usando el primer espécimen de cada sujeto no determinó diferencia estadísticamente significativa en ABC entre la cuantificación manual de CRR (0,911 [0,882-0,935]) y el cálculo habilitado por el teléfono inteligente (0,923 [0,986-0,945], $P=0,329$) (FIG. 22C).

Tiempo de procesamiento

En la FIG. 23 se incluye un flujo de trabajo pantalla por pantalla de la aplicación del iPhone que ilustra el tiempo de procesamiento (en las imágenes de ejemplo mostradas Foto1 y Foto2 se han adquirido previamente y se han almacenado en la biblioteca de imágenes del teléfono inteligente). Utilizando la herramienta de procesamiento de imágenes de los presentes inventores, el tiempo desde la conclusión de la "parte húmeda" de la matriz de prueba de CRD hasta el resultado se redujo a aproximadamente 2 minutos de tiempo de procesamiento en el teléfono inteligente.

Análisis del rendimiento y la tolerancia al diseño

Para verificar el algoritmo de los presentes inventores y mejorar más la robustez del protocolo de obtención de imágenes de los presentes inventores en la etapa 3 de su estudio, se adquirió un conjunto de datos adicional de 6 matrices de CRD normalizadas. Los experimentos se realizaron por una persona no capacitada a la que tampoco se le dieron instrucciones sobre cómo poner el teléfono inteligente para adquirir las imágenes o evitar la iluminación y el sombreado irregulares (ángulo de la cámara). Este conjunto de datos ayudó a evaluar posibles fuentes de error inducidas por el operador. Estos problemas de manipulación se resumen en la Tabla 5 junto con sus consecuencias sobre la cadena de procesamiento de obtención de imágenes y remedios implementados en una versión actualizada. El error de manipulación casi siempre observado fue el exceso de perspectiva con la que se adquirieron Foto1 y Foto2. La mayoría de los problemas se remediaron mediante retroalimentación al usuario con instrucciones sobre cómo volver a adquirir la imagen para evitar el problema. Se mejoró más la robustez de la cadena de obtención de imágenes de los presentes inventores estableciendo un límite al nivel de iluminación irregular tolerada en Foto1 y Foto2. Se solicitó al usuario mediante la interfaz que volviera a tomar la imagen y se alejara de la fuente de luz cuando el sombreado superara el nivel de tolerancia en la varianza (coeficiente de variación > 15 %).

Optimizaciones adicionales de la parte húmeda de la prueba de CRD

Como parte de la etapa 3, se realizaron matrices adicionales en un conjunto consecutivo de 94 muestras de orina comparando la "parte húmeda" previamente validada de la prueba de CRD con dos versiones abreviadas: una que omitía la normalización de proteínas de la orina y la otra que omitía tanto la normalización de proteínas como la agitación de 1 hora con rojo Congo. La omisión tanto de la normalización de la orina como la agitación (las muestras mezcladas con rojo Congo se dispusieron inmediatamente sobre la hoja) produjeron concordancia aceptable (ρ de Lin =0,914 [0,873-0,942]) con el protocolo original. En la regresión lineal multifactorial, el grado de sesgo se determinó únicamente por el nivel de CRR y no por la posición sobre la hoja, la competencia del operador o la concentración de proteínas en la orina. La exactitud ($C_b=0,997$) superó la precisión (ρ de Pearson=0,916), sugiriendo que aunque los números pueden variar ligeramente, el omitir la normalización no afectará significativamente la clasificación de la enfermedad. Se llevaron a cabo otros experimentos para sustituir el lavado con metanol con alternativas más fáciles de adquirir y desechar. En todo el ensayo y error los presentes inventores determinaron que el isopropanol de calidad farmacéutica (90 %) demostró ser más eficaz que el metanol y acortó el tiempo de lavado (medido hasta la decoloración completa del blanco) a 7 min. El etanol de calidad farmacéutica (70 %) no fue adecuado como sustituto del metanol. Los desnaturalizantes (concretamente la acetona, añadida en los EE. UU. para hacerlo imbebible) afectó el tamaño de poro en la hoja de nitrocelulosa que produjo la pérdida de señal inaceptable sobre muestras positivas.

Procedimientos estadísticos

Se usó el software MedCalc (v 12.5 Ostend, Bélgica) como auxiliar estadístico, a menos que se especifique de otro modo. Se probaron las correlaciones usando la correlación del momento de producto de Pearson, mientras que la concordancia se determinó usando el coeficiente de concordancia de Lin y la escala descriptiva de McBride de concordancia. Se realizó la prueba de equivalencia/no inferioridad en Microsoft Excel usando el procedimiento de complementos de TOST/XLSTAT. Se usó regresión lineal escalonada multifactorial para determinar el impacto de variables múltiples sobre el nivel de sesgo (diferencia entre el resultado obtenido usando el método manual y el resultado después de la eliminación sistemática de etapas en el protocolo húmedo). Se entraron las variables en el modelo si $P<0,05$ y se quitaron si $P>0,1$. Para todos los procedimientos se usó $P<0,05$ para indicar significación estadística.

Ecuaciones

$$L(x,y) = 0,3 \times R(x,y) + 0,59 \times G(x,y) + 0,11 \times B(x,y) \quad \text{(Ecuación 1)}$$

siendo $L(x,y)$ la luminancia, y $R(x,y)$, $G(x,y)$ y $B(x,y)$ determinan los valores de rojo, verde y azul del píxel en la posición x,y , respectivamente.

$$r(d_i) = \frac{\sum_{x,y \in d_i} L(x,y)}{N_{d_i}} - \frac{\sum_{(x,y) \in c_i, (x,y) \notin d_i} L(x,y)}{N_{c_i} - N_{d_i}} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

5 siendo $r(d)$ la luminancia normalizada (considerada como "rojez") de punto d_i , c_i la celda que contiene el punto d_i , y N el número de píxeles en c_i o d_i .

Referencias

1. S. Lunde, in Wipro. (Wipro Ltd), vol. 2013.
2. C. Free et al., The effectiveness of M-health technologies for improving health and health services: a systematic review protocol. BMC research notes 3, 250 (2010).
- 10 3. M. Fiordelli, N. Diviani, P. J. Schulz, Mapping mHealth research: a decade of evolution. Journal of medical Internet research 15, e95 (2013).
4. E. Ozdalga, A. Ozdalga, N. Ahuja, The smartphone in medicine: a review of current and potential use among physicians and students. Journal of medical Internet research 14, e128 (2012).
- 15 5. A. Hart, K. Tallevi, D. Wickland, R. E. Kearney, J. A. Cafazzo, A contact-free respiration monitor for smart bed and ambulatory monitoring applications. Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference 2010, 927 (2010).
6. J. M. Ruano-Lopez et al., The SmartBioPhone, a point of care vision under development through two European projects: OPTOLABCARD and LABONFOIL. Lab on a chip 9, 1495 (Jun 7, 2009).
- 20 7. J. J. Oresko, H. Duschl, A. C. Cheng, A wearable smartphone-based platform for real-time cardiovascular disease detection via electrocardiogram processing. IEEE transactions on information technology in biomedicine : a publication of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society 14, 734 (May, 2010).
8. K. Boehret, in All Things Reviewed. (<http://allthingsd.com/20130813/device-nags-vou-to-sit-up-straight/>, 2013), vol. accessed October 18, 2013.
- 25 9. H. Engel et al., Remote real-time monitoring of free flaps via smartphone photography and 3G wireless Internet: a prospective study evidencing diagnostic accuracy. Microsurgery 31, 589 (Nov, 2011).
10. E. Jonathan, M. Leahy, Investigating a smartphone imaging unit for photoplethysmography. Physiological measurement 31, N79 (Nov, 2010).
- 30 11. R. A. Joundi, J. S. Brittain, N. Jenkinson, A. L. Green, T. Aziz, Rapid tremor frequency assessment with the iPhone accelerometer. Parkinsonism & related disorders 17, 288 (May, 2011).
12. R. Lemoyne, T. Mastroianni, M. Cozza, C. Coroian, W. Grundfest, Implementation of an iPhone as a wireless accelerometer for quantifying gait characteristics. Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference 2010, 3847 (2010).
- 35 13. R. Lemoyne, T. Mastroianni, M. Cozza, C. Coroian, W. Grundfest, Implementation of an iPhone for characterizing Parkinson's disease tremor through a wireless accelerometer application. Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference 2010, 4954 (2010).
- 40 14. J. A. Wolf et al., Diagnostic inaccuracy of smartphone applications for melanoma detection. JAMA dermatology 149, 422 (Apr, 2013).
15. I. A. Buhimschi et al., Protein misfolding, urine congophilia, oligomeric state immunoreactivity and defective amyloid precursor protein processing in preeclampsia. Manuscript in review.
16. I. A. Buhimschi et al., Proteomic profiling of urine identifies specific fragments of SERPINA1 and albumin as biomarkers of preeclampsia. American journal of obstetrics and gynecology 199, 551 e1 (Nov, 2008).
- 45 17. W. Gottesman, N. Baum, QR codes: next level of social media. The Journal of medical practice management: MPM 28, 345 (May-Jun, 2013).

18. N. Otsu, A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 9, 62 (1979).
19. P. V. C. Hough, Machine Analysis of Bubble Chamber Pictures. *Proc. Int. Conf. High Energy Accelerators and Instrumentation*, (1959).
- 5 20. T. M. Lehmann, Gönner, C., Spitzer, K., Interpolation methods in medical image processing. *IEEE Trans Med Imaging* 18, 1049 (1999).
21. R. O. Duda, P. E. Hart, Use of the Hough transformation to detect lines and curves in pictures. *Communications of Association for Computing Machinery* 15, 11 (1972).
22. L. I. Lin, A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* 45, 255 (Mar, 1989).
- 10 23. G. B. McBride, A proposal for strength-of-agreement criteria for Lin's Concordance Correlation Coefficient. *NIWA Client Report HAM2005-062*, (2005).
24. E. Walker, A. S. Nowacki, Understanding equivalence and noninferiority testing. *Journal of general internal medicine* 26, 192 (Feb, 2011).
- 15 25. A. A. Okunad, V. N. Murthy, Technology as a 'major driver' of health care costs: a cointegration analysis of the Newhouse conjecture. *Journal of health economics* 21, 147 (Jan, 2002).
26. A. F. Coskun, R. Nagi, K. Sadeghi, S. Phillips, A. Ozcan, Albumin testing in urine using a smartphone. *Lab on a chip* 13, 4231 (Nov 7, 2013).
- 20 27. S. Adibi, Mobile health (mHealth) biomedical imaging paradigm. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference 2013*, 6453 (Jul, 2013).
28. A. Labrique, L. Vasudevan, L. W. Chang, G. Mehl, H_{pe} for mHealth: more "y" or "o" on the horizon? *International journal of medical informatics* 82, 467 (May, 2013).
29. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *American College of Obstetricians and Gynecologists*. (2002).
- 25 30. K. S. Khan, D. Wojdyla, L. Say, A. M. Gulmezoglu, P. F. Van Look, WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet* 367, 1066 (Apr 1, 2006).
31. R. J. Guidotti, D. (2005).
32. F. Schoonjans, A. Zalata, C. E. Depuydt, F. H. Comhaire, MedCalc: a new computer program for medical statistics. *Computer methods and programs in biomedicine* 48, 257 (Dec, 1995).
- 30 Se debe entender que todas las definiciones, como se definen y usan en el presente documento, prevalecen sobre las definiciones de diccionario, definiciones en documentos incorporados como referencia y/o significados habituales en los términos definidos.
- Se debe entender que los artículos indefinidos "un" y "una", como se usan en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, significan "al menos uno".
- 35 Se debe entender que la expresión "y/o", como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, se significa "cualquiera o ambos" de los elementos así unidos, es decir, elementos que están conjuntamente presentes en algunos casos y disyuntivamente presentes en otros casos. Los múltiples elementos listados con "y/o" se deben interpretar del mismo modo, es decir, "uno o más" de los elementos así unidos. Pueden estar opcionalmente presentes otros elementos distintos de los elementos específicamente identificados por la cláusula "y/o", si están relacionados o sin relacionar con los elementos identificados específicamente. Así, como ejemplo no limitante, una referencia a "A y/o B", cuando se usa junto con lenguaje abierto tal como "que comprende", se puede referir, en una realización, a A solo (que opcionalmente incluye elementos distintos de B); en otra realización, a B solo (que incluye opcionalmente elementos distintos de A); y en otra realización más, a tanto A como B (que incluye opcionalmente otros elementos). Similarmente, una referencia a "A, B y/o C", cuando se usa junto con lenguaje abierto tal como "que comprende" se puede referir, en algunas realizaciones, a A solo (que incluye opcionalmente elementos distintos de B y C); en otra realización, a B solo (que incluye opcionalmente elementos distintos de A y C); en otra realización más, a C solo (que incluye opcionalmente elementos distintos de C y C); en otra realización más, a A y B (que incluye opcionalmente otros elementos), a A y C (que incluye opcionalmente otros elementos), a B y C (que incluye opcionalmente otros elementos), o a A, B y C (que incluye opcionalmente otros elementos).
- 40
- 45
- 50 Como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la expresión "al menos uno", en referencia a una lista de uno o más elementos, se debe entender que significa al menos un elemento

5 seleccionado de uno cualquiera o más de los elementos en la lista de elementos, pero que no necesariamente incluye al menos uno de cada uno y cada elemento específicamente enumerado dentro de la lista de elementos y que no excluye ninguna combinación de elementos en la lista de elementos. Esta definición también permite que puedan estar opcionalmente presentes elementos distintos de los elementos específicamente identificados dentro de la lista de elementos a la que se refiere la expresión "al menos uno", tanto si están relacionados como sin relacionar con los elementos específicamente identificados. Así, como ejemplo no limitante, "al menos uno de A y B" (o, equivalentemente, "al menos uno de A o B," o, equivalentemente "al menos uno de A y/o B") se puede referir, en algunas realizaciones, a al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, A, sin B presente (y que incluye opcionalmente elementos distintos de B); en otra realización, a al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, B, sin A presente (y que incluye opcionalmente elementos distintos de A); en otra realización más, a al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, A, y al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, B (y que incluye opcionalmente otros elementos).

15 También se debe entender que, a menos que se indique claramente lo contrario, en cualquier método reivindicado en el presente documento que incluye más de una etapa o acto, el orden de las etapas o actos del método no está necesariamente limitado al orden en que se citan las etapas o actos del método.

20 En las reivindicaciones, así como en la memoria descriptiva anterior, se debe entender que todas las expresiones de transición tales como "que comprende", "que incluye", "que lleva", "que tiene", "que contiene", "que implica", "que mantiene", "compuesto de" y similares son de extremos abiertos, es decir, que significa que incluyen, pero no se limitan a. Solo las fases de transición "que consiste en" y "que consiste esencialmente en" deben ser expresiones de transición cerradas o semicerradas, respectivamente, como se expone en el United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures, Sección 2111.03.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Yale University
- 25 <120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA DETECTAR PROTEÍNAS MAL PLEGADAS
- <130> Y0087.70084WO00
- <140> TBD
- 30 <141> 10-04-2015
- <150> US 61/978.158
- <151> 2014-04-10
- 35 <160> 6
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 40 <211> 130
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 45 <223> Polipéptido sintético

ES 2 817 417 T3

<400> 1

Met Arg Gln Lys Ala Val Ser Leu Phe Leu Cys Tyr Leu Leu Leu Phe
1 5 10 15
Thr Cys Ser Gly Val Glu Ala Gly Lys Lys Lys Cys Ser Glu Ser Ser
20 25 30
Asp Ser Gly Ser Gly Phe Trp Lys Ala Leu Thr Phe Met Ala Val Gly
35 40 45
Gly Gly Leu Ala Val Ala Gly Leu Pro Ala Leu Gly Phe Thr Gly Ala
50 55 60
Gly Ile Ala Ala Asn Ser Val Ala Ala Ser Leu Met Ser Met Ser Ala
65 70 75 80
Ile Leu Asn Gly Gly Gly Val Pro Ala Gly Gly Leu Val Ala Thr Leu
85 90 95
Gln Ser Leu Gly Ala Gly Gly Ser Ser Val Val Ile Gly Asn Ile Gly
100 105 110
Ala Leu Met Gly Tyr Ala Thr His Lys Tyr Leu Asp Ser Glu Glu Asp
115 120 125
Glu Glu
130

5

<210> 2

<211> 134

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 2

15

ES 2 817 417 T3

Met Arg Gln Lys Ala Val Ser Leu Phe Leu Cys Tyr Leu Leu Leu Phe
 1 5 10 15

Thr Cys Ser Gly Val Glu Ala Gly Glu Asn Ala Gly Lys Lys Lys Cys
 20 25 30

Ser Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser Gly Phe Trp Lys Ala Leu Thr Phe
 35 40 45

Met Ala Val Gly Gly Gly Leu Ala Val Ala Gly Leu Pro Ala Leu Gly
 50 55 60

Phe Thr Gly Ala Gly Ile Ala Ala Asn Ser Val Ala Ala Ser Leu Met
 65 70 75 80

Ser Met Ser Ala Ile Leu Asn Gly Gly Gly Val Pro Ala Gly Gly Leu
 85 90 95

Val Ala Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Gly Gly Ser Ser Val Val Ile
 100 105 110

Gly Asn Ile Gly Ala Leu Met Gly Tyr Ala Thr His Lys Tyr Leu Asp
 115 120 125

Ser Glu Glu Asp Glu Glu
 130

<210> 3

<211> 138

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 3

Met Arg Gln Lys Ala Val Ser Leu Phe Leu Cys Tyr Leu Leu Leu Phe
 1 5 10 15

Thr Cys Ser Gly Val Glu Ala Gly Glu Asn Ala Gly Lys Asp Ala Gly
 20 25 30

ES 2 817 417 T3

Lys Lys Lys Cys Ser Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser Gly Phe Trp Lys
 35 40 45

Ala Leu Thr Phe Met Ala Val Gly Gly Gly Leu Ala Val Ala Gly Leu
 50 55 60

Pro Ala Leu Gly Phe Thr Gly Ala Gly Ile Ala Ala Asn Ser Val Ala
 65 70 75 80

Ala Ser Leu Met Ser Met Ser Ala Ile Leu Asn Gly Gly Gly Val Pro
 85 90 95

Ala Gly Gly Leu Val Ala Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Gly Gly Ser
 100 105 110

Ser Val Val Ile Gly Asn Ile Gly Ala Leu Met Gly Tyr Ala Thr His
 115 120 125

Lys Tyr Leu Asp Ser Glu Glu Asp Glu Glu
 130 135

<210> 4

<211> 418

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 4

Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys
 1 5 10 15

Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala
 20 25 30

Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn
 35 40 45

Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln
 50 55 60

Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser
 65 70 75 80

Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr
 85 90 95

ES 2 817 417 T3

His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro
 100 105 110

Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn
 115 120 125

Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu
 130 135 140

Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys
 145 150 155 160

Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn Phe Gly Asp Thr Glu Glu
 165 170 175

Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly Lys
 180 185 190

Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu
 195 200 205

Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val
 210 215 220

Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe His Val Asp Gln Val Thr Thr Val
 225 230 235 240

Lys Val Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys
 245 250 255

Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala
 260 265 270

Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu
 275 280 285

Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp
 290 295 300

Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr
 305 310 315 320

Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe
 325 330 335

Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys
 340 345 350

ES 2 817 417 T3

Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly
 355 360 365

Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile
 370 375 380

Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu
 385 390 395 400

Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr
 405 410 415

Gln Lys

<210> 5

<211> 21

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 5

Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val
 1 5 10 15

Asn Pro Thr Gln Lys
 20

15 <210> 6

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 6

ES 2 817 417 T3

Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val
1 5 10 15

Val Asn Pro Thr Gln Lys
20

REIVINDICACIONES

1. Un método de determinación de que una muestra de orina de una mujer embarazada contiene o no contiene proteínas mal plegadas, que comprende:
 - 5 (a) combinar una muestra de orina de una mujer embarazada con colorante rojo Congo que se une a proteínas mal plegadas y celulosa, produciendo así una disolución de orina y colorante;
 - (b) aplicar la disolución a una superficie celulósica que comprende grupos hidroxilo libres, en condiciones en las que el colorante se une a proteínas mal plegadas y celulosa, produciendo así un punto sobre la superficie;
 - (c) mantener el punto sobre la superficie en condiciones en las que ocurre la difusión de una disolución de orina que comprende proteínas mal plegadas y colorante; y
 - 10 (d) determinar que la muestra de orina contiene proteínas mal plegadas si difunde el colorante desde el punto sobre la superficie, o determinar que la muestra de orina no contiene proteínas mal plegadas si el colorante no difunde desde el punto sobre la superficie.
2. El método de la reivindicación 1, en donde: (a) la concentración del colorante en la disolución es 0,05 % a 0,2 %, siendo opcionalmente 0,1 %; y/o (b) la superficie celulósica que comprende grupos hidroxilo libres: (i) es una superficie de papel; y/o (ii) comprende además un reverso adhesivo.

15
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además:
 - (a) comparar el grado al que difunde la disolución de orina y el colorante desde el punto sobre la superficie con un control positivo, y determinar que la muestra de orina contiene proteínas mal plegadas si el grado al que difunde la disolución de orina y el colorante desde el punto sobre la superficie es comparable al control positivo;

20 y/o
 - (b) comparar el grado al que difunde la disolución de orina y el colorante radialmente desde el punto sobre la superficie con un control negativo, y determinar que la muestra de orina no contiene proteínas mal plegadas si el grado al que difunde la disolución de orina y el colorante desde el punto sobre la superficie es comparable al control negativo; y/o
 - 25 (c) las etapas de: (i) diluir una muestra adicional de orina de la mujer embarazada, produciendo así una muestra diluida de orina; (ii) combinar la muestra diluida de orina con colorante rojo Congo que se une a proteínas mal plegadas y celulosa, produciendo así una disolución de orina y colorante; (iii) aplicar la disolución de la etapa (ii) a una superficie celulósica que comprende grupos hidroxilo libres, en condiciones en las que el colorante se une a proteínas mal plegadas y celulosa, produciendo así un punto sobre la superficie; (iv) mantener el punto sobre la superficie de la etapa (iii) en condiciones en las que ocurre la difusión de una disolución de orina que comprende proteínas mal plegadas y colorante; y (v) determinar que la muestra diluida de orina contiene proteínas mal plegadas si difunde el colorante desde el punto sobre la superficie de la etapa (iv), o determinar que la muestra de orina no contiene proteínas mal plegadas si el colorante no difunde radialmente desde el punto sobre la superficie de la etapa (iv), opcionalmente en donde la muestra adicional de orina se diluye 5 veces a 15 veces; y/o
 - 30
 - 35 (d) diagnosticar que la mujer embarazada tiene preeclampsia, o que probablemente desarrollará preeclampsia, si la muestra de orina contiene proteínas mal plegadas.
4. Un método de determinación de que una muestra de orina de una mujer embarazada contiene o no contiene proteínas mal plegadas, que comprende:
 - 40 (a) combinar una muestra de orina de una mujer embarazada con un primer colorante rojo Congo que se une a proteínas mal plegadas y celulosa y un segundo colorante que es erio glucina, produciendo así una disolución de orina y dos colorantes;
 - (b) aplicar la disolución a una superficie celulósica que comprende grupos hidroxilo libres, en condiciones en las que el primer colorante se une a proteínas mal plegadas y celulosa, produciendo así un punto sobre la superficie;
 - 45 (c) mantener el punto sobre la superficie en condiciones en las que ocurre la difusión de una disolución de orina que comprende proteínas mal plegadas y colorante; y
 - (d) determinar que la muestra de orina contiene proteínas mal plegadas si el primer colorante y el segundo colorante difunden desde el punto sobre la superficie, o determinar que la muestra de orina no contiene proteínas mal plegadas si el segundo colorante, pero no el primer colorante, difunde desde el punto sobre la superficie.
- 50 5. El método de la reivindicación 4, que comprende además:

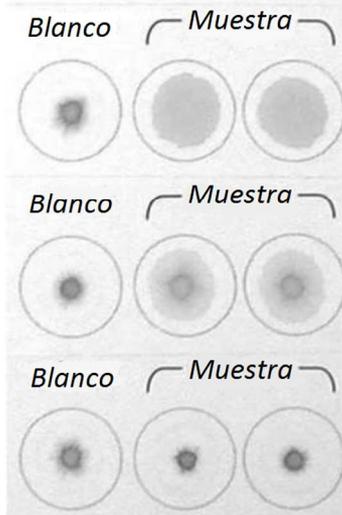
- (a) comparar el grado al que difunde la disolución de orina y los dos colorantes desde el punto sobre la superficie con un control positivo, y determinar que la muestra de orina contiene proteínas mal plegadas si el grado al que difunde la disolución de orina y los dos colorantes desde el punto sobre la superficie es comparable al control positivo; y/o
- 5 (b) comparar el grado al que difunde la disolución de orina y los dos colorantes desde el punto sobre la superficie con un control negativo, y determinar que la muestra de orina no contiene proteínas mal plegadas si el grado al que difunde la disolución de orina y los dos colorantes desde el punto sobre la superficie es comparable al control negativo; y/o
- 10 (c) adquirir una imagen del punto sobre la superficie, opcionalmente en donde la imagen se adquiere usando un teléfono móvil; y/o
- (d) cuantificar la diferencia entre el grado al que difunde el primer colorante desde el punto sobre la superficie y el grado al que difunde el segundo colorante desde el punto sobre la superficie, que opcionalmente comprende además calcular un coeficiente de correlación entre el grado al que difunde el primer colorante desde el punto sobre la superficie y el grado al que difunde el segundo colorante desde el punto sobre la superficie, por ejemplo, en donde el coeficiente de correlación se calcula usando un algoritmo; y/o
- 15 (e) las etapas de: (i) diluir una muestra adicional de orina de la mujer embarazada, produciendo así una muestra diluida de orina; (ii) combinar la muestra de orina con un primer colorante rojo Congo que se une a proteínas mal plegadas y celulosa y un segundo colorante que es erio glucina, produciendo así una disolución de orina y dos colorantes; (iii) aplicar la disolución de la etapa (ii) a una superficie celulósica que comprende grupos hidroxilo libres, en condiciones en las que el primer colorante se une a proteínas mal plegadas y celulosa, produciendo así un punto sobre la superficie; (iv) mantener el punto sobre la superficie de la etapa (iii) en condiciones en las que ocurre la difusión de una disolución de orina que comprende proteínas mal plegadas y colorante; y (v) determinar que la muestra diluida de orina contiene proteínas mal plegadas si el primer colorante y el segundo colorante difunden desde el punto sobre la superficie de la etapa (iv), o determinar que la muestra de orina no contiene proteínas mal plegadas si el segundo colorante, pero no el primer colorante, difunde desde el punto sobre la superficie de la etapa (iv), opcionalmente en donde la muestra adicional de orina se diluye 5 veces a 15 veces; y/o
- 20 (f) diagnosticar que la mujer embarazada tiene preeclampsia, o es probable que desarrollará preeclampsia, si la muestra de orina contiene proteínas mal plegadas.
- 25 6. El método de la reivindicación 4 o la reivindicación 5 en donde: (i) la concentración del primer colorante en la disolución es 0,05 % a 0,2 %, por ejemplo, que es 0,1 %; y/o (ii) la concentración del segundo colorante en la disolución es 0,05 % a 0,2 %, por ejemplo, que es 0,1 %; y/o (iii) la superficie celulósica que comprende grupos hidroxilo libres es una superficie de papel; y/o (iv) la superficie celulósica que comprende grupos hidroxilo libres comprende además un reverso adhesivo.
- 30 7. Un método de determinación de que una muestra de orina de una mujer embarazada contiene o no contiene proteínas mal plegadas, que comprende:
- 35 (a) combinar una muestra de orina de una mujer embarazada con colorante rojo Congo que se une a proteínas mal plegadas y celulosa, produciendo así una disolución de orina y colorante;
- (b) aplicar la disolución a una superficie celulósica que comprende grupos hidroxilo libres, en condiciones en las que el colorante se une a proteínas mal plegadas y celulosa, produciendo así un punto sobre la superficie;
- 40 (c) mantener el punto sobre la superficie en condiciones en las que ocurre la difusión de una disolución de orina que comprende proteínas mal plegadas y colorante; y
- (d) determinar que la muestra de orina contiene proteínas mal plegadas si es coloreada la disolución que pasa a través de la superficie, o determinar que la muestra de orina no contiene proteínas mal plegadas si es incolora la disolución que pasa a través de la superficie.
- 45 8. Un método de determinación de si una mujer embarazada tiene, o está en riesgo de, preeclampsia, comprendiendo el método:
- (a) combinar una muestra de orina de una mujer embarazada con rojo Congo, produciendo así una disolución de orina y rojo Congo;
- 50 (b) aplicar la disolución a una superficie celulósica que comprende grupos hidroxilo libres, produciendo así un punto sobre la superficie;
- (c) mantener el punto sobre la superficie en condiciones en las que ocurre la difusión de una disolución de orina que comprende colorante; y

(d) determinar que la mujer embarazada tiene, o está en riesgo de, preeclampsia si el rojo Congo se ha dispersado desde el punto sobre la superficie.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha difusión es radial.

FIG. 1

Etiquetas Easy Peel®
Plantilla Use Avery® 5160®



Características

**Caso 1: CRR 125 %
PEg, 30 sem => MIED**

**Caso 2: CRR 44 %
¿PE?, 36 sem => MIED**

**Caso 3: CRR 0 %
P-CRL, 28 sem => TD**

FIG. 2

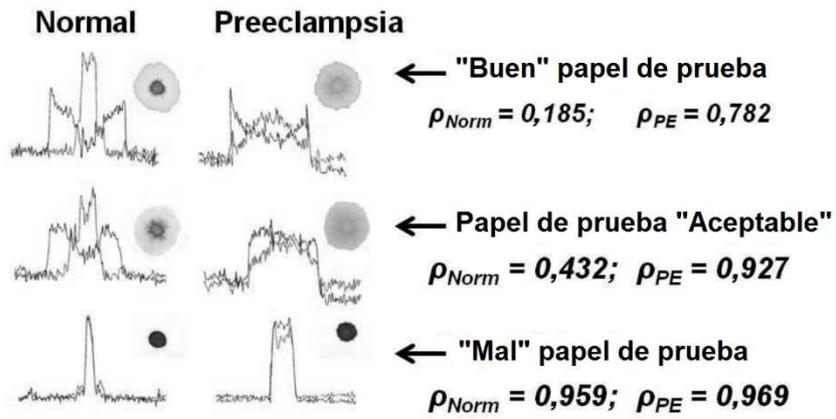


FIG. 3

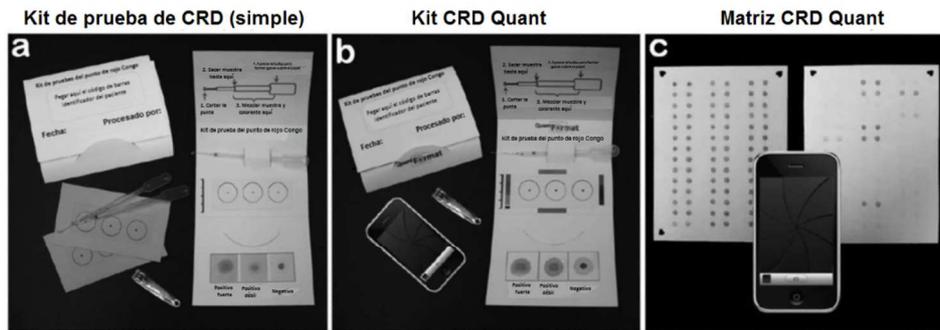
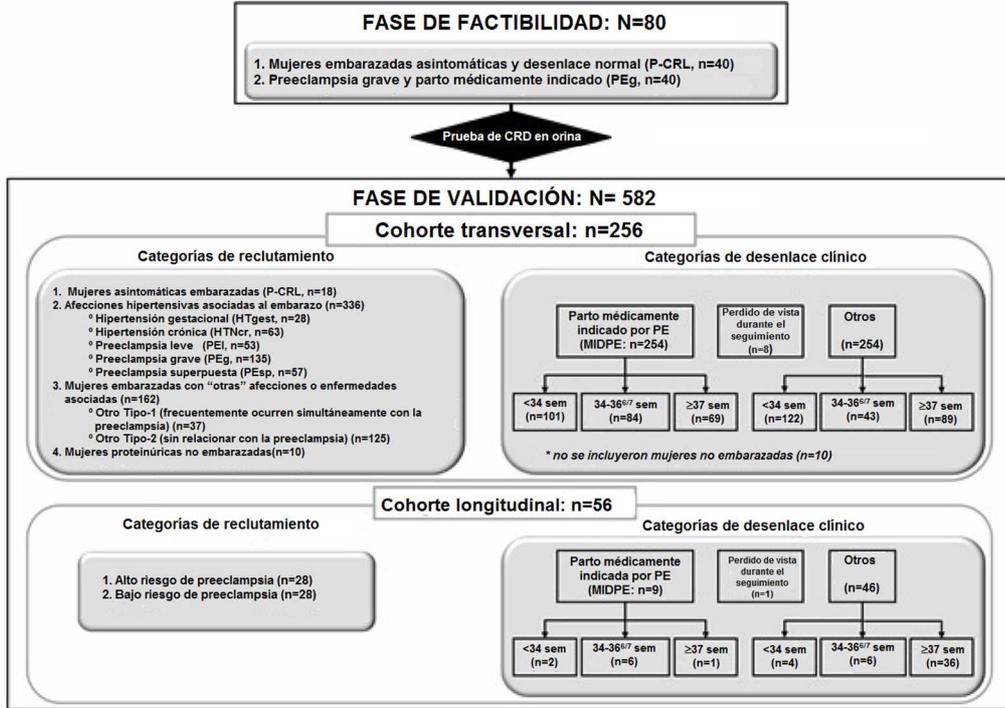


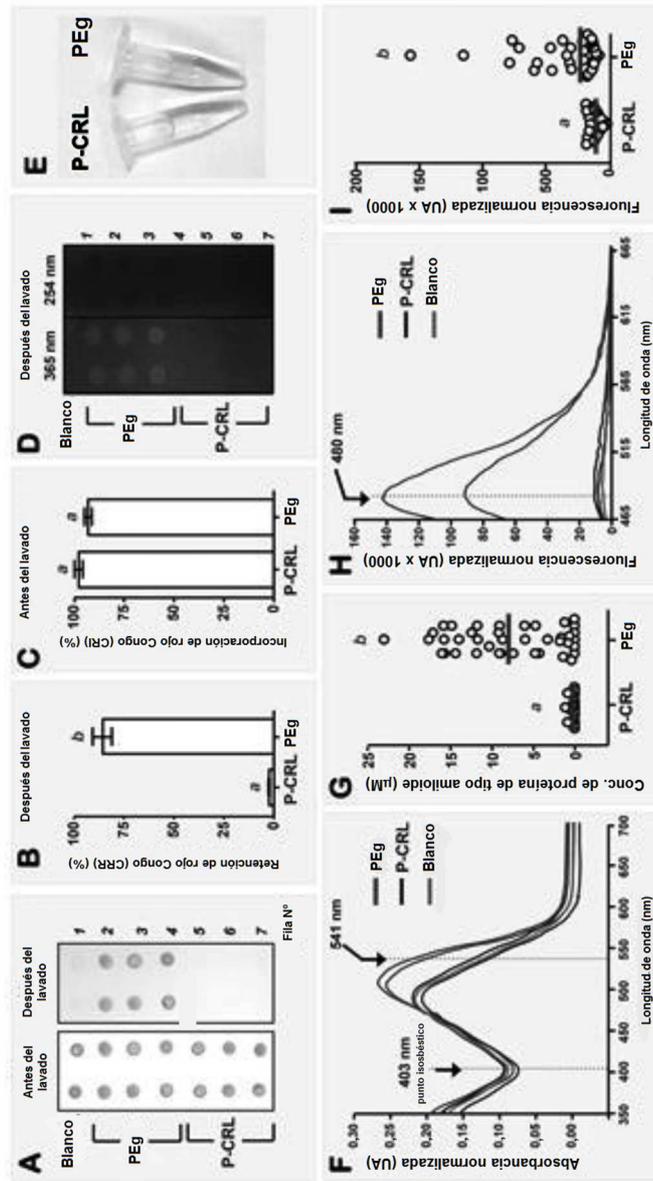
FIG. 4



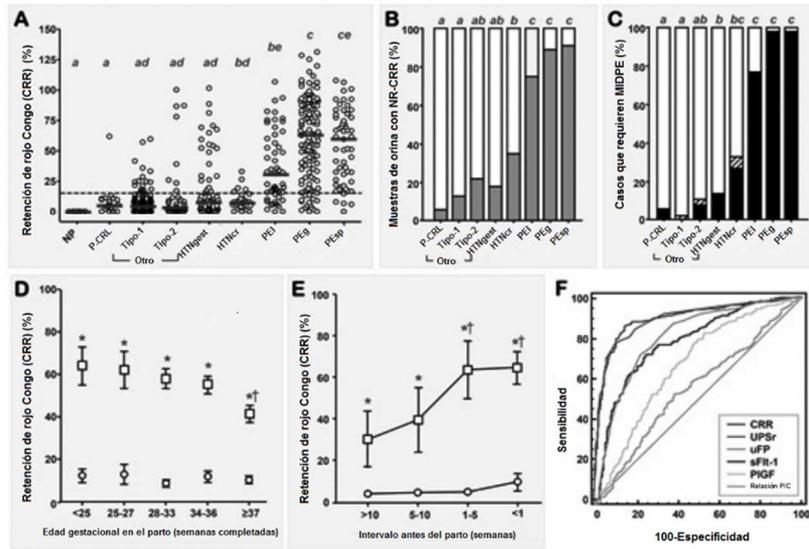
FIG. 5



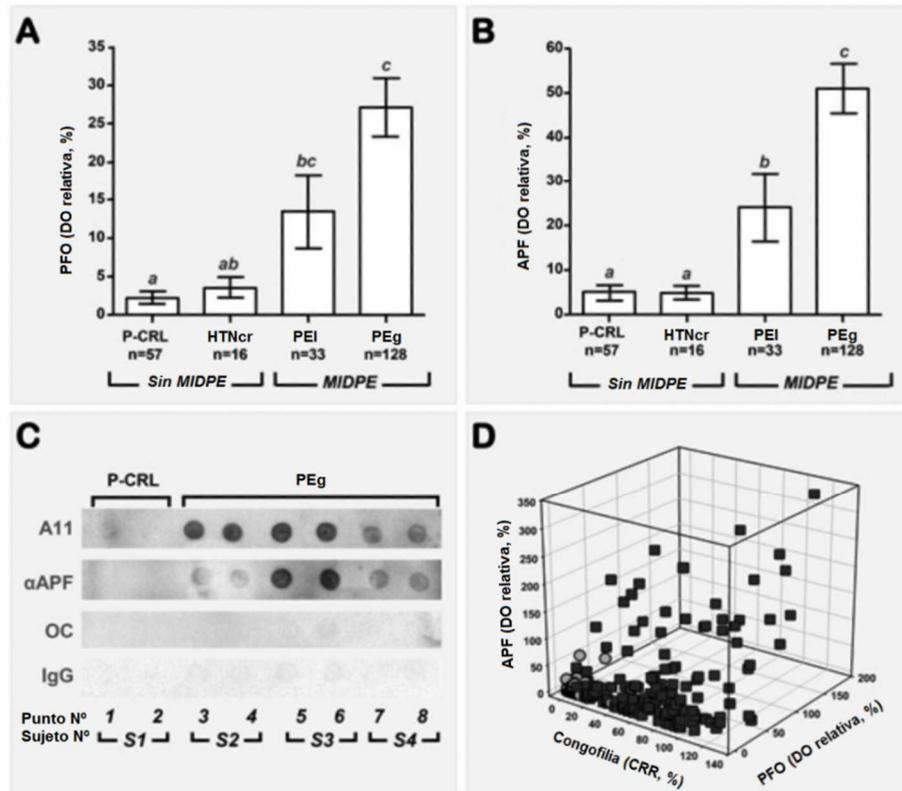
FIGS. 6A-6I



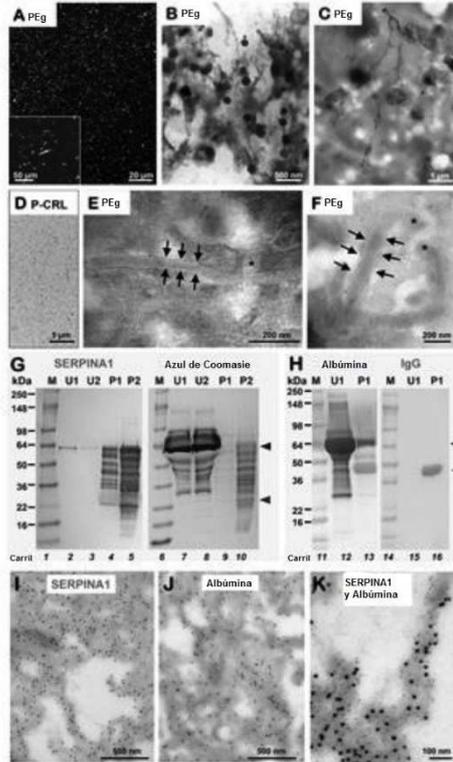
FIGS. 7A-7F



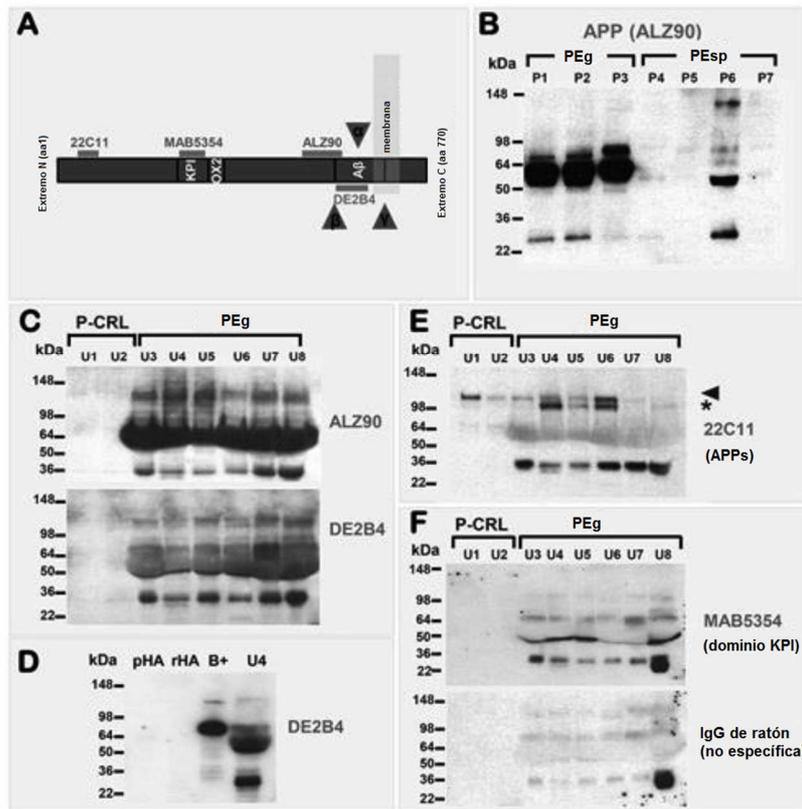
FIGS. 8A-8D



FIGS. 9A-9K



FIGS. 10A-10F



FIGS. 11A-11C

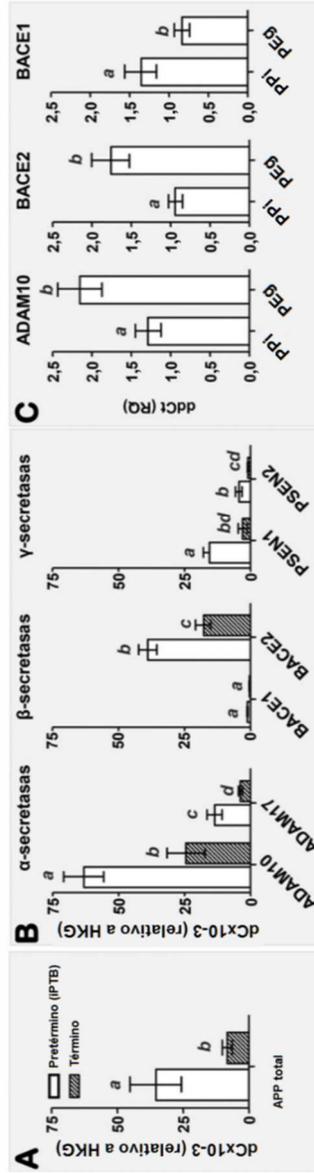
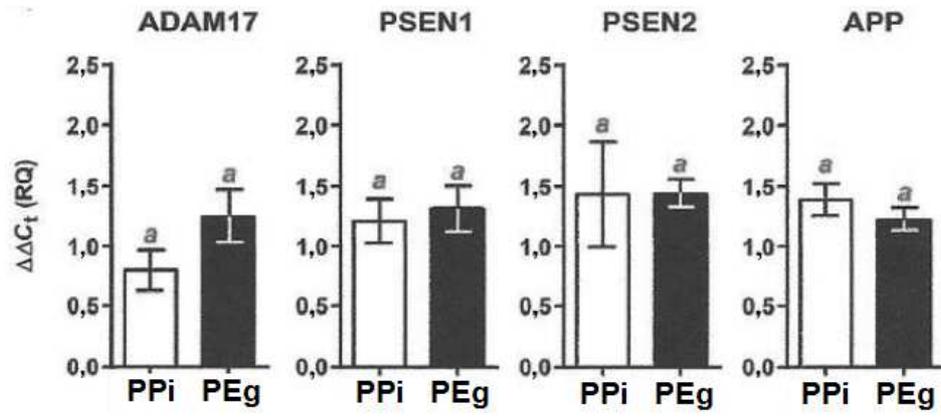


FIG. 11D



FIGS. 12A-12P

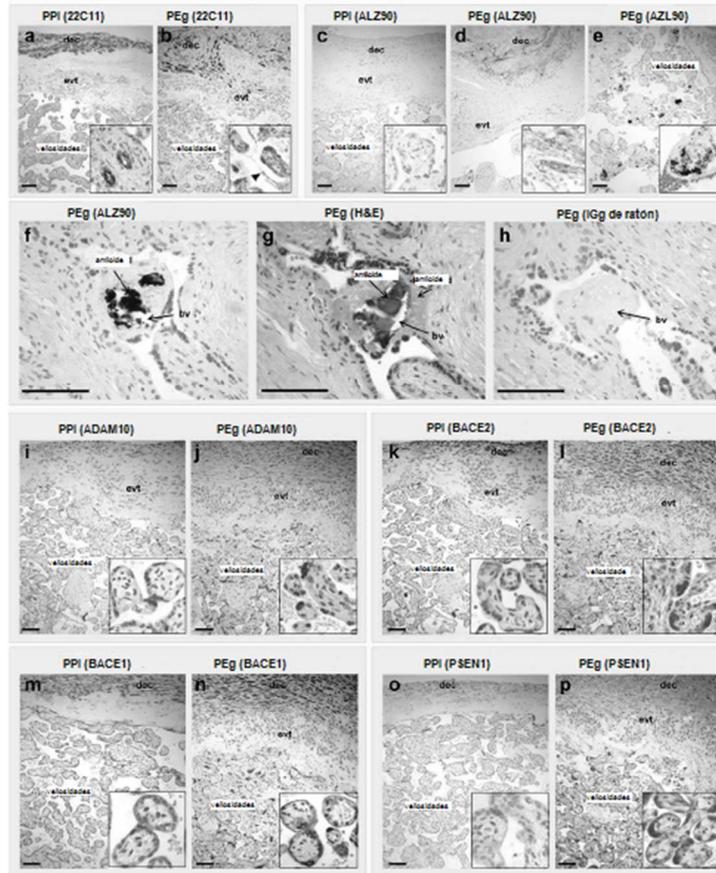


FIG. 13

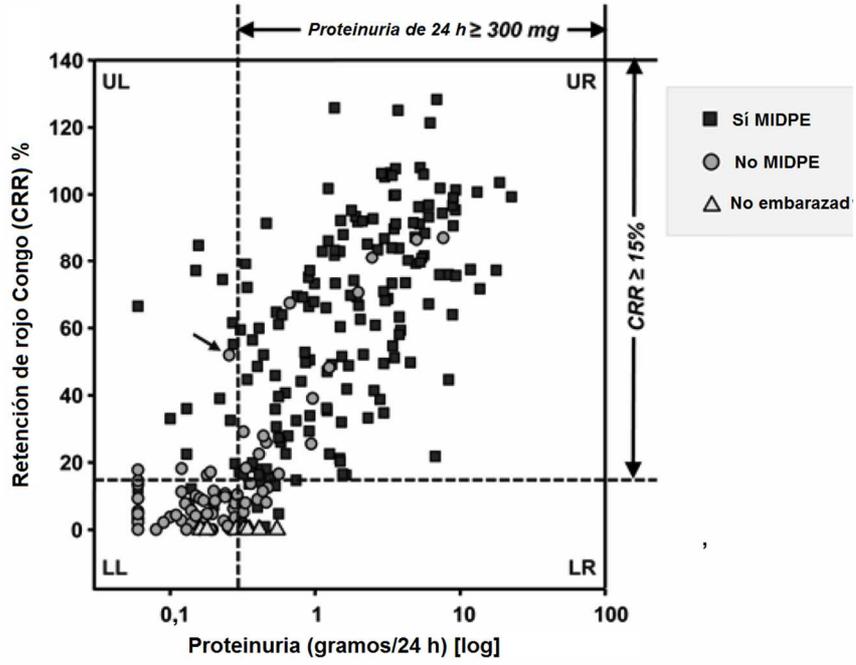
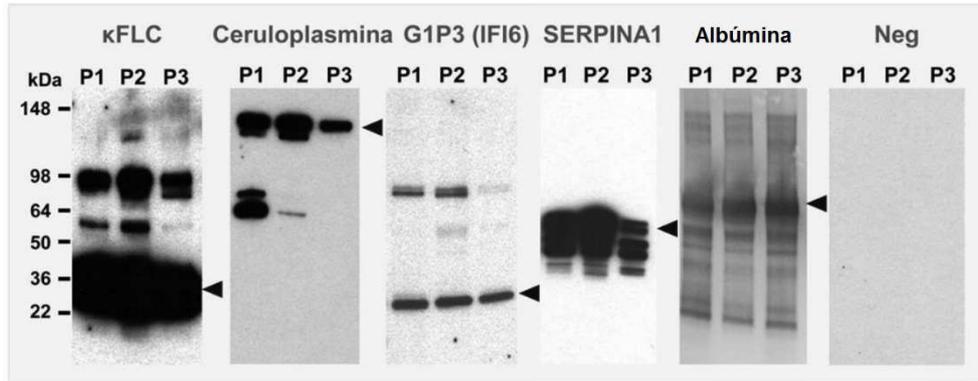
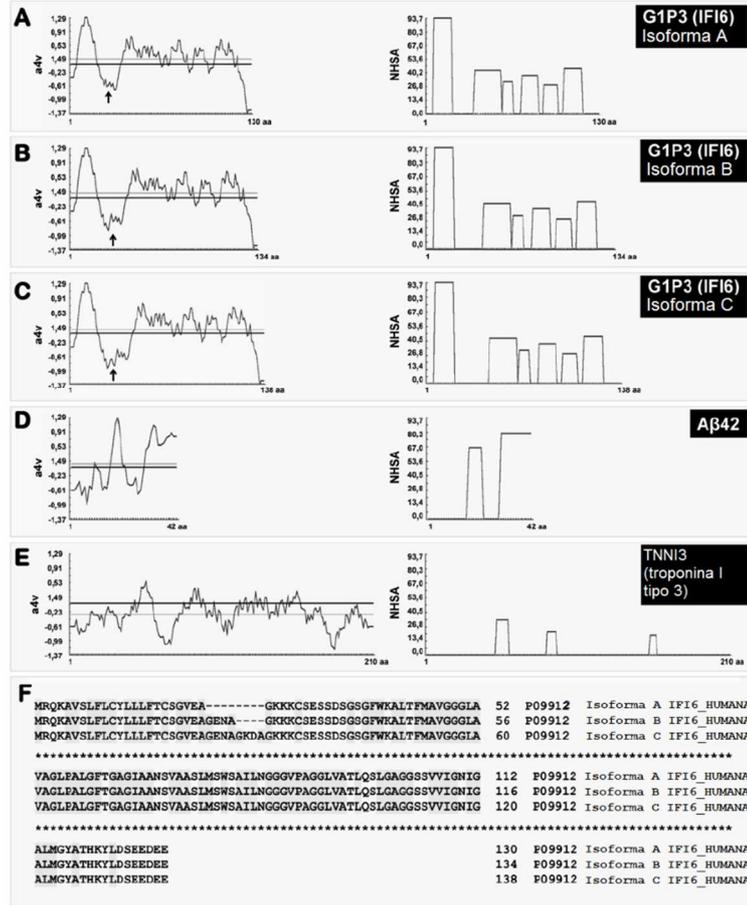


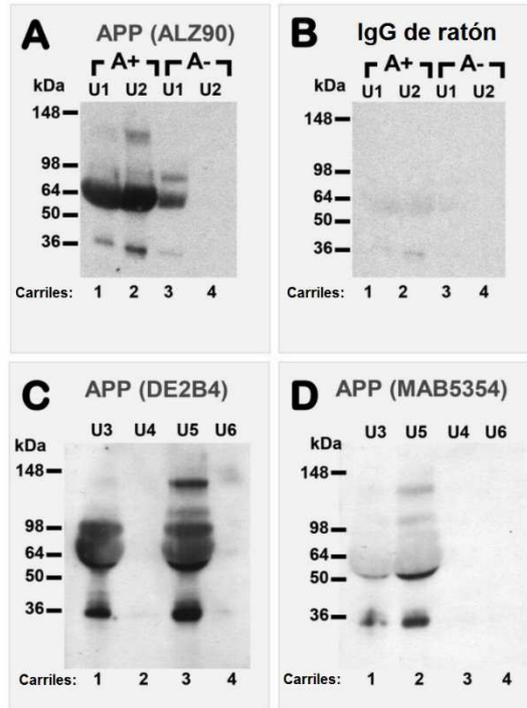
FIG. 14



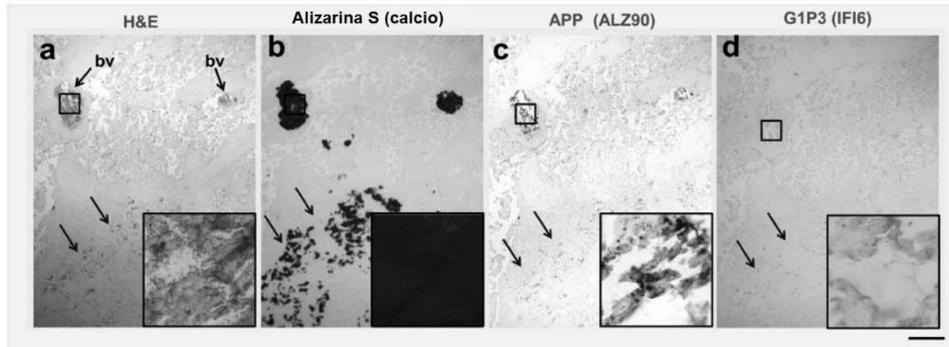
FIGS. 15A-15F



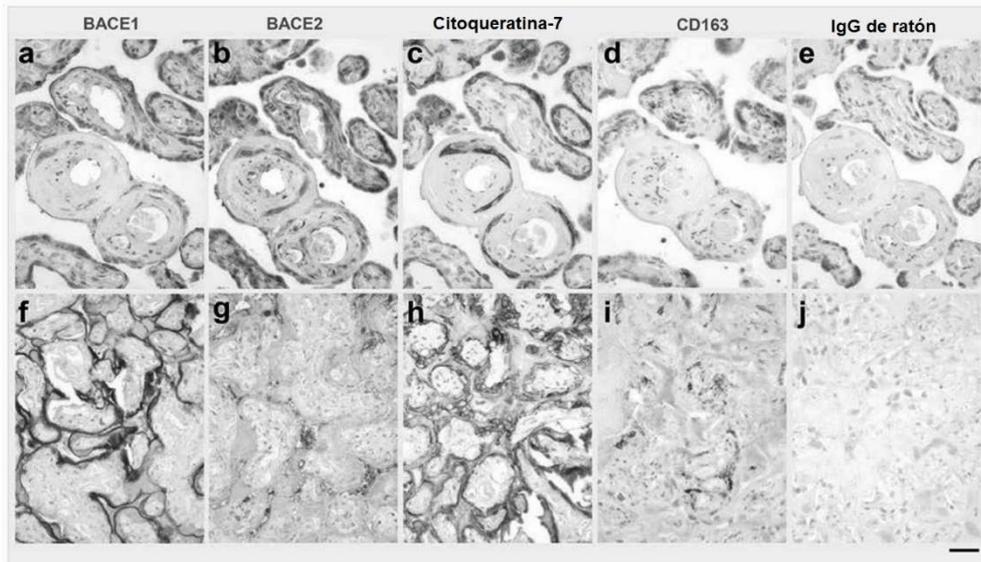
FIGS. 16A-16D



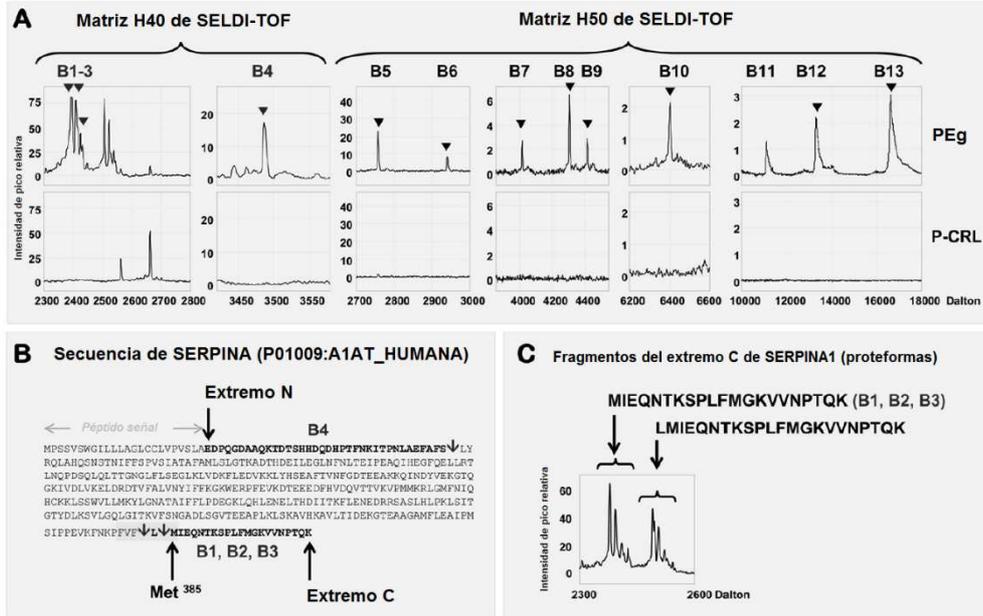
FIGS. 17A-17D



FIGS. 18A-18J



FIGS. 19A-19C



FIGS. 20A-20F

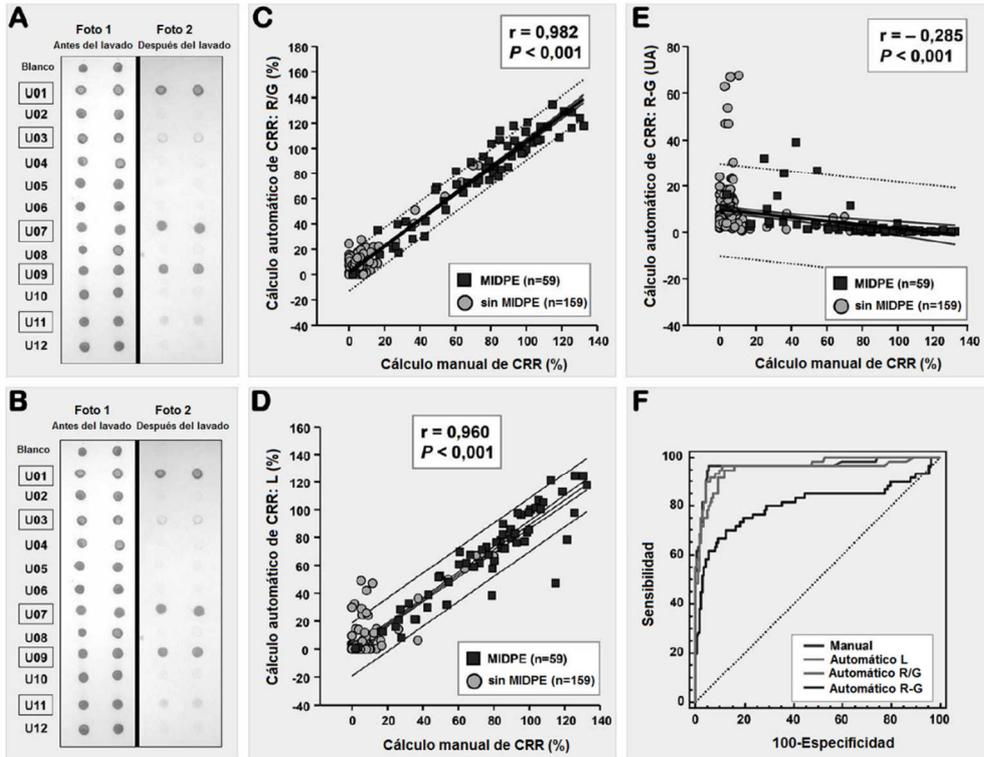


FIG. 21

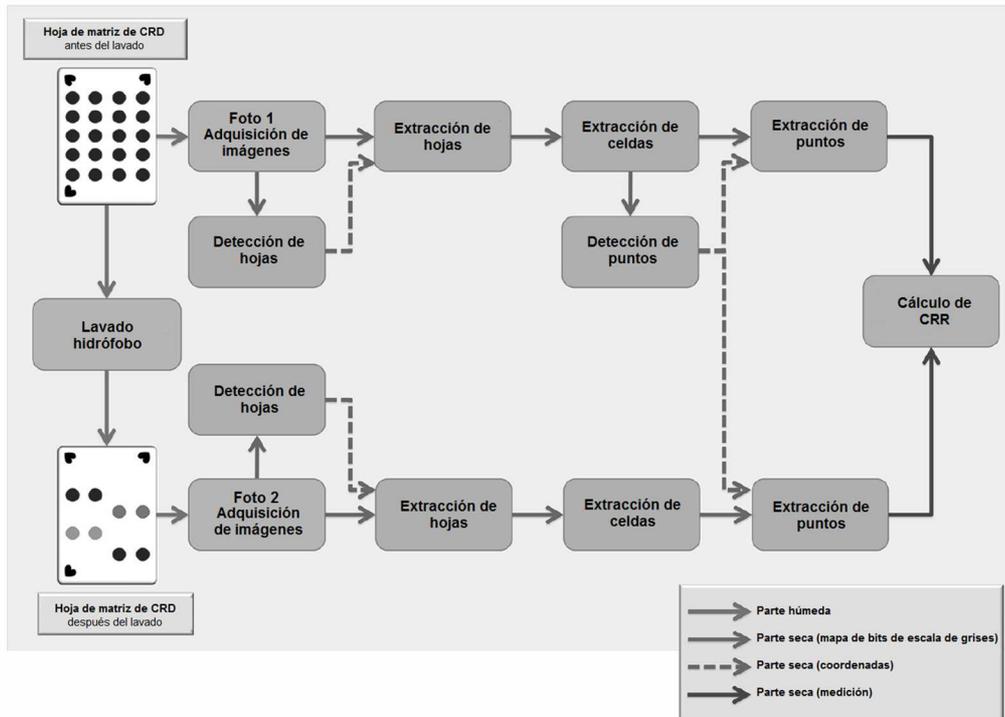


FIG. 23

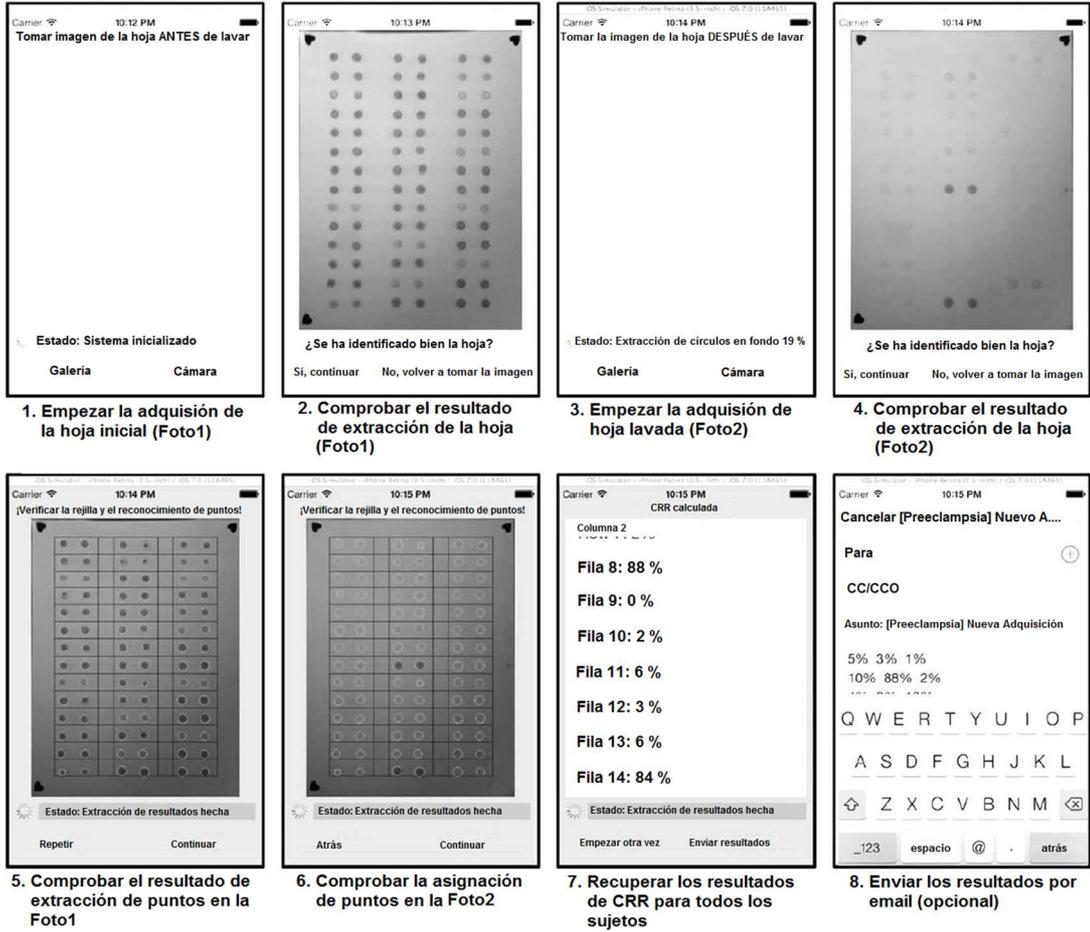
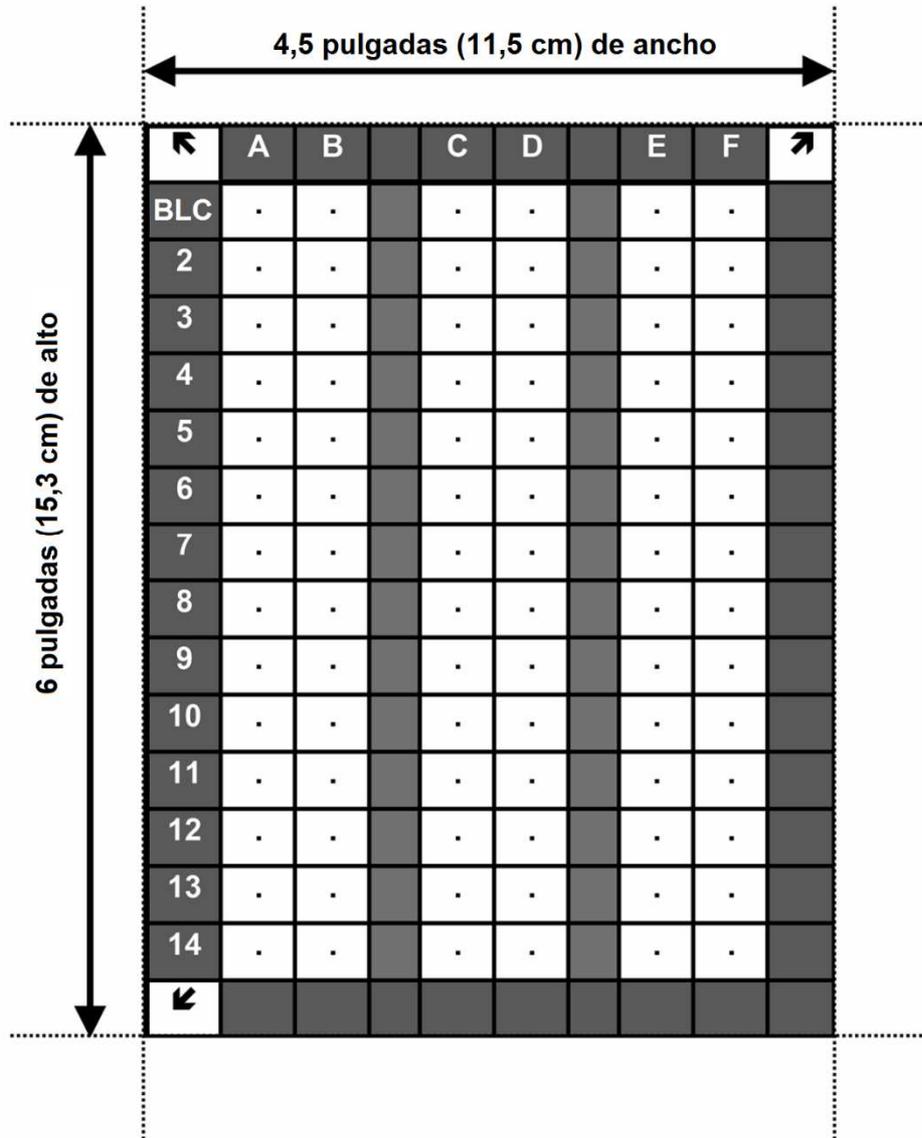
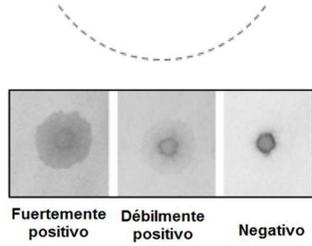
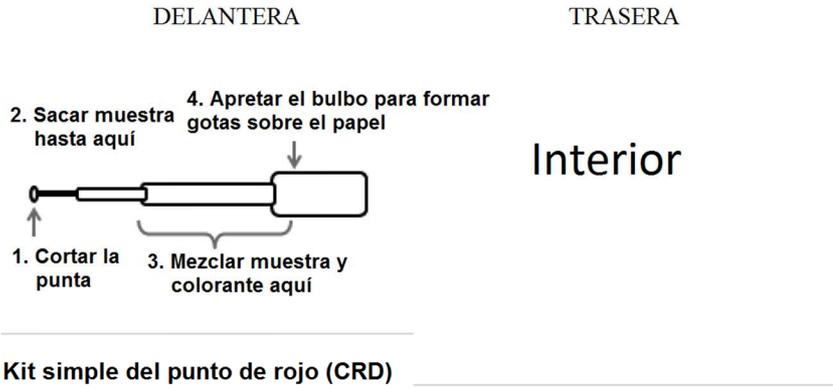


FIG. 24



FIGS. 25A-25B



Kit simple del punto de rojo (CRD)

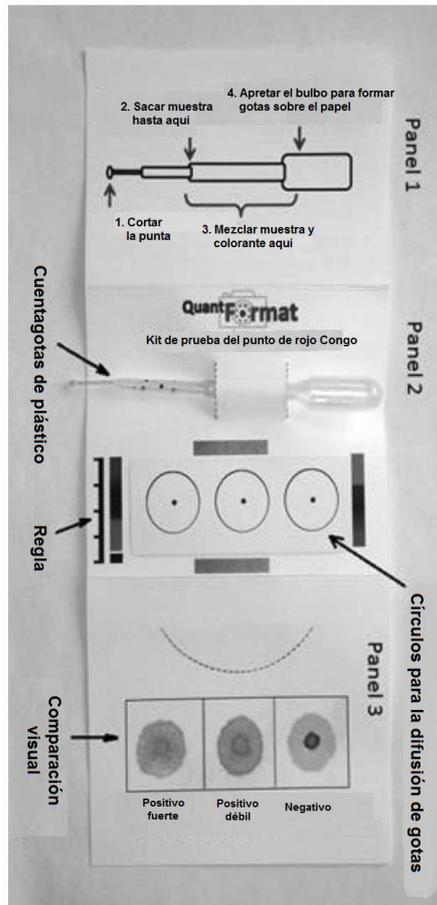
Pegar aquí el código de barras identificador

Fecha: Procesado por:

FIGS. 26A-26B

DELANTERA

TRASERA



Interior



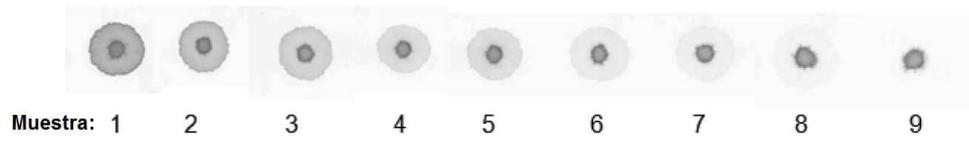
Kit Quant del punto de rojo (CRD)

Pegar aquí el código de barras identificador

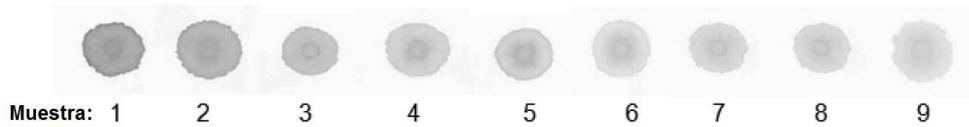
Fecha:

Procesado por:

FIGS. 27A-27B



(a) Difusión de las gotas de orina normal (relación creciente de CR/colorante alimentario de izquierda a derecha).



(b) Difusión de gotas de orina preeclámpticas (relación creciente de CR/colorante alimentario de izquierda a derecha en la misma relación que (a) anterior).

FIG. 28

