

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 440**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**G01N 33/74** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09757478 .4**  
96 Fecha de presentación: **29.05.2009**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2281203**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2011**

54 Título: **Marcador para fallo de injerto y mortalidad**

30 Prioridad:  
**04.06.2008 EP 08157595**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.05.2012**

73 Titular/es:  
**B.R.A.H.M.S. GmbH**  
**Neuendorfstr. 25**  
**16761 Berlin**

72 Inventor/es:  
**STRUCK, Joachim y**  
**BAKKER, Stephan J.L.**

74 Agente/Representante:  
**Curell Aguilá, Mireia**

**ES 2 380 440 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

Marcador para fallo de injerto y mortalidad.

### 5 Campo de la invención

El objeto de la presente invención es un biomarcador para fallo de injerto y/o la mortalidad después del trasplante de órganos. Se descubrió que la procalcitonina (PCT) es un marcador útil para el pronóstico de la estratificación del riesgo para fallo de injerto y/o de la mortalidad de un paciente que ha recibido un trasplante de órgano y el seguimiento y la orientación terapéutica de dicho paciente.

### 10 Antecedentes de la invención

La disfunción crónica del trasplante (DCT) después del trasplante renal se caracteriza por una disminución de la función renal y proteinuria.

La perduración de un año del trasplante tras el trasplante renal ha seguido mejorando desde aproximadamente el 40% en la década de los 70 hasta más del 90% actualmente (Merville P. Combating chronic renal allograft dysfunction: optimal immunosuppressive regimens, *Drugs* 2005; 65(5):615-631: <http://www.unos.org> 2008, Ref. Type:Generic). La perduración del trasplante a largo plazo, sin embargo, no resulta paralela a esta mejora. Aproximadamente la mitad de todos los aloinjertos renales cadavéricos se pierden en 10 a 12 años después del trasplante (Hariharan S., Johnson C., Bresnahan B., Taranto S., McIntosh M., Stablein D. Improved Graft Survival after Renal Transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N. Engl. J. Med.* 2000; 342(9):605-612). Una causa principal es el fallo de injerto reciente asociado a la disfunción del trasplante crónico (DCT) (Kreis H.A., Ponticelli C. Causes of late renal allograft loss, chronic allograft dysfunction, death, and other factors. *Transplantation* 2001; 71(11 Suppl):SS5-SS9). Actualmente, no existen biomarcadores buenos para predecir el desarrollo del DCT (Marsden P.A., Predicting outcomes after renal transplantation-new tolls and old tools. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349(2):182-184).

Existe una idea incipiente en la comunidad de trasplantes renales que consiste en la patogenia de DCT incluye la inflamación (Kreis H.A., Ponticelli C. Causes of late renal allograft loss: chronic allograft dysfunction death, and other factors. *Transplantation* 2001;71 (11 Suppl.):SS5-SS9, Vázquez M.A., Jeyarajah D.R., Kiehl M.L., Lu C.Y. Long-term outcomes of renal transplantation: a result of the original endowment of the donor kidney and the inflammatory response to both alloantigens and injury. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2000; 9(6):643-648). Se ha sugerido la procalcitonina (PCT) como biomarcador para infecciones bacterianas y septicemia (Assicot M., Gendrel D., Carsin H., Raymond J., Guibaud J., Bohuon C., High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet* 1993; 341(8844):515-518; Becker K.L., Nylén E.S., White J.C., Müller B., Snider R.H., Jr. Clinical review 167; Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89(4):1512-1525). Recientemente, se ha descubierto que las células parenquimales estimuladas por macrófagos activados en tejidos infectados mejor que las células mononucleares de la sangre periférica subyacen muy concentraciones muy altas de PCT circulante durante la septicemia (Linscheid P., Seboek D., Schaer D.J., Zulewski H., Keller U., Müller B., Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes. *Crit. Care Med.* 2004; 32(8):1715-1721). Los estudios en animales y seres humanos han demostrado que en la septicemia, las células parenquimales (incluyendo las del riñón, hígado, pulmón, músculos y adipocitos) son la fuente principal de PCT circulante (Linscheid P., Seboek D., Schaer D.J., Zulewski H., Keller U., Müller B., Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes. *Crit. Care Med.* 2004; 32(8):1715-1721; Linscheid P., Seboek D., Nylén ES *et al.* In vitro and in vivo calcitonin I gene expression in procalcitonin and calcitonin gene expression in parenchymal cells: a novel product of human adipose tissue. *Endocrinology* 2003; 144(12):5578-5584; Müller B., White J.C., Nylén E.S., Snider R.H., Becker K.L., Habener J.F. Ubiquitous expression of the calcitonin-I gene in multiple tissues in response to sepsis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86(1):396-404).

Se ha descubierto inesperadamente que PCT es un pronóstico independiente para el fallo de injerto tardío y/o la mortalidad. Por consiguiente, es un nuevo biomarcador prometedor para la pronóstico de pérdida de trasplante (GL) y/o la mortalidad.

### 55 Descripción de la invención

La invención en su alcance más amplio está definida por las reivindicaciones independientes 1, 18 y 19:

60 1. Procedimiento para la predicción o la estratificación del riesgo de fallo de injerto y/o la mortalidad de un paciente que ha recibido un trasplante de órgano y el seguimiento y las orientaciones terapéuticas de dicho paciente, que comprende la determinación de procalcitonina o fragmentos de la misma con por lo menos 12 aminoácidos en la muestra extraída de dicho paciente, en la que el nivel de procalcitonina asociada a un aumento de riesgo de fallo de injerto y/o mortalidad es superior a un punto de corte, que es inferior a 0,1 ng/ml en el que la concentración en el paciente de procalcitonina no está influida ya por el traumatismo quirúrgico causado por el trasplante de órgano, en



Según la presente invención dicha muestra se selecciona de entre un grupo que comprende una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre o fracciones de las mismas.

5 El procedimiento según la presente invención es un procedimiento para el pronóstico del fallo de injerto de larga duración, por el cual larga duración significa un periodo de más de un año, preferentemente hasta 5 años. El procedimiento según la presente invención es también un procedimiento de pronóstico del fallo de injerto a corto plazo, en el que corto plazo significa un periodo de una semana hasta un año.

10 En una forma de realización preferida del procedimiento según la presente invención la concentración de procalcitonina puede estar correlacionada preferentemente con la predicción o estratificación del riesgo de fallo de injerto y/o la mortalidad por un procedimiento que puede seleccionarse de entre las alternativas siguientes:

- 15 ▪ correlación con respecto a la media de la concentración de procalcitonina en un conjunto de muestras predeterminadas,
- correlación con respecto a los cuantiles (por ejemplo terciles) de la concentración de procalcitonina en un conjunto de muestras predeterminadas, y
- 20 ▪ correlación con un modelo matemático, tal como por ejemplo la Regresión de Cox.

Un experto en la materia apreciará que éste listado de procedimientos no resulta exhaustivo. El experto en la materia puede conocer más procedimientos.

25 Según la presente invención la concentración de procalcitonina asociada a un aumento del riesgo de fallo de injerto y/o la mortalidad es superior a la concentración media de la población normal. La concentración media de la población normal se ha determinado anteriormente que es 0,0127 ng/ml (Morgenthaler N.G., Struck J., Fischer-Schulz C., Seidel-Mueller E., Beier W., Bergmann A. Detection of procalcitonin (PCT) in healthy controls and patients with local infection by sensitive ILMA. *Clin Lab.* 2002; 48(5-6):263-70).

30 Preferentemente, la concentración de procalcitonina asociada a un aumento de riesgo del fallo de injerto y/o la mortalidad es superior a la media de la población normal (0,0127 ng/ml) pero inferior a 0,1 ng/ml, preferentemente inferior a 0,08 ng/ml, más preferentemente inferior a 0,05 ng/ml, aún más preferentemente inferior a 0,025 ng/ml. Esto significa que el valor de punto de corte preferido por encima del cual la concentración de procalcitonina en la muestra de un paciente es indicativo de un aumento de riesgo del fallo de injerto y/o de mortalidad en el paciente es inferior a 0,1 ng/ml, preferentemente inferior a 0,08 ng/ml, más preferentemente inferior a 0,05 ng/ml, aún más preferentemente inferior a 0,025 ng/ml, pero por encima de la media de la población normal (0,0127 ng/ml). Las concentraciones de procalcitonina superiores a 0,1 ng/ml o 0,25 ng/ml se utilizan como punto de corte para diagnosticar infecciones bacterianas, que requieren tratamiento antibiotico (Christ-Crain M., Jaccard-Stolz D., Bingisser R., Gencay M.M., Huber P.R., Tamm M., Müller B. Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single-blinded intervention trial. *Lancet* 2004 Feb 21; 363(9409):600-7). Un valor de punto de corte adecuado determinado por análisis de COR que optimiza la sensibilidad y especificidad para el pronóstico de un aumento del riesgo de fallo de injerto es de 0,029 ng/ml y para la mortalidad es de 0,028 ng/ml (tabla 4). El experto en la materia sabe que el valor de punto de corte exacto depende de varios factores. De este modo, el experto en la materia sabe como definir exactamente una concentración de punto de corte unitaria para la procalcitonina, por encima de la cual las concentraciones están asociadas a dicho aumento de riesgo, ya que los valores de punto de corte dependen de la calibración del ensayo y del tipo de modelo matemático utilizado para describir dicha asociación; es decir si la población destinataria está dividida de acuerdo con la concentración de procalcitonina en dos subgrupos de tamaño idéntico, la concentración media resultante podría representar un punto de corte útil; alternativamente la misma población puede estar dividida en tres subgrupos de tamaño idéntico, y la concentración de procalcitonina que separa el tercil mayor del promedio podría representar un valor de punto de corte útil, que es diferente, sin embargo, del valor de punto de corte que representa el nivel medio de la población. Otros modelos matemáticos pueden aparecer con otras concentraciones de procalcitonina de punto de corte útiles.

55 En una forma de realización preferida del procedimiento de la presente invención, se determina y se utiliza además la concentración de uno o más marcadores adicionales o parámetros clínicos, que están asociados a un aumento de riesgo de fallo de injerto y/o mortalidad.

60 En una forma de realización preferida dichos uno o más parámetros clínicos se seleccionan de entre el grupo que comprende: edad, sexo, antecedentes de las enfermedades, en particular de la diabetes, el índice de masa corporal, la predisposición genética/antecedentes familiares, antecedentes étnicos, hábitos que afectan a dicha propensión, tales como hábito de fumar, consumo de alcohol o alimentación.

65 En una forma de realización preferida dicho o dichos marcadores adicionales se seleccionan de entre el grupo que comprende: marcadores para la función renal, marcadores para la inflamación y/o marcadores asociados a la regulación cardiovascular y osmótica.

En una forma de realización preferida de dicho marcador para la función renal se selecciona de entre el grupo que comprende depuración de creatinina, proteinuria y marcadores lipídicos. Dichos marcadores lipídicos pueden ser HDL y/o triglicéridos.

5 En una forma de realización preferida dicho marcador de inflamación es la proteína C reactiva.

En una forma de realización preferida dicho marcador asociado a la regulación cardiovascular y osmótica se selecciona de entre un grupo que comprende proBNP o fragmentos de los mismos de por lo menos 12 aminoácidos incluyendo BNP y NT-proBNP, proANP o fragmentos de los mismos de 12 aminoácidos por lo menos incluyendo NT-proANP y MR-proADM, proAdrenomedulina o fragmentos de la misma de 12 aminoácidos por lo menos incluyendo Adrenomedulina, PAMP y MR-proADM, proEndotelina o fragmentos de los mismos de 12 aminoácidos por lo menos incluyendo Endotelina-1, big-Endotelina-1, CT-proET-1 y NT-proET-1, proVasopresina o fragmentos de los mismos de por lo menos 8 aminoácidos incluyendo Vasopresina, Copeptina y Neurofisiina 2.

15 El objeto de la presente invención es una forma de realización de un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- 20 ▪ tomar una muestra de un paciente después del trasplante renal,
- determinar la concentración de procalcitonina o de fragmentos de la misma con 12 aminoácidos por lo menos en una muestra extraída de dicho paciente, y
- 25 ▪ correlacionar la concentración de procalcitonina o de fragmentos de la misma con 12 aminoácidos por lo menos con un pronóstico.

En una forma de realización preferida del procedimiento según la presente invención la concentración de procalcitonina o de fragmentos de la misma con 12 aminoácidos por lo menos se determina con un análisis de diagnóstico.

30 En una forma de realización preferida se determina la concentración de PCT circulante en estado estacionario.

El análisis de diagnóstico utilizado en el contexto de la presente invención puede ser de cualquier tipo aplicado en el campo de los diagnósticos, incluyendo pero sin limitarse a los métodos analíticos basados en reacciones enzimáticas, luminiscencia, en particular fluorescencia o radioquímicos. Los procedimientos de detección preferidos comprenden formatos de análisis rápido incluyendo inmunocromatografía, radioinmunoanálisis, inmunoanálisis de quimioluminiscencia y fluorescencia, análisis de inmunotransferencia, inmunoanálisis con enzima ligada (ELISA), chips en bolitas a base de luminex y análisis de microchip de proteínas. Los tipos de análisis pueden estar basados en placas de microvaloración, basados en chip, basados en bolitas, en los que las proteínas del biomarcador pueden estar unidas a la superficie o en solución. Los ensayos pueden ser ensayos homogéneos o heterogéneos, ensayos en sándwich, ensayos competitivos y no competitivos (*The Immunoassay Handbook*, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3ª Edición (Mayo 2005), ISBN-13:978-0080445267; Hultschig C. *et al.*, *Curr Opin Chem Biol.* 2006 Feb; 10(1):4-10, PMID: 16376134).

45 En el contexto de la presente invención, las moléculas de captura utilizadas en un ensayo de diagnóstico pueden seleccionarse de entre el grupo que comprende una molécula de ácido nucleico, una molécula de carbohidrato, una molécula de APN, una proteína, un anticuerpo, un péptido o una glucoproteína. Preferentemente, las moléculas de captura son anticuerpos, incluyendo los fragmentos de los mismos con suficiente especificidad para una diana, e incluyendo anticuerpos recombinantes, así como derivados modificados química o bioquímicamente de dichos anticuerpos o fragmentos derivados de la cadena variables con una longitud de 12 aminoácidos por lo menos de la misma.

Según una forma de realización especialmente preferida el ensayo de diagnóstico para procalcitonina o de los fragmentos de la misma con 12 aminoácidos por lo menos es ultrasensible y tiene una sensibilidad de análisis funcional (definida como la concentración más pequeña que puede determinarse con un coeficiente de variación (CV) del interanálisis máximo del 20%) inferior a 0,1 ng/ml, preferentemente inferior a 0,08 ng/ml, más preferentemente inferior a 0,05 ng/ml, aún más preferentemente inferior a 0,025 ng/ml.

60 El objeto de la invención es además la utilización de la medición de procalcitonina o fragmentos de la misma con 12 aminoácidos por lo menos para la predicción de la estratificación del riesgo de fallo de injerto y/o la mortalidad del paciente que ha recibido un trasplante de órgano y el seguimiento y las orientaciones terapéuticas de dicho paciente.

El objeto de la invención es además la utilización de un inmunoanálisis que tiene una sensibilidad del análisis (definida como la concentración más pequeña que puede determinarse con un CV de interanálisis máximo del 20%) inferior a 0,1 ng/ml, más preferentemente inferior a 0,05 ng/ml, aún más preferentemente inferior a 0,025 ng/ml, para la predicción o la estratificación del riesgo de fallo de injerto y/o la mortalidad de un paciente que ha recibido un

trasplante de órgano y el seguimiento y las orientaciones terapéuticas de dicho paciente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la terminología tal como “marcador”, “marcador de pronóstico” o “biomarcador” o “marcador biológico” se utilizan indistintamente y se refieren a parámetros biológicos mensurables y cuantificables (por ejemplo, concentración específica de enzimas, concentración específica de hormonas, distribución del fenotipo de genes específicos en una población, presencia de sustancias biológicas) que sirven como índices para las evaluaciones relacionadas con la salud y la fisiología, tales como el riesgo de enfermedad, trastornos psiquiátricos, exposición medioambiental y sus efectos, diagnóstico de la enfermedad, procesos metabólicos, drogadicción, embarazo, desarrollo de la estirpe celular, estudios epidemiológicos, etc. Además, un biomarcador se define como una característica que se mide objetivamente y se evalúa como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacológicas de una intervención terapéutica. Un biomarcador puede medirse en una biomuestra (como sangre, orina o ensayo tisular), y puede ser un registro obtenido de una persona (presión sanguínea, ECG u Holter), o puede ser un análisis de detección por la imagen (ecocardiograma o exploración CT) (Vasan *et al.* 2006, *Circulation* 113:2335-2362).

Los biomarcadores pueden indicar una variedad de características de salud o de enfermedad, incluyendo el nivel o el tipo de exposición a un factor medioambiental, la sensibilidad genética, las respuestas genéticas a las exposiciones, los biomarcadores de enfermedad subclínica o clínica, o indicadores de respuesta a la terapia. Por lo tanto, una manera simple de pensar en biomarcadores es como indicadores del rastro de la enfermedad (factor de riesgo o biomarcador de riesgo), estado de la enfermedad (preclínica o clínica) o tasa de enfermedad (evolución). Por consiguiente, los biomarcadores pueden clasificarse como biomarcadores de antecedentes (identificando el riesgo de desarrollar una enfermedad), biomarcadores de identificación (identificación de una enfermedad subclínica), biomarcadores de diagnóstico (que reconocen la enfermedad declarada), biomarcadores de extensión (que clasifican la gravedad de la enfermedad) o biomarcadores de pronóstico (que predicen el transcurso futuro de la enfermedad, incluyendo las recaídas y la respuesta a la terapia, y haciendo el seguimiento de la eficacia de la terapia). Los biomarcadores pueden servir también como puntos sustitutos finales. Un punto sustituto final es el que puede utilizarse como resultado en los ensayos clínicos para evaluar la calidad y eficacia de las terapias en lugar de la medición del verdadero resultado de interés. El principio subyacente es que las alteraciones en el punto sustituto final rastrean estrechamente con cambios en el verdadero resultado de interés. Los puntos sustitutos finales tienen la ventaja de que pueden ser reunidos en un marco de tiempo más breve y con menos gastos que los puntos finales tales como la morbilidad y mortalidad, que requieren grandes pruebas clínicas para la evaluación. Los valores adicionales de los puntos sustitutos finales incluyen el hecho de que son más próximos a la exposición/intervención de interés y pueden ser más fáciles de relacionar etiológicamente que los episodios clínicos más distantes. Una ventaja importante de los puntos sustitutos finales es que el resultado clínico de interés está influido por numerosos factores (además del punto sustituto final), el residual confuso puede reducir la validez del punto sustituto final. Se ha sugerido que la validez de un punto sustituto final es mayor si puede explicar por lo menos el 50% del efecto de una exposición o intervención en el resultado de interés. Por ejemplo, un biomarcador puede ser una molécula de proteína, de péptido o de ácido nucleico.

Los marcadores moleculares preferidos son marcadores para la función renal, tales como los marcadores de depuración de creatinina, de proteinuria y de lípidos, tales como colesterol total, colesterol lipoproteína de alta densidad, colesterol lipoproteína de baja densidad y triglicéridos; marcadores de inflamación, tales como por ejemplo, proteína C reactiva o marcadores asociados a la regulación cardiovascular y osmótica, tales como por ejemplo ANP, BNP, Adrenomedulina, Endotelina-1, Vasopresina incluyendo sus correspondientes precursores y fragmentos de los mismos. De este modo, la depuración de creatinina, denominada también índice de depuración de creatinina (CCr) es el volumen de plasma sanguíneo que es depurado de creatinina por unidad de tiempo. Proteinuria significa la presencia de un exceso (es decir, más de 2 mg/ml de albúmina y/o creatinina) de proteínas de suero en la orina.

En el contexto de la presente invención la expresión “población normal” se refiere a la parte sana de la población global. Sanos a éste respecto, son los individuos que no están afectados por una enfermedad mediante la cual el nivel de uno de los marcadores mencionados en la presente memoria está alterado o sino afectado.

En el contexto de la presente invención la expresión “fallo de injerto” se refiere al rechazo, rotura o si no disfunción de un tejido trasplantado, en el que el tejido trasplantado es por ejemplo tejido trasplantado por intervención quirúrgica.

En el contexto de la presente invención expresiones tales como “la concentración de procalcitonina no está influenciada ya por el traumatismo quirúrgico originado por el trasplante de órgano” se refiere a un estado en el que, en el transcurso normal del tratamiento de trasplante, en pacientes de trasplante, por lo general la concentración de procalcitonina que normalmente es elevada directamente después del trasplante del órgano como resultado del traslado de endotoxina procedente del intestino después de la isquemia/reperfusión parcial del intestino durante la intervención quirúrgica, no se altera más debido a ésta causa.

En el contexto de la presente invención el término “predicción” significa correlacionar una probabilidad de un resultado con un resultado obtenido en la medición de un analito. Un ejemplo de esto es la medición de un

determinado marcador, tal como procalcitonina, en una muestra, cuya concentración medida se correlaciona con la probabilidad del fallo de injerto después del trasplante del órgano.

5 “Pacientes” en el contexto de la invención debe apreciarse que son todas las personas o animales, independientemente de si presentan o no cambios patológicos, a menos que se indique de otra manera. En el contexto de la invención, cualquier muestra recogida de los tejidos, órganos, organismos o similares puede ser una muestra de un paciente que debe diagnosticarse. En una forma de realización preferida el paciente es un ser humano.

10 En el contexto de la presente invención el término “seguimiento” se refiere a la determinación repetida de una afección médica del paciente. Por la presente, pueden determinarse, registrarse y/o documentarse por ejemplo los efectos de una determinada forma de tratamiento sobre la afección médica del paciente.

15 En el contexto de la presente invención la expresión “orientación terapéutica” se refiere a la utilización de los resultados de la determinación de la concentración de un determinado marcador o biomarcador en un paciente, o de los resultados obtenidos por seguimiento de dicho paciente como se mencionó anteriormente a fin de determinar el transcurso óptimo del tratamiento en dicho paciente. De esta manera el tratamiento puede mantenerse, o puede alterarse o modificarse, dependiendo de si la evolución del estado médico del paciente es como se desea, o por lo menos aceptable, o no.

20 En el contexto de la presente invención las expresiones tales como “fracción de una muestra” o “extracto de una muestra” preferentemente se refiere a las extracciones obtenidas por los procedimientos seleccionados de entre el grupo que comprende filtración, filtración con esterilización, sedimentación, precipitación, centrifugación o purificación mediante una columna de purificación o un dispositivo de membrana o similar con objeto de depurar selectivamente determinadas proteínas, carbohidratos, lípidos u otros componentes. Esto puede comprender también la coagulación de determinados componentes de la muestra, por ejemplo, basándose en la cascada de coagulación de la sangre, y la eliminación de los componentes coagulados por uno de los procedimientos mencionados anteriormente.

25 En el contexto de la presente invención la expresión “afección que requiere tratamiento antimicrobiano” se refiere preferentemente a una afección en la que normalmente un médico en una sociedad técnica y médicamente avanzada tal como en los denominados estados en primer y segundo mundo, consideraría que un tratamiento antimicrobiano es apropiado. Esto no significa que dicho tratamiento sea absolutamente necesario para la supervivencia del paciente con infección microbiana, sino que un tratamiento antimicrobiano mejoraría al menos la afección médica de dicho paciente. En este contexto, las infestaciones microbianas con especies o cepas que son resistentes al tratamiento antimicrobiano o si no están afectadas por el mismo, pero para las que dicho tratamiento sería deseable si estuvieran disponibles, están comprendidas en las afecciones mencionadas anteriormente. Un experto, en éste caso un médico, podrá muy bien decidir qué casos están dentro de las especificaciones anteriores.

30 La concentración de PCT o de fragmentos de la misma puede obtenerse por cualquier procedimiento reconocido. La concentración puede determinarse por inmunoanálisis u otras técnicas convencionales para determinar la concentración del marcador. Los procedimientos reconocidos incluyen el envío de las muestras de un fluido corporal del paciente a un laboratorio comercial para la medición, pero también la realización de la medición en el punto de atención médica.

35 El nivel, es decir, la concentración, de PCT en la muestra del paciente puede atribuirse por ejemplo al pronóstico de un resultado o a la evolución del riesgo para el paciente. Por ejemplo, las concentraciones de PCT superiores a un determinado valor umbral pueden ser indicadoras de un resultado específico, riesgo o pronóstico para un paciente.

40 La concentración de PCT obtenida por los procedimientos o la utilización de los ensayos según la presente invención puede analizarse de numerosas maneras bien conocidas por un experto en la materia.

45 Por ejemplo, cada resultado del ensayo obtenido puede ser comparado con un valor “normal” o un valor que indica un pronóstico, riesgo o resultado específico. Un diagnóstico/pronóstico específico puede depender de la comparación de cada resultado del análisis para dicho valor, que puede denominarse “umbral” de diagnóstico o pronóstico.

50 La sensibilidad y especificidad de una prueba de diagnóstico y/o pronóstico en más de sólo la “calidad” analítica de la prueba, dependen también de la definición de lo que constituye un resultado anormal. En la práctica, las curvas Características de Operación del Receptor (curvas COR) se calculan por lo general representando el valor de una variable frente a su frecuencia relativa en poblaciones “normales” (es decir aparentemente sanas) y “enfermas”. Para cualquier marcador específico, una distribución de los niveles de marcador para pacientes con y sin una enfermedad se solaparán probablemente. En tales condiciones, una prueba no distingue absolutamente lo normal de la enfermedad con el 100% de precisión, y el área del solapamiento indica donde la prueba no puede distinguir lo normal de la enfermedad. Se selecciona un umbral, por encima del cual (o por debajo del cual dependiendo de cómo un marcador cambia con la enfermedad) la prueba se considera que es anormal y por debajo de la cual la

prueba se considera que es normal. El área bajo la curva COR es una medición de la probabilidad de que la medición percibida permitirá la identificación correcta de una enfermedad. Las curvas COR pueden utilizarse aun cuando los resultados de la prueba no den necesariamente un número exacto. Siempre que se puede ordenar los resultados, se puede crear una curva COR. Por ejemplo, los resultados de un análisis en las muestras de "enfermedad" pueden ordenarse según el grado (por ejemplo, 1=bajo, 2= normal y 3=alto). Esta clasificación se puede correlacionar con los resultados en la población "normal", y crearse una curva COR. Estos procedimientos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Hanley *et al.* 1982. *Radiology* 143: 29-36. Preferentemente, se selecciona un umbral para proporcionar un área de la curva COR superior a aproximadamente 0,5, más preferentemente superior a aproximadamente 0,7, todavía más preferentemente superior a aproximadamente a 0,8, aún más preferentemente superior a aproximadamente 0,85, y aún más preferentemente superior a aproximadamente 0,9. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a  $\pm 5\%$  de una medición dada.

El eje horizontal de la curva COR representa (especificidad 1), que aumenta con la cantidad de falsos positivos. El eje vertical de la curva representa la sensibilidad, que aumenta con la cantidad de positivos verdaderos. De este modo, para un punto de corte específico seleccionado, el valor de (especificidad 1) puede determinarse, y puede obtenerse una sensibilidad correspondiente. El área bajo la curva COR es una medición de la probabilidad de que la concentración medida del marcador permitirá la identificación correcta de una enfermedad o afección. De este modo, el área bajo la curva COR puede utilizarse para determinar la eficacia de la prueba.

En otras formas de realización, como medición de una capacidad de la prueba para predecir el riesgo o diagnosticar una enfermedad se utiliza una relación de probabilidad positiva, una relación de probabilidad negativa, una relación de probabilidades o relación al azar. En el caso de una relación de probabilidad positiva, un valor de 1 indica que un resultado positivo es igualmente probable entre los pacientes tanto en los grupos "enfermos" como de "referencia"; un valor superior a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo enfermo; y un valor inferior a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo de referencia. En el caso de una relación de probabilidad negativa, un valor de 1 indica que un resultado negativo es igualmente probable entre pacientes tanto en los grupos de "enfermos" como de "referencia"; un valor superior a 1 indica que un resultado negativo es más probable en el grupo de ensayo; y un valor inferior a 1 indica que un resultado negativo es más probable en el grupo de referencia.

En el caso de una relación de probabilidades, un valor de 1 indica que un resultado positivo es igualmente probable entre los pacientes tanto en los grupos de "enfermos" como de "referencia; un valor superior a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo de enfermos; y un valor inferior a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo de referencia.

En el caso de una relación al azar, un valor de 1 indica que el riesgo relativo de un punto final (por ejemplo, muerte) es igual tanto en los grupos de "enfermos" como de "referencia", un valor superior a 1 indica que el riesgo es mayor en el grupo de enfermos; y un valor inferior a 1 indica que el riesgo es mayor en el grupo de referencia.

El experto deberá apreciar que al asociar un indicador de diagnóstico o pronóstico, a un riesgo de diagnóstico o de pronóstico de un resultado clínico futuro hay un análisis estadístico. Por ejemplo, una concentración de marcador superior a X puede indicar que un paciente es más probable que padezca un resultado adverso que los pacientes con una concentración inferior o igual a X, como se determina por un nivel de significación estadística. Además, un cambio en la concentración del marcador de los niveles de referencia puede ser reflejo del pronóstico del paciente, y el grado de cambio en el nivel del marcador puede relacionarse con la gravedad de un resultado. La significación estadística se determina con frecuencia comparando dos o más poblaciones, y determinando un intervalo de confianza y/o un valor p. Véase, por ejemplo, Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & sons, Nueva York, 1983. Los intervalos de confianza preferidos de la invención son 90%, 95%, 97,5%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, y 99,99%, mientras que los valores p preferidos son 0,1, 0,05, 0,025, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001 y 0,0001.

No obstante en otras formas de realización, pueden hacerse múltiples determinaciones de PCT, y puede utilizarse un cambio temporal en el marcador para determinar un diagnóstico o pronóstico. Por ejemplo, la concentración de PCT en una muestra del paciente puede determinarse en un tiempo inicial, y de nuevo en un segundo tiempo a partir de una segunda muestra del paciente. En dichas formas de realización, un aumento en el nivel del tiempo inicial al segundo tiempo puede ser indicativo de un diagnóstico específico o de un pronóstico específico. Así mismo, una disminución en el nivel del tiempo inicial al segundo tiempo puede ser indicativo de un diagnóstico específico o de un pronóstico específico.

El término "muestra" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una muestra de fluido corporal obtenida para diagnóstico, pronóstico o evaluación de un sujeto de interés, tal como un paciente. Las muestras de análisis preferidas incluyen de sangre, suero, plasma, fluido cerebroespinal, orina, saliva, esputo y efusiones de la pleura. Además, un experto en la materia pensará que algunas muestras de análisis se analizarían más fácilmente siguiendo un procedimiento de fraccionamiento o purificación, por ejemplo, separación de la sangre completa en los componentes suero o plasma.

De este modo, en una forma de realización específica de la invención la muestra se selecciona del grupo que

comprende una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de fluido cerebroespinal, una muestra de saliva y una muestra de orina o un extracto de cualquiera de las muestras mencionadas anteriormente. Preferentemente, la muestra es una muestra de sangre, aún más preferentemente una muestra de suero o una muestra de plasma.

El término “que se correlaciona” o “correlacionado”, tal como se utiliza en la presente memoria en referencia a la utilización de la concentración de PCT o de fragmentos del mismo, hace referencia a comparar la presencia o cantidad de PCT o fragmentos del mismo en un paciente con su presencia o cantidad en personas que se sabe que padecen una enfermedad dada, o que se sabe que están en situación de riesgo de la misma; o en personas que se sabe que están libres de una enfermedad dada. Como se expuso anteriormente, una concentración de marcador en una muestra del paciente puede compararse con una concentración conocida por estar asociada con un pronóstico específico. La concentración de marcador de la muestra se dice que ha estado correlacionada con el pronóstico, el riesgo y/o la probabilidad de un resultado específico; es decir, el experto puede utilizar la concentración de marcador para determinar el pronóstico del paciente, el riesgo o la probabilidad de un resultado específico, y responder en consecuencia. Alternativamente, la concentración de marcador en la muestra puede compararse con una concentración de marcador conocida por estar asociada con un buen resultado.

Las concentraciones umbral adecuadas para la estratificación de los pacientes en diferentes grupos (categorías) puede determinarse para cada grupo específico de pacientes. Esto puede hacerse por ejemplo, agrupando una población de referencia de pacientes según su concentración de PCT en determinados cuantiles, por ejemplo, terciles, cuartiles, quintiles o incluso según percentiles apropiados. Para cada uno de los cuantiles o grupos por encima y por debajo pueden calcularse determinados percentiles, relaciones de riesgo comparando el riesgo de un resultado adverso, es decir, un “efecto desfavorable”, por ejemplo, en términos de índice de supervivencia, entre los pacientes que han recibido una determinada medicación y los que no. En tal escenario, una relación de riesgo (HR) por encima de 1 indica un riesgo mayor de un resultado adverso para los pacientes que han recibido un tratamiento que para los pacientes que no lo han recibido.

La determinación (o medición o detección) de la concentración de PCT en la presente memoria puede realizarse utilizando un método de detección y/o un ensayo de diagnóstico como se explicó anteriormente.

Tal como se mencionó en la presente memoria, un “ensayo” o “ensayo de diagnóstico” puede ser de cualquier tipo aplicado en el campo de los diagnósticos. Dicho ensayo puede basarse en la unión de un analito que debe detectarse a una o más sondas de captura con una determinada afinidad. En lo que concierne a la interacción entre las moléculas de captura (denominadas también “aglutinantes” en la presente memoria) y las moléculas diana o las moléculas de interés, la constante de afinidad es preferentemente superior a  $10^8 \text{ M}^{-1}$ .

En el contexto de la presente invención, las “moléculas de captura” son moléculas que pueden utilizarse para unir las moléculas diana o las moléculas de interés, es decir los analitos (es decir, en el contexto de la presente invención PCT o los fragmentos de los mismos que tienen una longitud de por lo menos 12 aminoácidos), de una muestra. Las moléculas de captura de este modo deben dimensionarse adecuadamente, tanto espacialmente como desde el punto de vista de las propiedades superficiales, tales como la carga en superficie, la hidrofobia, la hidrofilia, la presencia o ausencia de donantes y/o receptores de Lewis, para unir específicamente las moléculas diana o las moléculas de interés. Por este medio, la unión puede estar mediada por ejemplo por interacciones iónicas, de van-der-Waals, pi-pi, sigma-pi, hidrófobo o de enlace de hidrógeno, o por una combinación de dos o más de las interacciones mencionadas anteriormente entre las moléculas de captura y las moléculas diana o las moléculas de interés. En el contexto de la presente invención, las moléculas de captura pueden seleccionarse por ejemplo de entre el grupo que comprende una molécula de ácido nucleico, una molécula de carbohidrato, una molécula de ARN, una proteína, un anticuerpo, un péptido o una glucoproteína. Preferentemente, las moléculas de captura son anticuerpos, incluyendo los fragmentos de los mismos con suficiente afinidad para una diana o molécula de interés, e incluyendo anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpo recombinante, así como derivados modificados química y/o bioquímicamente de dichos anticuerpos o fragmentos procedentes de la cadena variables con una longitud de 12 aminoácidos por lo menos de la misma, preferentemente una longitud de por lo menos 20 aminoácidos.

Los procedimientos de detección preferidos comprenden los inmunoanálisis en varios formatos tales como por ejemplo radioinmunoanálisis (RIA), inmunoanálisis de quimioluminiscencia y fluorescencia, los inmunoanálisis con enzima ligada (ELISA), los chips de bolitas a base de Luminex, los análisis en microchip de proteínas y los formatos de ensayo rápido tales como por ejemplo los ensayos inmunocromatográficos con tira.

Los análisis pueden ser análisis homogéneos o heterogéneos, análisis en sándwich competitivos y no competitivos. En una forma de realización particularmente preferida el análisis es en forma de un análisis en sándwich, que es un inmunoanálisis no competitivo, en el que la molécula que debe detectarse y/o cuantificarse está unida a un primer anticuerpo y a un segundo anticuerpo. El primer anticuerpo puede estar unido a una fase sólida, por ejemplo, una bolita, una superficie de un pocillo u otro recipiente, un chip o una tira, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo que está marcado, por ejemplo, con un colorante, con un radioisótopo o un resto reactivo o catalíticamente reactivo. La cantidad de anticuerpo marcado unido al analito se mide a continuación por un procedimiento apropiado. La

composición general y los procedimientos implicados con “análisis en sándwich” están muy demostrados y son conocidos por los expertos. (*The Immunoassay Handbook*, Ed. Daid Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3ª ed. (Mayo 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hutschig C. *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* Febrero de 2006: 10(1):4-10, PMID: 16376134), incorporada a la presente memoria por referencia).

5 En una forma de realización particularmente preferida el análisis comprende dos moléculas de captura, preferentemente anticuerpos que están ambos presentes como dispersiones en una mezcla líquida de reacción, en la que un primer componente de marcaje está unido a la primera molécula de captura, en la que dicho primer componente de marcaje es parte de un sistema de marcaje basado en extinción por fluorescencia o quimioluminiscencia o ampliación, y un segundo componente de marcaje de dicho sistema de marcaje está unido a la segundo molécula de captura, de modo que durante la unión de ambas moléculas de captura al analito se genera una señal mensurable que permite la detección de los complejos en sándwich formados en la solución que comprende la muestra.

15 Aún más preferido, dicho sistema de marcaje comprende criptatos de tierras raras o quelatos de tierras raras en combinación con un colorante de fluorescencia o un colorante de quimioluminiscencia, en particular un colorante del tipo cianina.

20 En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en fluorescencia comprenden la utilización de colorantes, que pueden seleccionarse por ejemplo de entre el grupo que comprende FAM (5 ó 6-carboxifluoresceína), VIC, NED, fluoresceína, fluoresceína-isotiocianato (FITC), IRD-700/800, colorantes de cianina, tales como CY3, CY5, CY3,5, CY5,5, CY7, xanteno, 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), TET, 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetodifluoresceína (JOE), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxirrodamina-6G (R6G5), 6-carboxirrodamina-6G-(RG6), rodamina, verde de rodamina, rojo de rodamina, rodamina 110, colorantes de BODIPY, tales como BODIPY TMR, verde Oregón, cumarinas tales como umbeliferona, bencimidias, tal como Hoechst 33258; fenantridinas, tales como rojo de Texas, amarillo Yakima, Fluor Alexa, PET, bromuro de etidio, colorantes de acridinio, colorantes de carbazol, colorantes de fenoxacina, colorantes de porfirina, colorantes de polimetina y similares.

30 En el contexto de la presente invención, los análisis basados en quimioluminiscencia comprenden la utilización de colorantes, basándose en los principios físicos descritos para los materiales quimioluminiscentes en Kirk-Othmer, *Enciclopedia of chemical technology*, 4ª ed., editor ejecutivo, J. I. Kroschwitz; editor, M. Howe-Grant, John Wiley & Sons, 1993, vol. 15, págs. 518-562, incorporada en la presente memoria por referencia, incluyendo las citas en las páginas 551-562. Los colorantes quimioluminiscentes preferidos son ésteres de acridinio.

35 **Leyendas de las figuras**

Figura 1: Diagramas de dispersión de log PCT frente a (a) log PCR, (b) depuración de creatinina y (c) log proteinuria. La acción de PCT con PCR se describió mejor mediante un modelo cuadrático ( $\log(\text{PCT})=1,65+0,12 \times \log(\text{PCR})+0,07 \times (\log(\text{PCR}))^2$ ,  $P<0,0001$ ). La asociación de PCT con la depuración de creatinina se describió mejor mediante un modelo inverso ( $\log(\text{PCT})=1,80+(11,7/\text{depuración de creatinina})$ ,  $P<0,0001$ ). La asociación de PCT con proteinuria se describió mejor mediante un modelo lineal ( $\log(\text{PCT})=1,68+0,57 \times \log(\text{proteinuria})$ ,  $P<0,0001$ ).

45 Figura 2: Concentraciones de PCT en (a) RTR sin fallo de injerto frente a RTR con fallo de injerto ( $P<0,0001$ ) y (b) RTR vivo frente a RTR muerto ( $P<0,0001$ ). Las concentraciones de PCR en (c) RTR sin fallo de injerto frente a RTR con fallo de injerto ( $P=0,2$ ) y (d) RTR vivo frente a RTR muerto ( $P=0,0001$ ). Las diferencias se probaron utilizando el ensayo de Mann-Whitney.

50 Figura 3: Curvas COR para PCT y PCR con respecto a (a) fallo de injerto y (b) mortalidad. Los valores de punto de corte de ABC y óptimo con la sensibilidad y especificidad correspondientes se presentan en la tabla 4.

Figura 4: Curvas de Kaplan Meier de (a y c) perduración del trasplante y (b y d) de supervivencia del receptor en terciles estratificados por sexo de PCT en (a y b) todos los RTR y (c y d) RTR no proteinúricos solos.

55 **Ejemplos**

#### Materiales y procedimientos

60 **Diseño y tema de la investigación**

En este estudio prospectivo de cohortes todos los receptores de trasplante renal que visitaron la clínica ambulatoria entre agosto de 2001 y julio de 2003 y tenían un injerto en funcionamiento durante por lo menos un año podían seleccionarse para participar en su próxima visita a la clínica ambulatoria. Se consultó a los receptores para participar en una visita posterior a la clínica ambulatoria si estaban enfermos o presentaban signos de una infección. Un total de 606 receptores de trasplante renal firmaron el consentimiento informado por escrito de 847

seleccionables (índice de consentimiento del 72%). El grupo que no firmó el consentimiento informado era comparable al grupo que firmó el consentimiento informado con respecto a la edad, sexo, índice de masa corporal, creatinina en el suero, depuración de creatinina y proteinuria. Dos RTR se consideraron valores atípicos extremos con respecto a la concentración de PCT (figura 1) y se excluyeron por consiguiente de los análisis. Los detalles adicionales de este estudio han sido publicados anteriormente (van Ree R.M., De Vries A.P., Oterdoom L.H. *et al.* Abdominal obesity and smoking are important determinants of C-reactive protein in renal transplant recipients. *Nephrol. Dial. Transplants* 2005; 20(11):2524-2531). El Institutional Review Board aprobó el protocolo del estudio (METc 01/039) que se había adherido a la declaración de Helsinki (Declaración de Helsinki revisada, IRB 2000: 22:10-11).

#### Episodios finales

Todos los pacientes participantes visitaron la clínica ambulatoria por lo menos una vez al año. Como punto final secundario se utilizó la mortalidad. El centro de trasplante renal registra la información sobre mortalidad y fallo de injerto y por contacto íntimo con los médicos generales y remitiendo a los nefrólogos. El fallo de injerto se definió como retorno a la diálisis o al retrasplante. El fallo de injerto y la mortalidad de todos los RTR se registraron hasta agosto de 2007. No se produjeron bajas en el seguimiento.

#### Características del trasplante renal

Las características relevantes del trasplante se tomaron de la base de datos de trasplantes renales de Groningen. Esta base de datos contiene información sobre todos los trasplantes renales realizados en nuestro centro desde 1968, incluyendo el historial de diálisis. El tratamiento inmunosupresor normal y la medicación actual se describieron anteriormente (van Ree R.M., De Vries A.P., Oterdoom L.H. *et al.* Abdominal obesity and smoking are important determinants of C-reactive protein in renal transplant recipients, *Nephrol. Dial. Transplant* 2005; 20(11):2524-2531). El índice de masa corporal, el perímetro de la cintura, el área corporal (BSA) y la presión sanguínea se midieron como se describió anteriormente (van Ree R.M., De Vries A.P., Oterdoom L.H. *et al.* Abdominal obesity and smoking are important determinants of C-reactive protein in renal transplant recipients, *Nephrol. Dial. Transplant* 2005; 20(11):2524-2531). El estado del hábito de fumar y los antecedentes cardiovasculares se registraron en un cuestionario de autoevaluación. Los antecedentes de la enfermedad cardiovascular se consideraban positivos si existía un infarto de miocardio (IM) previo, un ataque isquémico temporal (AIT) o un accidente cerebrovascular (ACV).

#### Mediciones en laboratorio

Se extrajo sangre después de un periodo de ayuno de 8 a 12 h durante la noche. Se realizaron análisis de PCT utilizando un análisis inmunoluminométrico (LIA sensible a PCT BRAHMS; Aktiengesellschaft, Hennigsdorf, Alemania) (Morgenthaler N.G., Struck J., Fischer-Schulz C., Bergmann A., Sensitive immunoluminometric assay for the detection of procalcitonin. *Clin. Chem.* Mayo 2002; 48(5):788-90). Se determinaron las concentraciones de proteína C reactiva (PCR) de alta sensibilidad utilizando ensayos inmunsorbentes con enzima ligada propios; el límite inferior de detección fue 0,002 mg/l. Se determinaron las concentraciones de creatinina en el suero utilizando una versión modificada del método de Jaffé (MEGA AU 510, Merck Diagnostica, Darmstadt, Alemania). Se evaluaron el colesterol total en el suero, el colesterol HDL, los triglicéridos y la excreción de proteína urinaria como se describió en 12 anteriormente. La proteinuria se definió como excreción urinaria de proteínas > 0,5 g/24 h.

#### Análisis estadístico

Se realizaron análisis en versión 14.0 de SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) y la versión 10 de representación Sigma (Systat software Inc., Alemania). Los parámetros paramétricos se expresan como medias  $\pm$  desviación estándar (DS), mientras que los parámetros no paramétricos se expresan como mediana [intervalo intercuantil]. Se publicaron las relaciones de riesgo (HR) con [intervalo de confianza del 95% (IC)]. Un valor P de dos caras inferior a  $P < 0,05$  indicaba la significación estadística.

En primer lugar, para investigar qué receptores o características relacionadas con el riñón trasplantado estaban asociadas a concentraciones de PCT, estos factores se analizaron utilizando análisis de regresión lineal con log concentración de PCT como variable dependiente. Para determinar si PCT estaba correlacionada con PCR, la depuración de creatinina o la proteinuria se diseñaron diagramas de dispersión. Se utilizaron estadísticas de regresión de estimación de curvas para determinar los mejores ajustes en los diagramas de dispersión. Posteriormente, se determinaron determinantes independientes y asociados de PCT utilizando análisis de regresión lineal hacia atrás. Se ajustó la depuración de creatinina y la proteinuria a la referencia y el tiempo entre el trasplante y la fecha de inclusión, para ajustar por el hecho de que los receptores comenzaron con una función de aloinjerto en la inclusión y por el hecho de que los receptores estaban incluidos en diferentes puntos de tiempo en el estudio de los inventores. Las características adicionales con un valor  $P < 0,05$  en los análisis de regresión lineal se añadieron posteriormente. Las variables obtenidas se consideraron determinantes independientes asociadas de concentraciones de PCT.

La sensibilidad y especificidad para determinar el fallo de injerto o la mortalidad se calcularon diseñando determinando curvas características de operador receptor (COR) para PCT, PCR, proteinuria y depuración de creatinina. Los valores óptimos de punto de corte se extrapolaron de las curvas. El área bajo la curva (ABC) se calculó para comparar el rendimiento pronóstico de PCT, PCR, proteinuria y depuración de la creatinina para el fallo de injerto y PCT y PCR para mortalidad. Las diferencias estadísticas entre las ABC se compararon de manera no paramétrica por el método de DeLong *et al.* (DeLong E.R., DeLong D.M., Clarke-Pearson D.L., Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988; 44(3):837-845).

Por último, se llevó a cabo el tiempo para los análisis del episodio. En primer lugar, se investigaron las concentraciones de PCT como pronóstico potencial de fallo de injerto y mortalidad utilizando análisis de Kaplan-Meier. Para estos análisis se utilizaron terciles de PCT estratificados por sexo, porque los porcentajes de hombres y mujeres no estaban divididos igualmente entre los terciles de PCT (1<sup>er</sup> tercil: 41% de mujeres y 24% de hombres; 2<sup>o</sup> tercil: 31% de mujeres y 37% de hombres; 3<sup>er</sup> tercil: 28% de mujeres y 39% de hombres). En segundo lugar se realizaron análisis de regresión de Cox de una variable y multivariable. Se introdujo la concentración de PCT en los análisis de regresión como 2 log variable transformada. Esto significa que, por ejemplo, una relación de riesgo (HR) de 1,5 para fallo de injerto indica que cada vez que se duplica la concentración de PCT la HR para el fallo de injerto aumenta 1,5 veces. Se ajustó para la depuración de creatinina, proteinuria y el tiempo entre el trasplante y la fecha de inclusión (tabla 5, modelo 2), para la edad y sexo del receptor (tabla 5, modelo 3) y por último para los asociados dependientes y determinantes de PCT (tabla 5, modelo 4). Se realizaron análisis secundarios (1) con exclusión adicional de RTR con concentraciones de PCR superiores a 10 mg/l y (2) en RTR no proteinúrica solamente.

### Resultados

Se analizaron un total de 575 RTR (54% varones, de 51,7±12,0 años de edad, 84% de trasplantes cadavéricos). El tiempo medio entre el trasplante y las mediciones de referencia fue de 6,1 [2,9-11,7] años. La concentración media de PCT fue de 0,023 [0,017-0,036] ng/ml. El receptor y las características de referencia del trasplante y los coeficientes de regresión estandarizados de los análisis de regresión lineal de una variante con el log concentración de PCT como variable independiente se muestran en las tablas 1 y 2. Con concentraciones crecientes de PCT, RTR eran con más frecuencia hombres, tenían un perímetro de cintura mayor y eran con más frecuencia más fumadores, tenían una presión sanguínea sistólica y diastólica mayor, utilizaban más cifras de medicación antihipertensora, tenían HDL menor y concentración de triglicéridos mayor, y tenían concentración de PCR mayor. Las concentraciones más altas de PCT estaban además asociadas a la mayor edad del donante, a la concentración mayor de creatinina en el suero, a la menor depuración de creatinina, a la mayor proteinuria, a la mayor frecuencia de rechazo agudo y al tratamiento de rechazo agudo y a la mayor dosis de prednisona.

La figura 1 representa la correlación de PCT con (a) PCR, (b) depuración de creatinina y (c) proteinuria. Los análisis de regresión de estimación de la curva demostraron que la asociación de PCT con PCR se ajustaba mejor utilizando un modelo cuadrático que la asociación de PCT con la depuración de creatinina se adaptaba mejor utilizando un modelo inverso, y que la asociación de PCT con la proteinuria se adaptaba mejor utilizando un modelo lineal (véase para las ecuaciones del modelo la nota al pie de la figura 1, todas las  $P < 0,0001$ ). Para determinar los determinantes independientes y asociados de PCT se realizó un análisis de regresión lineal hacia atrás con un log concentración de PCT como variable dependiente y todas las características que estaban significativamente asociadas con las concentraciones de PCT en análisis univariantes, (véanse las tablas 1 y 2). Los determinantes independientes y asociados de PCT eran la concentración de PCR, la depuración de creatinina, el sexo del receptor, la proteinuria, la concentración de HDL y triglicérido y la edad del donante (tabla 3).

El seguimiento medio hasta el fallo de injerto fue de 5,2 [4,5-5,7] años y hasta la mortalidad el seguimiento medio fue de 5,3 [4,7-5,7] años. Durante el seguimiento, 41 (7%) RTR experimentaron fallo de injerto y 91 (16%) RTR murieron. Las concentraciones medias de PCT en la inclusión fueron significativamente mayores en RTR quienes desarrollaron fallo de injerto en comparación con RTR sin fallo de injerto (0,046 [0,035-0,078] ng/ml frente a 0,023 [0,017-0,034] ng/ml,  $P < 0,0001$ , figura 2a). RTR quienes murieron durante el seguimiento tenían concentraciones significativamente mayores de PCT en la inclusión en comparación con RTR quienes no murieron (0,032 [0,021-0,055] ng/ml frente a 0,022 [0,017-0,034] ng/ml,  $P < 0,0001$ , figura 2b). En comparación, las concentraciones de PCR en la inclusión no fueron significativamente mayores en RTR quienes desarrollaron fallo de injerto en comparación con aquellas que experimentaron fallo de injerto (2,43 [1,18-8,04] mg/l frente a 2,06 [0,81-4,87] mg/l,  $P = 0,2$ , figura 2c). Sin embargo, las concentraciones de PCR en RTR quienes murieron eran significativamente mayores en comparación con las que no murieron (3,49 [1,38-8,91] mg/l frente a 1,89 [0,74-4,38] mg/l,  $P = 0,0001$ , figura 2d).

El rendimiento predictivo de las concentraciones en el suero de PCT se comparó con la depuración de creatinina, proteinuria y PCR para el fallo de injerto y con PCR para la mortalidad al generar curvas COR (figuras 3a y b, respectivamente). Los valores de ABC y de punto de corte de óptimos con sensibilidad y especificidad correspondientes se muestran en la tabla 4. Los análisis ROC de la predicción del fallo de injerto por PCT pusieron de manifiesto una ABC media (SE) de 0,84 (0,03). Este fue significativamente mayor en comparación con la ABC de PCR (0,56 (0,04),  $P < 0,0001$  en comparación con PCT), pero igual al ABC de depuración de creatinina (0,86 (0,03)  $P = NS$  en comparación con PCT) y proteinuria (0,80 (0,04),  $P = NS$  en comparación con PCT). El valor óptimo de

5 punto de corte para detectar el fallo de injerto fue 0,029 ng/ml para PCT, 51,5 ml/min para depuración de creatinina y 0,4 g/24 h para proteinuria. El valor óptimo de punto de corte para detectar el fallo de injerto no pudo determinarse para PCR porque el modelo no era mucho mejor que la probabilidad al azar en predecir el fallo de injerto. Los análisis de COR de la predicción de mortalidad pusieron de manifiesto un ABC de 0,66 (0,03) para PCT y 0,63 (0,03) para PCR (P=NS en comparación entre si). El valor óptimo de punto de corte para detectar la mortalidad fue de 0,028 ng/ml para PCT y 2,1 mg/l para PCR.

10 Por último, se llevó a cabo el tiempo para análisis del episodio. En el tercil inferior de PCT 1 (1%) RTR experimentó fallo de injerto durante el seguimiento, mientras que estos números eran 5 (3%) y 35 (19%) para el tercil medio y superior, respectivamente (prueba del orden logarítmico: P<0,0001, figura 4a). Las cifras para la mortalidad fueron 15 (8%), 32 (17%) y 44 (23%) en terciles crecientes de PCT, respectivamente (prueba del orden logarítmico: P=0,0001, figura 4b). La tabla 5 presenta los análisis de regresión de Cox de una variante y multivariante para el fallo de injerto reciente y la mortalidad en RTR. PCT fue un pronóstico significativo para el fallo de injerto reciente después del ajuste de la depuración de creatinina, la proteinuria y el tiempo entre los datos de trasplante e inclusión (HR=1,7, P<0,05, tabla 5, modelo 2). Lo mismo era cierto con más ajuste de la edad y el sexo del receptor (HR=1,6, P=0,01, tabla 5, modelo 3) y el ajuste de asociados independientes y determinantes de PCT (tabla 5, modelo 4). La asociación significativa de PCT con la mortalidad desapareció después del ajuste de la depuración de creatinina, la proteinuria y el tiempo entre los datos del trasplante y la inclusión (HR=1,3, P=0,06, tabla 5, modelo 2). Sin embargo, la significación reapareció después del ajuste de la edad y sexo del receptor (HR=1,4, P=0,01, tabla 5, modelo 3) y se mantuvo después del ajuste de asociados independientes y determinantes de PCT (HR=1,4, P<0,05, tabla 5, modelo 4). Los resultados no fueron materialmente diferentes después de la exclusión de RTR con concentraciones de PCR superiores a 10 mg/l o cuando los análisis se realizaron en RTR no protenúrico solo (véase la figura 4c y d para análisis de Kaplan-Meier según los terciles estratificados de PCT para RTR no proteinúrico solo).

25 **Tabla 1**

Características relacionadas con el receptor y análisis de regresión lineal univariante de características relacionadas con el receptor y log concentración de PCT

		Log PCT	
		β Estandarizada	P
Demografía del receptor			
Edad (años)	51,7 ± 12,0	0,005	NS
Sexo masculino, n (%)	310 (54)	0,199	<0,0001
Mediciones de la composición del cuerpo			
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,1 ± 4,3	0,071	NS
Perímetro de la cintura (cm)	97,3 ± 13,8	0,197	<0,0001
Hábito de fumar, n(%)	125 (22)	0,085	<0,05
Presión sanguínea			
Presión sistólica	152,9 ± 22,9	0,110	<0,01
Presión diastólica (mmHg)	89,8 ± 9,9	0,086	<0,05
Utilización de inhibidor de ACE o AII-antagonista, n			
Utilización de bloqueador β, n (%)	354 (62)	-0,007	NS
Numero de antihipertensores	2,0 [1,0-3,0]	0,110	<0,01
Antecedentes anteriores de enfermedad cardiovascular			
Mia, n (%)	47 (8)	0,021	NS
TIA/CVAb, n (%)	32 (6)	0,006	NS
Lípidos			
Colesterol total (mmol/L)	5,6 [4,9-6,2]	-0,048	NS
LDL (mmol/L)	3,5 [2,9-4,1]	-0,076	NS
HDL (mmol/L)	1,1 [0,9-1,3]	-0,306	<0,0001
Triglicéridos (mmol/l)	1,9 [1,4-2,7]	0,244	<0,0001
Utilización de estatina en índice, n (%)	292 (51)	0,002	NS
Diabetes			
Glucosa (mmol/l)	4,6 [4,1-5,0]	0,066	NS
Insulina (Pmol/L)	11,1 [7,9-16,3]	0,084	<0,05
Diabetes después del trasplante, n (%)	106 (18)	0,020	NS
Utilización de fármacos antidiabéticos (%)	79 (14)	-0,015	NS
PCR (mg/l)	2,1 [0,8-4,9]	0,360	<0,0001

(1) AIT: Ataque isquémico temporal, (2) ACV: Accidente cerebrovascular, (3) Tratamiento de rechazo agudo con altas dosis de corticoesteroides, NS: no significativo

Tabla 2

Características relacionadas con el riñón trasplantado y análisis de regresión lineal univariante de las características relacionadas con el riñón trasplantado y log de concentración PCT

		Log PCT	
		$\beta$ Estandarizada	P
Demografía del donante			
Edad (años)	36,9 $\pm$ 15,5	0,209	<0,0001
Sexo masculino, n (%)	316 (55)	-0,050	NS
Función de alotrasplante renal			
Concentración de creatinina en suero ( $\mu$ mol/l)	134[112-167]	0,537	<0,0001
CrCl (ml/min)	61,5 $\pm$ 22,3	-0,396	<0,0001
Proteinuria (g/24 h)	0,2 [0,0-0,5]	0,082	<0,05
Proteinuria, n (%)	164 (29)	0,250	<0,0001
Nefropatía primaria, n (%)			
Enfermedad glomerular primaria	159 (28)		
Glomerulonefritis	34 (6)		
Enfermedad intersticial tubular	91 (16)		
Nefropatía poliquística	100 (17)	-0,005	NS
Displasia e hipoplasia	20 (3)		
Nefrovasculopatía	32 (6)		
Diabetes mellitus	22 (4)		
Otras o causa desconocida	117 (20)		
Modalidad de diálisis anterior, n (%)			
Ninguna	47 (8)		
Hemodiálisis	309 (54)	-0,021	NS
Diálisis peritoneal (CAPD)	219 (38)		
Duración de la diálisis anterior (mo)	27 [13-48]	-0,023	NS
Tipo de trasplante, n (%)			
Donante póstumo	481 (84)		
Donante vivo	76 (13)	0,012	NS
Trasplante combinado	18 (3)		
Número de trasplantes anteriores, n (%)			
0	515 (90)	0,047	NS
1 o más	60 (10)		
Duraciones de la isquemia			
Duraciones de la isquemia en frío (h)	22,0 [15,0-0,0]	-0,062	NS
Duraciones de la isquemia en caliente (min)	35,0 [30,0-45,0]	-0,001	NS
Función retardada del trasplante (días de oliguria)	0,0 [0,0-0,0]	0,042	NS
Incompatibilidades de HLA, n			
HLA-AB	1,3 $\pm$ 1,1	0,046	NS
HLA-DR	0,4 $\pm$ 0,6	-0,013	NS
Rechazo agudo, n (%)	256 (45)	0,091	<0,05
Tratamiento de rechazo agudo, n (%)			
Dosis altas de corticoesteroides	182 (32)	0,100	<0,05
Anticuerpos antilinfocitos	74 (13)		
Dosis de inmunosupresión de prednisolona, (mg/día)	10,0 [7,5-0,0]	0,111	<0,01
Inhibidor de calcineurina, n (%)	449 (78)	-0,08	NS
Inhibidor de proliferación, n (%)			
Azatioprina	195 (34)	-0,025	NS
Micofenolato de mofetilo	227 (40)		

NS: no significativa

**Tabla 3**

Determinantes independientes y asociados de PCT		
Variable	Beta Estandarizada	P
Concentración de PCR	0,30	<0,0001
Depuración de creatinina	-0,30	<0,0001
Sexo del receptor	0,21	<0,0001
Proteinuria	0,16	<0,0001
Concentración de HDL	-0,13	<0,001
Concentración de triglicéridos	0,08	<0,05
Edad del donante	0,08	<0,05
R <sup>2</sup> =0,39		

**Tabla 4**

5

ABC y valores óptimos de punto de corte de curvas COR

Variable	ABC (SE)	P	Valor óptimo de punto de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
<b>Fallo de injerto</b>					
PCT (ng/mL)	0,84 (0,03)	<0,0001	0,029	90,2	66,0
PCR (mg/L)	0,56 (0,04)a	0,2	NA	NA	NA
Depuración de creatinina (ml/min)	0,86(0,03)b,c	<0,0001	51,5	85,4	68,7
Proteinuria (g/24 h)	0,80 (0,04)b, c	<0,0001	0,4	80,5	68,7
<b>Mortalidad</b>					
PCT (ng/m)	0,66 (0,03)	<0,0001	0,028	61,1	64,0
PCR (mg/l)	0,63 (0,03)b	0,0001	2,1	69,2	53,5

a: P<0,0001 en comparación con PCT  
 b: no significativo en comparación con PCT  
 c: P<0,0001 en comparación con PCR  
 ES: error estándar, NA: no aplicable.

**Tabla 5**

Análisis de regresión de Cox univariante y multivariante para fallo de injerto reciente y mortalidad en RTR

	Fallo de injerto reciente			Mortalidad		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Modelo 1	3.0	2.3-3.9	<0.0001	1.6	1.3-2.0	<0.0001
Modelo 2	1.7	1.2-2.5	0.003	1.3	1.0-1.6	0.06
Modelo 3	1.6	1.1-2.3	0.01	1.4	1.1-1.9	0.01
Modelo 4	2.0	1.3-3.0	0.002	1.4	1.0-1.9	0.04

Se introdujo PCT en los análisis de regresión como 2 log variable transformada y los datos desviados se normalizaron por transformación logarítmica en todos los análisis  
 Modelo 1: Modelo en bruto  
 Modelo 2: Modelo 1 + ajustes para depuración de creatinina, proteinuria y duración entre los datos de trasplante e inclusión.  
 Modelo 3: Modelo 2 + edad y sexo del receptor  
 Modelo 4: Modelo 3 + asociados independientes y determinantes de PCT.

10

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la predicción o la estratificación del riesgo de fallo de injerto y/o la mortalidad de un paciente que ha recibido un trasplante de órgano y el seguimiento y la orientación terapéutica de dicho paciente, que comprende la determinación de procalcitonina o fragmentos de la misma con por lo menos 12 aminoácidos en una muestra tomada de dicho paciente, en el que la concentración de procalcitonina asociada a un riesgo aumentado de fallo de injerto y/o la mortalidad es superior a un punto de corte, que es inferior a 0,1 ng/ml y en el que la concentración de procalcitonina en el paciente no está influida ya por el traumatismo quirúrgico originado por el trasplante de órgano, en el que dicha muestra se selecciona de entre un grupo que comprende una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre o fracciones de las mismas.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el paciente ha recibido un trasplante renal.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el paciente no presenta una afección seleccionada de entre el grupo que comprende: una infección que requiere terapia antimicrobiana o formas aumentadas de infección como septicemia, septicemia grave o choque septicémico.
4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, en el que el procedimiento es un procedimiento para la predicción del fallo de injerto a largo plazo lo que significa un periodo de más de un año.
5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, en el que el procedimiento es un procedimiento para la predicción del fallo de injerto a corto plazo lo que significa un periodo de una semana hasta un año.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de procalcitonina puede estar correlacionada preferentemente con la predicción o estratificación del riesgo de fallo de injerto y/o la mortalidad por un procedimiento que puede seleccionarse de entre las alternativas siguientes:
- correlación con respecto a la media de la concentración de procalcitonina en un conjunto de muestras predeterminadas,
  - correlación con respecto a los cuantiles de la concentración de procalcitonina en un conjunto de muestras predeterminadas, y
  - correlación con un modelo matemático, tal como por ejemplo la Regresión de Cox.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de procalcitonina asociada a riesgo aumentado de fallo de injerto y/o mortalidad es superior a la concentración media de la población normal.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que además la concentración de uno o más marcadores adicionales o parámetros clínicos, que están asociados a un riesgo aumentado de fallo de injerto y/o mortalidad se determina y se utiliza para la predicción o la estratificación del riesgo de fallo de injerto y/o la mortalidad de un paciente que ha recibido un trasplante de órgano y el seguimiento y la orientación terapéutica de dicho paciente.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que dichos uno o más parámetros clínicos se seleccionan de entre el grupo que comprende: edad, sexo, antecedentes de las enfermedades, en particular la diabetes, el índice de masa corporal, la predisposición genética/antecedentes familiares, antecedentes étnicos, hábitos que afectan a dicha propensión, tales como fumar, consumo de alcohol o alimentación.
10. Procedimiento según la reivindicación 8 ó 9, en el que dichos uno o más marcadores adicionales se seleccionan de entre el grupo que comprende: marcadores para la función renal, marcadores para inflamación y/o marcadores asociados a la regulación cardiovascular y osmótica.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicho marcador para la función renal se selecciona de entre el grupo que comprende depuración de creatinina, proteinuria y marcadores lipídicos.
12. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicho marcador para la inflamación es la proteína C reactiva.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que dicho marcador asociado a la regulación cardiovascular y osmótica se selecciona de entre un grupo que comprende proBNP o fragmentos de los mismos de por lo menos 12 aminoácidos incluyendo BNP y NT-proBNP, proANP o fragmentos de los mismos de por lo menos 12 aminoácidos incluyendo NT-proANP y MR-proADM, proAdrenomedulina o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos incluyendo Adrenomedulina, PAMP y MR-proADM, proEndotelina o fragmentos de los mismos de por lo menos 12 aminoácidos incluyendo Endotelina-1, big-Endotelina-1, CT-proET-1 y NT-proET-1, proVasopresina o fragmentos de los mismos de por lo menos 8 aminoácidos incluyendo Vasopresina, Copeptina y Neurofina 2.

14. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 13, que comprende las etapas siguientes:

- 5
- tomar una muestra de un paciente después del trasplante renal,
  - determinar la concentración de procalcitonina o de fragmentos de la misma con por lo menos 12 aminoácidos en una muestra tomada de dicho paciente, y
  - 10 ▪ correlacionar la concentración de procalcitonina o de fragmentos de la misma con por lo menos 12 aminoácidos con un pronóstico.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que la concentración de procalcitonina o de fragmentos de la misma con por lo menos 12 aminoácidos se determina con un análisis de diagnóstico.

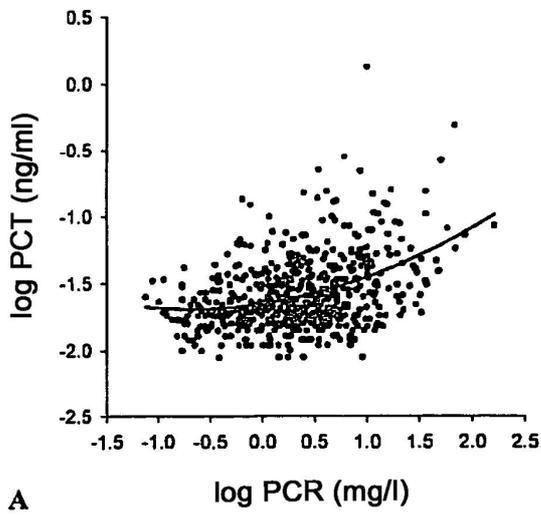
- 15
16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que el ensayo de diagnóstico para la procalcitonina o los fragmentos de la misma con por lo menos 12 aminoácidos es ultrasensible y presenta una sensibilidad de análisis funcional (definida como la concentración más pequeña que puede determinarse con un CV de interanálisis máximo de 20%) inferior a 0,1 ng/ml.

- 20
17. Procedimiento según las reivindicaciones 14 a 16, en el que la muestra se toma de un paciente no antes de una semana después del trasplante.

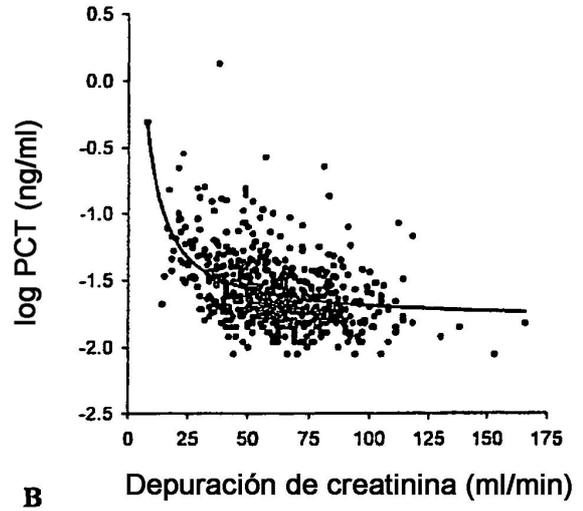
- 25
18. Utilización de procalcitonina o de fragmentos de la misma con por lo menos 12 aminoácidos para la predicción o la estratificación del riesgo del fallo de injerto y/o la mortalidad de un paciente que ha recibido un trasplante de órgano y el seguimiento y la orientación terapéutica de dicho paciente, en la que la concentración de procalcitonina asociada a un riesgo aumentado de fallo de injerto y/o la mortalidad es superior a un punto de corte, que es inferior a 0,1 ng/ml y en la que la concentración de procalcitonina en el paciente no está influida ya por el traumatismo quirúrgico originado por el trasplante de órgano, en la que dicha muestra se selecciona de entre un grupo que comprende una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre o fracciones de las mismas.
- 30

- 35
19. Utilización de un inmunoanálisis que presenta una sensibilidad del análisis (definida como la concentración más pequeña que puede determinarse con un CV de interanálisis máximo de 20%) inferior a 0,1 ng/ml para la predicción o la estratificación del riesgo del fallo de injerto y/o la mortalidad de un paciente que ha recibido un trasplante de órgano y el seguimiento y la orientación terapéutica de dicho paciente, en la que la concentración de procalcitonina asociada a un riesgo aumentado de fallo de injerto y/o la mortalidad es superior a un punto de corte, que es inferior a 0,1 ng/ml y en el que la concentración de procalcitonina en el paciente no está influida ya por el traumatismo quirúrgico originado por el trasplante de órgano, en la que dicha muestra se selecciona de entre un grupo que comprende una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre o fracciones de las mismas.

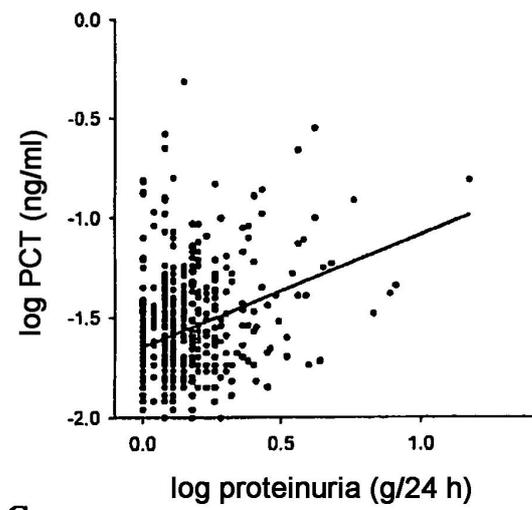
Figura 1



A



B



C

Figura 2

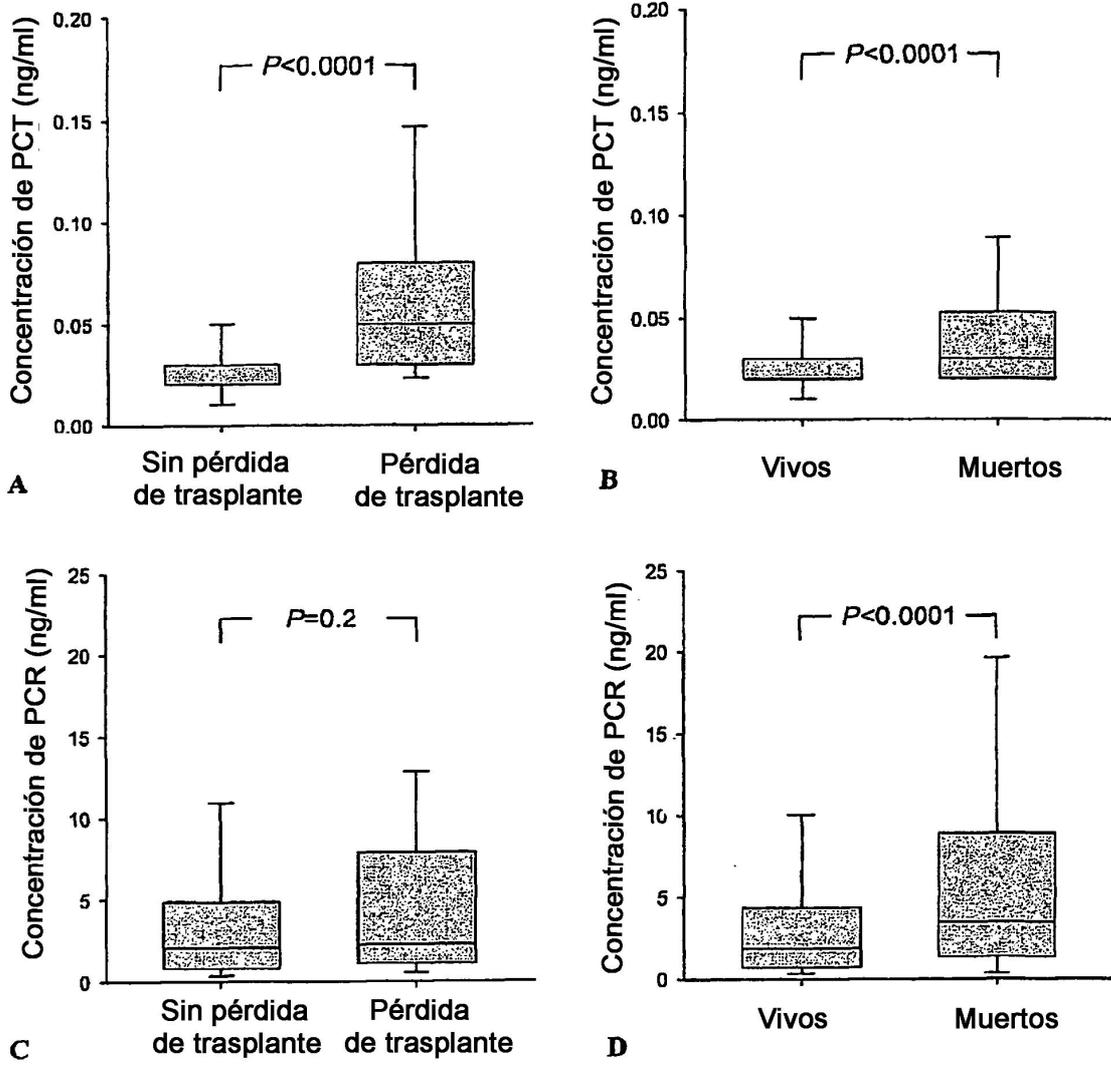


Figura 3

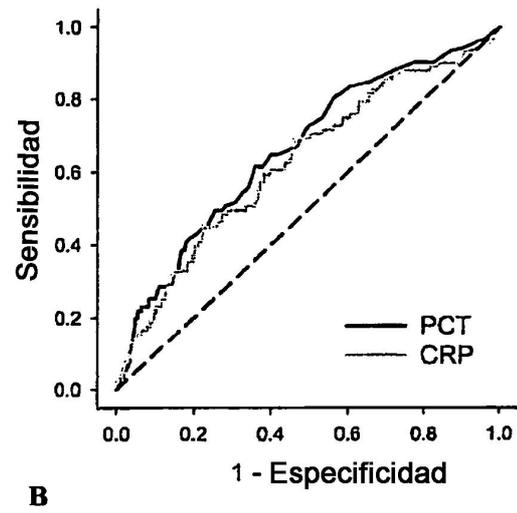
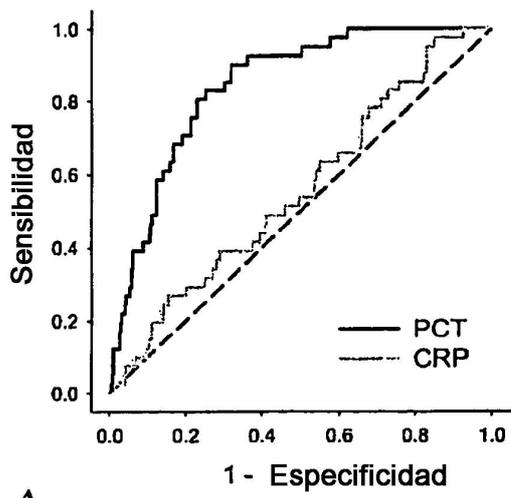


Figura 4

