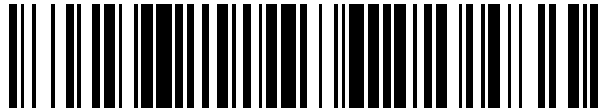


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 499 415**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2009 E 09776673 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2438441**

54 Título: **Nuevos biomarcadores para la evaluación de enfermedades renales**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.09.2014

73 Titular/es:

**BIOCRATES LIFE SCIENCES AG (100.0%)
Innrain 66
6020 Innsbruck, AT**

72 Inventor/es:

**LUNDIN. ULRIKA y
WEINBERGER, KLAUS**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 499 415 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

Nuevos biomarcadores para la evaluación de enfermedades renales

5 Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere al uso de biomarcadores específicos para la evaluación de enfermedades renales que son más sensibles a los cambios patológicos en el riñón, especialmente en el estadio inicial de la enfermedad o daño. Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para la evaluación de enfermedades renales en un sujeto mamífero.

Antecedentes de la técnica

[0002] La metabolómica es una medición cuantitativa exhaustiva de compuestos de bajo peso molecular que cubre sistemáticamente los metabolitos clave, lo que representa el intervalo completo de las rutas del metabolismo intermediario. En una estrategia de sistemas biológicos esta proporciona una lectura funcional de cambios determinados por el mapa genético, regulación, abundancia y modificación de proteínas e influencia ambiental. La capacidad para analizar matrices grandes de metabolitos extrae información bioquímica que refleja criterios de valoración funcionales reales de acontecimientos biológicos manifiestos, mientras que las tecnologías genómicas funcionales como la transcriptómica y la proteómica, aunque de gran valor, indican simplemente la posible causa de la respuesta fenotípica. Por tanto, no pueden predecir necesariamente los efectos de los fármacos, la respuesta toxicológica o el estado de la enfermedad a nivel fenotípico a no ser que se añada una validación funcional.

[0003] La metabolómica zanja esta falta de información describiendo en particular dicha información funcional ya que las diferencias de metabolitos en los fluidos biológicos y tejidos proporcionan la relación más próxima con las diversas respuestas fenotípicas. Huelga decir que estos cambios en el fenotipo bioquímico son de interés directo para las industrias farmacéuticas, de biotecnología y sanitarias una vez que la tecnología apropiada permite la exploración más rentable y la integración de esta información.

[0004] En general, el fenotipo no está previsto necesariamente por el genotipo. La distancia entre genotipo y fenotipo está cubierta por muchas reacciones bioquímicas, cada una con dependencias individuales de diversas influencias, que incluyen fármacos, nutrición y factores ambientales. En esta cadena de biomoléculas desde los genes al fenotipo, los metabolitos son las moléculas cuantificables con la relación más próxima al fenotipo. Muchos estados fenotípicos y genotípicos, como una respuesta tóxica a un fármaco o la prevalencia de una enfermedad se pronostican por diferencias en las concentraciones de metabolitos de importancia funcional dentro de los fluidos biológicos y tejidos.

[0005] La enfermedad renal crónica (ERC) supone una pérdida progresiva de la función renal en los túbulos y en los glomérulos, normalmente irreversible. La ERC es un problema de salud pública a nivel mundial, con complicaciones como insuficiencia renal, enfermedad cardiovascular y muerte prematura. La ERC puede aparecer por diversas razones, aunque una razón principal es una complicación debido a diabetes mellitus de tipo 2 denominada nefropatía diabética (ND). En Europa, hay aproximadamente 22,3 millones de personas que padecen diabetes y el 94,9% de estas sufren diabetes de tipo 2, la causa principal de enfermedad renal en estadio terminal (ERET) en la mayoría de los países industrializados de Europa (Ha H. y col. 2008). Un tercio de los pacientes con ERET son diabéticos (Wolf G. y Ritz E., 2003) y los datos recientes muestran un aumento epidemiológico de la ERET en pacientes con diabetes de tipo 2, lo más probablemente debido a mejores tratamientos para la hipertensión y para la cardiopatía coronaria, lo que hace que la mayoría de los pacientes sobrevivan lo suficiente como para desarrollar nefropatía y ERET (Sampeis Ch. 2008). En EE. UU., se prevé que el coste anual para el tratamiento de La ERET aumente a más del doble entre 1995 y 2010, de 11 800 a 28 300 millones de dólares americanos. Los factores económicos no se han estudiado de forma tan exhaustiva en Europa (Massi-Benedetti M & CODE-2 Advisory Board 2002) aunque en el coste del estudio de diabetes de tipo 2 (CODE-2) se evaluó el impacto de las complicaciones diabéticas sobre el coste del tratamiento de la diabetes. En el estudio se mostró que un paciente sin complicaciones tenía unos costes médicos anuales de aproximadamente 1505 € en comparación con un paciente con complicaciones microvasculares que tenía unos gastos médicos anuales de 2563 €, lo que supone un aumento del 70% (Williams R y col. 2002). La revista médica independiente líder mundial concluyó recientemente un estudio a largo plazo en el que se incluyó prácticamente a medio millón de adultos y en el que se demostró que prácticamente todos los sujetos desconocían su enfermedad hasta los estadios finales de la ERC. Puesto que se pensó que la ERC era tratable y podía prevenirse en los estadios iniciales (Wen CP y col. 2008) una detección precoz podría aliviar las complicaciones de los pacientes con diabetes de tipo 2 y reducir los costes de la atención sanitaria tanto

de los sistemas de salud pública como de los propios pacientes.

[0006] Los riñones realizan varias funciones para mantener una función adecuada del organismo, p. ej., eliminando mediante filtración los residuos y las toxinas, manteniendo la homeostasis y produciendo hormonas. Para mantener esta función renal apropiada, tiene que regularse la velocidad con la que la sangre se filtra a través de la membrana glomerular en el riñón. Se necesita una tasa de filtración glomerular (TFG) alta para mantener niveles extracelulares de agua y solutos estables y óptimos (Boron WF y Boulpaep EL. 2003). La TFG se calcula a partir del aclaramiento de la creatinina sérica, edad, étnica y género y se usa para dividir las ERC en cinco estadios, donde el último es la enfermedad renal en estadio terminal (ERET) y es necesario recurrir a diálisis o trasplante para sobrevivir. Ahora es bien sabido que cuanto antes se diagnostique y trate la disfunción renal, mayores son las probabilidades de conservar las nefronas restantes y reducir de ese modo la progresión.

[0007] Entre los marcadores convencionales para evaluar y diagnosticar la enfermedad renal se incluyen la TFG, la creatinina y la albúmina.

[0008] La TFG, tras un aumento en el estadio más inicial, se reduce antes de que aparezca ningún síntoma. Entre las desventajas de la medición de la TFG se incluyen su alto coste y la incompatibilidad con una monitorización analítica de rutina. La creatinina sérica es, como se mencionó anteriormente, el marcador utilizado con mayor frecuencia para calcular la TFG, aunque se ha propuesto la cistatina C como marcador más sensible que puede detectar incluso una reducción ligera de la TRG (Herget-Rosenthal S y col. 2007). Una desventaja es que no existe procedimiento de referencia o material de calibración uniforme para la cistatina C y suponen limitaciones adicionales el efecto de la disfunción tiroidea de dosis de glucocorticoides altas y, potencialmente, la presencia de enfermedades cardiovasculares sobre los niveles de cistatina C. Debido a las limitaciones de estos marcadores individuales, no se sugiere confiar por completo en la TFG estimada para tomar decisiones clínicas concretas. Aparte de la enfermedad renal, la edad es el segundo factor principal que influye sobre la TFG. Por tanto, una ligera disminución de la TFG no siempre puede ser debida a daño renal sino a la edad. También, no siempre la reducción de la TFG se debe a una enfermedad renal crónica. La medición de la TFG también se considera inconveniente y, por tanto, la función renal normalmente se estima mediante la concentración de creatinina sérica.

[0009] La creatinina sérica se ha utilizado durante mucho tiempo para detectar alteraciones en la enfermedad renal y también para calcular la TFG (Star R y col. 2002). La creatinina es un producto de degradación del fosfato de creatinina por el metabolismo muscular (Barr DB. y col. 2005) y la cantidad de esta formada cada día depende de la masa muscular, aunque las concentraciones plasmáticas son bastante estables en un individuo. La concentración de creatinina sérica se ve afectada por factores como la edad, el sexo, la raza y el tamaño corporal y, por tanto, normalmente se implementa la medida del aclaramiento de la creatinina. El aclaramiento de creatinina de un organismo se realiza a través de la filtración glomerular en los riñones, pero la creatinina también se secreta de forma activa a partir de la sangre en los túbulos. Esta tasa depende de factores genéticos y biológicos como el sexo y la edad y lleva a una sobreestimación del 15-20% de la TFG. Por tanto, la creatinina se considera un marcador no sensible, especialmente en personas de baja estatura y ancianos. También, otra deficiencia de la creatinina es que solo se detecta daño renal en estadios tardíos.

[0010] La albúmina es la proteína plasmática más abundante (Basi S, y col. 2008) y el daño estructural del riñón puede reflejarse por la elevación de la excreción de albúmina en orina, lo que se denomina microalbuminuria, de 30-300 mg/24 h. La microalbuminuria se desarrolla algunos años después de la aparición de la diabetes y tras 15-20 años progresa a macroalbuminuria, una concentración de albúmina en orina de más de 300 mg/24 h. La presencia de albuminuria es un rasgo característico de la nefropatía diabética y normalmente se mide con tiras reactivas. Existen algunas deficiencias en la albúmina como marcador del daño renal. En primer lugar, hasta hace un par de años se creía que la albúmina en orina que no se reabsorbía en las células tubulares proximales se excretaba intacta, pero la albúmina de hecho se excreta como una mezcla de albúmina intacta y péptidos derivados de la albúmina que no se detectan en las pruebas con tira reactiva y otras especies de albúmina intacta que tampoco se detectan. Esto deja cierto margen a resultados falsos negativos de la prueba. (Comper WD. & Osicka TM. 2005). En segundo lugar, la albuminuria es una confirmación de la nefropatía ya existente, lo que hace que la albúmina no sea un buen biomarcador pronóstico. Si se detecta nefropatía diabética antes de la aparición de microalbuminuria, cabe la posibilidad de que el tratamiento prevenga o revierta la progresión de la ERC. La medición de la albuminuria no puede identificar a todos los pacientes con daño renal.

[0011] Los dos isómeros de la metilarginina, la dimetilarginina simétrica (DMAS) y la dimetilarginina asimétrica (DMAA) se han estudiado de forma intensiva en el contexto de la enfermedad renal (revisión en Fleck C y col. 2001). Están formados por restos de arginina modificados postraduccionalmente por las proteína arginina

- metiltransferasas (PRMT). Mientras que la DMAS es prácticamente inerte desde un punto de vista fisiológico, al menos sin metabolizarse normalmente en el organismo, la DMAA tiene importancia biológica debido a su potencial como inhibidor endógeno de la óxido nítrico sintetasa (NOS), lo que significa que concentraciones elevadas de DMAA dan lugar a una reducción de la síntesis de NO y, en consecuencia, llevan a una alteración de la función endotelial. Se ha considerado desde hace décadas que la acumulación de DMAA contribuye a la hipertensión, a la defensa inmunológica y características implicadas en la ERC, y estudios animales han mostrado que la inhibición crónica de NOS inducida experimentalmente produce hipertensión sistemática y glomerular, isquemia glomerular, glomeruloesclerosis, lesión tubulointersticial y proteinuria (Zatz R y Baylis C., 1998). También se ha observado que la DMAS estaba significativa aumentada en pacientes con ERC, incluso más que la DMAA.
- 10 **[0012]** También, las acilcarnitinas se han relacionado con la ERC (Fougue D y col. 2006). Se ha observado un aumento de acilcarnitinas libres en el suero de pacientes con ERC debido a la disminución de la función excretora del riñón dañado.
- 15 **[0013]** Adicionalmente, el estrés oxidativo se ha relacionado con la progresión de la enfermedad renal durante muchos años (Loughrey CM y col. 1994, Ha H y col. 1995). En varios estudios se establece que un aumento del estrés oxidativo debido a hiperglucemia es el origen de complicaciones de la diabetes tanto microvasculares como macrovasculares (Sakana N y col. 2008). El estrés oxidativo se origina a partir de una abundancia de glucosa y ácidos grasos y cuando estos sustratos se suministran a la mitocondria para su metabolización, pueden escapar electrones de la cadena de transporte de electrones. El sulfóxido de metionina es uno de los indicadores más directos de oxidación por las especies de oxígeno reactivo (ROS, Mashima R y col. 2003), pero no se ha implementado antes como biomarcador de enfermedad renal. Además, se ha estudiado el papel de los intermedios del ciclo del ácido cítrico en la insuficiencia renal donde las concentraciones de citrato, fumarato, oxalacetato y malato estaban significativamente aumentadas en pacientes con ERC.
- 20 **[0014]** En pacientes con ERC, parece que las alteraciones metabólicas renales influyen sobre las alteraciones del metabolismo en el organismo completo y de los aminoácidos en el riñón. En condiciones normales solo una cantidad limitada de aminoácidos se excreta con la orina. Se ha observado una alteración de la conversión de la fenilalanina en tirosina que lleva a una acumulación de fenilalanina en estos pacientes. Adicionalmente, los riñones alterados afectan a la producción de arginina que se ha mostrado con una disminución de la síntesis de arginina renal tanto en estudios clínicos como en animales. También, se ha observado una reducción de la captación renal de citrulina y de la liberación de taurina, ornitina, alanina, tirosina y lisina en pacientes con ERC avanzada. Además, parece que se reduce la conversión de citrulina en arginina.
- 25 **[0015]** Adicionalmente, se ha sugerido que el metabolismo del triptófano tiene una función en la patogénesis de la ERC. La enzima limitante de velocidad en esta ruta en el riñón es la indolamino-2,3-dioxigenasa (IDO) que convierte el triptófano en N-formil-quinurenina la cual a su vez se cataboliza en quinurenina y, a continuación, hidroxiquinurenina. Se ha observado un aumento de la actividad de la IDO en estudios previos lo que explica la depleción del triptófano.
- 30 **[0016]** Se ha observado que aumentan los marcadores inflamatorios, como la proteína C-reactiva, interleuquina 6, interleuquina 18 y factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa y disminuye la fetuina en el suero de pacientes con diabetes y ND. Esto ocurre en un estadio muy inicial de la enfermedad y se correlaciona con el grado de albuminuria.
- 35 **[0017]** Entre los biomarcadores conocidos para el diagnóstico de ERC o ND se incluyen, por ejemplo, varios marcadores polipeptídicos (documentos US 2006286602 A1, CA2473814A1, EP 1972940 A1, US 2009081713 A1) que tienen diferentes masas moleculares y tiempos de migración, por ejemplo, el polipéptido del gen de la insuficiencia renal crónica 1a (CRFG-1a) (documentos JP 11069985 A, JP 11069984 A) así como marcados polinucleotídicos (documentos JP 2003235573 A, JP 2004187620 A).
- 40 **[0018]** La cistatina C mencionada anteriormente es uno de entre todos los marcadores proteicos usados para el diagnóstico de la enfermedad renal (documento JP 11064333 A) junto con la proteína de unión a holo y aporenitil (RBP) y la proteína de Tamm Horsfall (THP, (documento DE 10327773 A1)). Calbindina D-28k (una proteína de unión a calcio miembro de la gran familia manos-EF), molécula de lesión renal 1 (Kim-1, proteína de membrana de tipo 1 que contiene un dominio inmunoglobulina de seis cisteína extracelular), proteína relacionada con globulina alfa-2u (Alfa-2u), también conocida como lipocalina 2 (LCN2) o lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilos (NGAL) en humanos (almacenado en los gránulos de neutrófilos), osteopontina (OPN), también conocida como fosfoproteína 1 secretada (SPP1, una fosfoproteína glucosilada y altamente ácida secretada que contiene un motivo
- 45
- 50

de adhesión celular arginina-glicina-ácido aspártico (RGD)), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, conocido porque promueve la angiogénesis, aumenta la permeabilidad vascular, sirve como quimiotáctico para monocitos y tiene una función en la diabetes, curación de heridas, respuestas inflamatorias y remodelación tisular (documento WO 2008116867 A1), precursor de N-acetilmuramilo-L-alanina amidasa, adiponectina, precursor de la proteína AMBP (alfa-1-microglobulina), precursor de la cadena alfa de la proteína de unión a C4b, precursor de la ceruloplasmina, precursor de C3 del complemento, precursor del componente C9 del complemento, precursor del factor D del complemento, alfa-1B-glicoproteína, precursor de beta-2-glicoproteína I, precursor del cofactor II de heparina, proteína de la región de la cadena C, precursor de la alfa-2-glicoproteína rica en leucina, precursor del factor derivado de pigmento epitelial, precursor de la proteína plasmática de unión al retinol y subunidad 10 del factor de iniciación de traducción 3 (documento EP 1905846 A2).

[0019] Antígenos, citotoxinas e inhibidores del crecimiento celular pueden ser útiles como biomarcadores (documento WO 2008101231 A2). Se ha encontrado que el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF-23) y la adiponectina son marcadores con gran capacidad pronostica de la progresión de la enfermedad renal crónica tanto independientemente como en combinación (documento WO 2008089936 A1). Otro procedimiento utilizado para el diagnóstico y el seguimiento de la enfermedad renal o la predisposición a la misma es la detección del supresor tumoral de Hippel-Lindau (pVHL), receptor de quemoquina CXC 4 (CXCR4), integrina β -1, polipéptido del factor de crecimiento alfa derivado de plaquetas (PDGF-A), factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF1 α) y/o factor de crecimiento transformante beta (TGF β) en una muestra del sujeto (documento US 2008/0038269 A1). Midiendo la lactoferrina, la mieloperoxidasa y el antígeno carcinoembrionario (CEA) (documento JP 9072906 A) y la fibronectina (documento JP 9274036 A) también puede diagnosticarse una enfermedad renal.

[0020] En otro procedimiento se describe la medición del nivel de factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF) en una muestra para decidir sobre la presencia y el progreso de la fibrosis renal y enfermedades renales asociadas, en particular complicaciones asociadas con la diabetes, la hiperglicemia y la hipertensión (documento US 2004/0224360 A1).

[0021] En el campo de la genómica también existen varios biomarcadores evaluados con la enfermedad renal. En una invención se incluye la identificación de genes expresados solo en células de interés clínico o científico, como podocitos y células del túbulo proximal (documento CN 1863928 A). Los marcadores genéticos del antígeno de leucocitos humanos (HLA) HLA-A11, HLA-DR9 y HLA-DQA1*0320 son todos genes que predisponen a la diabetes y a la nefropatía (documento CN 101294215 A). Se ha encontrado que una desintegrina y metaloproteinasas con motivo 4 de la trombospondina de tipo 1, agreganasa 1 (ADAMTS4) es útil como biomarcador sanguíneo para la ERC (documento 2009002451 A2) así como los genes de calbindina-D28k, KIM-1, OPN, EGF, clusterina, VEGF, OAT-K1, aldolasa A, aldolasa B, podocina, alfa-2u, C4 (documento EP 1925677 A2) y ceramida glucosiltransferasa (CGT) (documento WO 03057874 A1).

[0022] También se han utilizado marcadores de ARN como marcadores para la enfermedad renal (documento EP 2058402 A1). Por ejemplo, se selecciona un marcador de ARN renal a partir de la proteína reguladora de andrógenos específica de riñón (KAP) expresada en las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales del riñón, molécula de lesión renal-1 (KIM-1), una proteína de membrana expresada en las células epiteliales del túbulo proximal, expresión del factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) inducida en el riñón tras una lesión isquémica y tras el tratamiento con un agente nefrotóxico, factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF-1), factor de crecimiento de queratinocitos (FGF-7) y el receptor FGFR2 IIIb de FGF-7 inducido en el riñón tras el tratamiento con un agente nefrotóxico; las proteínas de los canales de agua, acuaporina 1, 2 y 3, se expresan especialmente en el riñón; glicoproteína de Tamm Horsfall, expresada en células epiteliales renales y localizada en las ramas ascendentes gruesas de las asas de Henle y los túbulos contorneados distales del riñón y, finalmente, la expresión del gen de respuesta al crecimiento temprano (Egr-1), el protooncogen (c-fos) y el gen de respuesta al estrés (hsp 70) se activan tras la lesión isquémica del riñón.

[0023] Otros procedimientos descritos en la técnica previa para evaluar la enfermedad renal comprenden determinar una actividad proteasa en la orina usando dos o más sustancias y analizar los patrones de la actividad proteasa frente a los sustratos (documento WO 2008001840 A1) o midiendo el hierro catalítico en humanos (documento US 2007238760 A1).

[0024] Aunque se han sugerido varios biomarcadores para evaluar la enfermedad renal, aquellos descritos y, en particular, los que se utilizan hoy en día en clínica no son suficientemente sensibles y solo se detectan en estadios tardíos de la enfermedad. Por tanto, sigue existiendo una notable necesidad médica de marcadores más sensibles para los cambios patológicos en el riñón, especialmente en estadio inicial de la enfermedad o el daño.

- 5 **[0025]** Aunque los marcadores mencionados anteriormente como la albúmina y la creatinina se han usado para descubrir a pacientes diabéticos en riesgo de nefropatía, es de extrema importancia encontrar biomarcadores metabólicos nuevos y más sensibles que tengan la capacidad de pronosticar o detectar la nefropatía diabética en un estadio más inicial, haciendo que sea posible intervenir en el tratamiento para prevenir, o al menos ralentizar, la progresión del daño renal llevando finalmente a ERET y controlar las complicaciones relacionadas.
- 10 **[0026]** En el documento US 2007/004044 A1 se describe un aparato y un procedimiento de análisis del perfil metabólico en una muestra biológica.
- 15 **[0027]** En Toxicologic Pathology, Sage Science Press, vol. 37, N.º 3, 1. Enero de 2009, páginas 280 - 292; «Discovery of metabolomic biomarkers for early detection of nephrototoxicity» se describe el descubrimiento de biomarcadores metabolómicos para la detección inicial de nefrotoxicidad.
- 20 **[0028]** En Journal of Renal Nutrition: la revista oficial del Consejo de Nutrición Renal de la National Kidney Foundation de Estados Unidos, abril. 2006, vol. 16, N.º 2, 1. Enero de 2006, páginas 125-131; «Relationship between serum carnitine, acylcarnitines, and renal function in patient with chronic renal disease» se describe un estudio sobre la relación entre la carnitina en suero, acilcarnitinas, función renal y pacientes con enfermedad crónica renal.
- 25 **[0029]** En Advances in Peritoneal Dialysis. Conferencia sobre Diálisis Peritoneal 2006, vol. 22, 2006, páginas 130-135; «Total carnitine and acylated carnitine ratio: relationship of free carnitine with lipid parameters in pediatric dialysis patients» se describe un estudio con respecto a la relación de la carnitina libre con los parámetros lipídicos en pacientes pediátricos en diálisis.
- 30 **[0030]** En Molecular and Cellular Proteomics, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. vol. 8, N.º 3, 1. Enero de 2009, páginas 558-570; «Urine metabolomics analysis for kidney cancer detection and biomarker discovery» se describe un análisis metabolómico de la orina para la detección del cáncer renal y el descubrimiento de biomarcadores.
- 35 **[0031]** En Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, Ashley Publications, Londres, vol. 3, N.º 4, 1. de enero de 2007, páginas 527 – 544; «Biochemical mechanisms of nephrotoxicity: application for metabolomics» se describe un estudio sobre mecanismos bioquímicos de nefrotoxicidad como aplicación para la metabolómica.
- 40 **[0032]** A la vista de los problemas mencionados anteriormente existentes en la técnica previa, el objeto subyacente de la presente invención es la provisión de biomarcadores para evaluar enfermedades renales, cuyos marcadores son más sensibles a los cambios patológicos en el riñón, especialmente en el estadio inicial de la enfermedad o daño. De forma óptima, el marcador debería ser fácilmente detectable en sangre, su nivel debería estar relacionado de modo consistente con el grado de lesión renal y su nivel debería cambiar. Además, es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para evaluar las enfermedades renales en una muestra biológica.
- 45 **[0033]** Para resolver los objetos subyacentes de la presente invención, los inventores basaron sus investigaciones en la metabolómica de modo que pudiera facilitarse la comprensión de los cambios bioquímicos que se producen en el riñón durante el transcurso de la enfermedad y ofrecer varios biomarcadores nuevos y potencialmente mejores. De hecho, el riñón es un órgano especialmente activo desde un punto de vista metabólico donde los metabolitos se excretan o absorben de nuevo dependiendo de su función en el organismo. Por tanto, supondría una mejora significativa tener biomarcadores metabólicos para la enfermedad renal, que también pudieran proporcionar más información sobre la función del riñón y las reacciones bioquímicas que se producen en éste. Los inventores han encontrado que se proporciona una imagen más completa de todas las rutas y mecanismos implicados cuando se usa un panel de metabolitos que se alteran con la progresión de la enfermedad renal mejor que emplear solo un único marcado como en la técnica previa.
- 50 **[0034]** Por tanto, la presente invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas y proporciona el uso de biomarcadores específicos (es decir, un nuevo conjunto de biomarcadores) para evaluar las enfermedades renales que son más sensibles a los cambios patológicos en el riñón, especialmente en el estadio inicial de la enfermedad o daño. Además, la presente invención también proporciona un procedimiento para la evaluación de enfermedades renales en un sujeto mamífero.

Breve descripción de las figuras

[0035] En el anexo de la memoria descriptiva se hace referencia a las siguientes figuras 1-14. En estas se muestran ejemplos según la invención del aumento o disminución de un biomarcador metabólico en la progresión de la enfermedad renal.

10 La figura 1 se refiere a la dimetilarginina simétrica (DMAS) en los estadios 3-5 de la ERC en diabéticos y no diabéticos y se muestra que los pacientes en estadio 5 presentaban un aumento muy significativo ($p < 0,01$) del cociente en comparación con los pacientes en estadio 3 y estadio 4, que sugiere que la DMAS es un buen marcador de la progresión de la ERC.

15 La figura 2 se refiere al cociente de DMAS en los estadios 3-5 de la ERC y se muestra que los pacientes en estadio 5 presentaban un aumento altamente significativo ($p < 0,01$) del cociente en comparación con los pacientes en estadio 3 y estadio 4.

20 La figura 3 se refiere a diagramas de caja del cociente DMAS/arginina en los estadios 3-5 de la ERC en diabéticos y no diabéticos y se muestra que los pacientes en estadio 5 presentaban un aumento muy significativo ($p < 0,01$) del cociente en comparación con los pacientes en estadio 3 y en estadio 4, lo que sugiere que el cociente DMAS/arginina es un buen marcador de la progresión de la ERC. El cociente es indicativo de que DMAS/Arg es un buen marcador pronóstico y refleja un aumento de la actividad de la proteína arginina-N-metiltransferasa II.

25 La figura 4 se refiere a diagramas de caja del cociente DMAS/arginina en los estadios 3-5 de la ERC y se muestra que los pacientes en estadio 5 presentaban un aumento altamente significativo ($p < 0,01$) del cociente en comparación con los pacientes en estadio 3 y estadio 4. DMAS es un buen marcador pronóstico y refleja un aumento de la actividad de la proteína arginina-N-metiltransferasa II.

30 La figura 5 se refiere a diagramas de caja de la acilcarnitica glutarilcarnitina en los estadios 3-5 de la ERC en diabéticos y no diabéticos y muestra que la glutarilcarnitina presentaba niveles elevados en los estadios tardíos de la ERC.

En la figura 6 se muestran diagramas de caja de la glutarilcarnitina en los estadios 3-5 de la ERC.

35 La figura 7 se refiere a diagramas de caja del cociente citrulina/arginina en los estadios 3-5 de la ERC en diabéticos y no diabéticos y se muestra que los pacientes en el estadio 5 presentaban un aumento muy significativo ($p < 0,01$) del cociente en comparación con los pacientes en estadio 3, y el cociente es indicativo de una alteración de la actividad enzimática en el ciclo de la urea.

40 La figura 8 se refiere a diagramas de caja del cociente citrulina/arginina en los estadios 3-5 de la ERC.

45 La figura 9 se refiere a diagramas de caja del cociente ornitina/arginina en los estadios 3-5 de la ERC en diabéticos y no diabéticos y muestra que los pacientes en estadio 5 presentaban un aumento muy significativo ($p < 0,01$) del cociente en comparación con los pacientes en estadio 3 solo en no diabéticos, lo que indica que este biomarcador podría ser importante para un diagnóstico diferencial entre diferentes tipos de enfermedad renal.

50 La figura 10 se refiere a diagramas de caja del cociente sulfóxido de metionina/metionina en los estadios 3-5 de la ERC en diabéticos y no diabéticos y muestra que este marcador de estrés oxidativo está aumentado de forma muy significativa ($p < 0,01$) en pacientes en estadio 5 en comparación con pacientes en estadio 3.

55 La figura 11 se refiere a diagramas de caja del cociente sulfóxido de metionina (MetSO)/metionina (Met) en los estadios 3-5 de la ERC y muestra que los pacientes en estadio 5 presentaban un aumento muy significativo ($p < 0,01$) del cociente en comparación con los pacientes en estadio 3, lo que sugiere que el cociente MetSO/Met es un buen biomarcador de la progresión de la ERC.

La figura 12 se refiere a diagramas de caja del fumarato en los estadios 3-5 de la ERC y muestra que, puesto que no aparece fumarato en los estadios iniciales, el fumarato funciona como un marcador cualitativo.

La figura 13 se refiere a diagramas de caja de alfa-cetoglutarato en los estadios 3-5 de la ERC en diabéticos

y no diabéticos y muestra que los pacientes diabéticos en estadio 5 presentaban un aumento muy significativo ($p < 0,01$) del cociente en comparación con los pacientes en estadio 3.

La figura 14 se refiere a diagramas de caja de alfa-cetoglutarato en los estadios 3-5 de la ERC.

5

Descripción de las realizaciones preferidas

[0036] Empleando los biomarcadores (conjunto de) específicos y el procedimiento según la presente invención ha sido posible evaluar de forma más adecuada y fiable la enfermedad renal. «Evaluar» en el sentido de la presente invención significa el diagnóstico del inicio y el seguimiento de la progresión de la enfermedad, en especial, la detección y el marcaje de la enfermedad en los diferentes estadios. La presente invención permite predecir y diagnosticar la enfermedad renal de una forma mejorada y en un estadio inicial de la misma y permite una detección más sensible de los cambios patológicos en el riñón. De hecho, los biomarcadores según la invención se detectan fácilmente en sangre, sus niveles se relacionan de forma consistente con el grado de enfermedad/lesión renal y sus cambios de nivel.

[0037] Además, en la evaluación también se debería incluir el hecho de que estos marcadores son adecuados para evaluar la nefrotoxicidad en modelos animales o en ensayos clínicos en fase I. En otras palabras, también son adecuados para evaluar la nefrotoxicidad preclínica y clínica, es decir, también en un estadio muy inicial del desarrollo de fármacos, en concreto en modelos animales o en ensayos clínicos en fase I.

[0038] En general, un biomarcador es una herramienta valiosa debido a la posibilidad de distinguir entre dos o más estados biológicos, trabajarlo como indicador de un proceso biológico normal, un proceso patológico o como reacción a una intervención farmacológica. Un metabolito es un compuesto de bajo peso molecular (< 1 kDa), más pequeño que la mayoría de las proteínas, ADN y otras macromoléculas. Pequeños cambios en la actividad de las proteínas tienen como resultado grandes cambios en las reacciones bioquímicas y sus metabolitos (=marcador metabólico, teniendo en cuenta el metabolismo del organismo), cuyas concentraciones, flujos y mecanismos de transporte son sensibles a enfermedades e intervenciones farmacológicas. Esto permite obtener un perfil individual de las sustancias fisiológicas y fisiopatológicas, que refleja tanto factores genéticos como ambientales como nutrición, actividad física, microflora intestinal y medicación. Por tanto, un biomarcador metabólico proporciona información más completa que, por ejemplo, una proteína u hormona que sean biomarcadores, pero no biomarcadores metabólicos.

[0039] En vista de lo cual, el término biomarcador metabólico como se utiliza en este documento se define como un compuesto adecuado como indicador del estado de la enfermedad renal, en especial de la ERC, siendo un metabolito o compuesto metabólico que aparece durante procesos metabólicos en el organismo del mamífero. Se pretende que el término biomarcador metabólico también comprenda con cociente producto/sustrato con respecto a una reacción enzimática.

[0040] El biomarcador (conjunto) metabólico medido según la presente invención comprende obligatoriamente las siguientes clases de metabolitos (es decir, analitos): al menos dos aminoácidos, al menos dos acilcarnitinas y al menos dos aminas biogénicas. Las definiciones de estas clases son conocidas para los expertos, a continuación. Además, se entiende por aminas biogénicas un grupo de compuestos activos biológicos naturales derivados por descarboxilación enzimática de los aminoácidos naturales. Una sustancia biogénica es una sustancia proporcionada por los procesos biológicos y las aminas biogénicas contienen un grupo amino. La mayoría de ellas actúan como neurotransmisores, aunque también presentan cierta actividad en la regulación de, por ejemplo, la presión arterial y la temperatura corporal.

[0041] Se ha encontrado sorprendentemente que midiendo un conjunto de biomarcadores que comprenden estas clases de metabolitos se puede predecir y diagnosticar la enfermedad renal de forma mejorada y en un estadio inicial de la misma. En particular, esto permite una detección más sensible de los cambios patológicos en el riñón. Si se omite una clase de metabolitos de este grupo o si disminuye el número de los mismos la evaluación de la enfermedad renal se hace menos sensible y menos fiable. Esto se aplica especialmente a los estadios iniciales de la enfermedad que no son detectables de forma fiable en absoluto según los procedimientos conocidos usando biomarcadores conocidos. De hecho, la medición de al menos dos aminoácidos, al menos dos acilcarnitinas y al menos dos aminas biogénicas al mismo tiempo permite un diagnóstico más fiable de la enfermedad renal y, en particular, de ERC y ND, ya en los estadios 1-3, y también en los estadios 4 y 5. Este hecho no ha sido descrito ni se ha puesto de manifiesto en la técnica previa.

- [0042]** Preferiblemente, el conjunto de biomarcadores además comprende un cociente de un producto/sustrato con respecto a una reacción enzimática, más preferiblemente el cociente DMAS/arginina, el cociente citrulina/arginina, el cociente ornitina/arginina y/o el cociente sulfóxido de metionina/metionina (cf. figuras adjuntas). El cociente DMAS/arginina se refiere a la enzima proteína arginina N-metiltransferasa (PRMT), el cociente citrulina/arginina se refiere a la óxido nítrico sintetasa (NOS), el cociente ornitina/arginina se refiere a la arginasa y el cociente sulfóxido de metionina/metionina se refiere a la oxidación por especies reactivas de oxígeno (ROS). Midiendo además estos cocientes, el rendimiento del diagnóstico del conjunto de biomarcadores y el procedimiento según la invención pueden mejorarse adicionalmente.
- 10 **[0043]** Más preferiblemente, el conjunto de biomarcadores utilizado según la invención comprende además uno o más metabolitos seleccionados a partir del grupo de poliaminas, fosfatidilcolinas, mono y oligosacáridos (azúcares) reducidos, esfingomielinas, eicosanoides, ácidos biliares e intermediarios del metabolismo energético. En las tablas 4-9 a continuación se proporcionan ejemplos preferidos de estas clases. De nuevo, midiendo además metabolitos de estas clases, el rendimiento del diagnóstico del conjunto de biomarcadores y el procedimiento según la invención pueden mejorarse adicionalmente.
- 15 **[0044]** Un conjunto de biomarcadores especialmente preferibles es aquel en el que los aminoácidos se seleccionan a partir de Cit, Phe, Asn, Trp, His, Orn, Tyr, Met, Ala, Arg, Thr, Lys, Gln, Ser, Val, Glu y Pro, las acilcarnitinas se seleccionan a partir de C0, C5-DC(C6-OH), C5:1-DC, C8, C9, C10, C10:1, Cm4:1, y C18:1, las aminas biogénicas se seleccionan a parte de MetSO, creatinina, DMAS, DMAA, DMA total y serotonina y los cocientes se seleccionan a partir del cociente DMAS/arginina, el cociente citrulina/arginina, el cociente ornitina/arginina y/o el cociente sulfóxido de metionina/metionina.
- 20 **[0045]** Como se mencionó anteriormente, la enfermedad que se va a evaluar es la enfermedad renal. Preferiblemente, es enfermedad renal crónica (ERC), más preferiblemente nefropatía diabética (ND).
- 25 **[0046]** La muestra biológica se obtiene de un mamífero, preferiblemente, un ratón, una rata, una cobaya, un perro, un mini cerdo o un humano. La muestra biológica es una muestra de sangre. Por tanto, el procedimiento según la invención es un procedimiento *in vitro*. Para la medición de las concentraciones de metabolito en la muestra biológica se emplea un procedimiento analítico cuantitativo como cromatografía, espectroscopia y espectrometría de masas, siendo la espectrometría de masas especialmente preferida. La cromatografía puede comprender CG, CL, HPLC y UPLC; la espectroscopia puede comprender UV/Vis, IR y RMN, y la espectrometría de masas puede comprender ESI-QqQ, ESI-QqTOF, MALDI-QqQ, MALDI-QqTOF y MALDI-TOF-TOF. Se prefiere el uso de espectrometría de masa en tándem con FIA y HPLC. Estos procedimientos analíticos son, en general, conocidos por los expertos.
- 30 **[0047]** Para medir las cantidades de metabolitos objetivo de la metabolómica se usa la cuantificación de los metabolitos en la muestra biológica, incluyendo las clases de analitos aminoácidos, aminas biogénicas, poliaminas, acilcarnitinas, fosfatidilcolinas, mono y oligosacáridos reducidos, esfingomielinas, eicosanoides, ácidos biliares e intermediarios del metabolismo energético. Como intermediarios del metabolismo energético se entenderán azúcares fosforilados, ácidos orgánicos mono, di y trivalentes y nucleótidos. Sin embargo, es necesario según la invención que entre los metabolitos medidos estén contenidos al menos las clases de analitos de aminoácidos, acilcarnitinas y aminas biogénicas. La cuantificación se realiza usando la presencia de patrones internos marcados con isótopos y se determina mediante los procedimientos descritos anteriormente. En las tablas siguientes se indica una lista de analitos incluyendo sus abreviaturas (códigos BC) que son adecuados como metabolitos para determinar según la invención.
- 45

Tabla 1: aminoácidos (µM)

| Código BC | Analito |
|-----------|-------------|
| Ala | Alanina |
| Arg | Arginina |
| Asn | Asparragina |
| Asp | Aspartato |
| Cit | Citrulina |
| Gln | Glutamina |
| Glu | Glutamato |
| Gly | Glicina |
| His | Histidina |

ES 2 499 415 T3

| Código BC | Analito |
|-----------|--------------|
| Ile | Isoleucina |
| Leu | Leucina |
| Lys | Lisina |
| Met | Metionina |
| Orn | Ornitina |
| Phe | Fenilalanina |
| Pro | Prolina |
| Ser | Serina |
| Thr | Treonina |
| Trp | Triptófano |
| Tyr | Tirosina |
| Val | Valina |

Tabla 2: acilcarnitina (µM)

| Código BC | Analito |
|---------------|--|
| Co | Carnitina (libre) |
| C2 | Acetilcarnitina |
| C3 | Propionilcarnitina |
| C3:1 | Propenoilcarnitina |
| C3-DC | Malonilcarnitina |
| C3-DC-M | Metilmalonilcarnitina |
| C3-OH | Hidroxipropionilcarnitina |
| C4 | Butirilcarnitina / Isobutirilcarnitina |
| C4:1 | Butenoilcarnitina |
| C4:1-DC (C10) | Fumarilcarnitina (Decanoilcarnitina) |
| C4-OH | 3-Hidroxibutirilcarnitina |
| C5 | Isovalerilcarnitina / 2-Metilbutirilcarnitina / Valerilcarnitina |
| C5:1 | Tigililcarnitina / 3-Metil-crotonilcarnitina |
| C5:1-DC (C11) | Glutaconilcarnitina / Mesaconilcarnitina (Undecanoilcarnitina) |
| C5-DC (C6-OH) | Glutarilcarnitina |
| C5-M-DC | Metilglutarilcarnitina |
| C5-OH | 3-Hidroxiisovalerilcarnitina / 3-Hidroxi-2-metilbutirilo |
| C6 | Hexanoilcarnitina [caproilcarnitina] |
| C6:1 | Hexenoilcarnitina |
| C6-OH | Hidroxihexanoilcarnitina [Hidroxicaproilcarnitina] |
| C7 | Heptanoilcarnitina [Enantilcarnitina] |
| C7-DC | Pimelilcarnitina |
| C8 | Octanoilcarnitina [Caprililcarnitina] |
| C8:1 | Octenoilcarnitina |
| C8-DC | Octanodioilcarnitina [Suberilcarnitina] |
| C9 | Nonanoilcarnitina [Pelargonilcarnitina] |
| C10 (C4:1-DC) | Decanoilcarnitina [Caprilcarnitina] (Fumarilcarnitina) |
| C10:1 | Decenoilcarnitina |
| C10:2 | Decadienoilcarnitina |
| C10-DC | Decanodioilcarnitina [Sebacilcarnitina] |
| C11 (C5:1-DC) | Undecanoilcarnitina (Glutaconilcarnitina / Mesaconilcarnitina) |
| C12 | Dodecanoilcarnitina [Laurilcarnitina] |
| C12:1 | Dodecenoilcarnitina |
| C12-DC | Dodecanodioilcarnitina |
| C14 | Tetradecanoilcarnitina [Miristolcarnitina] |
| C14:1 | Tetradecenoilcarnitina [Miristoleilcarnitina] |
| C14:1-OH | 3-Hidroxitetradecenoilcarnitina [3-Hidroximiristoleilcarnitina] |
| C14:2 | Tetradecadienoilcarnitina |
| C14:2-OH | 3-Hidroxitetradecadienoilcarnitina |

| Código BC | Analito |
|------------------|--|
| C14-OH | 3-Hidroxitetradecanoilcarnitina [Hidroximiristilcarnitina] |
| C16 | Hexadecanoilcarnitina [Palmitoilcarnitina] |
| C16:1 | Hexadecenoilcarnitina [Palmitoleilcarnitina] |
| C16:1-OH | 3-Hidroxihexadecenoilcarnitina [3-Hidroxipalmitoleilcarnitina] |
| C16:2 | Hexadecadienoilcarnitina |
| C16:2-OH | 3-Hidroxihexadecadienoilcarnitina |
| C16-OH | 3-Hidroxihexadecanoilcarnitina [3-Hidroxipalmitoilcarnitina] |
| C18 | Octadecanoilcarnitina [Estearilcarnitina] |
| C18:1 | Octadecenoilcarnitina [Oleilcarnitina] |
| C18:1-OH | 3-Hidroxioctadecenoilcarnitina [3-Hidroxioleilcarnitina] |
| C18:2 | Octadecadienoilcarnitina [Linoleilcarnitina] |
| C18:2-OH | 3-Hidroxioctadecadienoilcarnitina [3-Hidroxilinoleilcarnitina] |

Tabla 3: aminas biogénicas (µM)

| Código BC | Analito |
|--------------------|----------------------------|
| DMAA | Dimetilarginina asimétrica |
| DMAS | Dimetilarginina simétrica |
| DMA total | Dimetilarginina total |
| Histamina | Histamina |
| MetSO | Sulfóxido de metionina |
| Quinurenina | Quinurenina |
| Hidroxiquinurenina | Hidroxiquinurenina |
| Putrescina | Putrescina |
| Espermidina | Espermidina |
| Espermina | Espermina |
| Serotonina | Serotonina |
| Creatinina | Creatinina |

Tabla 4: fosfatidilcolinas (µM)

| Código BC | Analito |
|------------------|--|
| lysoPC a C14:0 | Lisofosfatidilcolina con resto acilo C14:0 |
| lysoPC a C16:0 | Lisofosfatidilcolina con resto acilo C16:0 |
| lysoPC a C16:1 | Lisofosfatidilcolina con resto acilo C16:1 |
| lysoPC a C17:0 | Lisofosfatidilcolina con resto acilo C17:0 |
| lysoPC a C18:0 | Lisofosfatidilcolina con resto acilo C18:0 |
| lysoPC a C18:1 | Lisofosfatidilcolina con resto acilo C18:1 |
| lysoPC a C18:2 | Lisofosfatidilcolina con resto acilo C18:2 |
| lysoPC a C20:3 | Lisofosfatidilcolina con resto acilo C20:3 |
| lysoPC a C20:4 | Lisofosfatidilcolina con resto acilo C20:4 |
| lysoPC a C24:0 | Lisofosfatidilcolina con resto acilo C24:0 |
| lysoPC a C26:0 | Lisofosfatidilcolina con resto acilo C26:0 |
| lysoPC a C26:1 | Lisofosfatidilcolina con resto acilo C26:1 |
| lysoPC a C28:0 | Lisofosfatidilcolina con resto acilo C28:0 |
| lysoPC a C28:1 | Lisofosfatidilcolina con resto acilo C28:1 |
| lysoPC a C6:0 | Lisofosfatidilcolina con resto acilo C6:0 |
| PC aa C24:0 | Fosfatidilcolina con adición de restos diacilo C24:0 |
| PC aa C26:0 | Fosfatidilcolina con adición de restos diacilo C26:0 |
| PC aa C28:1 | Fosfatidilcolina con adición de restos diacilo C28:1 |
| PC aa C30:0 | Fosfatidilcolina con adición de restos diacilo C30:0 |
| PC aa C30:2 | Fosfatidilcolina con adición de restos diacilo C30:2 |
| PC aa C32:0 | Fosfatidilcolina con adición de restos diacilo C32:0 |
| PC aa C32:1 | Fosfatidilcolina con adición de restos diacilo C32:1 |
| PC aa C32:2 | Fosfatidilcolina con adición de restos diacilo C32:2 |
| PC aa C32:3 | Fosfatidilcolina con adición de restos diacilo C32:3 |
| PC aa C34:1 | Fosfatidilcolina con adición de restos diacilo C34:1 |

| Código BC | Analito |
|------------------|--|
| PC ae C40:5 | Fosfatidilcolina con adición de restos acilalquilo C40:5 |
| PC ae C40:6 | Fosfatidilcolina con adición de restos acilalquilo C40:6 |
| PC ae C42:0 | Fosfatidilcolina con adición de restos acilalquilo C42:0 |
| PC ae C42:1 | Fosfatidilcolina con adición de restos acilalquilo C42:1 |
| PC ae C42:2 | Fosfatidilcolina con adición de restos acilalquilo C42:2 |
| PC ae C42:3 | Fosfatidilcolina con adición de restos acilalquilo C42:3 |
| PC ae C42:4 | Fosfatidilcolina con adición de restos acilalquilo C42:4 |
| PC ae C42:5 | Fosfatidilcolina con adición de restos acilalquilo C42:5 |
| PC ae C44:3 | Fosfatidilcolina con adición de restos acilalquilo C44:3 |
| PC ae C44:4 | Fosfatidilcolina con adición de restos acilalquilo C44:4 |
| PC ae C44:5 | Fosfatidilcolina con adición de restos acilalquilo C44:5 |
| PC ae C44:6 | Fosfatidilcolina con adición de restos acilalquilo C44:6 |

Tabla 5: esfingomielinas (μM)

| Código BC | Analito |
|------------------|---|
| SM (OH) C14:1 | Hidroxiesfingomielina con adición de residuos acilo C14:1 |
| SM (OH) C16:1 | Hidroxiesfingomielina con adición de residuos acilo C16:1 |
| SM (OH) C22:1 | Hidroxiesfingomielina con adición de residuos acilo C22:1 |
| SM (OH) C22:2 | Hidroxiesfingomielina con adición de residuos acilo C22:2 |
| SM (OH) C24:1 | Hidroxiesfingomielina con adición de residuos acilo C24:1 |
| SM C14:0 | Esfingomielina con adición de residuos acilo C14:0 |
| SM C16:0 | Esfingomielina con adición de residuos acilo C16:0 |
| SM C16:1 | Esfingomielina con adición de residuos acilo C16:1 |
| SM C18:0 | Esfingomielina con adición de residuos acilo C18:0 |
| SM C18:1 | Esfingomielina con adición de residuos acilo C18:1 |
| SM C20:2 | Esfingomielina con adición de residuos acilo C20:2 |
| SM C22:3 | Esfingomielina con adición de residuos acilo C22:3 |
| SM C24:0 | Esfingomielina con adición de residuos acilo C24:0 |
| SM C24:1 | Esfingomielina con adición de residuos acilo C24:1 |
| SM C26:0 | Esfingomielina con adición de residuos acilo C26:0 |
| SM C26:1 | Esfingomielina con adición de residuos acilo C26:1 |

Tabla 6: prostaglandinas

| Código BC | Analito |
|------------------|---|
| 9S-HODE | ácido (\pm)9-hidroxi-10E,12Z-octadecadienoico |
| 13S-HODE | ácido 13(S)-hidroxi-9Z,11E-octadecadienoico |
| 14(15)-EpETE | ácido (\pm)14(15)-epoxi-5Z,8Z,11Z,17Z-eicosatetraenoico |
| 12S-HETE | ácido 12(S)-hidroxi-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraenoico |
| 15S-HETE | ácido 15(S)-hidroxi-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoico |
| 15S-HpETE | ácido 15(S)-hidroperoxi-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoico |
| LTB4 | Leucotrieno B4 |
| 5S-HpETE | ácido 5(S)-hidroperoxi-6Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoico |
| TXB2 | Tromboxano B2 |
| LTD4 | Leucotrieno D4 |
| DHA | Ácido docosahexaenoico |
| PGE2 | Prostaglandina E2 |
| 8-iso PGF2a | 8-iso-prostaglandina F2alfa |
| PGF2a | Prostaglandina F2alfa |
| 6-keto-PGF1a | 6-ceto-prostaglandina F1alfa |
| PGD2 | Prostaglandina D2 |
| AA | Ácido araquidónico |

ES 2 499 415 T3

Tabla 7: azúcares (µM)

| Código BC | Analito |
|-----------------------------|--|
| (HNAcS-UA)2-HNAc | di(N-acetilhexosamina-sulfato-ácido urónico)-(N-acetilhexosamina) |
| (HNAc-UA)2 | di-(N-acetilhexosamina-ácido urónico) |
| (HNAc-UA)2-S | di-(N-acetilhexosamina-ácido urónico)-sulfato |
| (UA-HNAcS)2-UA | di-(ácido urónico-N-acetilhexosamina-sulfato)-ácido urónico |
| dH | deoxihexosa |
| Glucosona | glucosona (= 2-ceto-glucosa) |
| H1 (Glucosa etc.) | hexosa [glucosa, etc.] |
| H2 | dihexosa [maltosa, lactosa, etc.] |
| H2-dH | dihexosa-deoxihexosa |
| H2-dH2 | dihexosa-dideoxihexosa |
| H2-HNAc2 | dihexosa-di(N-acetilhexosamina) |
| H2-HNAc3 | dihexosa-tri(N-acetilhexosamina) |
| H2-NANA | dihexosa-(ácido N-acetilneuramínico) (= sialilactosa) |
| H3 | trihexosa [maltotriosa, etc.] |
| H3-HNAc2 y UA-HN-UA-HNAc-UA | trihexosa-di(N-acetilhexosamina) y ácido urónico-hexosamina-ácido urónico-(N-acetilhexosa)-ácido urónico |
| H3-HNAc2-NANA* | trihexosa-di-(N-acetilhexosamina)-(ácido N-acetilneuramínico) |
| H3-HNAc3 | trihexosa-tri(N-acetilhexosamina) |
| H3-HNAc4 | trihexosa-tetra(N-acetilhexosamina) |
| H3-HNAc5 | trihexosa-penta(N-acetilhexosamina) |
| H4 | tetrahexosa [maltotetraosa, etc.] |
| H4-HNAc2 | tetrahexosa-di(N-acetilhexosamina) |
| H4-HNAc2-NANA | tetrahexosa-di-(N-acetilhexosamina)-(ácido N-acetilneuramínico) |
| H4-HNAc3 | tetrahexosa-tri(N-acetilhexosamina) |
| H5 | pentahexosa [maltopentaosa, etc.] |
| H5-HNAc3 | pentahexosa-tri(N-acetilhexosamina) |
| H6 | hexahexosa [maltohexaosa, etc.] |
| H7 | heptahexosa [maltoheptaosa, etc.] |
| H-dH | hexosa-deoxihexosa |
| H-HNAc-NANA | hexosa-(N-acetilhexosamina)-(ácido N-acetilneuramínico) |
| HNAc | N-acetilhexosamina |
| HNAc(S)-UA | (N-acetilhexosamina)-sulfato-ácido urónico |
| HNAc(S2) | (N-acetilhexosamina)-disulfato |
| HNAc2-H-dH | di(N-acetilhexosamina)-hexosa-deoxihexosa |
| HNAc-dH | (N-acetilhexosamina)-deoxihexosa |
| HNAc-H | (N-acetilhexosamina)-hexosa |
| HNAc-H2 | (N-acetilhexosamina)-dihexosa |
| HNAc-H2-dH* | (N-acetilhexosamina)-dihexosa-deoxihexosa |
| HNAc-H2-dH2 | (N-acetilhexosamina)-dihexosa-dideoxihexosa |
| HNAc-H3 | (N-acetilhexosamina)-trihexosa |
| HNAc-H3-dH | (N-acetilhexosamina)-trihexosa-deoxihexosa |
| HNAc-H3-dH2 | (N-acetilhexosamina)-trihexosa-dideoxihexosa |
| HNAc-H4 | (N-acetilhexosamina)-tetrahexosa |
| HNAc-H4-dH | (N-acetilhexosamina)-tetrahexosa-deoxihexosa |
| HNAc-H4-dH2 | (N-acetilhexosamina)-tetrahexosa-dideoxihexosa |
| HNAc-H5 | (N-acetilhexosamina)-pentahexosa |
| HNAc-H5-dH | (N-acetilhexosamina)-pentahexosa-deoxihexosa |
| HNAc-H6 | (N-acetilhexosamina)-hexahexosa |
| HNAc-H-dH | (N-acetilhexosamina)-hexosa-deoxihexosa |
| HNAcS | N-acetilhexosamina-sulfato |
| HNAc-UA | (N-acetilhexosamina)-ácido urónico |
| HNAc-UA-HNS-UA | N-acetilhexosamina-ácido urónico-(hexosamina-sulfato)-ácido urónico |
| HNAc-UA-HNS-UA(S) | N-acetilhexosamina-ácido urónico-(hexosamina-sulfato)-ácido urónico- sulfato |
| HNS-UA | N-uronosilhexosamina-sulfato |

| Código BC | Analito |
|-----------------------|---|
| HN-UA | N-uronosilhexosamina |
| H-P | hexosa-pentosa |
| Neu5Gc-HNAc-H3 | (ácido N-glicolilneuramínico)-(N-acetilhexosamina)-trihexosa |
| Pentosa (Ribosa etc.) | pentosa [ribosa etc.] |
| Fosfo-H | fosfohexosa, hexosa-6-fosfato |
| UA | ácido urónico |
| UA-HN | ácido urónico-hexosamina |
| UA-HNAc | ácido urónico-(N-acetilhexosamina) |
| UA-HNAc-S | ácido urónico-(N-acetilhexosamina)-sulfato |
| UA-HNAc-UA | ácido urónico-(N-acetilhexosamina)-ácido urónico |
| UA-HNAc-UA(S) | ácido urónico-(N-acetilhexosamina)-ácido urónico |
| UA-HNAc-UA(S2) | ácido urónico-(N-acetilhexosamina)-(ácido urónico-bisulfato) |
| UA-HNAc-UA-HNAc(S2) | ácido urónico-(N-acetilhexosamina)-ácido urónico-(N-acetilhexosamina-disulfato) |
| UA-HNS | ácido urónico-(hexosamina-sulfato) |
| UA-HNS-UA | ácido urónico-(hexosamina-sulfato)-ácido urónico |
| UA-HNS-UA-HNAc-UA | ácido urónico-(hexosamina-6-sulfato)-ácido urónico-(N-acetilhexosamina)-ácido urónico |
| UA-HN-UA(S2) | ácido urónico- hexosamina-(ácido urónico-disulfato) |
| UA-HNAc-UA-HNAc(S2) | ácido urónico-(N-acetilhexosamina)-ácido urónico-(N-acetilhexosamina-disulfato) |
| UA-HNS | ácido urónico-(hexosamina-sulfato) |
| UA-HNS-UA | ácido urónico-(hexosamina-sulfato)-ácido urónico |
| UA-HNS-UA-HNAc-UA | ácido urónico-(hexosamina-6-sulfato)-ácido urónico-(N-acetilhexosamina)-ácido urónico |
| UA-HN-UA(S2) | ácido urónico- hexosamina-(ácido urónico-disulfato) |
| UA-HNS-UA-HNAc-UA | ácido urónico- hexosamina-ácido urónico-(N-acetilhexosamina)-ácido urónico |
| UA-HNAc-UA-HNAc(S2) | ácido urónico-(N-acetilhexosamina)-ácido urónico-(N-acetilhexosamina-disulfato) |
| UA-HNS | ácido urónico-(hexosamina-sulfato) |
| UA-HNS-UA | ácido urónico-(hexosamina-sulfato)-ácido urónico |
| UA-HNS-UA-HNAc-UA | ácido urónico-(hexosamina-6-sulfato)-ácido urónico-(N-acetilhexosamina)-ácido urónico |
| UA-HNAc-UA(S2) | ácido urónico-(N-acetilhexosamina)-(ácido urónico-disulfato) |
| UA-HNS | ácido urónico-(hexosamina-sulfato) |
| UA-HNS-UA | ácido urónico-(hexosamina-sulfato)-ácido urónico |
| UA-HNS-UA-HNAc-UA | ácido urónico-(hexosamina-6-sulfato)-ácido urónico-(N-acetilhexosamina)-ácido urónico |

*) artefacto de medición relacionado con hexosa

Tabla 8: ácidos biliares (nM)

| Código BC | Analito |
|------------------|-----------------------------------|
| CA | Ácido cólico |
| CDCA | Ácido quenodeoxicólico |
| DCA | Ácido deoxicólico |
| GCA | Ácido glicocólico |
| GCDCA | Ácido glicoquenodeoxicólico |
| GDCA | Ácido glicodeoxicólico |
| GLCA | Ácido glicolitocólico |
| GLCAS | Sulfato del ácido glicolitocólico |
| GUDCA | Ácido glicoursodeoxicólico |
| LCA | Ácido litocólico |
| TCA | Ácido taurocólico |
| TCDCA | Ácido tauroquenodeoxicólico |
| TDCA | Ácido taurodeoxicólico |
| TLCA | Ácido taurolitocólico |
| TLCAS | Sulfato del ácido taurolitocólico |
| TUDCA | Ácido taoursodeoxicólico |
| UDCA | Ácido ursodeoxicólico. |

Tabla 9: metabolitos del metabolismo energético (μM)

| Código BC | Nuevo código BC | Analitos |
|-----------------------------|-----------------|--|
| 3-PG | 3-PG | 3-fosfoglicerato |
| alfa-KGA | alfa-KGA | Ácido alfa-cetoglutarico |
| AMP | AMP | Adenosina-5'-monofosfato |
| Arg | Arg | Arginina |
| Asp | Asp | Ácido aspártico |
| DHAP + 3-PGA | DHAP + 3-PGA | Dihidroxiacetonafosfato + 3-fosfogliceraldehido |
| Fum | Fum | Ácido fumárico |
| Glt-6-P | Glt-6-P | Gluconato-6-fosfato |
| Glu | Glu | Ácido glutámico |
| Hex | Hex | Hexosa (p. ej. Glucosa) |
| Fru-1,6-BP | Hex-BP | Hexosabifosfato (p. ej., Fructosa-1,6-bifosfato) |
| Glc-1-P + Glc-6-P + Fru-6-P | Hex-P | Hexosafosfato (p. ej., Glucosa-1-fosfato + Glucosa-6-fosfato + Fructosa-6-fosfato) |
| Lac | Lac | Lactato |
| Rib-5-P + Ribul-5-P | Pent-P | Pentosa-5-fosfato (p. ej., Ribosa-5-fosfato + Ribulosa-5-fosfato) |
| PEP | PEP | Fosfoenolpiruvato |
| Pyr + OAA | Pyr + OAA | Piruvato + Oxalacetato |
| Suc | Suc | Ácido succínico |
| Ery-4-P | Tetr-P | Tetrosafosfato (p. ej., Eritrosa-4-fosfato) |

[0048] Además, el procedimiento de la invención puede llevarse a cabo con un kit que comprenda un dispositivo que contenga uno o más pocillos y uno o más insertos impregnados con al menos un patrón interno. Este dispositivo se describe en detalle en los documentos WO 2007/003344 y WO 2007/003343.

[0049] Los ejemplos siguientes clarifican adicionalmente la presente invención sin pretender limitar el alcance de ninguna forma.

10 Ejemplos

[0050] Se han hecho comparaciones entre los diferentes estadios de la enfermedad renal y también se ha comparado la nefropatía diabética con otras enfermedades renales crónicas.

15 Información general:

[0051] Se recogieron seis cohortes, diabéticos en estadios 3-5 de la ERC (los estadios oficiales 1-3 se incluyeron todos en lo que se denominó en este documento estadio 3) y no diabéticos en estadios 3-5 de la ERC, de muestra de orina (57) y plasma (76), respectivamente, en el Hospital Universitario de Montpellier. Se usó metabolómica dirigida para cuantificar aproximadamente 320 metabolitos de plasma y 300 de orina incluyendo las clases aminoácidos, aminos biogénicas, poliaminas, acilcarnitinas, fosfatidilcolinas, mono y oligosacáridos reducidos, esfingomielinas, eicosanoides, ácidos biliares e intermediarios del metabolismo energético (como se definió anteriormente) en presencia de patrones internos marcados con isótopos y determinados mediante espectrometría de masas en tándem con FIA y HPLC con monitorización de reacciones múltiples (MRM) usando un sistema 4000 QTrap con electropulverización de Sciex. Adicionalmente, se cuantificaron 160 ácidos grasos en el plasma mediante CG-EM/EM. Los conjuntos de datos se analizaron con análisis de componentes principales (ACP) no supervisado y análisis discriminantes sobre mínimos cuadrados parciales (AD-MCP) supervisados usando software de MarkerView (Life Technologies).

30 Análisis de P/O y O:

[0052] Los análisis se hicieron usando tanto plasma como orina de los pacientes si estaban disponibles (es decir, 57 «análisis P/O») y también se usaron solo muestras de plasma (es decir, 76, «análisis P») mostrando de

este modo que un marcador podía funcionar en combinación con plasma y orina, pero también podía medirse solo en plasma. Se hicieron diferentes comparaciones para evaluar biomarcadores para la ERC, pero también para ver si podían observarse diferencias entre nefropatía diabética y otras enfermedades renales. Por tanto, se hicieron comparación entre los estadios inferiores y superiores de la ERC en todos los pacientes, así como también independientemente en diabéticos y no diabéticos.

Definición de términos:

[0053]

- 10 1) regulación por incremento y por disminución: una regulación por incremento significa un aumento en la concentración de un metabolito, por ejemplo, un aumento en la velocidad a la que se produce esta reacción bioquímica debido a, por ejemplo, un cambio en la actividad enzimática. Para una regulación por disminución es justo a la inversa.
- 15 2) prueba *t*: la prueba *t* es una prueba de hipótesis estadística, se usa la integrada en el software MarkerView y se aplica a cada variable de la tabla y determina si la media de cada grupo es significativamente diferente en función de la desviación típica y el número de muestras, p. ej., para encontrar si existen diferencias reales entre las medias (promedios) de dos grupos diferentes.
- 20 3) valor de *p*: el valor de *p* es la probabilidad de obtener un resultado al menos tan extremo como el observado actualmente, asumiendo que la hipótesis nula (la hipótesis de sin cambio o efecto) es verdadera. El valor de *p* siempre es positivo y cuanto más pequeño es menor es la probabilidad de que se produzca un cambio. Un valor de *p* de 0,05 o menor rechaza la hipótesis nula a nivel del 5%, lo que significa que sólo el 5% de las veces cabe la posibilidad de que se produzca el cambio. Este es el nivel establecido en nuestras
- 25 tablas.
- 4) Diferencia de expresión: La diferencia de expresión se define como la diferencia entre la media de la transformada logarítmica de las concentraciones en cada condición. Esta es una forma de describir si un valor es mucho mayor o menor en comparación con otros dentro de un grupo. Por ejemplo, una diferencia de expresión de 0,3 veces logarítmicas es «equivalente» a un aumento de $\exp(0,3)=1,34$ veces en comparación con el control (grupo sano). Además una diferencia de expresión de -0,3 veces logarítmicas es «equivalente» a un aumento de $\exp(-0,3)=0,74=(1/1,34)$ veces en comparación con el control o una disminución de la diferencia de expresión de 1,34 con la enfermedad.
- 30

35 Resultados:

[0054]

Los resultados de las mediciones descritas anteriormente se resumen en las tablas 10-27 siguientes. Las tablas 10-18 se refieren al «análisis P/O» y las tablas 19-27 se refieren al «análisis P». Los valores de *p* de las tablas se obtuvieron con la prueba de *t* estándar implementada en el software MarkerView. Una diferencia de expresión positiva representa una regulación por incremento del metabolismo en el estadio superior y viceversa. Las abreviaturas son: D, diabético; ND, no diabético; AC, acilcarnitina; AZ, azúcar; AB, amina biogénica; EM, esfingomielina; AGT, ácido graso total, AGL, ácido graso libre; FC, fosfatidilcolina; AO, ácido orgánico; AB, amina biogénica.

45 «Análisis P/O»

[0055]

50 Tabla 10: Metabolitos muy significativa y significativamente regulados por aumento y disminución comparados en los estadios 4 y 3 de la ERC.

| Metabolito | Clase | Plasma / Orina | Valor de <i>p</i> | Diferencia de expresión (estadio4/estadio3) |
|--------------|----------|----------------|-------------------|---|
| C5-DC(C6-OH) | AC | P | 5,65E-05 | 0,57 |
| DMAA | AB | O | 1,70E-04 | -0,44 |
| Cit/Arg | COCIENTE | P | 2,20E-04 | 0,16 |
| Phe | AA | P | 0,0005 | 0,10 |
| Serotonina | AB | O | 0,0009 | -0,44 |
| DMA total | AB | O | 0,0011 | -0,32 |

ES 2 499 415 T3

| Metabolito | Clase | Plasma / Orina | Valor de p | Diferencia de expresión (estadio4/estadio3) |
|---------------------|----------|----------------|------------|--|
| Cit | AA | P | 0,0013 | 0,19 |
| C4 | AC | O | 0,0018 | -0,31 |
| PC aa C42:4 | FC | P | 0,0029 | 0,08 |
| C18:2 | AC | P | 0,0042 | 0,16 |
| DMAS | AB | O | 0,0056 | -0,27 |
| C10 | AC | P | 0,0085 | 0,19 |
| Gly | AA | O | 0,0105 | -0,32 |
| C4:1-DC(C6) | AC | O | 0,0110 | -0,34 |
| C9 | AC | P | 0,0138 | 0,26 |
| C5-OH (C3-DC-M) | AC | O | 0,0138 | -0,18 |
| Met-SO | AB | P | 0,0140 | 0,15 |
| C9 | AC | O | 0,0140 | -0,30 |
| PC ae C32:1 | FC | P | 0,0143 | 0,08 |
| C5:1-DC | AC | O | 0,0147 | -0,29 |
| C2 | AC | P | 0,0154 | 0,13 |
| Creatinina | AB | O | 0,0162 | -0,22 |
| dH | AZ | O | 0,0164 | -0,33 |
| Orn/Arg | COCIENTE | P | 0,0172 | 0,10 |
| Ácido cetoglutámico | AO | P | 0,0214 | 0,31 |
| His | AA | O | 0,0217 | -0,28 |
| Asn | AA | P | 0,0253 | 0,06 |
| PC ae C32:2 | FC | P | 0,0277 | 0,07 |
| PC ae C44:6 | FC | P | 0,0299 | 0,09 |
| Orn | AA | P | 0,0306 | 0,10 |
| C10 | AC | O | 0,0311 | -0,20 |
| C10:1 | AC | O | 0,0325 | -0,20 |
| Creatinina | AB | P | 0,0338 | 0,17 |
| PC aa C30:2 | FC | P | 0,0338 | 0,06 |
| C5 | AC | O | 0,0340 | -0,26 |
| Ser | AA | O | 0,0342 | -0,19 |
| SM (OH) C16:1 | EM | P | 0,0354 | 0,07 |
| His | AA | P | 0,0362 | 0,05 |
| cis-C18:1w7 | AGL | P | 0,0368 | 0,09 |
| SM C16:0 | EM | P | 0,0369 | 0,05 |
| H5 | AZ | O | 0,0369 | -0,25 |
| DMAS | AB | P | 0,0388 | 0,14 |
| cis-C18:1w9 | AGL | P | 0,0412 | 0,11 |
| SM C16:1 | EM | P | 0,0441 | 0,05 |
| C5:1 | AC | O | 0,0443 | -0,16 |
| C8:1 | AC | P | 0,0450 | 0,22 |
| Trp | AA | O | 0,0465 | -0,21 |
| SM (OH) C14:1 | EM | P | 0,0492 | 0,07 |
| Met | AA | O | 0,0493 | -0,29 |

ES 2 499 415 T3

Tabla 11: Metabolitos muy significativa y significativamente regulados por aumento y disminución comparados en el estadio 5 y el estadio 4 de la ERC.

| Metabolito | Clase | Plasma / Orina | Valor de <i>p</i> | Diferencia de expresión (estadio5/estadio4) |
|---------------|----------|----------------|-------------------|---|
| Creatinina | AB | P | 3,41E-05 | 0,35 |
| DMAS | AB | P | 8,22E-05 | 0,26 |
| DMAS/Arg | COCIENTE | P | 0,0001 | 0,34 |
| DMA total | AB | P | 0,0001 | 0,27 |
| C5-DC(C6-OH) | AC | P | 0,0004 | 0,30 |
| Cit/Arg | COCIENTE | P | 0,0006 | 0,20 |
| C0 | AC | P | 0,0006 | -0,22 |
| PC ae C38:3 | FC | P | 0,0013 | -0,12 |
| Orn | AA | O | 0,0018 | 0,89 |
| Pro | AA | O | 0,0028 | 0,50 |
| SM (OH) C22:2 | EM | P | 0,0038 | -0,12 |
| PC aa C36:3 | FC | P | 0,0040 | -0,14 |
| Trp | AA | P | 0,0055 | -0,22 |
| C3 | AC | P | 0,0055 | -0,22 |
| PC aa C36:4 | FC | P | 0,0076 | -0,14 |
| Tyr | AA | P | 0,0077 | -0,19 |
| SM C22:3 | EM | P | 0,0080 | -0,12 |
| C9 | AC | P | 0,0086 | 0,24 |
| SM C20:2 | EM | P | 0,0097 | -0,18 |
| C9:0 | AGT | P | 0,0099 | 0,40 |
| C2 | AC | P | 0,0104 | -0,16 |
| PC aa C34:3 | FC | P | 0,0114 | -0,20 |
| PC aa C34:4 | FC | O | 0,0114 | -0,19 |
| SM C18:1 | EM | P | 0,0115 | -0,14 |
| Val | AA | P | 0,0121 | 0,52 |
| PC aa C38:3 | FC | O | 0,0125 | -0,11 |
| Xle | AA | P | 0,0131 | 0,50 |
| Glucosona | AZ | P | 0,0136 | 0,35 |
| PC aa C38:4 | FC | P | 0,0143 | -0,12 |
| GUDCA | AcB | P | 0,0150 | -0,68 |
| PC aa C32:2 | FC | O | 0,0164 | -0,15 |
| Espermina | AB | P | 0,0186 | 1,78 |
| PC ae C38:2 | FC | P | 0,0238 | -0,10 |
| Gly | AA | P | 0,0239 | 0,29 |
| SM C18:0 | EM | P | 0,0243 | -0,11 |
| PC aa C38:5 | FC | P | 0,0246 | -0,11 |
| PC ae C40:4 | FC | P | 0,0251 | -0,10 |
| Phe | AA | P | 0,0259 | -0,11 |
| UA (1) | AZ | O | 0,0280 | 0,35 |
| PC aa C40:4 | FC | O | 0,0290 | -0,13 |
| C0 | AC | O | 0,0292 | -0,31 |
| Tyr/Phe | COCIENTE | O | 0,0296 | -0,11 |
| PC aa C32:3 | FC | P | 0,0315 | -0,12 |
| PC ae C38:4 | FC | O | 0,0322 | -0,09 |
| cis-C18:3w6 | AGT | P | 0,0326 | -0,15 |
| PC aa C40:3 | FC | P | 0,0354 | -0,08 |
| (HNAc-UA)2 | AZ | O | 0,0362 | 0,28 |
| PC ae C40:3 | FC | O | 0,0376 | -0,09 |

ES 2 499 415 T3

| | | | | |
|----------------|-----|---|--------|-------|
| H-dH | AZ | O | 0,0384 | 0,33 |
| Ile | AA | P | 0,0400 | 1,08 |
| Leu | AA | O | 0,0402 | 0,62 |
| lysoPC a C16:1 | FC | P | 0,0403 | -0,14 |
| PC ae C32:1 | FC | P | 0,0424 | -0,09 |
| PC aa C34:2 | FC | P | 0,0424 | -0,10 |
| C18:1 | AC | P | 0,0436 | 0,92 |
| C10-DC | AC | P | 0,0446 | 0,38 |
| C5:1-DC | AC | P | 0,0471 | 0,19 |
| cis-C22:1w9 | AGT | P | 0,0495 | 0,12 |

Tabla 12: Metabolitos muy significativa y significativamente regulados por aumento y disminución comparados en el estadio 5 y el estadio 3 de la ERC.

| Metabolito | Clase | Plasma / Orina | Valor de p | Diferencia de expresión (estadio5/estadio3) |
|---------------------|----------|----------------|------------|---|
| C5-DC(C6-OH) | AC | P | 2,77E-09 | 0,88 |
| Creatinina | AB | P | 3,20E-08 | 0,51 |
| Cit/Arg | COCIENTE | P | 5,24E-08 | 0,37 |
| DMAS | AB | P | 7,89E-08 | 0,41 |
| DMA total | AB | P | 7,32E-07 | 0,32 |
| Ácido cetoglutárico | AO | P | 1,91E-06 | 0,38 |
| Pro | AA | O | 3,08E-06 | 0,85 |
| DMAS/Arg | COCIENTE | P | 6,60E-06 | 0,51 |
| C9 | AC | P | 7,93E-06 | 0,50 |
| Cit | AA | P | 4,83E-05 | 0,28 |
| Trp | AA | P | 0,0002 | -0,27 |
| Dopamina | AB | O | 0,0002 | -1,06 |
| DMAA | AB | O | 0,0003 | -0,73 |
| C6:1 | AC | P | 0,0004 | 1,18 |
| C10:1 | AC | O | 0,0005 | -0,55 |
| Tyr/Phe | COCIENTE | P | 0,0007 | -0,15 |
| Serotonina | AB | O | 0,0008 | -0,76 |
| C5:1 | AC | O | 0,0008 | -0,38 |
| Cit | AA | O | 0,0014 | 0,66 |
| C0 | AC | P | 0,0017 | -0,21 |
| C5:1-DC | AC | P | 0,0024 | 0,37 |
| C4 | AC | O | 0,0026 | -0,50 |
| SM C20:2 | EM | P | 0,0027 | -0,17 |
| C5-OH (C3-DC-M) | AC | O | 0,0027 | -0,29 |
| lysoPC a C20:3 | FC | P | 0,0027 | -0,16 |
| SM C22:3 | EM | P | 0,0029 | -0,14 |
| PC aa C34:4 | FC | P | 0,0035 | -0,22 |
| PC aa C34:3 | FC | P | 0,0044 | -0,17 |
| Lactato | AO | P | 0,0049 | -0,16 |
| lysoPC a C14:0 | FC | P | 0,0062 | -0,31 |
| PC aa C36:4 | FC | P | 0,0066 | -0,14 |
| DMA total | AB | O | 0,0077 | -0,36 |
| lysoPC a C16:1 | FC | P | 0,0079 | -0,18 |
| Glucosona | AZ | O | 0,0081 | 0,31 |
| Orn/Arg | COCIENTE | P | 0,0082 | 0,13 |
| UA (1) | AZ | O | 0,0083 | 0,33 |
| C8 | AC | P | 0,0122 | 0,49 |
| dH | AZ | O | 0,0143 | -0,49 |

ES 2 499 415 T3

| Metabolito | Clase | Plasma / Orina | Valor de p | Diferencia de expresión (estadio5/estadio3) |
|--------------------------|-------|----------------|------------|---|
| P | AZ | O | 0,0152 | -0,39 |
| C8:1 | AC | P | 0,0159 | 0,31 |
| Pro | AA | P | 0,0172 | 0,13 |
| PC aa C32:1 «PC aa C32:1 | FC | O | 0,0176 | 1,60 |
| C0 | AC | O | 0,0185 | -0,47 |
| C4:1-DC(C6) | AC | O | 0,0196 | -0,51 |
| Espermina | AB | O | 0,0209 | 1,01 |
| lysoPC a C20:4 | FC | P | 0,0212 | -0,15 |
| PC aa C38:5 | FC | P | 0,0212 | -0,11 |
| TDCA | BA | P | 0,0220 | 0,55 |
| PC aa C38:4 | FC | P | 0,0231 | -0,12 |
| SM C24:0 | EM | O | 0,0236 | 1,38 |
| HNAc-H6 | AZ | O | 0,0245 | 0,70 |
| PC ae C38:0 | FC | P | 0,0248 | -0,11 |
| Met-SO | AB | P | 0,0249 | 0,15 |
| PC aa C34:1 | FC | O | 0,0255 | 1,50 |
| PC aa C36:6 | FC | P | 0,0261 | -0,14 |
| C5:1-DC | AC | O | 0,0288 | -0,40 |
| SM C20:2 | EM | O | 0,0295 | 1,20 |
| SM C24:1 | EM | O | 0,0301 | 1,45 |
| lysoPC a C16:0 | FC | P | 0,0310 | -0,09 |
| C9 | AC | O | 0,0344 | -0,35 |
| GCA | AcB | P | 0,0360 | 0,28 |
| DMAS | AB | O | 0,0361 | -0,27 |
| Val | AA | O | 0,0371 | 0,35 |
| HS-HNAc3 | AZ | O | 0,0406 | 0,82 |
| lysoPC a C18:1 | FC | P | 0,0419 | -0,09 |
| cis-C18:1w7 | AGL | P | 0,0422 | 0,11 |
| HNAc | AZ | O | 0,0422 | -0,31 |
| cis-C22:1w9 | AGT | P | 0,0449 | 0,11 |
| Tyr | AA | P | 0,0471 | -0,14 |
| SM C22:3 | EM | O | 0,0493 | 1,31 |

Tabla 13: Metabolitos muy significativa y significativamente regulados por aumento y disminución comparados en diabéticos en el estadio 4 y el estadio 3 de la ERC.

| Metabolito | Clase | Plasma / Orina | Valor de p | Diferencia de expresión (D4/D3) |
|-------------------|----------|----------------|------------|---------------------------------|
| Cit/Arg | COCIENTE | P | 0,0046 | 0,18 |
| DMAA | AB | O | 0,0048 | -0,35 |
| C5-DC(C6-OH) | AC | P | 0,0079 | 0,49 |
| C4 | AC | O | 0,0084 | -0,35 |
| C4:1 | AC | P | 0,0097 | 0,30 |
| Serotonina | AB | O | 0,0178 | -0,37 |
| cis-C17:2w6 | AGT | P | 0,0205 | -0,23 |
| PC aa C42:4 | FC | P | 0,0227 | 0,09 |
| Gly | AA | O | 0,0254 | -0,39 |
| Cit | AA | P | 0,0288 | 0,18 |
| DMA total | AB | O | 0,0299 | -0,27 |
| cis-C22:3w3 | AGL | P | 0,0326 | -0,18 |
| cis-C22:6w3 (DHA) | AGT | P | 0,0407 | 0,11 |
| Ser | AA | O | 0,0435 | -0,20 |
| cis-C22:5w3 | AGT | P | 0,0499 | 0,10 |

Tabla 14: Metabolitos muy significativa y significativamente regulados por aumento y disminución comparados en diabéticos en el estadio 5 y el estadio 4 de la ERC.

| Metabolito | Clase | Plasma / Orina | Valor de p | Diferencia de expresión (D5/D4) |
|----------------|----------|----------------|--------------|---------------------------------|
| Creatinina | AB | P | 5,30E-06 | 0,48 |
| C5-DC(C6-OH) | AC | P | 0,0002 | 0,42 |
| UA (1) | AZ | P | 0,0009 | 1,06 |
| C9:0 | AGT | P | 0,0026 | 0,41 |
| DMA total | AB | P | 0,0026 | 0,32 |
| C0 | AC | P | 0,0034 | -0,19 |
| Pro | AA | O | 0,0050 | 0,64 |
| DMAA | AB | P | 0,0053 | 0,13 |
| DMAS | AB | P | 0,0076 | 0,26 |
| Espermina | AB | O | 0,0443 | 1,51 |
| Gly | AA | P | 0,0127 | 0,11 |
| Ácido fumárico | AO | P | 0,0160 | 0,76 |
| Pro | AA | P | 0,0219 | 0,17 |
| C9 | AC | P | 0,0247 | 0,28 |
| Gln | AA | P | 0,0249 | 0,07 |
| DMAS/Arg | COCIENTE | P | 0,0276 | 0,20 |
| Asn | AA | P | 0,0287 | 0,14 |
| C0 | AC | O | 0,0439 | -0,47 |

Tabla 15: Metabolitos muy significativa y significativamente regulados por aumento y disminución comparados en diabéticos en el estadio 5 y el estadio 3 de la ERC.

| Metabolito | Clase | Plasma / Orina | Valor de p | Diferencia de expresión (D5/D3) |
|---------------------|----------|----------------|--------------|---------------------------------|
| C5-DC(C6-OH) | AC | P | 4,24E-07 | 0,92 |
| Creatinina | AB | P | 8,35E-07 | 0,51 |
| Ácido cetoglutárico | AO | P | 4,60E-05 | 0,46 |
| DMAS | AB | P | 0,0004 | 0,40 |
| DMA total | AB | P | 0,0004 | 0,27 |
| C9 | AC | P | 0,0005 | 0,44 |
| TDCA | AcB | P | 0,0007 | 1,02 |
| TCA | AcB | P | 0,0008 | 1,11 |
| C5:2 | AC | O | 0,0009 | -0,39 |
| DMAA | AB | O | 0,0009 | -0,76 |
| C10:1 | AC | O | 0,0010 | -0,63 |
| Cit/Arg | COCIENTE | P | 0,0016 | 0,29 |
| GCA | AcB | P | 0,0020 | 0,61 |
| Pro | AA | O | 0,0021 | 0,73 |
| Dopamina | AB | O | 0,0025 | -1,28 |
| Pro | AA | P | 0,0028 | 0,23 |
| Serotonina | AB | O | 0,0040 | -0,98 |
| C5-OH (C3-DC-M) | AC | O | 0,0043 | -0,31 |
| Cit | AA | P | 0,0043 | 0,27 |
| C0 | AC | P | 0,0087 | -0,22 |
| cis-C17:2w6 | AGL | P | 0,0145 | -0,13 |
| DMA total | AB | O | 0,0152 | -0,49 |
| C4 | AC | O | 0,0165 | -0,62 |
| Asn | AA | P | 0,0170 | 0,17 |
| Gln | AA | P | 0,0220 | 0,09 |
| dH | AZ | O | 0,0229 | -0,51 |
| C9 | AC | O | 0,0252 | -0,45 |
| DMAS/Arg | COCIENTE | P | 0,0265 | 0,36 |

ES 2 499 415 T3

| Metabolito | Clase | Plasma / Orina | Valor de p | Diferencia de expresión (D5/D3) |
|-------------|----------|----------------|------------|---------------------------------|
| His | AA | P | 0,0334 | 0,11 |
| C5:1-DC | AC | P | 0,0349 | 0,29 |
| DMAS | AB | O | 0,0366 | -0,42 |
| SM C20:2 | EM | P | 0,0382 | -0,12 |
| PC aa C34:3 | FC | P | 0,0394 | -0,15 |
| C0 | AC | O | 0,0400 | -0,65 |
| C6:0 | AGL | P | 0,0415 | -0,07 |
| C4:1-DC(C6) | AC | O | 0,0420 | -0,61 |
| GDCA | AcB | P | 0,0436 | 0,41 |
| HNAc | AZ | O | 0,0482 | -0,41 |
| Tyr/Phe | COCIENTE | P | 0,0484 | -0,11 |

Tabla 16: Metabolitos muy significativa y significativamente regulados por aumento y disminución comparados en no diabéticos en el estadio 4 y el estadio 3 de la ERC.

| Metabolito | Clase | Plasma / Orina | Valor de p | Diferencia de expresión (ND4/ND3) |
|---------------------|----------|----------------|------------|-----------------------------------|
| Phe | AA | P | 0,0008 | 0,14 |
| Orn/Arg | COCIENTE | P | 0,0017 | 0,18 |
| Met-SO | AB | P | 0,0023 | 0,25 |
| Orn | AA | P | 0,0030 | 0,18 |
| Creatinina | AB | P | 0,0033 | 0,35 |
| C5 | AC | P | 0,0036 | 0,24 |
| C5-DC(C6-OH) | AC | P | 0,0040 | 0,68 |
| Asn | AA | P | 0,0044 | 0,11 |
| DMAA | AB | P | 0,0067 | 0,13 |
| Cit | AA | P | 0,0067 | 0,18 |
| DMA total | AB | O | 0,0086 | -0,44 |
| C9 | AC | P | 0,0098 | 0,42 |
| DMAS | AB | O | 0,0101 | -0,38 |
| Creatinina | AB | O | 0,0104 | -0,28 |
| H5 | AZ | O | 0,0110 | -0,56 |
| DMAA | AB | O | 0,0131 | -0,62 |
| SM C26:1 | EM | P | 0,0144 | 0,07 |
| H4 | AZ | O | 0,0151 | -0,33 |
| PC ae C44:6 | FC | P | 0,0162 | 0,14 |
| C14:2 | AC | O | 0,0180 | -0,97 |
| C18:1 | AC | P | 0,0182 | 0,10 |
| Pro | AA | P | 0,0185 | 0,09 |
| cis-C20:2w6 | AGL | P | 0,0193 | 0,11 |
| C10 | AC | P | 0,0200 | 0,23 |
| Cit/Arg | COCIENTE | P | 0,0204 | 0,14 |
| Serotonina | AB | O | 0,0216 | -0,60 |
| SM C16:1 | EM | P | 0,0243 | 0,08 |
| Dopamina | AB | O | 0,0254 | -0,44 |
| P | AZ | O | 0,0255 | -0,47 |
| Ácido cetoglutárico | AO | P | 0,0256 | 0,21 |
| DMA total | AB | P | 0,0262 | 0,16 |
| cis-C18:2w6 | AGL | P | 0,0263 | 0,12 |
| PC aa C42:0 | FC | P | 0,0298 | 0,13 |
| PC ae C32:2 | FC | P | 0,0308 | 0,10 |
| Glu | AA | P | 0,0308 | 0,30 |
| cis-C18:2w6 | AGT | P | 0,0313 | 0,08 |

ES 2 499 415 T3

| Metabolito | Clase | Plasma / Orina | Valor de p | Diferencia de expresión (ND4/ND3) |
|-----------------|-------|----------------|------------|-----------------------------------|
| C5:1 | AC | O | 0,0323 | -0,33 |
| HNAc | AZ | O | 0,0332 | -0,45 |
| cis-C18:1w7 | AGL | P | 0,0337 | 0,14 |
| SM C16:0 | EM | P | 0,0369 | 0,07 |
| PC ae C32:1 | FC | P | 0,0376 | 0,09 |
| C5-OH (C3-DC-M) | AC | O | 0,0383 | -0,26 |
| His | AA | P | 0,0391 | 0,06 |
| Gln | AA | P | 0,0411 | 0,03 |
| dH | AZ | O | 0,0417 | -0,64 |
| PC aa C42:1 | FC | P | 0,0424 | 0,12 |
| C12 | AC | O | 0,0430 | -0,34 |
| PC aa C30:2 | FC | P | 0,0443 | 0,09 |
| C7-DC | AC | P | 0,0460 | 0,78 |
| C8 | AC | P | 0,0472 | 0,79 |
| C9 | AC | O | 0,0482 | -0,51 |
| PC aa C42:4 | FC | P | 0,0489 | 0,08 |

Tabla 17: Metabolitos muy significativa y significativamente regulados por aumento y disminución comparados en no diabéticos en el estadio 5 y el estadio 3 de la ERC.

| Metabolito | Clase | Plasma / Orina | Valor de p | Diferencia de expresión (ND5/ND4) |
|----------------|----------|----------------|------------|-----------------------------------|
| C14:2 | AC | O | 0,0001 | 1,07 |
| Cit/Arg | COCIENTE | P | 0,0006 | 0,31 |
| DMAS/Arg | COCIENTE | P | 0,0011 | 0,45 |
| PC ae C38:3 | FC | P | 0,0014 | -0,18 |
| Phe | AA | P | 0,0024 | -0,21 |
| Arg | AA | O | 0,0030 | 0,43 |
| Asn | AA | P | 0,0033 | -0,17 |
| SM C20:2 | EM | P | 0,0039 | -0,22 |
| C14:1 | AC | O | 0,0042 | 0,93 |
| PC aa C38:3 | FC | P | 0,0048 | -0,19 |
| Trp | AA | P | 0,0050 | -0,33 |
| PC aa C36:3 | FC | P | 0,0050 | -0,17 |
| DMAS | AB | P | 0,0054 | 0,27 |
| H1 | AZ | O | 0,0058 | 0,64 |
| PC aa C40:3 | FC | P | 0,0059 | -0,15 |
| PC aa C34:3 | FC | P | 0,0060 | -0,23 |
| Met | AA | P | 0,0063 | -0,24 |
| Tyr | AA | P | 0,0089 | -0,31 |
| cis-C18:4w3 | AGT | P | 0,0092 | -0,92 |
| H2-dH2 | AZ | O | 0,0097 | 0,41 |
| Gln | AA | P | 0,0100 | -0,12 |
| PC ae C44:3 | FC | P | 0,0101 | -0,14 |
| SM (OH) C22:2 | EM | P | 0,0101 | -0,18 |
| His | AA | P | 0,0102 | -0,19 |
| PC ae C40:3 | FC | P | 0,0112 | -0,14 |
| Arg | AA | P | 0,0128 | -0,19 |
| PC aa C40:5 | FC | P | 0,0130 | -0,20 |
| lysoPC a C16:0 | FC | P | 0,0133 | -0,17 |
| C10-DC | AC | O | 0,0162 | 0,77 |
| C3 | AC | P | 0,0163 | -0,30 |

ES 2 499 415 T3

| Metabolito | Clase | Plasma / Orina | Valor de p | Diferencia de expresión (ND5/ND4) |
|---------------|-------|----------------|------------|-----------------------------------|
| SM C18:1 | EM | P | 0,0182 | -0,18 |
| PC aa C38:5 | FC | P | 0,0184 | -0,18 |
| PC aa C32:3 | FC | P | 0,0189 | -0,17 |
| C12 | AC | O | 0,0203 | 0,46 |
| Orn | AA | O | 0,0208 | 1,36 |
| PC aa C32:2 | FC | P | 0,0221 | -0,19 |
| PC aa C38:4 | FC | P | 0,0223 | -0,19 |
| PC aa C34:4 | FC | P | 0,0235 | -0,28 |
| PC aa C42:5 | FC | P | 0,0237 | -0,11 |
| PC ae C32:1 | FC | P | 0,0246 | -0,11 |
| Glu | AA | O | 0,0254 | 0,74 |
| cis-C16:1w13 | AGT | P | 0,0255 | -0,38 |
| UA-HNAC-S | AZ | P | 0,0259 | -0,52 |
| PC ae C40:4 | FC | P | 0,0269 | -0,14 |
| Xle | AA | O | 0,0293 | 0,81 |
| C0 | AC | P | 0,0299 | -0,26 |
| DMA total | AB | P | 0,0302 | 0,22 |
| PC aa C40:4 | FC | P | 0,0329 | -0,23 |
| Thr | AA | P | 0,0332 | -0,21 |
| SM C22:3 | EM | P | 0,0333 | -0,13 |
| Ala | AA | P | 0,0338 | -0,20 |
| Val | AA | O | 0,0343 | 0,74 |
| PC aa C42:4 | FC | P | 0,0353 | -0,11 |
| PC ae C38:2 | FC | P | 0,0354 | -0,17 |
| PC aa C36:2 | FC | P | 0,0363 | -0,15 |
| PC ae C44:6 | FC | P | 0,0364 | -0,20 |
| PC aa C36:4 | FC | P | 0,0365 | -0,15 |
| Glucosona | AZ | O | 0,0401 | 0,49 |
| cis-C18:3w3 | AGT | P | 0,0439 | -0,20 |
| Lys | AA | O | 0,0459 | 0,58 |
| PC aa C36:1 | FC | P | 0,0467 | -0,11 |
| C4-OH (C3-DC) | AC | O | 0,0472 | 0,28 |
| H3 | AZ | O | 0,0472 | 0,51 |

Tabla 18: Metabolitos muy significativa y significativamente regulados por aumento y disminución comparados en no diabéticos en el estadio 5 y el estadio 3 de la ERC.

| Metabolito | Clase | Plasma / Orina | Valor de p | Diferencia de expresión (ND5/ND3) |
|----------------|----------|----------------|------------|-----------------------------------|
| Cit | AA | O | 1,15E-06 | 0,89 |
| Cit/Arg | COCIENTE | P | 1,26E-05 | 0,44 |
| Orn/Arg | COCIENTE | P | 2,63E-05 | 0,28 |
| DMAS/Arg | COCIENTE | P | 4,36E-05 | 0,62 |
| Creatinina | AB | P | 8,73E-05 | 0,53 |
| DMAS | AB | P | 0,0001 | 0,42 |
| C5-DC(C6-OH) | AC | P | 0,0002 | 0,83 |
| DMA total | AB | P | 0,0002 | 0,38 |
| C8 | AC | P | 0,0005 | 1,06 |
| lysoPC a C14:0 | FC | P | 0,0006 | -0,78 |
| Pro | AA | O | 0,0006 | 1,10 |
| Trp | AA | P | 0,0007 | -0,41 |
| C9 | AC | P | 0,0032 | 0,61 |

ES 2 499 415 T3

| Metabolito | Clase | Plasma / Orina | Valor de p | Diferencia de expresión (ND5/ND3) |
|---------------------|----------|----------------|------------|--------------------------------------|
| Cit | AA | P | 0,0033 | 0,29 |
| lysoPC a C16:0 | FC | P | 0,0037 | -0,16 |
| H1 | AZ | O | 0,0045 | 0,52 |
| Lys | AA | O | 0,0062 | 0,80 |
| Tyr/Phe | COCIENTE | P | 0,0084 | -0,19 |
| cis-C18:1w7 | AGL | P | 0,0086 | 0,22 |
| cis-C18:1w9 | AGL | P | 0,0088 | 0,27 |
| lysoPC a C20:3 | FC | P | 0,0097 | -0,23 |
| Arg | AA | P | 0,0100 | -0,18 |
| Ácido cetoglutárico | AO | P | 0,0108 | 0,29 |
| Met-SO | AB | P | 0,0109 | 0,20 |
| PC aa C34:4 | FC | P | 0,0131 | -0,38 |
| lysoPC a C20:4 | FC | P | 0,0135 | -0,26 |
| Tyr | AA | P | 0,0156 | -0,25 |
| MetSO/Met | COCIENTE | P | 0,0160 | 0,32 |
| Ala | AA | P | 0,0166 | -0,18 |
| Val | AA | O | 0,0175 | 0,64 |
| C18:1 | AC | P | 0,0176 | 0,13 |
| lysoPC a C16:1 | FC | P | 0,0183 | -0,25 |
| SM C20:2 | EM | O | 0,0216 | 2,12 |
| His | AA | P | 0,0218 | -0,13 |
| Gln | AA | P | 0,0230 | -0,09 |
| Thr | AA | P | 0,0231 | -0,19 |
| Thr | AA | O | 0,0235 | 0,37 |
| Asp | AA | P | 0,0237 | 1,16 |
| SM C22:3 | EM | P | 0,0252 | -0,19 |
| Met | AA | P | 0,0257 | -0,16 |
| Dopamina | AB | O | 0,0268 | -0,83 |
| C16:2 | AC | P | 0,0281 | 0,32 |
| SM C16:0 | EM | O | 0,0294 | 2,56 |
| PC aa C38:4 | FC | P | 0,0299 | -0,20 |
| C5:1-DC | AC | P | 0,0303 | 0,49 |
| cis-C20:1w9 | AGT | P | 0,0310 | 0,13 |
| PC aa C38:5 | FC | P | 0,0319 | -0,16 |
| Ala | AA | O | 0,0320 | 0,28 |
| H3 | AZ | O | 0,0336 | 0,41 |
| Glucosona | AZ | O | 0,0345 | 0,41 |
| SM C20:2 | EM | P | 0,0356 | -0,21 |
| cis-C16:1w7 | AGL | P | 0,0375 | 0,39 |
| cis-C20:1w9 | AGL | P | 0,0391 | 0,21 |
| cis-C17:1w9 | AGL | P | 0,0395 | 0,28 |
| PC aa C36:4 | FC | P | 0,0406 | -0,19 |
| Lactato | AO | P | 0,0407 | -0,19 |
| lysoPC a C28:1 | FC | P | 0,0435 | -0,28 |
| lysoPC a C18:1 | FC | P | 0,0463 | -0,12 |
| cis-C11:1w5 | AGL | P | 0,0495 | -0,68 |
| PC ae C38:0 | FC | P | 0,0498 | -0,18 |

«Análisis P»

[0056]

Tabla 19: Metabolitos muy significativa y significativamente regulados por aumento y disminución comparados en los estadios 4 y 3 de la ERC.

| Metabolito | Clase | Valor de <i>p</i> | Diferencia de expresión (estadio4/estadio3) |
|---------------------|----------|-------------------|---|
| C5-DC(C6-OH) | AC | 1,51E-05 | 0,59 |
| Cit/Arg | COCIENTE | 0,0004 | 0,15 |
| Cit | AA | 0,0019 | 0,17 |
| C18:2 | AC | 0,0019 | 0,16 |
| Phe | AA | 0,0024 | 0,08 |
| C10 | AC | 0,0026 | 0,20 |
| PC aa C42:4 | FC | 0,0044 | 0,08 |
| PC ae C32: | FC | 0,0049 | 0,08 |
| PC ae C32:2 | FC | 0,0076 | 0,08 |
| Met-SO | AB | 0,0088 | 0,14 |
| PC ae C44:6 | FC | 0,0103 | 0,09 |
| SM (OH) C16:1 | EM | 0,0105 | 0,08 |
| PC aa C30:2 | FC | 0,0128 | 0,01 |
| Creatinina | AB | 0,0142 | 0,17 |
| cis-C18:1w7 | AGL | 0,0152 | 0,10 |
| DMAS | AB | 0,0155 | 0,16 |
| SM C16:0 | EM | 0,0158 | 0,05 |
| PC ae C40:3 | FC | 0,0194 | 0,07 |
| C10:1 | AC | 0,0205 | 0,41 |
| C2 | AC | 0,0210 | 0,11 |
| C9 | AC | 0,0216 | 0,23 |
| Asn | AA | 0,0218 | 0,06 |
| cis-C18:1w9 | AGL | 0,0220 | 0,12 |
| Ácido cetoglutárico | AO | 0,0220 | 0,28 |
| cis-C18:1w7 | AGT | 0,0224 | 0,07 |
| PC aa C40:1 | FC | 0,0225 | 0,19 |
| SM C16:1 | EM | 0,0252 | 0,06 |
| C8:1 | AC | 0,0254 | 0,23 |
| Orn/Arg | COCIENTE | 0,0278 | 0,09 |
| C18:1 | AC | 0,0313 | 0,08 |
| Trp | AA | 0,0317 | -0,08 |
| C14:1 | AC | 0,0320 | 0,06 |
| DMAS/Arg | COCIENTE | 0,0325 | 0,19 |
| C8 | AC | 0,0338 | 0,38 |
| PC aa C42:0 | FC | 0,0366 | 0,08 |
| PC aa C42:1 | FC | 0,0381 | 0,08 |
| SM (OH) C14:1 | EM | 0,0385 | 0,07 |
| SM C18:1 | EM | 0,0400 | 0,06 |
| SM C26:1 | EM | 0,0403 | 0,05 |
| C16:0 | AGT | 0,0405 | 0,06 |
| PC ae C30:2 | FC | 0,0407 | 0,07 |
| GDCA | AcB | 0,0410 | 0,28 |
| TDCA | AcB | 0,0411 | 0,80 |
| PC aa C40:2 | FC | 0,0422 | 0,06 |
| His | AA | 0,0439 | 0,05 |
| PC ae C34:1 | FC | 0,0477 | 0,07 |

ES 2 499 415 T3

| Metabolito | Clase | Valor de <i>p</i> | Diferencia de expresión (estadio4/estadio3) |
|-------------|-------|-------------------|--|
| PC ae C30:1 | FC | 0,0481 | 0,07 |
| Orn | AA | 0,0493 | 0,09 |

Tabla 20. Metabolitos muy significativa y significativamente regulados por aumento y disminución comparados en el estadio 5 y el estadio 4 de la ERC.

| Metabolito | Clase | Valor de <i>p</i> | Diferencia de expresión (estadio5/estadio4) |
|---------------|----------|-------------------|--|
| UA (1) | AZ | 7,28E-09 | 1,35 |
| Creatinina | AB | 2,60E-08 | 0,39 |
| C5-DC(C6-OH) | AC | 2,48E-07 | 0,38 |
| SM (OH) C22:2 | EM | 7,04E-07 | -0,16 |
| DMAS/Arg | COCIENTE | 1,10E-06 | 0,34 |
| Glucosona | AZ | 1,49E-06 | 1,16 |
| DMAS | AB | 1,84E-06 | 0,26 |
| Trp | AA | 1,45E-05 | -0,25 |
| DMA total | AB | 1,86E-05 | 0,24 |
| Cit/Arg | COCIENTE | 2,07E-05 | 0,20 |
| PC ae C38:2 | FC | 2,33E-05 | -0,15 |
| C0 | AC | 2,62E-05 | -0,23 |
| PC ae C38:3 | FC | 3,58E-05 | -0,13 |
| SM (OH) C22:1 | EM | 4,31E-05 | -0,15 |
| C9 | AC | 0,0001 | 0,28 |
| PC ae C42:3 | FC | 0,0001 | -0,14 |
| PC ae C38:1 | FC | 0,0002 | -0,15 |
| PC ae C40:4 | FC | 0,0002 | -0,12 |
| PC ae C34:2 | FC | 0,0002 | -0,14 |
| PC ae C36:3 | FC | 0,0002 | -0,12 |
| Tyr | AA | 0,0003 | -0,18 |
| C16 | AC | 0,0003 | -0,12 |
| PC ae C42:2 | FC | 0,0004 | -0,14 |
| PC ae C42:4 | FC | 0,0005 | -0,12 |
| Met | AA | 0,0007 | -0,16 |
| Ala | AA | 0,0008 | -0,16 |
| PC ae C32:1 | FC | 0,0009 | -0,10 |
| C3 | AC | 0,0009 | -0,24 |
| C14:1 | AC | 0,0010 | -0,11 |
| SM (OH) C16:1 | EM | 0,0010 | -0,11 |
| PC ae C40:3 | FC | 0,0010 | -0,10 |
| PC ae C36:4 | FC | 0,0013 | -0,12 |
| SM C18:1 | EM | 0,0014 | -0,12 |
| PC ae C34:3 | FC | 0,0015 | -0,15 |
| Arg | AA | 0,0017 | -0,13 |
| C23:0 | AGT | 0,0017 | -0,14 |
| SM (OH) C14:1 | EM | 0,0017 | -0,11 |
| PC ae C44:4 | FC | 0,0019 | -0,12 |
| SM C16:1 | EM | 0,0019 | -0,09 |
| PC ae C36:2 | FC | 0,0024 | -0,11 |
| PC ae C44:5 | FC | 0,0026 | -0,11 |
| PC ae C32:2 | FC | 0,0026 | -0,10 |
| C21:0 | AGT | 0,0026 | -0,11 |
| C14:2 | AC | 0,0027 | -0,09 |

ES 2 499 415 T3

| Metabolito | Clase | Valor de <i>p</i> | Diferencia de expresión (estadio5/estadio4) |
|----------------|----------|-------------------|--|
| lysoPC a C16:0 | FC | 0,0030 | -0,12 |
| SM (OH) C24:1 | EM | 0,0031 | -0,10 |
| PC ae C36:5 | FC | 0,0033 | -0,12 |
| PC ae C42:5 | FC | 0,0034 | -0,09 |
| PC ae C38:4 | FC | 0,0037 | -0,10 |
| lysoPC a C18:2 | FC | 0,0040 | -0,18 |
| PC ae C44:6 | FC | 0,0044 | -0,11 |
| Tyr/Phe | COCIENTE | 0,0050 | -0,10 |
| PC ae C30:1 | FC | 0,0051 | -0,10 |
| lysoPC a C18:0 | FC | 0,0052 | -0,15 |
| C18:1 | AC | 0,0056 | -0,11 |
| PC ae C40:1 | FC | 0,0057 | -0,11 |
| PC aa C36:2 | FC | 0,0057 | -0,10 |
| PC ae C40:5 | FC | 0,0057 | -0,09 |
| PC aa C36:3 | FC | 0,0058 | -0,11 |
| C18:2 | AC | 0,0060 | -0,15 |
| C18 | AC | 0,0060 | -0,11 |
| PC aa C38:3 | FC | 0,0063 | -0,10 |
| PC aa C34: | FC | 0,0066 | -0,10 |
| Phe | AA | 0,0067 | -0,09 |
| PC aa C40:2 | FC | 0,0068 | -0,07 |
| PC aa C42:0 | FC | 0,0070 | -0,10 |
| Thr | AA | 0,0071 | -0,13 |
| PC aa C32:3 | FC | 0,0075 | -0,11 |
| PC aa C42:4 | FC | 0,0077 | -0,09 |
| lysoPC a C17:0 | FC | 0,0078 | -0,15 |
| PC ae C40:2 | FC | 0,0085 | -0,09 |
| PC ae C44:3 | FC | 0,0085 | -0,10 |
| PC ae C38:6 | FC | 0,0088 | -0,11 |
| SM C26:0 | EM | 0,0090 | -0,07 |
| trans-C18:1w9 | AGL | 0,0090 | 0,19 |
| SM C14:0 | EM | 0,0090 | -0,09 |
| SM C24:1 (P) | EM | 0,0091 | -0,07 |
| PC ae C38:5 | FC | 0,0096 | -0,09 |
| PC aa C32:2 | FC | 0,0100 | -0,11 |
| lysoPC a C20:3 | FC | 0,0101 | -0,15 |
| Lys | AA | 0,0116 | -0,11 |
| C2 | AC | 0,0118 | -0,14 |
| lysoPC a C20:4 | FC | 0,0131 | -0,15 |
| PC aa C28:1 | FC | 0,0134 | -0,09 |
| Gln | AA | 0,0144 | -0,06 |
| 8Me-C18:0 | AGL | 0,0145 | -0,43 |
| Ser | AA | 0,0153 | -0,10 |
| lysoPC a C14:0 | FC | 0,0165 | -0,24 |
| PC aa C42:1 | FC | 0,0172 | -0,08 |
| PC ae C30:2 | FC | 0,0178 | -0,09 |
| PC ae C36:1 | FC | 0,0189 | -0,08 |
| cis-C11:1w5 | AGL | 0,0193 | -0,48 |
| PC ae C30:0 | FC | 0,0194 | -0,10 |
| Ácido fumárico | AO | 0,0198 | 0,43 |

ES 2 499 415 T3

| Metabolito | Clase | Valor de <i>p</i> | Diferencia de expresión (estadio5/estadio4) |
|----------------|----------|-------------------|--|
| cis-C22:1w9 | AGT | 0,0200 | 0,11 |
| lysoPC a C28:1 | FC | 0,0216 | -0,19 |
| PC aa C38:1 | FC | 0,0232 | -0,08 |
| SM C24:0 | EM | 0,0237 | -0,07 |
| Val | AA | 0,0254 | -0,11 |
| lysoPC a C18:1 | FC | 0,0263 | -0,11 |
| lysoPC a C16:1 | FC | 0,0272 | -0,12 |
| PC aa C40:3 | FC | 0,0273 | -0,07 |
| cis-C17:2w7 | AGT | 0,0276 | -0,13 |
| PC aa C38:4 | FC | 0,0284 | -0,10 |
| cis-C11:1w5 | AGT | 0,0308 | -0,37 |
| SM C16:0 | EM | 0,0320 | -0,05 |
| trans-C18:1w9 | AGT | 0,0332 | 0,09 |
| cis-C17:2w7 | AGL | 0,0351 | -0,12 |
| cis-C18:2w6 | AGT | 0,0355 | -0,07 |
| 17Me-C18:0 | AGL | 0,0355 | -0,27 |
| cis-C20:3w6 | AGT | 0,0390 | -0,11 |
| cis-C15:1w5 | AGL | 0,0402 | -0,09 |
| PC ae C40:6 | FC | 0,0411 | -0,08 |
| PC aa C34:3 | FC | 0,0442 | -0,12 |
| C9:0 | AGT | 0,0469 | 0,24 |
| PC ae C42:1 | FC | 0,0469 | -0,08 |
| MetSO/Met | COCIENTE | 0,0471 | 0,11 |
| His | AA | 0,0472 | -0,07 |
| PC ae C36:0 | FC | 0,0486 | -0,07 |
| PC aa C40:1 | FC | 0,0489 | -0,15 |
| Glu | AA | 0,0490 | -0,26 |

Tabla 21: Metabolitos muy significativa y significativamente regulados por aumento y disminución comparados en el estadio 5 y el estadio 3 de la ERC.

| Metabolito | Clase | Valor de <i>p</i> | Diferencia de expresión (estadio5/estadio3) |
|---------------------|----------|-------------------|--|
| C5-DC(C6-OH) | AC | 3,78E-13 | 0,98 |
| Creatinina | AB | 2,67E-11 | 0,57 |
| DMAS | AB | 1,52E-10 | 0,42 |
| Cit/Arg | COCIENTE | 8,77E.10 | 0,34 |
| DMAS/Arg | COCIENTE | 1,34E-09 | 0,53 |
| Trp | AA | 2,93E-09 | -0,33 |
| Ácido cetoglutárico | AO | 9,96E-09 | 0,41 |
| C9 | AC | 2,75E-08 | 0,51 |
| DMA total | AB | 1,04E-07 | 0,30 |
| C7-DC | AC | 1,37E-06 | 0,98 |
| Tyr/Phe | COCIENTE | 1,61E-06 | -0,15 |
| lysoPC a C20:3 | FC | 2,35E-05 | -0,20 |
| C0 | AC | 2,71E-05 | -0,22 |
| Cit | AA | 7,49E-05 | 0,22 |
| lysoPC a C14:0 | FC | 0,0002 | -0,33 |
| lysoPC a C20:4 | FC | 0,0004 | -0,18 |
| Orn/Arg | COCIENTE | 0,0008 | 0,14 |
| SM (OH) C22:1 | EM | 0,0008 | -0,11 |

ES 2 499 415 T3

| Metabolito | Clase | Valor de <i>p</i> | Diferencia de expresión (estadio5/estadio3) |
|----------------|----------|-------------------|--|
| lysoPC a C16:0 | FC | 0,0011 | -0,13 |
| lysoPC a C18:2 | FC | 0,0012 | -0,19 |
| Tyr | AA | 0,0012 | -0,16 |
| PC ae C42:3 | FC | 0,0013 | -0,11 |
| C23:0 | AGT | 0,0014 | -0,14 |
| SM (OH) C22:2 | EM | 0,0014 | -0,10 |
| Ala | AA | 0,0018 | -0,13 |
| lysoPC a C18:0 | FC | 0,0022 | -0,14 |
| lysoPC a C18:1 | FC | 0,0022 | -0,14 |
| MetSO/Met | COCIENTE | 0,0023 | 0,25 |
| trans-C18:1w9 | AGL | 0,0026 | 0,24 |
| GCA | AcB | 0,0028 | 0,42 |
| PC ae C44:4 | FC | 0,0028 | -0,09 |
| Val | AA | 0,0033 | -0,12 |
| PC ae C42:2 | FC | 0,0037 | -0,11 |
| C5:1-DC | AC | 0,0043 | 0,28 |
| PC ae C34:3 | FC | 0,0045 | -0,13 |
| PC ae C38:2 | FC | 0,0047 | -0,10 |
| Arg | AA | 0,0051 | -0,11 |
| C21:0 | AGT | 0,0055 | -0,11 |
| Met | AA | 0,0061 | -0,13 |
| PC ae C36:3 | FC | 0,0066 | -0,09 |
| lysoPC a C16:1 | FC | 0,0070 | -0,15 |
| PC ae C38:1 | FC | 0,0074 | -0,10 |
| Lys | AA | 0,0089 | -0,10 |
| Pro | AA | 0,0097 | 0,12 |
| PC aa C34:4 | FC | 0,0112 | -0,17 |
| cis-C17:2w7 | AGT | 0,0114 | -0,13 |
| PC ae C36:5 | FC | 0,0121 | -0,10 |
| TDCA | AcB | 0,0138 | 0,60 |
| cis-C17:2w9 | AGT | 0,0139 | -0,10 |
| cis-C18:1w7 | AGL | 0,0142 | 0,12 |
| cis-C17:2w7 | AGL | 0,0145 | -0,11 |
| Thr | AA | 0,0152 | -0,12 |
| PC ae C42:4 | FC | 0,0153 | -0,07 |
| C8:1 | AC | 0,0158 | 0,39 |
| PC ae C40:1 | FC | 0,0159 | -0,08 |
| lysoPC a C28:1 | FC | 0,0173 | -0,19 |
| lysoPC a C17:0 | FC | 0,0179 | -0,12 |
| Met-SO | AB | 0,0185 | 0,11 |
| cis-C22:1w9 | AGT | 0,0187 | 0,10 |
| DMAA | AB | 0,0190 | 0,08 |
| cis-C15:1w5 | AGT | 0,0191 | -0,09 |
| PC ae C36:4 | FC | 0,0192 | -0,08 |
| PC ae C34:2 | FC | 0,0194 | -0,08 |
| PC ae C38:3 | FC | 0,0210 | -0,08 |
| Ser | AA | 0,0218 | -0,09 |
| Glu | AA | 0,0260 | 0,16 |
| TCA | AcB | 0,0266 | 0,58 |
| C3 | AC | 0,0268 | -0,17 |

| Metabolito | Clase | Valor de <i>p</i> | Diferencia de expresión (estadio5/estadio3) |
|---------------|-------|-------------------|---|
| PC ae C40:4 | FC | 0,0283 | -0,07 |
| cis-C15:1w5 | AGL | 0,0287 | -0,08 |
| cis-C17:2w9 | AGL | 0,0289 | -0,10 |
| PC ae C44:5 | FC | 0,0291 | -0,07 |
| C8 | AC | 0,0331 | 0,34 |
| PC aa C36:5 | FC | 0,0333 | -0,13 |
| SM C22:3 | EM | 0,0342 | -0,09 |
| SM (OH) C24:1 | EM | 0,0385 | -0,07 |
| Leu | AA | 0,0413 | -0,12 |
| 8Me-C18:0 | AGL | 0,0429 | -0,36 |
| PC ae C38:0 | FC | 0,0441 | -0,10 |
| cis-C18:1w9 | AGL | 0,0443 | 0,13 |

Tabla 22. Metabolitos muy significativa y significativamente regulados por aumento y disminución comparados en diabéticos en el estadio 4 y el estadio 3 de la ERC.

| Metabolito | Clase | Valor de <i>p</i> | Diferencia de expresión (D4/D3) |
|-------------------|----------|-------------------|---------------------------------|
| C4:1 | AC | 0,0063 | 0,29 |
| Cit/Arg | COCIENTE | 0,0074 | 0,15 |
| PC aa C42:4 | FC | 0,0084 | 0,11 |
| C5-DC(C6-OH) | AC | 0,0114 | 0,49 |
| Cit | AA | 0,0134 | 0,19 |
| cis-C22:6w3 (DHA) | AGT | 0,0188 | 0,13 |
| Phe | AA | 0,0398 | 0,08 |
| cis-C22:5w3 | AGT | 0,0438 | 0,10 |
| GDCA | AcB | 0,0460 | 0,47 |
| cis-C17:2w6 | AGT | 0,0471 | -0,19 |
| PC ae C38:4 | FC | 0,0488 | 0,08 |
| DMAS | AB | 0,1692 | 0,14 |
| Creatinina | AB | 0,7538 | 0,03 |

Tabla 23: Metabolitos muy significativa y significativamente regulados por aumento y disminución comparados en diabéticos en el estadio 5 y el estadio 4 de la ERC.

5

| Metabolito | Clase | Valor de <i>p</i> | Diferencia de expresión (D5/D4) |
|----------------|----------|-------------------|---------------------------------|
| Creatinina | AB | 4,23E-06 | 0,49 |
| UA (1) | AZ | 3,40E-05 | 1,18 |
| DMAS/Arg | COCIENTE | 5,12E-05 | 0,40 |
| C0 | AC | 5,61E-05 | -0,23 |
| C5-DC(C6-OH) | AC | 8,10E-05 | 0,48 |
| Glucosona | AZ | 9,48E-05 | 1,19 |
| DMAS | AB | 0,0004 | 0,27 |
| DMA total | AB | 0,0010 | 0,26 |
| C3 | AC | 0,0024 | -0,27 |
| Trp | AA | 0,0025 | -0,26 |
| SM (OH) C22:2 | EM | 0,0037 | -0,12 |
| C14:1 | AC | 0,0068 | -0,12 |
| 17Me-C18:0 | AGL | 0,0077 | -0,50 |
| Tyr | AA | 0,0100 | -0,18 |
| SM (OH) C14:1 | EM | 0,0115 | -0,11 |
| C16 | AC | 0,0121 | -0,14 |
| C9 | AC | 0,0145 | 0,25 |
| Ácido fumárico | AO | 0,0151 | 0,75 |

ES 2 499 415 T3

| Metabolito | Clase | Valor de p | Diferencia de expresión (D5/D4) |
|---------------|----------|--------------|---------------------------------|
| SM (OH) C16:1 | EM | 0,0159 | -0,11 |
| trans-C18:1w9 | AGT | 0,0159 | 0,14 |
| SM (OH) C22:1 | EM | 0,0163 | -0,10 |
| Tyr/Phe | COCIENTE | 0,0187 | -0,12 |
| cis-C16:1w13 | AGT | 0,0202 | 0,19 |
| Cit/Arg | COCIENTE | 0,0206 | 0,16 |
| C9:0 | AGT | 0,0224 | 0,28 |
| trans-C18:1w9 | AGL | 0,0236 | 0,25 |
| Arg | AA | 0,0255 | -0,14 |
| PC ae C42:3 | FC | 0,0283 | -0,11 |
| PC ae C42:4 | FC | 0,0297 | -0,12 |
| PC ae C44:5 | FC | 0,0315 | -0,11 |
| PC ae C38:2 | FC | 0,0320 | -0,10 |
| PC ae C44:4 | FC | 0,0322 | -0,12 |
| Ala | AA | 0,0323 | -0,16 |
| PC ae C42:5 | FC | 0,0332 | -0,10 |
| PC ae C38:3 | FC | 0,0353 | -0,09 |
| H1 | AZ | 0,0353 | -0,15 |
| PC ae C40:4 | FC | 0,0361 | -0,09 |
| PC ae C42:2 | FC | 0,0368 | -0,11 |
| PC ae C34:2 | FC | 0,0406 | -0,10 |
| cis-C17:2w7 | AGT | 0,0444 | -0,15 |
| cis-C11:1w5 | AGL | 0,0455 | -0,57 |
| Orn | AA | 0,0465 | -0,12 |
| GDCA | AcB | 0,0483 | -0,48 |

Tabla 24: Metabolitos muy significativa y significativamente regulados por aumento y disminución comparados en diabéticos en el estadio 5 y el estadio 3 de la ERC.

| Metabolito | Clase | Valor de p | Diferencia de expresión (D5/D3) |
|---------------------|----------|--------------|---------------------------------|
| C5-DC(C6-OH) | AC | 2,89E-07 | 0,97 |
| Creatinina | AB | 1,03E-06 | 0,52 |
| DMAS | AB | 5,67E-06 | 0,41 |
| Ácido cetoglutámico | AO | 1,14E-05 | 0,46 |
| DMAS/Arg | COCIENTE | 3,09E-05 | 0,51 |
| C0 | AC | 7,11E-05 | -0,25 |
| Cit/Arg | COCIENTE | 0,0001 | 0,31 |
| C9 | AC | 0,0002 | 0,38 |
| Trp | AA | 0,0004 | -0,29 |
| DMA total | AB | 0,0004 | 0,22 |
| GCA | AcB | 0,0013 | 0,71 |
| cis-C17:2w7 | AGL | 0,0014 | -0,15 |
| Tyr/Phe | COCIENTE | 0,0018 | -0,14 |
| cis-C17:2w7 | AGT | 0,0028 | -0,16 |
| cis-C15:1w5 | AGT | 0,0083 | -0,13 |
| cis-C17:2w9 | AGT | 0,0083 | -0,15 |
| C6:0 | AGL | 0,0085 | -0,07 |
| lysoPC a C20:3 | FC | 0,0129 | -0,16 |
| cis-C17:2w9 | AGL | 0,0143 | -0,13 |
| C3 | AC | 0,0146 | -0,25 |
| cis-C15:1w5 | AGL | 0,0158 | -0,11 |
| cis-C16:1w13 | AGT | 0,0158 | 0,23 |

ES 2 499 415 T3

| | | | |
|----------------|-----|--------|-------|
| PC ae C34:3 | FC | 0,0162 | -0,14 |
| cis-C17:2w6 | AGT | 0,0175 | -0,23 |
| Cit | AA | 0,0180 | 0,19 |
| PC ae C44:4 | FC | 0,0221 | -0,10 |
| Pro | AA | 0,0241 | 0,14 |
| TCA | AcB | 0,0257 | 1,32 |
| TDCA | AcB | 0,0337 | 1,11 |
| PC ae C42:3 | FC | 0,0352 | -0,10 |
| C23:0 | AGT | 0,0378 | -0,14 |
| lysoPC a C14:0 | FC | 0,0455 | -0,24 |
| C8:1 | AC | 0,0462 | 0,24 |
| lysoPC a C18:1 | FC | 0,0468 | -0,14 |

Tabla 25: Metabolitos muy significativa y significativamente regulados por aumento y disminución comparados en no diabéticos en el estadio 4 y el estadio 3 de la ERC.

| Metabolito | Clase | Valor de p | Diferencia de expresión (ND4/ND3) |
|---------------------|----------|--------------|-----------------------------------|
| C5-DC(C6-OH) | AC | 0,0005 | 0,72 |
| Creatinina | AB | 0,0005 | 0,38 |
| C18:2 | AC | 0,0009 | 0,30 |
| Met-SO | AB | 0,0009 | 0,24 |
| C10 | AC | 0,0024 | 0,30 |
| C9 | AC | 0,0038 | 0,41 |
| Orn/Arg | COCIENTE | 0,0039 | 0,16 |
| PC ae C44:6 | FC | 0,0049 | 0,15 |
| C8 | AC | 0,0060 | 0,98 |
| C18:1 | AC | 0,0075 | 0,13 |
| DMA total | AB | 0,0077 | 0,19 |
| C10:1 | AC | 0,0087 | 0,66 |
| PC aa C42:0 | FC | 0,0104 | 0,13 |
| PC ae C32:2 | FC | 0,0117 | 0,11 |
| 12S-HETE | AcB | 0,0123 | -0,84 |
| PC aa C42:1 | FC | 0,0138 | 0,14 |
| cis-C18:1w7 | AGT | 0,0144 | 0,11 |
| Cit/Arg | COCIENTE | 0,0144 | 0,14 |
| SM C26:1 | EM | 0,0180 | 0,07 |
| PC ae C32:1 | FC | 0,0187 | 0,09 |
| Ácido cetoglutárico | AO | 0,0188 | 0,21 |
| C5 | AC | 0,0189 | 0,19 |
| C5:1-DC | AC | 0,0197 | 0,40 |
| SM C16:0 | EM | 0,0208 | 0,07 |
| cis-C20:2w6 | AGL | 0,0211 | 0,10 |
| Cit | AA | 0,0229 | 0,15 |
| cis-C18:1w7 | AGL | 0,0243 | 0,15 |
| Orn | AA | 0,0269 | 0,14 |
| Asn | AA | 0,0302 | 0,08 |
| Lactato | AO | 0,0306 | -0,14 |
| cis-C18:2w6 | AGL | 0,0313 | 0,11 |
| PC aa C30:2 | FC | 0,0313 | 0,09 |
| SM C16:1 | EM | 0,0320 | 0,08 |
| MetSO/Met | COCIENTE | 0,0325 | 0,24 |
| Phe | AA | 0,0340 | 0,09 |
| DMAS/Arg | COCIENTE | 0,0352 | 0,27 |
| PC aa C42:2 | FC | 0,0359 | 0,11 |

ES 2 499 415 T3

| Metabolito | Clase | Valor de <i>p</i> | Diferencia de expresión (ND4/ND3) |
|---------------|----------|-------------------|-----------------------------------|
| DMAS | AB | 0,0375 | 0,19 |
| PC aa C38:0 | FC | 0,0396 | 0,12 |
| cis-C18:2w6 | AGT | 0,0396 | 0,07 |
| C8:1 | AC | 0,0402 | 0,37 |
| Trp | AA | 0,0412 | -0,13 |
| DMAA | AB | 0,0430 | 0,10 |
| SM (OH) C16:1 | EM | 0,0491 | 0,08 |
| Tyr/Phe | COCIENTE | 0,0491 | -0,09 |

Tabla 26: Metabolitos muy significativa y significativamente regulados por aumento y disminución comparados en no diabéticos en el estadio 5 y el estadio 3 de la ERC.

| Metabolito | Clase | Valor de <i>p</i> | Diferencia de expresión (ND5/ND4) |
|---------------|----------|-------------------|-----------------------------------|
| SM (OH) C22:2 | EM | 8,21E-05 | -0,20 |
| Cit/Arg | COCIENTE | 0,0002 | 0,24 |
| PC ae C38:3 | FC | 0,0002 | -0,17 |
| PC ae C38:2 | FC | 0,0003 | -0,21 |
| PC ae C36:3 | FC | 0,0005 | -0,17 |
| Glucosona | AZ | 0,0005 | 1,13 |
| C18:2 | AC | 0,0007 | -0,29 |
| C5-DC(C6-OH) | AC | 0,0008 | 0,29 |
| PC ae C38:1 | FC | 0,0012 | -0,21 |
| SM (OH) C22:1 | EM | 0,0013 | -0,19 |
| Creatinina | AB | 0,0014 | 0,30 |
| PC ae C40:4 | FC | 0,0016 | -0,14 |
| PC ae C34:2 | FC | 0,0017 | -0,17 |
| PC ae C42:3 | FC | 0,0020 | -0,18 |
| DMAS | AB | 0,0022 | 0,25 |
| PC aa C38:3 | FC | 0,0024 | -0,16 |
| PC aa C36:3 | FC | 0,0024 | -0,15 |
| Trp | AA | 0,0025 | -0,24 |
| Met | AA | 0,0026 | -0,19 |
| PC ae C32:1 | FC | 0,0026 | -0,12 |
| PC aa C34:3 | FC | 0,0032 | -0,18 |
| PC ae C40:3 | FC | 0,0033 | -0,12 |
| PC ae C44:3 | FC | 0,0036 | -0,16 |
| SM C20:2 | EM | 0,0039 | -0,17 |
| C9 | AC | 0,0040 | 0,30 |
| C21:0 | AGT | 0,0042 | -0,15 |
| PC aa C34:4 | FC | 0,0044 | -0,24 |
| PC ae C36:2 | FC | 0,0050 | -0,14 |
| PC aa C32:2 | FC | 0,0051 | -0,16 |
| DMAS/Arg | COCIENTE | 0,0052 | 0,28 |
| His | AA | 0,0053 | -0,14 |
| PC aa C36:2 | FC | 0,0058 | -0,15 |
| PC ae C42:2 | FC | 0,0058 | -0,17 |
| SM C16:1 | EM | 0,0060 | -0,12 |
| PC aa C40:2 | FC | 0,0063 | -0,11 |
| PC ae C36:4 | FC | 0,0067 | -0,14 |
| PC ae C42:4 | FC | 0,0073 | -0,13 |
| SM C24:1 | EM | 0,0074 | -0,11 |
| Ala | AA | 0,0077 | -0,16 |
| PC aa C34:2 | FC | 0,0077 | -0,12 |

ES 2 499 415 T3

| Metabolito | Clase | Valor de p | Diferencia de expresión (ND5/ND4) |
|----------------|-------|--------------|-----------------------------------|
| DMA total | AB | 0,0084 | 0,21 |
| SM C18:1 | EM | 0,0084 | -0,15 |
| PC aa C40:3 | FC | 0,0094 | -0,12 |
| PC ae C34:3 | FC | 0,0096 | -0,19 |
| PC ae C44:6 | FC | 0,0102 | -0,14 |
| PC ae C40:1 | FC | 0,0106 | -0,15 |
| PC aa C36:1 | FC | 0,0108 | -0,12 |
| PC aa C36:0 | FC | 0,0109 | -0,12 |
| SM (OH) C24:1 | EM | 0,0113 | -0,13 |
| PC ae C40:2 | FC | 0,0116 | -0,13 |
| Gln | AA | 0,0116 | -0,09 |
| lysoPC a C18:2 | FC | 0,0129 | -0,24 |
| PC ae C32:2 | FC | 0,0133 | -0,11 |
| Phe | AA | 0,0135 | -0,13 |
| C16 | AC | 0,0136 | -0,10 |
| PC ae C40:5 | FC | 0,0137 | -0,12 |
| PC aa C38:4 | FC | 0,0140 | -0,15 |
| PC ae C36:1 | FC | 0,0145 | -0,11 |
| PC aa C38:5 | FC | 0,0159 | -0,14 |
| Tyr | AA | 0,0164 | -0,18 |
| PC ae C38:0 | FC | 0,0168 | -0,18 |
| C23:0 | AGT | 0,0172 | -0,16 |
| PC aa C32:3 | FC | 0,0180 | -0,14 |
| C0 | AC | 0,0182 | -0,22 |
| lysoPC a C16:0 | FC | 0,0184 | -0,15 |
| PC aa C36:6 | FC | 0,0185 | -0,21 |
| lysoPC a C18:0 | FC | 0,0187 | -0,19 |
| Glu | AA | 0,0191 | -0,34 |
| PC ae C38:6 | FC | 0,0193 | -0,14 |
| PC ae C38:4 | FC | 0,0199 | -0,12 |
| PC aa C28:1 | FC | 0,0218 | -0,13 |
| PC aa C36:4 | FC | 0,0228 | -0,13 |
| PC ae C36:5 | FC | 0,0233 | -0,13 |
| cis-C18:4w3 | AGT | 0,0239 | -0,51 |
| PC aa C42:0 | FC | 0,0246 | -0,11 |
| C14:2 | AC | 0,0255 | -0,10 |
| PC ae C40:6 | FC | 0,0265 | -0,14 |
| SM (OH) C16:1 | EM | 0,0266 | -0,10 |
| PC ae C34:1 | FC | 0,0272 | -0,10 |
| Arg | AA | 0,0274 | -0,11 |
| C18 | AC | 0,0276 | -0,11 |
| PC ae C36:0 | FC | 0,0281 | -0,09 |
| SM C14:0 | EM | 0,0289 | -0,12 |
| PC aa C38:1 | FC | 0,0291 | -0,12 |
| SM C24:0 | EM | 0,0294 | -0,10 |
| SM C18:0 | EM | 0,0297 | -0,10 |
| PC ae C44:4 | FC | 0,0298 | -0,12 |
| SM C26:1 | EM | 0,0302 | -0,09 |
| Lys | AA | 0,0303 | -0,11 |
| PC ae C38:5 | FC | 0,0304 | -0,11 |

ES 2 499 415 T3

| Metabolito | Clase | Valor de <i>p</i> | Diferencia de expresión (ND5/ND4) |
|----------------|-------|-------------------|-----------------------------------|
| PC aa C42:4 | FC | 0,0330 | -0,10 |
| lysoPC a C17:0 | FC | 0,0332 | -0,18 |
| PC aa C42:1 | FC | 0,0344 | -0,12 |
| Thr | AA | 0,0347 | -0,13 |
| lysoPC a C16:1 | FC | 0,0368 | -0,19 |
| PC ae C44:5 | FC | 0,0384 | -0,11 |
| PC ae C30:1 | FC | 0,0387 | -0,12 |
| SM C22:3 | EM | 0,0392 | -0,11 |
| SM C26:0 | EM | 0,0395 | -0,09 |
| PC ae C34:0 | FC | 0,0405 | -0,09 |
| PC aa C42:5 | FC | 0,0440 | -0,08 |
| PC ae C30:0 | FC | 0,0443 | -0,10 |
| cis-C20:3w6 | AGT | 0,0457 | -0,12 |
| lysoPC a C28:1 | FC | 0,0466 | -0,28 |
| H4 | AZ | 0,0466 | 0,28 |
| C18:0 | AGT | 0,0473 | -0,08 |
| Asn | AA | 0,0482 | -0,09 |
| C18:1 | AC | 0,0482 | -0,12 |
| C14:1 | AC | 0,0482 | -0,10 |
| PC ae C42:5 | FC | 0,0492 | -0,08 |
| PC ae C30:2 | FC | 0,0499 | -0,11 |

Tabla 27: Metabolitos muy significativa y significativamente regulados por aumento y disminución comparados en no diabéticos en el estadio 5 y el estadio 3 de la ERC.

| Metabolito | Clase | Valor de <i>p</i> | Diferencia de expresión (ND5/ND3) |
|---------------------|----------|-------------------|-----------------------------------|
| C5-DC(C6-OH) | AC | 1,42E-07 | 1,00 |
| Creatinina | AB | 1,67E-06 | 0,67 |
| Trp | AA | 2,03E-06 | -0,38 |
| Cit/Arg | COCIENTE | 2,65E-06 | 0,38 |
| DMAS | AB | 1,59E-05 | 0,43 |
| Orn/Arg | COCIENTE | 2,40E-05 | 0,22 |
| DMAS/Arg | COCIENTE | 2,94E-05 | 0,55 |
| C9 | AC | 4,56E-05 | 0,72 |
| DMA total | AB | 6,36E-05 | 0,40 |
| Ácido cetoglutárico | AO | 0,0002 | 0,36 |
| PC aa C34:4 | FC | 0,0003 | -0,38 |
| Tyr/Phe | COCIENTE | 0,0005 | -0,16 |
| lysoPC a C20:3 | FC | 0,0009 | -0,24 |
| Cit | AA | 0,0010 | 0,27 |
| lysoPC a C14:0 | FC | 0,0012 | -0,44 |
| MetSO/Met | COCIENTE | 0,0016 | 0,32 |
| lysoPC a C20:4 | FC | 0,0021 | -0,24 |
| C8 | AC | 0,0028 | 0,96 |
| Ala | AA | 0,0030 | -0,16 |
| SM C22:3 | EM | 0,0031 | -0,18 |
| C5:1-DC | AC | 0,0034 | 0,50 |
| Met-SO | AB | 0,0034 | 0,18 |
| SM (OH) C22:1 | EM | 0,0037 | -0,16 |
| Tyr | AA | 0,0042 | -0,19 |
| lysoPC a C18:2 | FC | 0,0048 | -0,21 |
| Met | AA | 0,0049 | -0,15 |

ES 2 499 415 T3

| Metabolito | Clase | Valor de <i>p</i> | Diferencia de expresión (ND5/ND3) |
|-------------------|-------|-------------------|-----------------------------------|
| PC aa C36:6 | FC | 0,0057 | -0,23 |
| PC aa C36:4 | FC | 0,0057 | -0,18 |
| lysoPC a C28:1 | FC | 0,0057 | -0,35 |
| SM (OH) C22:2 | EM | 0,0063 | -0,14 |
| PC aa C38:4 | FC | 0,0063 | -0,18 |
| Arg | AA | 0,0064 | -0,13 |
| cis-C11:1w5 | AGL | 0,0066 | -0,61 |
| lysoPC a C16:0 | FC | 0,0069 | -0,15 |
| PC ae C40:1 | FC | 0,0075 | -0,13 |
| PC ae C38:2 | FC | 0,0078 | -0,14 |
| PC ae C38:1 | FC | 0,0079 | -0,16 |
| PC ae C38:0 | FC | 0,0080 | -0,18 |
| Lys | AA | 0,0091 | -0,13 |
| lysoPC a C16:1 | FC | 0,0097 | -0,22 |
| SM C20:2 | EM | 0,0104 | -0,18 |
| Thr | AA | 0,0118 | -0,14 |
| DMAA | AB | 0,0120 | 0,11 |
| lysoPC a C18:0 | FC | 0,0126 | -0,17 |
| His | AA | 0,0126 | -0,10 |
| PC ae C36:4 | FC | 0,0126 | -0,14 |
| Val | AA | 0,0153 | -0,16 |
| PC ae C38:3 | FC | 0,0167 | -0,15 |
| PC ae C38:4 | FC | 0,0172 | -0,13 |
| PC aa C38:5 | FC | 0,0176 | -0,14 |
| C23:0 | AGT | 0,0190 | -0,14 |
| PC ae C42:2 | FC | 0,0191 | -0,13 |
| C21:0 | AGT | 0,0194 | -0,11 |
| PC ae C42:3 | FC | 0,0203 | -0,11 |
| 12S-HETE | AcB | 0,0205 | -0,64 |
| PC aa C34:3 | FC | 0,0212 | -0,17 |
| Lactato | AO | 0,0228 | -0,15 |
| cis-C22:1w9 | AGT | 0,0241 | 0,13 |
| PC ae C36:3 | FC | 0,0247 | -0,12 |
| lysoPC a C18:1 | FC | 0,0249 | -0,14 |
| trans-C18:1w9 | AGL | 0,0264 | 0,29 |
| cis-C18:4w3 | AGT | 0,0277 | -0,59 |
| PC ae C40:4 | FC | 0,0291 | -0,11 |
| PC ae C44:3 | FC | 0,0298 | -0,12 |
| PC aa C36:3 | FC | 0,0322 | -0,13 |
| SM (OH) C24:1 | EM | 0,0339 | -0,10 |
| C0 | AC | 0,0342 | -0,19 |
| PC aa C36:5 | FC | 0,0366 | -0,18 |
| Leu | AA | 0,0367 | -0,16 |
| PC ae C36:5 | FC | 0,0376 | -0,13 |
| cis-C20:5w3 (FPA) | AGT | 0,0392 | -0,21 |
| cis-C18:1w7 | AGL | 0,0402 | 0,17 |
| PC aa C38:3 | FC | 0,0406 | -0,14 |
| Xle | AA | 0,0413 | -0,15 |
| PC ae C42:4 | FC | 0,0431 | -0,09 |
| cis-C20:3w6 | AGT | 0,0450 | -0,16 |

Aplicabilidad industrial

[0057] La presente invención permite pronosticar y diagnosticar la enfermedad renal de una forma mejorada y en un estadio inicial de la enfermedad, y permite una detección más sensible de los cambios patológicos en el riñón. De hecho, los biomarcadores utilizados según la invención se detectan fácilmente en sangre, sus niveles se relacionan de forma coherente con el grado de enfermedad/lesión renal y sus cambios de nivel. Además, los biomarcadores utilizados según la invención también son válidos en una forma fundamental tal que se pueda evaluar de forma apropiada su nefrotoxicidad en modelos animales o en ensayos clínicos en fase I. En otras palabras, también son adecuados para evaluar la nefrotoxicidad preclínica y clínica, es decir, también en un estadio muy inicial del desarrollo de fármacos, en concreto en modelos animales o en ensayos clínicos en fase I.

[0058] Basado en esto, es posible preparar un kit que sea adecuado como ayuda para un diagnóstico más fiable de la aparición de la enfermedad renal, es especial de ERC y ND, y para controlar la progresión de la misma.

15 Lista de referencias:**[0059]**

- 20 Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach* 1ª ed. Philadelphia: Elsevier Science; 2003 p. 737-747, 757-765, 769-772, 793-795
- Star R, Hostetter T, Hortin GL. New Markers for Kidney Disease. *Clin Chem*. 2002; 48(9) 1374-1376
- 25 Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, Gonzalez AJ, Needham LL, Pirkle JL. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environ Health Perspect*. 2005; 13(2) 192-200
- 30 Herget-Rosenthal S, van Wijk JA, Bröcker-Preuss M, Bökenkamp A. Increased urinary cystatin C reflects structural and functional renal tubular impairment independent of glomerular filtration rate. *Biochem*. 2007; 40(13-14) 946-51
- Basi S, Fesler P, Mimran A, Lewis JB. Microalbuminuria in Type 2 Diabetes and Hypertension: A marker, treatment, or innocent bystander? *Diabetes Care* 2008; 31(2) S 194-201
- 35 Wolf G, Ritz E. Diabetic Nephropathy in Type 2 Diabetes Prevention and Patient Management. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(5) 1396-1405
- Comper WD, Osicka TM. Detection of urinary albumin. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2005; 12(2) 170-6
- 40 Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339(8793) 572-5
- 45 Wahbi N, Dalton RN, Turner C, Denton M, Abbs I, Swaminathan R. Dimethylarginines in chronic renal failure. *J Clin Pathol*. 2001; 54(6) 470-3
- Fleck C, Janz A, Schweitzer F, Karge E, Schwertfeger M, Stein G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in renal failure patients. *Kidney Int Suppl*. 2001; 78:S14-8
- 50 Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM. Chromatographic-mass spectrometric methods for the quantification of L-arginine and its methylated metabolites in biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007; 15;851(1-2) 30-41
- Zatz R, Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension*. 1998; 32(6) 958-64
- 55 Fouque D, Holt S, Guebre-Egziabher F, Nakamura K, Vianey-Saban C, Hadj-Aissa A, Hoppel CL, Kopple JD. Relationship between serum carnitine, acylcarnitines, and renal function in patients with chronic renal disease. *J Ren Nutr*. 2006; 16(2) 125-31
- Loughrey CM, Young IS, Lightbody JH, McMaster D, McNamee PT, Trimble ER. Oxidative stress in

haemodialysis. QJM. 1994; 87(11):679-83

Ha H, Kim KH. Role of oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 1995; 51:S18-21. Revisión.

5

Mashima R, Nakanishi-Ueda T, Yamamoto Y. Simultaneous determination of methionine sulfoxide and methionine in blood plasma using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2003; 313(1) 28-33

10

Yokoyama T, Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Hoshino S, Yasuda T, Kimura K. Urinary excretion of liver type fatty acid binding protein accurately reflects the degree of tubulointerstitial damage. *Am J Pathol.* 2009; Publicación online previa a la edición impresa

Komaba H, Fukagawa M. Disturbance of phosphorus metabolism in chronic kidney disease. *Clin Calcium* 2009; 19(2) 166-72

15

Friedman DJ, Talbert ME, Bowden DW, Freedman BI, Mukanya Y, Enjyoji K, Robson SC. Functional ENTPD1 polymorphisms in African Americans with diabetes and end-stage renal disease. *Diabetes* 2009; 58(4) 999-1006

20

Atamer A, Kocyijit Y, Ecdar SA, Selek S, Ilhan N, Ecdar T, Atamer Y. Effect of oxidative stress on antioxidant enzyme activities, homocysteine and lipoproteins in chronic kidney disease. *J Nephrol.* 2008; 21(6) 924-30

Reich HN, Oudit GY, Penninger JM, Scholey JW, Herzenberg AM. Decreased glomerular and tubular expression of ACE2 in patients with type 2 diabetes and kidney disease. *Kidney Int.* 2008; 74(12) 1610-6

25

Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, Smith K, Lee H, Thadhani R, Jüppner H, Wolf M. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med.* 2008; 359(6) 584-92

30

Zhou H, Cheruvanky A, Matsumoto T, Hiramatsu N, Cho ME, Berger A, Leelahavanichkul A, Doi K, Chawla LS, Illei GG, Kopp JB, Balow JE, Austin HA 3rd, Yuen PS, Star RA. Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease. *Kidney Int.* 2008; 74(5) 613-21

35

Honda H, Oureshi AR, Heimbürger O, Barany P, Wang K, Pecoits-Filho R, Stenvinkel P, Lindholm B. Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin a as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis.* 2006; 47:139-48

National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease. http://www.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines_ckd/toc.htm Online 2009-05-15

40

Sakane N, Fujiwara S, Domichi M, Tsuzaki K, Matsuoka Y, Hamada T, Saiga Y, Kotani K. Oxidative stress, inflammation, and atherosclerotic changes in retinal arteries in the Japanese population; results from the Mima study. *Endocr J.* 2008; 55(3) 485-488

45

Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006; 212(2) 167-78

Ha H, Hwang IA, Park JH, Lee HB. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 82(1) 42-5 Revisión

50

Sampanis Ch. Management of hyperglycemia in patients with diabetes mellitus and chronic renal failure. *Hippokratia.* 2008; 12(1) 22-7.

Williams R, Van Gaal L, Lucioni C, CODE-2 Advisory Board. Assessing the impact of complications on the costs of Type II diabetes. *Diabetologia* 2002; 45(7)S13-7

55

Wen CP, Cheng TY, Tsai MK, Chang YC, Chan HT, Tsai SP, Chiang PH, Hsu CC, Sung PK, Hsu YH, Wen SF. All-cause mortality attributable to chronic kidney disease: a prospective cohort study based on 462 293 adults in Taiwan. *Lancet* 2008; 371(9631) 2173-82.

Massi-Benedetti M, CODE-2 Advisory Board. The Cost of Diabetes Type II in Europe The CODE-2 Study. Diabetologia 2002; 45(7)S1-4.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una combinación de metabolitos que comprende al menos dos aminoácidos, al menos dos acilcarnitinas y al menos dos aminas biogénicas, como conjunto de biomarcadores para evaluar la enfermedad renal en una muestra de sangre.
5
2. Un procedimiento para evaluar la enfermedad renal en un sujeto mamífero que comprende medir en la muestra de sangre obtenida del sujeto la cantidad de al menos dos aminoácidos, de al menos dos acilcarnitinas y de al menos dos aminas biogénicas.
10
3. El procedimiento según la reivindicación 2 que además comprende determinar en la muestra biológica el cociente de un producto/sustrato con respecto a una reacción enzimática, preferiblemente el cociente DMAS/arginina, el cociente citrulina/arginina, el cociente ornitina/arginina y/o el cociente sulfóxido de metionina/metionina.
15
4. El procedimiento según la reivindicación 2 y/o la reivindicación 3 en el que los aminoácidos se seleccionan a partir de la tabla 1, las acilcarnitinas se seleccionan a partir de la tabla 2 y las aminas biogénicas se seleccionan a partir de la tabla 3, como se indica en la memoria descriptiva, respectivamente.
20
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 que además comprende determinar en la muestra biológica la cantidad de uno o más metabolitos seleccionados a partir del grupo de poliaminas, fosfatidilcolinas, mono y oligosacáridos reducidos, esfingomielinas, eicosanoides, ácidos biliares e intermediarios del metabolismo energético.
25
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que los aminoácidos se seleccionan a partir de Cit, Phe, Asn, Trp, His, Orn, Tyr, Met, Ala, Arg, Thr, Lys, Gln, Ser, Val, Glu y Pro, las acilcarnitinas se seleccionan a partir de C0, C5-DC(C6-OH), C5:1-DC, C8, C9, C10, C10:1, C14:1 y C 18:1, las aminas biogénicas se seleccionan a partir de MetSO, creatinina, DMAS, DMAA, DMA total y serotonina, y los cocientes se seleccionan a partir del cociente DMAS/arginina, el cociente citrulina/arginina, el cociente ornitina/arginina y/o el cociente sulfóxido de metionina/metionina.
30
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que la determinación se basa en un procedimiento analítico cuantitativo, preferiblemente cromatografía, espectroscopía y espectrometría de masas.
35
8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que la cromatografía comprende CG, CL, HPLC y UPLC; la espectroscopia comprende UV/Vis, IR y RMN, y la espectrometría de masas comprende ESI-QqQ, ESI-QqTOF, MALDI-QqQ, MALDI-QqTOF y MALDI-TOF-TOF.
40
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que la enfermedad renal es enfermedad renal crónica (ERC), preferiblemente nefropatía diabética (ND).

Figura 1:

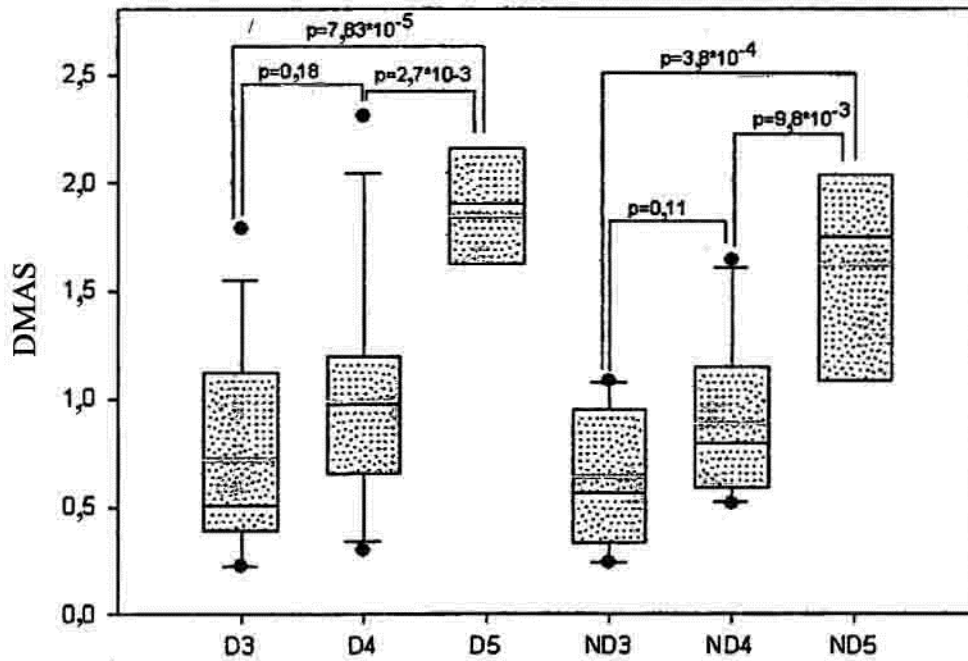
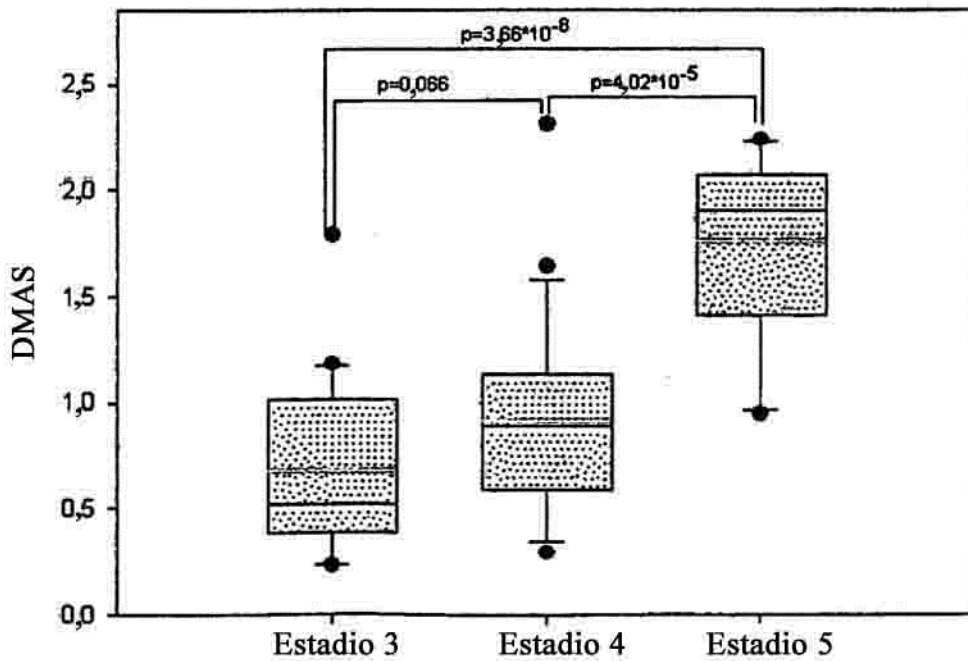


Figura 2:



Figuras 3

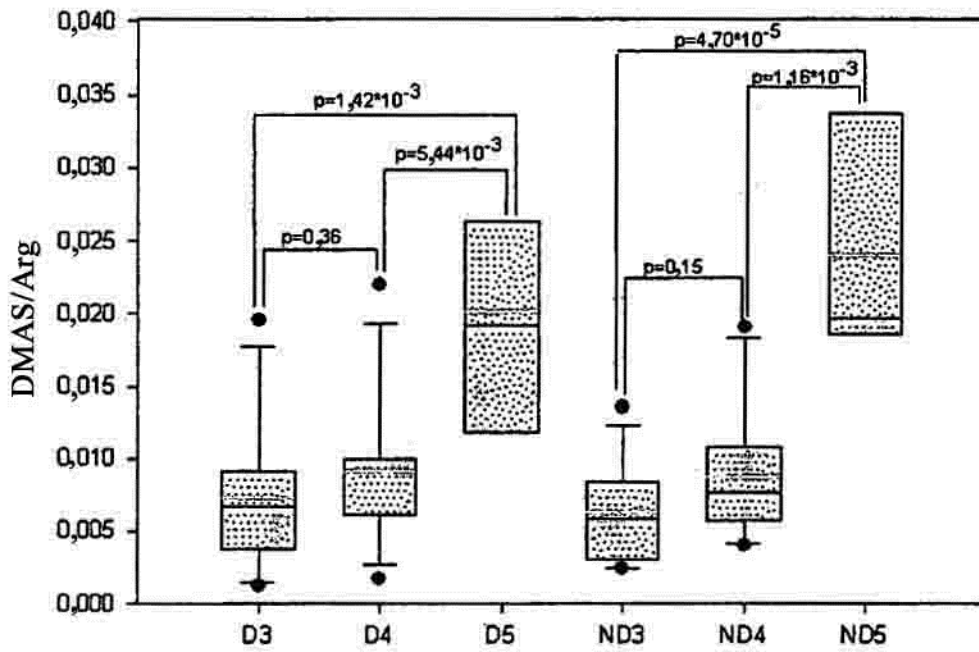


Figura 4:

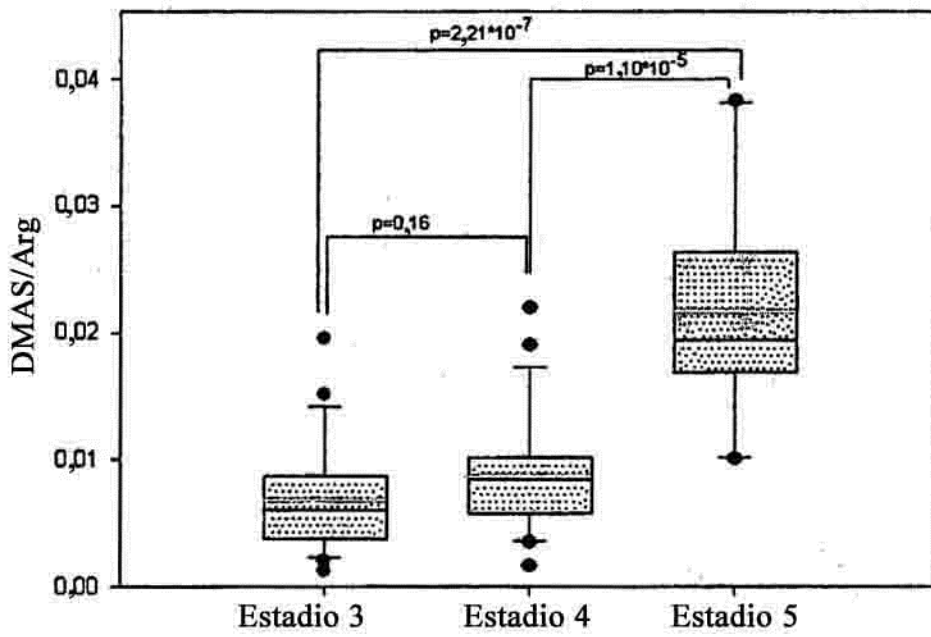


Figura 5:

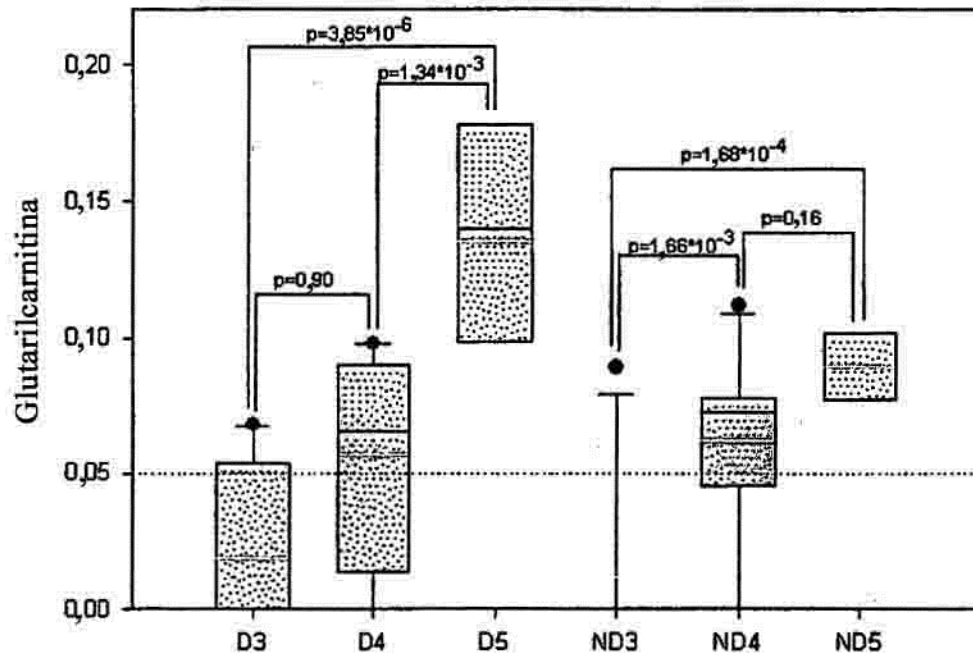


Figura 6:

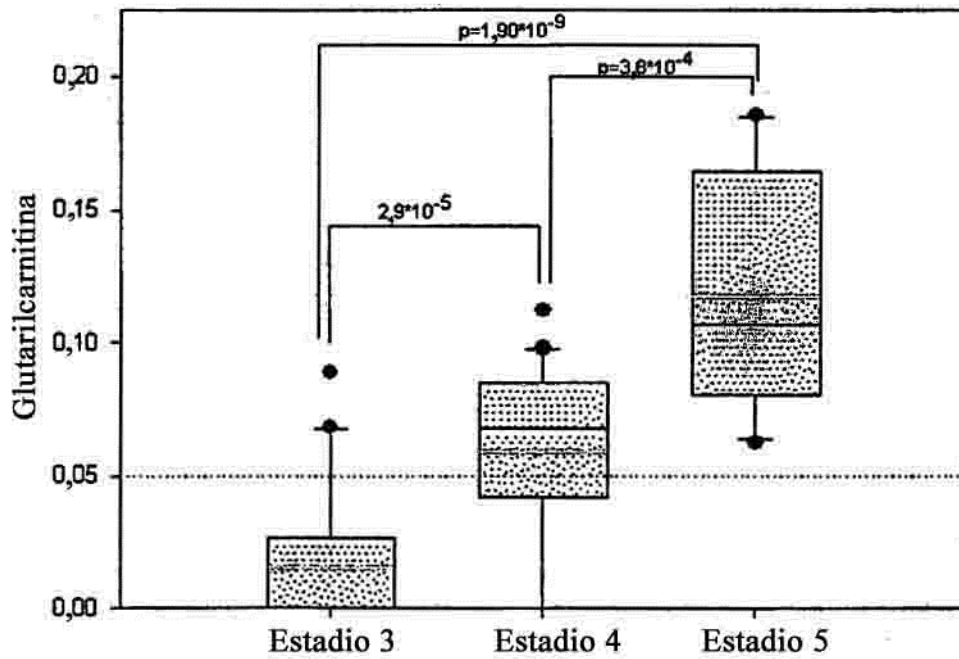


Figura 7:

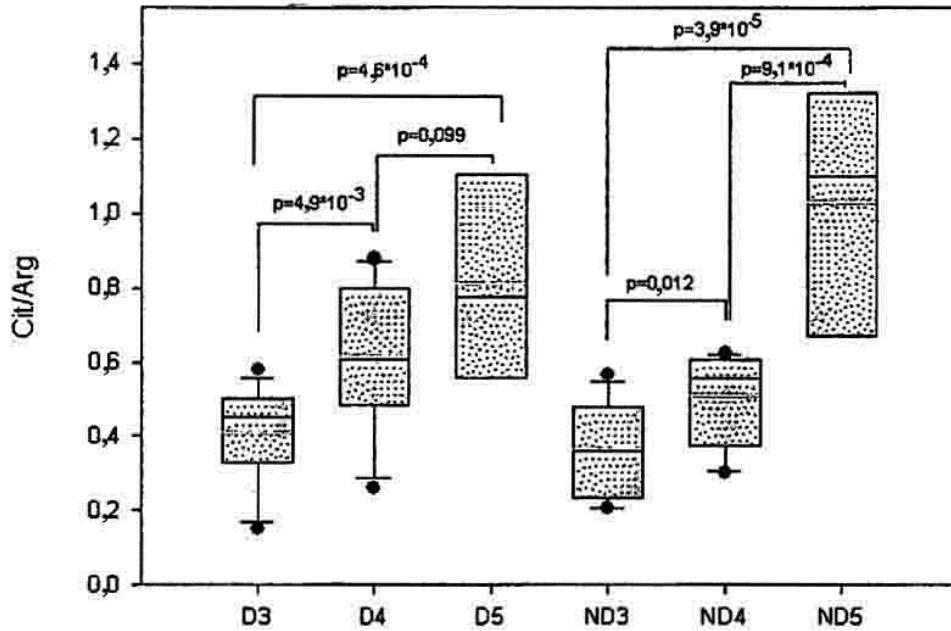


Figura 8:

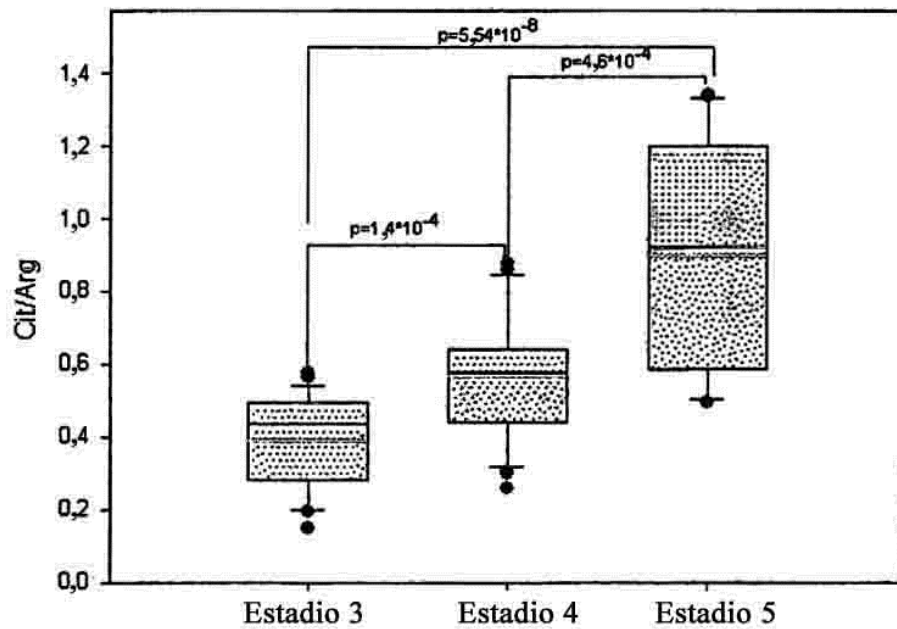


Figura 9:

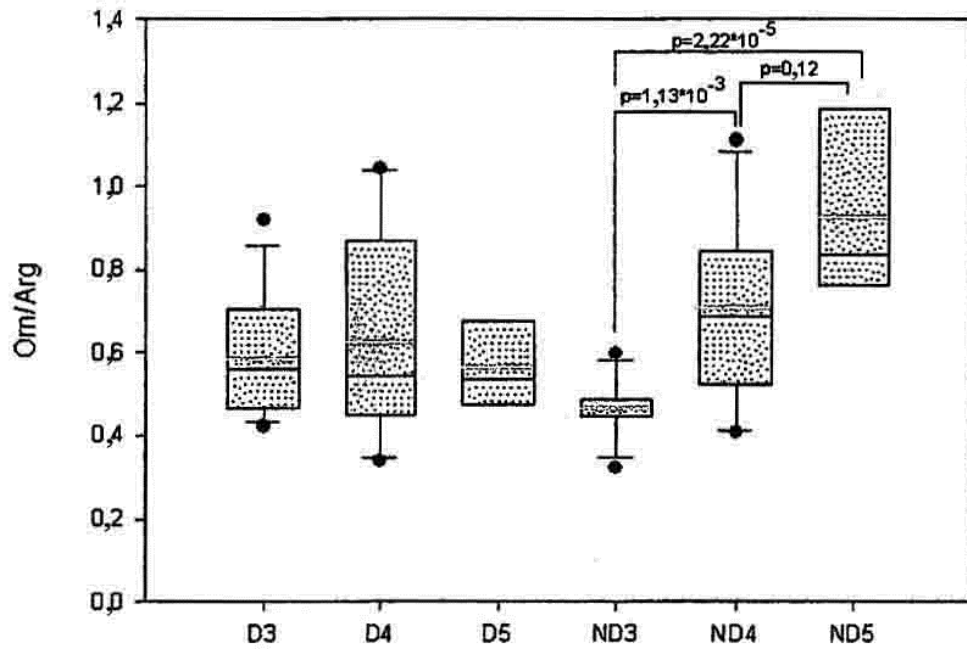


Figura 10:

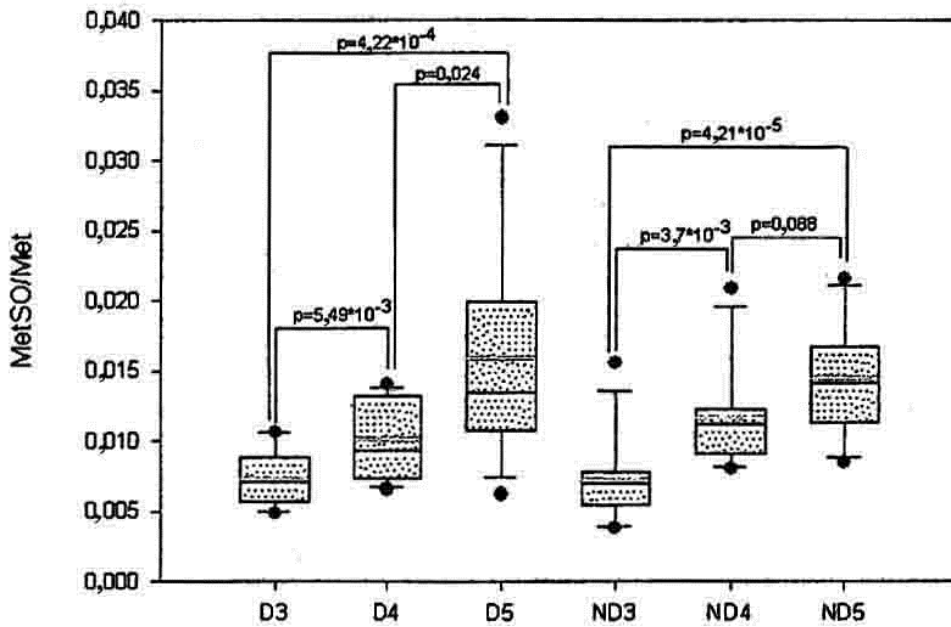


Figura 11:

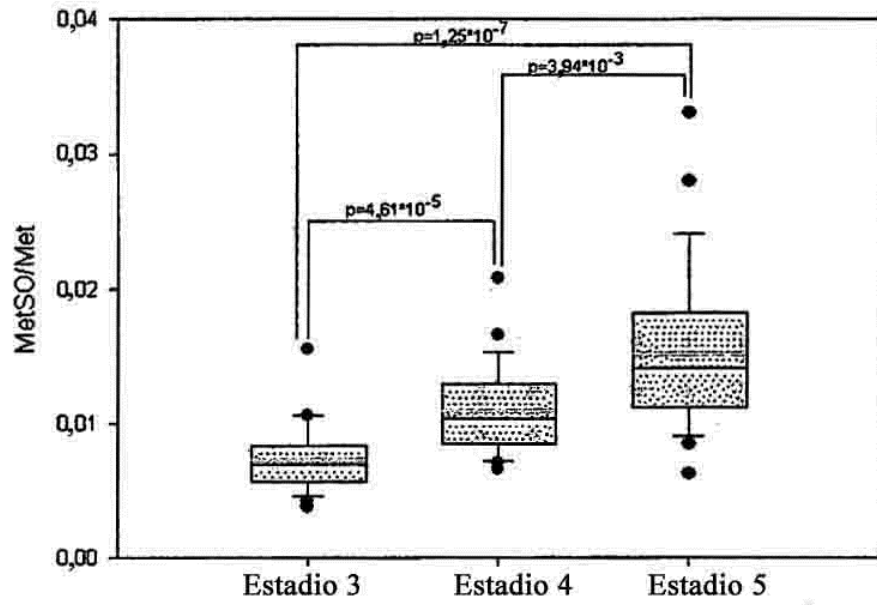


Figura 12:

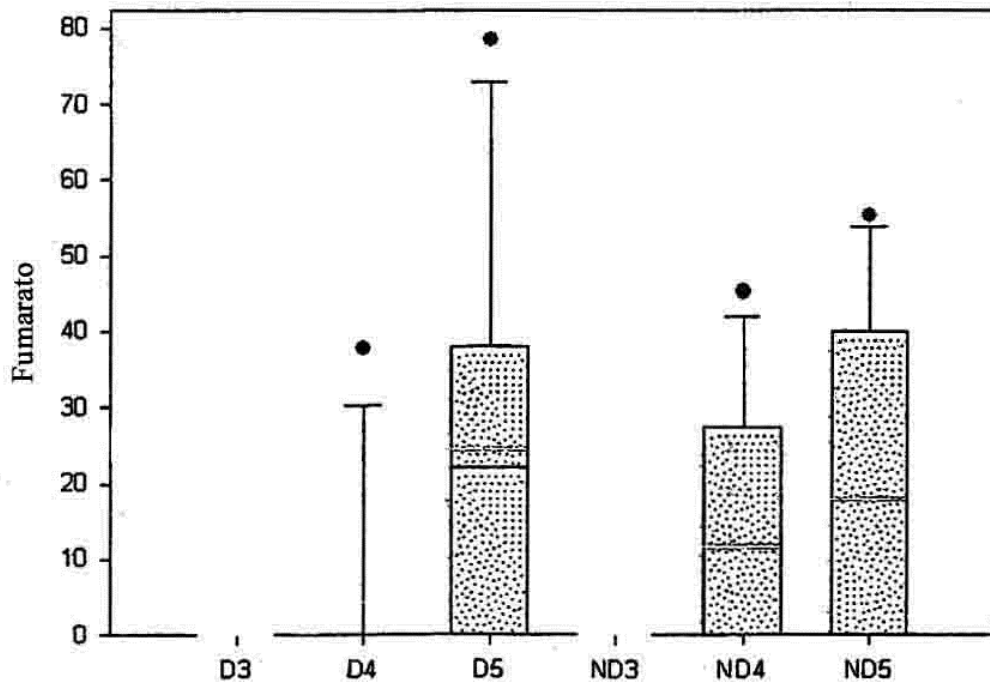


Figura 13:

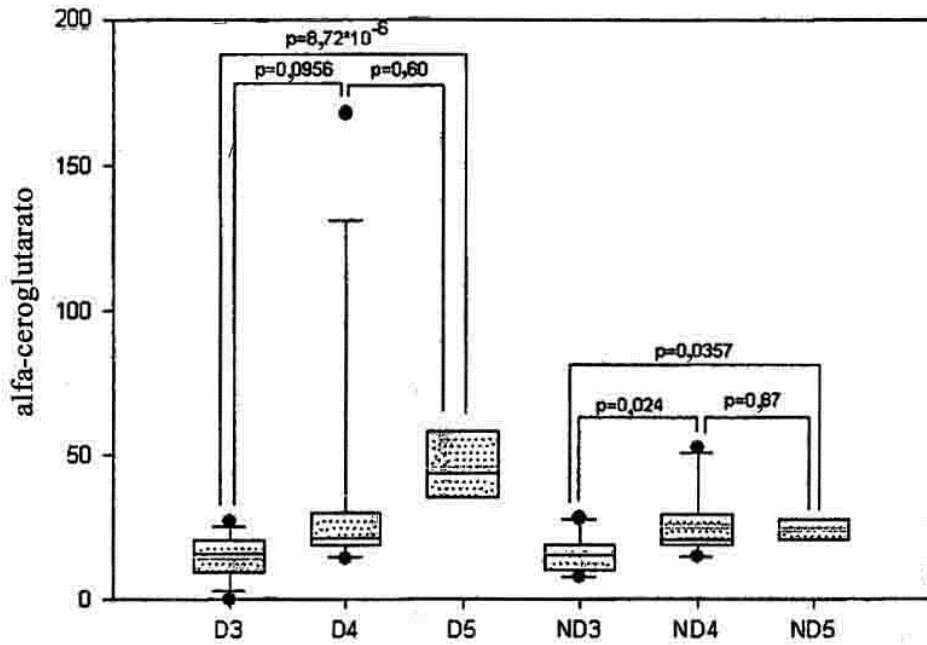


Figura 14:

