

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 229**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2008** **E 12154627 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014** **EP 2479572**

54 Título: **Biomarcadores de seguridad renal predictiva y señales de biomarcadores para monitorizar la función renal**

30 Prioridad:

26.03.2007 US 908094 P

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

25.03.2015

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**MAURER, GERARD;
ROTH, DANIEL ROBERT;
DIETERLE, FRANK;
PERENTES, ELIAS;
STADTLER, FRANK;
CORDIER, ANDRE;
MAHL, ANDREAS;
VONDERSCHER, JACKY;
WAHL, DANIEL y
GRENET, OLIVIER**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 532 229 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

Biomarcadores de seguridad renal predictiva y señales de biomarcadores para monitorizar la función renal

Campo de la invención

5 La invención se relaciona con señales de biomarcadores y su uso en métodos y dispositivos para la monitorización, el pronóstico, el diagnóstico y/o tratamiento de la toxicidad renal, y más específicamente la toxicidad tubular renal como consecuencia de la enfermedad o el tratamiento con fármacos.

Antecedentes de la invención

La progresión del fallo renal en etapa terminal es la ruta final común de diversas nefropatías proteinúricas. El grado de proteinuria está asociado con la tasa de progresión de la enfermedad renal.

10 En las enfermedades proteinúricas humanas, la lesión tubulointersticial es un predictor mejor del deterioro de la función renal que el daño glomerular. Se cree que las proteínas plasmáticas tubulotóxicas filtradas son responsables por esta asociación, aunque la naturaleza de estas proteínas es incierta. Las proteínas filtradas ejercen en parte sus efectos perjudiciales a través de la activación de las células tubulares proximales (PTC), las cuales excretan quimioquinas y citoquinas, lo que da como resultado la inflamación, biotransformación de fibroblastos intersticiales, fibrosis y apoptosis. Esto conduce finalmente al fallo renal en fase terminal. Por lo tanto, se considera que las células
15 epiteliales tubulares renales son cruciales en la progresión del daño intersticial. Se ha propuesto que la proteinuria causa lesión tubular y fibrosis intersticial.

20 La US 2006/008804 A1 divulga métodos para la lectura rápida y precisa de la toxicidad del riñón antes de que ocurra y antes de que se demuestre por examen histopatológico. La osteopontina se identifica como uno de los doce genes marcadores. La WO 99/15904 A1 describe métodos y composiciones para el diagnóstico de patologías renales e investiga los niveles urinarios de la osteopontina. Yokoo et al. (Biochemical Pharmacology, vol. 74, no. 3, 2007, páginas 477-487) discute la contribución diferencial de los transportadores de cationes orgánicos, OCT2 y MATE1, en la nefrotoxicidad inducida por agentes de platino. Se examina la expresión de proteínas de osteopontina en el riñón.

25 Existe una necesidad continua en la técnica para la determinar y la monitorizar la función renal y hepática en los animales y en el hombre después de tratamiento con fármacos o cuando la función renal es alterada debido a una enfermedad.

Resumen de la invención

30 La invención provee un método para establecer la toxicidad renal en un individuo después de la administración del compuesto sospechoso de causar toxicidad renal, en donde la toxicidad renal se identifica mediante la medición de un conjunto de biomarcadores en una muestra de orina del individuo y la comparación de la cantidad de biomarcadores medido con la cantidad correspondiente en un individuo saludable, en donde los biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste de los biomarcadores listados en la Tabla 1, e incluyen la osteopontina, proteína fosfoproteína secretada 1 y en donde la toxicidad renal es el daño tubular proximal.

35 La invención también provee un método para diagnosticar, predecir y clasificar la toxicidad renal por el uso de la osteopontina, proteína fosfoproteína secretada I en la orina mostrando el daño tubular proximal.

40 La efectividad de un agente para afectar la expresión del marcador se puede monitorizar en ensayos clínicos de sujetos que reciben tratamiento para la toxicidad renal. Así, la invención también provee un método para monitorizar la efectividad del tratamiento de un sujeto con un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña, u otro candidato de fármaco) que comprende las etapas de: (i) obtener una muestra de orina preadministración de un sujeto antes de la administración del agente; (ii) detectar el nivel de expresión de la osteopontina, fosfoproteína 1 secretada en la muestra previa a la administración; (iii) obtener una o más muestras de orina después de la administración del sujeto; (iv) detectar el nivel de expresión de osteopontina, fosfoproteína 1 secretada en las muestras posteriores a la administración; (v) comparar el nivel de
45 expresión de osteopontina, fosfoproteína 1 secretada en la muestra de preadministración con el nivel de expresión de osteopontina, fosfoproteína 1 secretada en la muestra o muestras postadministración; y (vi) alterar la administración del agente al sujeto concordantemente, en donde el sujeto está recibiendo tratamiento para la toxicidad renal y la toxicidad renal es el daño tubular proximal. Por ejemplo, la administración modificada del agente puede ser deseable para incrementar la expresión de los marcadores a los niveles I superiores a los detectados, esto es, para incrementar la efectividad del agente. Alternativamente, la administración incrementada/disminuida del agente puede ser deseable para incrementar/disminuir la efectividad del agente, respectivamente.
50

La invención hace posible la predicción, clasificación, correlación y diagnóstico de la toxicidad renal con base en los datos presentados aquí.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras de los dibujos representan realizaciones preferidas a modo de ejemplo, no a modo de limitaciones.

La Figura 1 es una lista de los compuestos administrados a los animales en los estudios *in vivo*.

5 La Figura 2 muestra el número de lesiones renales, que fueron publicados en los 10 estudios. Los números son subdivididos por grado y por los grupos de tratamiento (animales tratados con nefrotóxicos versus animales tratados con vehículos y hepatotóxico).

La Figura 3 es una tabla que muestra la histopatología de lesiones renales que se reportaron en los 10 estudios *in vivo*. El número de ocurrencias se listan categorizadas por grado y por los grupos de tratamiento (tratados con nefrotóxicos versus tratados con vehículo y hepatotóxicos).

10 La Figura 4 es una matriz de histopatología renal para el estudio cisplatino. Cada columna representa una lesión localizada. Cada fila corresponde a un animal, por lo que los animales se ordenan por grupos de dosis (controles, dosis baja, dosis media, y dosis alta) y dentro de cada grupo de dosis por punto de tiempo de terminación. Si se informó una lesión, el grado está representada por un cuadro de color naranja con el grado correspondiente en él (grado 1, grado 2-5, ningún informe/grado 0). Los procesos dominantes están etiquetados.

15 La Figura 5 es una tabla que muestra la histopatología de lesiones del hígado que se reportaron en los 10 estudios *in vivo*. Se lista el número de ocurrencias.

La Figura 6 es una tabla que muestra los resultados del análisis de las características del operador receptor (ROC) para biomarcadores y los estándares actuales para determinadas patologías. La columna 1 representa el biomarcador, la columna 2 la entidad molecular, La columna tres, el medio en el que se midió el biomarcador, y la columna 4 la patología para la que se realizó el análisis de ROC. La columna 5 representa las AUC y el error estándar de las mismas. La columna 6 indica si un valor de biomarcador se incrementa con la presencia de la patología correspondiente (+) o disminuye (-). Las columnas 7 y 8 despliegan el número de animales utilizados para los análisis correspondientes. La columna 11 muestra la sensibilidad correspondiente para el 95% de especificidad (columna 10) y la columna 9 el umbral correspondiente del biomarcador. Además de los biomarcadores de interés, también se muestran los resultados para estándares actuales de BUN y de la creatinina en suero para las 10 patologías de interés. Esta tabla demuestra el uso y el rendimiento de las implementaciones de dispositivos, ensayos, prueba de diagnóstico o kits de diagnóstico de los biomarcadores específicos listados para monitorizar las patologías renales específicas listadas.

20

25

La Figura 7 es un conjunto de gráficos de dispersión que muestra una evaluación de la hepatotoxicidad por diferentes biomarcadores de proteína. Los biomarcadores se obtuvieron de animales a los que se les administró vehículo o diferentes dosis del hepatotóxico ANIT (alfa-naftilisotiocianato). En este estudio se observaron hallazgos de histopatología relacionados con la dosis en el hígado, pero no en el riñón. En los gráficos se muestran los niveles de concentración relativos (veces del cambio versus controles). Los niveles de dosis están representados por los diferentes matices de color, los puntos de tiempo de muestreo están representados por etiquetas. Los niveles de biomarcadores se correlacionan bien con la dosis y por lo tanto con la hepatotoxicidad relacionada con la dosis. Los biomarcadores representados en estos gráficos son ALAT medido en plasma (Figura 7A parte superior), lipocalina-2 medida en el plasma (Figura 7A parte inferior), GST-mu medida en plasma (Figura 7B parte superior) y lipocalina-2 medida en la orina (Figura 7B parte inferior).

30

35

FIG. 8 es un conjunto de gráficos de dispersión que muestra una evaluación de la lesión renal por diferentes biomarcadores de proteínas y parámetros de química clínica. Los biomarcadores se obtuvieron de animales a los que se les administró vehículo o diferentes dosis de cisplatino nefrotóxico. En los gráficos se muestran los niveles de concentración relativos (veces del cambio frente a los controles). Los niveles de dosis se representan como etiquetas en el eje x, los puntos de tiempo de muestreo están representados mediante etiquetas de las muestras. Las muestras se somborean en color mediante el grado más alto del hallazgo histopatológico observado en el riñón. La barra horizontal indica el nivel de biomarcador más alto observado para los animales de controles de casos (animales dosificados con el vehículo sin que se observe un hallazgo histopatológico en el riñón). Los niveles de proteína más altos que la barra se incrementan significativamente (100 % de especificidad para controles de casos). Los diferentes parámetros clínicos y proteínas detectan lesión renal con una sensibilidad diferente. Los niveles de creatinina medidos en suero, que es la prueba periférica estándar actual para la lesión renal y la función renal, es el método menos sensible (Figura 8A, parte superior). La cistatina C medida en plasma (Figura 8A, parte inferior), la Kim-1 medida en orina (Figura 8B, parte superior), la lipocalina-2 medida en orina (Figura 8B, parte inferior), la osteopontina medida en orina (Figura 8C, parte superior) y la clusterina medida en orina (Figura 8C, parte inferior) identifican más animales con hallazgos renales significativos.

40

45

50

La Figura 9 es un conjunto de gráficas de dispersión que muestran una valoración de la lesión renal mediante la transcripción de diferentes genes en el ARNm de riñón. Los biomarcadores se obtuvieron de animales a los que se administró vehículo o diferentes dosis de cisplatino nefrotóxico. En las gráficas se muestran los valores de

55

expresión (valores Ct referidos a Polr2g). Los niveles de la dosis se representan como etiquetas en el eje x, los puntos de tiempo de la toma de muestras se representan mediante las etiquetas de las muestras. Las muestras se somborean en color mediante el grado más alto del hallazgo histopatológico observado en el riñón. La barra horizontal indica la expresión más alta (valor más bajo en el gráfico) observada para los animales de control. Los valores por debajo de la barra corresponden a niveles de expresión significativamente incrementados (100% de especificidad para animales a los que no se administró la dosis). Tanto Kim-1 (Figura 9A) como Cyr61 (Figura 9B) pueden detectar lesión renal temprana (en puntos del tiempo anteriores) y de una manera más sensible (a niveles de dosis menores) que el examen histopatológico.

Descripción detallada de la invención

Definiciones. Tal como se usa aquí la expresión "toxicidad renal" o "lesión renal" o de modo similar "trastorno renal", todos significarán una falla o disfunción renal o del riñón, bien sea repentina (aguda) o que declina lentamente con el tiempo (crónica), que puede ser desencadenada por un número de enfermedad o; procesos de trastorno, incluyendo (pero no limitado a) para la toxicidad renal aguda: sepsis I (infección), choque, trauma, cálculos renales, infección renal, toxicidad farmacológica, venenos o toxinas, o después de la inyección con un colorante de contraste yodado (efecto adverso); y para la toxicidad renal crónica: hipertensión de larga duración, diabetes, fallo cardíaco congestivo, lupus, o la anemia de células falciformes. Ambas formas de fallo renal dan como resultado un desarreglo metabólico que amenaza la vida.

La expresión "muestras corporales" deberá incluir, pero no se limita a biopsias, preferiblemente de los riñones, y los fluidos corporales tal como sangre, plasma, suero, linfa, fluido cerebroespinal, líquido quístico, ascitis, orina, heces y bilis. Una ventaja de la invención es que un marcador puede ser monitorizado particularmente bien en los fluidos corporales, tales como plasma u orina. Por ejemplo, el nivel de expresión de la clusterina puede determinarse particularmente bien en plasma.

Tal como se utiliza aquí, el término "individuo" significará una persona humana, un animal, tal como un ratón o una rata, o una población o grupo de individuos.

Tal como se utiliza aquí, el término "agente candidato" o "candidato a fármaco" pueden ser moléculas naturales o sintéticas tales como proteínas o fragmentos de las mismas, anticuerpos, inhibidores de moléculas pequeñas o agonistas, moléculas de ácidos nucleicos, compuestos orgánicos e inorgánicos y similares.

Métodos generales. En la práctica de la invención, se utilizan muchas técnicas convencionales en biología molecular, microbiología y ADN recombinante. Estas técnicas son bien conocidas y se explican en, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Volumes I, II, and III, 1997 (F. M. Ausubel ed.); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989); DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II, D. N. Glover ed. (1985); Oligonucleotide Synthesis, M. L. Gait ed. (1984); Hames & Higgins, Nucleic Acid Hybridization, (1985); Transcription and Translation, Hames & Higgins eds. (1984); Animal Cell Culture, R. I. Freshney ed. (1986); Immobilized Cells and Enzymes, (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning; the series, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., 1984); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, J. H. Miller & M. P. Calos eds. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1987); and Methods in Enzymology Vol. 154 and Vol. 155 (Wu & Grossman, and Wu, eds., respectivamente).

Biomarcadores. Se midieron las expresiones genómica y proteica de varios marcadores (listados en las Tablas 1 y 2) en tejidos renales. También se midió el curso de la proteína relacionada en la orina y plasma. Se realizó una correlación de expresión genómica o proteica en la concentración en tejido, orina y plasma con histopatología y con parámetros de análisis de orina, tales como proteinuria (Tabla 2) y parámetros de química clínica en plasma (véase la Tabla 2) tal como creatinina, nitrógeno úrico en sangre (BUN) y aclaramiento de la creatinina. La cuestión que se investigó fue si los biomarcadores renales en orina reflejaban daño en el tejido renal y posiblemente, en la función renal.

La Tabla 1 provee una lista de biomarcadores evaluados en un nivel de transcripción (ARNm de riñón e hígado) y en un nivel de proteína (en la orina y en la sangre). Las mediciones de estos biomarcadores en la Tabla 1, se describen más adelante.

TABLA 1

Lista de Biomarcadores evaluados en un nivel de transcripción y en un nivel de proteína

Nombre	ARNm	Proteína	No. Swissprot	Símbolo del gen
β-2-microglobulina	no	sí	P07151	B2m
N-acetil-beta-glucosaminidasa, Cadena alfa beta-exosaminidasa, NAG	no	sí	Q641X3	Hexa
Alfa Glutathiona-S-transferasa (alfa-GST) / Alfa Glutathiona S-transferasa 5	sí	sí	P46418	Gsta5
Calbindina d28	sí	sí	P07171	Calb1
Clusterina	sí	sí	P05371	Clu
Cistatina C	sí	sí	P14841	Cst3
Proteína 61 rica en cisteína (CYR61)	sí	sí	Q9ES72	Cyr61
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	sí	sí	P07522	Egf
Glutathiona S-transferasa Mu 1, GST Yb1, mu GST	sí	sí	P04905	Gstm1
Molécula 1 de lesión renal, Homólogo 1 del receptor celular del virus de la hepatitis A, Kim-1	sí	sí	054947	Havcr1 o Kim1
Lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos, HNL, Lipocalina 2	sí	sí	P30152	Lcn2
Osteopontina, Fosfoproteína 1 secretada	sí	sí	P08721	Spp1 o 2b7
Podocina	sí	sí	Q8K4G9	Nphs2
Inhibidor 1 de la metaloproteinasas, TIMP-1	sí	sí	P30120	Timp1
VEGF / Factor de crecimiento endotelial vascular A	sí	sí	P16612	VEGF de VEGF-A

5 La osteopontina (OPN), también conocida como fosfoproteína secretada 1 (SPP1), es una fosfoproteína secretada, altamente ácida y glicosilada que contiene un motivo de adhesión celular de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). Se ha demostrado en varios modelos de lesión renal la sobreexpresión de OPN, lo que sugiere un posible papel en la remodelación y reparación de tejidos. Persy VP et al., *Kidney Int.* 56(2): 601-611 (1999). También se encontró que la osteopontina era un componente principal de cálculos de oxalato de calcio en la orina. Kohri K et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84: 859-864 (1992). Adicionalmente, la OPN es altamente expresada en células tubulares distales en ratas propensas a la formación de cálculos urinarios. Kohri K et al., *J. Biol. Chem.* 268: 15180-15184 (1993).

10 La Tabla 2 provee una lista de parámetros de química clínica determinada en la orina y en la sangre. Las mediciones de estos biomarcadores en la Tabla 2, se describen más adelante.

Tabla 2

Lista de parámetros de química clínica

Parámetros de orina	Parámetros sanguíneos
Calcio (Ca++)	Albumina (ALB)
Cloruro (Cl-)	Relación Albumina/globulina (A/G)
Creatinina (CREAT)	Fosfatasa alcalina (ALP)
Aclaramiento de Creatinina (CLEAR)	Alanina Aminotransferasa (ALAT)
Fósforo inorgánico (I.PHOS)	Aspartato Aminotransferasa (ASAT)
Lactato deshidrogenasa (LDH)	Calcio (Ca++)
Magnesio (Mg++)	Cloruro (Cl-)
Potasio (K+)	Creatinina (CREAT)
Sodio (Na+)	Glucosa (GLUC)
Gravedad específica (SP.GRAV)	Fósforo inorgánico (I.PHOS)
Proteínas totales (PROT)	Lactato deshidrogenasa (LDH)
Urea (UREA)	Magnesio (MAGN)
Volumen (VOLUME)	Potasio (K+)
Color (COLOR)	Sodio (Na+)
Apariencia (APP)	Bilirrubina total (TOT.BIL)
	Colesterol total (CHOL)
	Proteínas totales (PROT)
	Triglicéridos (TRIG)
	Urea (UREA)

5 Resultados de estudios *in vivo* e histopatología. Los 10 estudios *in vivo* en ratas se llevaron a cabo con éxito. Se pudo recoger suficiente orina de casi todos los animales terminados en los días 3, 7, 14, 21 y 22. Solamente se analizaron los animales, para los que se disponía de conjuntos de datos completos (histopatología de riñón, química clínica urinaria, biomarcadores de proteínas urinarias, química clínica de sangre, biomarcadores de proteína en plasma, biomarcadores de ARNm en riñón) y se reportan aquí. En total se analizaron datos de 739 animales, incluidos 447 animales tratados con nefrotóxicos, 188 animales tratados con vehículos y 104 animales tratados con hepatotóxicos. Para nueve muestras no se disponía de mediciones de Kim-1 en orina; para 84 muestras no se disponía de mediciones de Kim-1 en sangre. Se excluyeron aquellas muestras para los análisis de Kim-1, pero se incluyeron para los análisis de otros parámetros y biomarcadores.

15 En la Figura 2, se muestran las distribuciones de los grados de la evaluación de histopatología. La predominancia de los hallazgos de grado 1 y grado 2 y la ausencia de lesiones de grado 5 indican que se ha alcanzado el objetivo de inducir principalmente neurotoxicidad leve. El considerable número de hallazgos de grado 1 y algunos de grado 2 en los animales dosificados con vehículo y los dosificados con hepatotóxico indica el nivel de sensibilidad de la evaluación de histopatología realizada en este proyecto. Los hepatotóxicos no indujeron ninguna neurotoxicidad significativa dependiente de la dosis. En la Figura 3 se muestra una lista detallada de todas las lesiones localizadas reportadas, incluyendo el número de ocurrencias para cada grado, separadas por animales dosificados con

nefrotóxico y los animales de control (dosificados con vehículo y dosificados con hepatotóxico). Se observaron setenta y cinco hallazgos localizados diferentes.

Usualmente no se observaron los diferentes tipos de lesiones de un modo aislado, sino que típicamente de una manera altamente correlacionada que representa diferentes procesos moleculares. En la Figura 4 se muestran todos los hallazgos de histopatología para el estudio de cisplatino. Los procesos no afectan a segmentos aislados únicos de la neurona, sino a varios segmentos de un modo correlacionado (por ejemplo, los túbulos proximales y los túbulos rectos descendentes). Además, se puede observar una secuencia lógica de procesos moleculares en los animales ordenados por dosis y por tiempo. Se observa necrosis como consecuencia de daños y, luego se observan procesos de regeneración tales como basofilia y mitosis, mientras que se producen procesos secundarios en paralelo (por ejemplo, agrandamiento de los túbulos, dilatación tubular, exfoliación celular etc.)

Para la cualificación de los biomarcadores hay dos consecuencias: Primera, se debe encontrar un nivel apropiado de detalle de localización que corresponde mejor a la expresión de un biomarcador. Segunda, las descripciones de histopatología sencilla se deberán integrar en procesos moleculares, que corresponde a los eventos moleculares que desencadenan la expresión de los biomarcadores. Así, las lesiones localizadas se integraron aquí en 10 procesos diferentes, de modo que para cada muestra se asignó el grado más alto de las correspondientes lesiones localizadas a la patología integrada. En particular, se investigan los 10 procesos patológicos siguientes:

1. *Daño en los túbulos proximales*: Lesiones con un grado 1 (“mínimas”, “muy pocas”, “muy pequeñas”) o mayores de los tipos “necrosis”, “apoptosis” o “exfoliación de células tubulares” localizadas en cualquiera de los segmentos tubulares S1, S2 o S3 o en no localizables.

2. *Alteraciones / daños glomerulares*: Lesiones con un grado 1 (“mínimas”, “muy pocas”, “muy pequeñas”) o mayores de los tipos “proliferación de células mesangiales”, “agrandamiento de las células mesangiales”, “vacuolización glomerular” o “fibrosis intersticial de la cápsula de Bowman”.

3. *Daños tubulares / regeneración/dilatación*: Lesiones con un grado 1 (“mínimas”, “muy pocas”, “muy pequeñas”) o mayor de los tipos “necrosis”, “apoptosis” “exfoliación de células tubulares”, “basofilia” o “incremento de la mitosis” localizadas en cualquiera de los segmentos tubulares S1, S2, S3, asa de Henle, túbulos ascendentes gruesos, túbulos distales, o conductos colectores o no localizables o “dilatación tubular” en la corteza, la médula o la papila.

4. *Alteraciones / daños glomerulares o daños tubulares / regeneración / dilatación*: Lesiones con un grado 1 (“mínimas”, “muy pocas”, “muy pequeñas”) o mayores de los tipos “proliferación de células mesangiales”, “agrandamiento de células mesangiales”, “vacuolización glomerular” o “fibrosis intersticial de la cápsula de Bowman” o de los tipos “necrosis”, “apoptosis”, “exfoliación de células tubulares”, “basofilia” o “incremento de la mitosis” localizadas en cualquiera de los segmentos tubulares S1, S2, S3, asa de Henle, túbulos ascendentes gruesos, túbulos distales o conductos colectores, o no localizables o “dilatación tubular” en la corteza, la médula o la papila.

5. *Daños en los túbulos ascendentes gruesos / regeneración*: Lesiones con un grado 1 (“mínimas”, “muy pocas”, “muy pequeñas”) o mayores de los tipos “necrosis”, “apoptosis”, “basofilia” o “incremento de la mitosis” localizadas en los túbulos ascendentes gruesos.

6. *Daños en los túbulos distales / regeneración*: Lesiones con un grado 1 (“mínimas”, “muy pocas”, “muy pequeñas”) o mayores de los tipos “necrosis”, “basofilia” o “incremento de la mitosis” localizadas en los túbulos distales.

7. *Daños en los conductos colectores / regeneración*: Lesiones con un grado 1 (“mínimas”, “muy pocas”, “muy pequeñas”) o mayores de los tipos “necrosis”, “apoptosis”, “exfoliación de las células tubulares” o “basofilia” en los ductos colectores.

8. *Mineralización tubular*: Lesiones con un grado 1 (“mínimas”, “muy pocas”, “muy pequeñas”) o mayores del tipo “matrices intratubulares - mineralización” localizadas en cualquiera de los segmentos tubulares S1, S2 o S3, asa de Henle, túbulos ascendentes gruesos, túbulos distales o conductos colectores.

9. *Matrices intratubulares de hialina*: Lesiones con un grado 1 (“mínimas”, “muy pocas”, “muy pequeñas”) o mayores del tipo “matrices intratubulares - Hialina (proteínicos, pigmentados)” localizadas en cualquiera de los segmentos tubulares S1, S2, S3, asa de Henle, túbulos ascendentes gruesos, túbulos distales o conductos colectores.

10. *Hipertrofia del aparato yuxtglomerular*: Las patologías observadas en el hígado de los animales de los 10 estudios se listan en la Figura 5.

Descripción de la analítica. Los biomarcadores de proteína se midieron mediante ensayos validados de proteínas multiplexadas desarrollados por y disponibles en RulesBasedMedicine (Texas, EE.UU.). Los parámetros de química clínica (por ejemplo, BUN, NAG, Creatinina y LDH) se midieron con ensayos de química clínica estándar (dispositivo ADVIA 1650). Los biomarcadores de ARNm se midieron con ensayos de expresión génica TaqMan de Applied

Biosystems en matrices de baja densidad en un instrumento de PCR, en tiempo real, 7900HT de Applied Biosystems. El ARNm se había extraído de la mitad de un riñón utilizando procedimientos estándar.

5 *Descripción de datos preprocesamiento.* Los valores de concentración de los biomarcadores obtenidos de los dispositivos analíticos se preprocesaron de acuerdo con las etapas siguientes: (1) los valores de concentración, que estaban por encima del límite superior de cuantificación, se sustituyeron por el límite superior de cuantificación; (2) los valores de concentración, que estaban por debajo del límite inferior de cuantificación, se sustituyeron por el límite inferior de cuantificación; (3) los biomarcadores urinarios se normalizaron a la concentración de la creatinina en orina dividiendo cada muestra por el correspondiente valor de creatinina en orina; y (4) para expresar los datos como factores de cambio, cada valor se dividió por la media aritmética del grupo de control coincidente en tiempo y coincidente en estudio (usualmente 6 animales) .

10 *Descripción del análisis de los datos.* Todos los análisis cuantitativos de los datos se basaron en los análisis de las características del operador receptor (ROC). En un análisis ROC, el umbral de decisión varía sistemáticamente para un problema de decisión binaria (por ejemplo, animales de control versus animales enfermos) y los verdaderos positivos (sensibilidad) son representados gráficamente versus los verdaderos negativos (1- especificidad). El área bajo la curva (AUC) es una medida de la potencia diagnóstica que combina la sensibilidad y la especificidad en un valor, de modo que un discriminador aleatorio corresponde a una AUC de 0.5 y un discriminador perfecto a 1. El cálculo de la AUC se realizó usando integración trapezoide como se describe por Bradley AP, Pat. Recogn. 30(7):1145-1159 (1997). El error estándar de la AUC se calculó a partir del error estándar de la estadística de Wilcoxon como se describe por Bradley (1997).

15 Como un ejemplo de aplicación del análisis ROC para un biomarcador y una patología dados, se estableció un umbral para el biomarcador/patología para una especificidad mínima predefinida de la forma siguiente:

20 Para una especificidad mínima dada (por ejemplo, 95%), en primer lugar se determinó la especificidad exacta más baja posible por encima o en la especificidad mínima. Para dicha especificidad exacta se seleccionó el umbral con la correspondiente sensibilidad más alta. El algoritmo no busca si son posibles especificidades más altas para esta sensibilidad variando además el umbral. Para este umbral, se reportan aquí la especificidad y sensibilidad correspondientes.

25 Para el análisis de los datos se usaron las siguientes definiciones de los animales control y los animales enfermos: (a) *Grupo de control:* Animales dosificados con vehículos o hepatotóxicos y que no muestran la lesión investigada. (b) *Grupo de enfermos:* Animales tratados con nefrotóxicos y a los que se asignó un grado 1 o mayor para la lesión de interés en la evaluación histopatológica.

30 Los animales dosificados con hepatotóxico se incluyen en el grupo de control para probar la especificidad de los marcadores versus otros cambios hepatotóxicos y debido al hecho de que en estos estudios no se observó nefrotoxicidad relacionada con la dosis.

35 Los animales que fueron dosificados tratados pero que no mostraron ninguna lesión o solamente otras lesiones (diferentes del contexto de histopatología específico de interés) se dejaron fuera del ROC considerando que estos animales no están "limpios". Este grupo de animales representa un estado indefinido especialmente cuando una respuesta molecular es anterior y más rápida que una manifestación histopatológica. En este caso no se puede decidir, si (1) una única lámina de histopatología de un riñón no es representativa del estado global del riñón (histopatología de falso negativo); (2) la respuesta molecular es anterior/más sensible que la histopatología, un denominado estado prodrómico; o (3) los animales son falsos positivos si la histopatología fuera la única verdad (biomarcador de falso positivo). El modo más conservador de tratar a estos animales es excluir a estos animales de cualquier análisis, ya que no se puede realizar ninguna asignación definitiva a ningún grupo.

40 *Resultados para biomarcadores y patologías de interés para monitorizar la lesión renal.* Los resultados del análisis ROC que combinan histopatología, la información del estudio y los valores de biomarcadores se muestran para las patologías renales y biomarcadores más interesantes en la Figura 6.

45 *Parámetros de proteínas y de química clínica para monitorizar e identificar lesiones hepáticas.* Los biomarcadores se obtuvieron de animales a los que se administró vehículo o diferentes dosis del hepatotóxico ANIT (alfa-Naftilisotiocianato). Véase la Figura 7. Se observaron hallazgos histopatológicos relacionados con la dosis en el hígado, pero no en el riñón. En las gráficas se muestran los niveles de concentración relativa (veces del cambio versus los controles). Los niveles de la dosis se representan mediante las diferentes sombras de color, los puntos de tiempo de la toma de muestras se representan mediante las etiquetas. Los niveles de biomarcador se correlacionan bien con la dosis y, así, con la hepatotoxicidad relacionada con la dosis. Los biomarcadores representados en estas gráficas son el estándar actual de ALAT medida en plasma (Figura 7A, parte superior) y los nuevos marcadores lipocalina-2 medidos en plasma (Figura 7A, parte inferior), GST-mu medida en plasma (Figura 7B parte superior) y lipocalina-2 medida en orina (Figura 7B, parte inferior).

5 *Parámetros de proteínas y de química clínica para monitorizar e identificar lesiones renales.* Los biomarcadores se obtuvieron de animales a los que se administró vehículo o diferentes dosis del cisplatino nefrototóxico. Véase la Figura 7. En las gráficas se muestran los niveles de concentración relativa (veces del cambio versus los controles). Los niveles de la dosis se representan como etiquetas en el eje x, los puntos de tiempo de la toma de muestras se representan mediante las etiquetas de las muestras. Las muestras se somborean en color mediante el grado más alto del hallazgo histopatológico observado en el riñón. La barra horizontal indica el nivel de biomarcador más alto observado para los animales de controles de casos (animales a los que se administra la dosis sin que se observe un hallazgo histopatológico en el riñón). Los niveles de proteína mayores que la barra se incrementan significativamente (100% de especificidad para los controles de casos). También, son posibles otros umbrales. Los umbrales específicos para una especificidad del 95% se dan en la Figura 6. Los diferentes parámetros clínicos y proteínas detectan lesión renal con una sensibilidad diferente. La creatinina medida en suero, que es el la prueba periférica estándar actual para la lesión renal y la función renal, es el método menos sensible (Figura 8A, parte superior). La cistatina C medida en plasma (Figura 8A, parte inferior), la Kim-1 medida en orina (Figura 8B, parte superior), la lipocalina-2 medida en orina (Figura 8B, parte inferior), la osteopontina medida en orina (Figura 8C, parte superior) y la clusterina medida en orina (Figura 8C, parte inferior) identifican más animales con hallazgos renales significativos.

20 *Transcripción de genes para monitorizar e identificar la lesión renal.* Los biomarcadores se obtuvieron de animales a los que se administró vehículo o el cisplatino nefrotóxico. Véase la Figura 9. En las gráficas se muestran los valores de expresión (valores Ct referenciados a Polr2g). Los niveles de la dosis se representan como etiquetas en el eje x, los puntos de tiempo de la toma de muestras se representan mediante las etiquetas de las muestras. Las muestras se somborean en color mediante el grado más alto del hallazgo histopatológico observado en el riñón. La barra horizontal indica la expresión más alta (valor más bajo en el gráfico) observada para los animales de control. Los valores por debajo de la barra corresponden a niveles de expresión significativamente incrementados (100% de especificidad para animales a los que no se administró la dosis). También, son posibles otros umbrales. Se proponen umbrales específicos para una especificidad del 95% en la Figura 6, Tanto la Kim-1 (Figura 9A) como el Cyr61 (Figura 9B) se pueden usar para detectar lesión renal antes (a puntos de tiempo anteriores) y de un modo más sensible (a niveles de dosis menores) que el examen histopatológico.

30 *Realizaciones y aspectos de la invención.* Usando las operaciones matemáticas y los datos descritos aquí, la invención provee métodos para diagnosticar, predecir y clasificar la toxicidad renal mediante el uso de biomarcadores en matrices biológicas (orina)

Así, el nivel de expresión, o el nivel de función, de un marcador en un individuo se pueden determinar para seleccionar de este modo el agente apropiado para el tratamiento terapéutico o profiláctico del individuo. Este conocimiento, cuando se aplica a la selección de la dosificación o del fármaco, puede evitar reacciones adversas o fallos terapéuticos y, así, potencia la eficiencia terapéutica o profiláctica cuando se trata a un sujeto con un modulador de la expresión de un marcador. Véase la WO 2004/005544.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para evaluar la toxicidad renal en un individuo después de la administración de compuestos que se sospecha que producen toxicidad renal, en donde la toxicidad renal se identifica mediante medición de un conjunto de biomarcadores en una muestra de orina del individuo y comparación de la cantidad de biomarcador medida con la correspondiente cantidad en un individuo sano, en donde los biomarcadores son seleccionados del grupo que consiste de los biomarcadores listados en la Tabla 1 e incluyen la osteopontina (proteína de fosfoproteína secretada) y en donde la toxicidad renal es el daño tubular proximal.
2. Un método para diagnosticar, predecir y clasificar la toxicidad renal mediante el uso de la osteopontina (proteína de fosfoproteína secretada 1) en orina para mostrar el daño tubular proximal.
- 10 3. Un método para monitorizar la efectividad del tratamiento de un sujeto con un agente que comprende las etapas de: (i) obtener una muestra de orina preadministración de un sujeto antes de la administración del agente; (ii) detectar el nivel de expresión de la osteopontina (fosfoproteína secretada 1) en la muestra preadministración; (iii) obtener una o más muestras de orina posteriores a la administración del sujeto; (iv) detectar el nivel de expresión de la osteopontina (fosfoproteína secretada 1) en las muestras posteriores a la administración; (v) comparar el nivel de expresión de la osteopontina (fosfoproteína secretada 1) en la muestra previa a la administración con el nivel de expresión de la osteopontina (fosfoproteína secretada 1) en la muestra o muestras posteriores a la administración; y (vi) alterar la administración del agente al sujeto en consecuencia, en donde el sujeto está recibiendo tratamiento para la toxicidad renal y la toxicidad renal es el daño tubular proximal.
- 15

FIG. 1
 COMPUESTOS ADMINISTRADOS EN LOS ESTUDIOS IN VIVO
 Nefrotóxicos

Compuesto	Tubular	Glomerular	Ducto colector	Modo de Toxicidad
Gentamicina	X			Fosfolipidosis lisosomal
Puromicina	x (2°)	x		Daño a los podocitos
Vancomicina	x	x		Estrés oxidativo (radicales libres)
Doxorubicina	x (2°)	x		Estrés oxidativo a la membrana de filtro glomerular
Furosemida	x		(x)	Mineralización
Carbonato de litio	x	(x)	(x)	Formación de influencias de monofosfato de adenosina cíclica intracelular
Cisplatina	x	(x)		Alquilación de ADN directa de ADN, Estrés oxidativo
FK 506	X	(x)		Complejo (Vasoconstricción, calcificación)
Hepatotóxicos				
α -Naftilfotiocianato (ANIT)				Colangitis
Metapirileno				Hepatocarcinógeno (tras tratamiento crónico)

FIG. 2
NÚMERO DE LESIONES RENALES REPORTADAS EN TODOS LOS 10 ESTUDIOS
Número de Ocurrencias de Lesiones en el Riñón

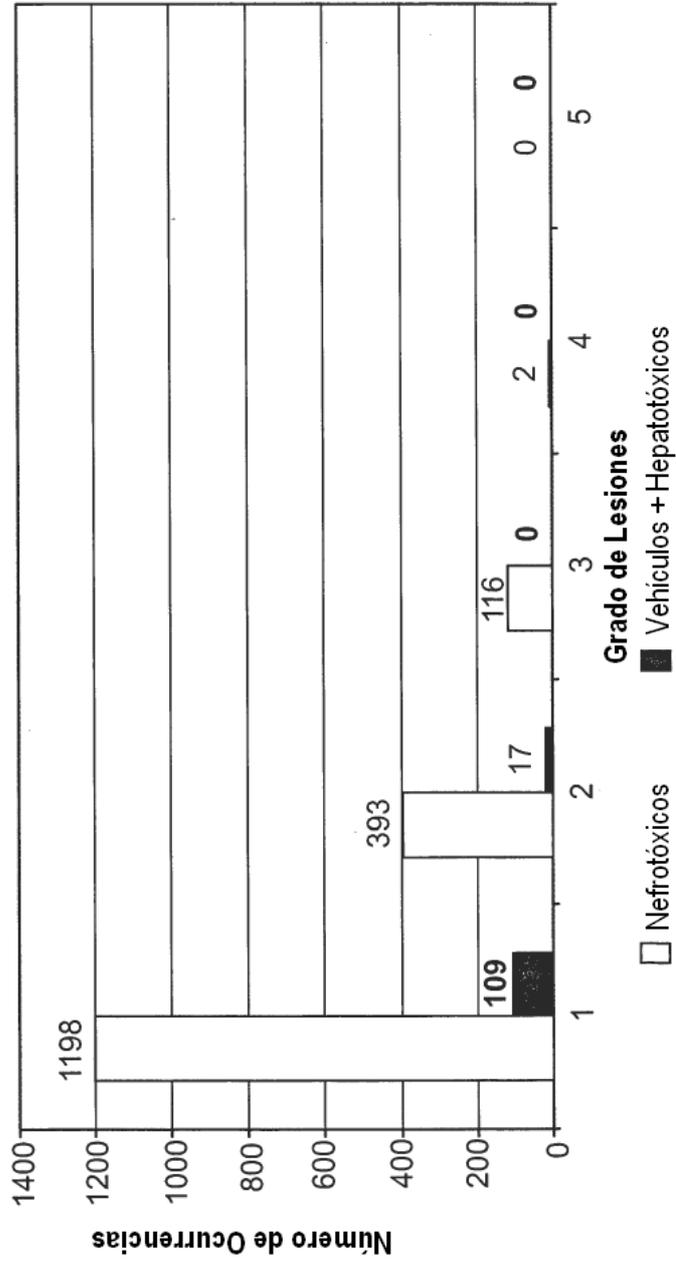


FIG. 3
HISTOPATOLOGÍA DE LESIONES RENALES

Histopatología primaria	Lesión secundaria	Elemento/Segmento estructural	Nefrotóxicos					Controles					Todos												
			0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5					
Proceso			0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5					
Degeneración/Necrosis/ Apoptosis Célula tubular	Necrosis	Sin localización precisa posible	412	19	14	2	0	0	2911						0	0	0	0	0	703	20	14	2	0	0
		Túbulo contorneado proximal (PCT, s1-s2)	396	41	10	0	0	0	2920						0	0	0	0	0	688	41	10	0	0	0
		Túbulo descendente grueso (s3)	347	81	17	2	0	0	2920						0	0	0	0	0	639	81	17	2	0	0
		Túbulo ascendente grueso	406	36	5	0	0	0	2920						0	0	0	0	0	698	36	5	0	0	0
		Túbulo contorneado distal	445	2	0	0	0	0	2920						0	0	0	0	0	737	2	0	0	0	0
		Ducto colector	429	17	1	0	0	0	2920						0	0	0	0	0	721	17	1	0	0	0
	Apoptosis	Sin localización precisa posible	443	4	0	0	0	0	2902						0	0	0	0	0	733	6	0	0	0	0
		Túbulo contorneado proximal (PCT, s1-s2)	431	15	1	0	0	0	2911						0	0	0	0	0	722	16	1	0	0	0
		Túbulo descendente grueso (s3)	443	3	1	0	0	0	2911						0	0	0	0	0	734	4	1	0	0	0
		Túbulo ascendente grueso	446	1	0	0	0	0	2920						0	0	0	0	0	738	1	0	0	0	0
		Ducto colector	436	10	1	0	0	0	2920						0	0	0	0	0	728	10	1	0	0	0

Figura 5**HISTOPATOLOGÍA DE LESIONES DEL HÍGADO**

Hallazgos de Histopatología	Conteo
necrosis coagualtiva aguda	9
necrosis hepatocelular aguda	1
apoptosis/necrosis celular individual	13
degeneración/necrosis de ducto biliar	19
hiperplasia de ducto biliar	67
proliferación de ducto biliar	2
figuras mitóticas epiteliales biliares	5
fibrosis capsular/focal	2
inflamación capsular	1
engrosamiento capsular	1
atrofia hepatocelular centrilobular	2
necrosis coagulativa	1
congestión	4
hematopoyesis extramedular	8
necrosis focal	55
contenido de glucógeno	112
disminución de glucógeno	31
granuloma(s)	9
hemorragia	1
atrofia epatocelular	7
hemosiderosis hepatocelular	7
hemosiderosis hepatocelular/focal	1

Hemosiderosis hepatocelular/proceso papilar izquierdo	2
Microvacuolación hepatocelular	2
vacuolación hepatocelular	10
Figuras mitóticas incrementadas	41
Inflamación/necrosis	22
Inflamación/necrosis/focal	4
Agregación de células mononucleares	88
vacuolización hepatocelular periportal	27
infiltración de células inflamatorias periportal	18
Inflamación perivascular	1
Macrófagos cargados pigmentados	6
Macrófagos cargados con pigmentos	1
Edema portal	3
Fibrosis portal	10
Infiltración de granulocitos portal	29
Infiltración de célula mononuclear portal	107
Núcleos del ducto biliar prominente	3
Nucléolos hepatocelulares prominentes	54
Célula de Kupffer prominente	1
Necrosis de célula individual	53
Ectasia sinusoidal	1
Fibrosis subcapsular	1
Necrosis subcapsular	1

FIG. 5 (continuación)

FIGURA 6
RESULTADOS DEL ANÁLISIS ROC PARA BIOMARCADORES

Biomarcador	Entidad	Matriz	Patología	AUC	Directo	No. Contr.	No. Dis.	Umbral	% Espec	% Sens.
Kim1	Proteína	Orina	Daño Tubular Proximal	0.91 ± 0.02	+	283	132	1.87	95	79
Clusterina	Proteína	Orina	Daño Tubular Proximal	0.88 ± 0.02	+	289	132	1.85	95	70
LCN2	Proteína	Orina	Daño Tubular Proximal	0.75 ± 0.03	+	289	132	2.50	95	52
SPP1	Proteína	Orina	Daño Tubular Proximal	0.71 ± 0.03	+	289	132	2.39	95	34
Timp1	Proteína	Orina	Daño Tubular Proximal	0.73 ± 0.03	+	289	132	2.98	95	34
Calb1	Proteína	Orina	Daño/Regeneración del ducto colector	0.87 ± 0.03	+	291	52	1.93	95	48
Calb1	Proteína	Orina	Hipertrofia del aparato Yuxtaglomerular	0.88 ± 0.02	-	292	30	0.35	95	87
B2-Microglob	Proteína	Orina	Alteraciones/Daño Glomerular	0.89 ± 0.03	+	291	40	2.50	95	78
Proteína total	Proteína	Orina	Alteraciones/Daño Glomerular	0.86 ± 0.04	+	291	40	1.50	95	78
Cistatina C	Proteína	Orina	Alteraciones/Daño Glomerular	0.91 ± 0.03	+	291	40	2.00	95	80
NAG	Proteína	Orina	Daño/Regeneración/ Dilatación Tubular	0.79 ± 0.02	+	244	215	1.38	95	45
LDH	Proteína	Orina	Daño/Regeneración/ Dilatación Tubular	0.73 ± 0.02	+	244	215	2.10	95	38
Calcio	Proteína	Orina	Mineralización Tubular	0.99 ± 0.01	+	292	20	1.99	95	100
Kim1	Proteína	Sangre	Daño Tubular Proximal	0.74 ± 0.03	+	266	119	2.27	95	13

FIGURA 6 (continuación)

LCN2	Proteína	Sangre	Daño tubular proximal		0.72 ± 0.03	+	289	132	2.54	95	31
SPP1	Proteína	Sangre	Matriz hialina intratubular (proteínica, pigmentada)		0.84 ± 0.03	+	290	82	1.24	95	63
SPP1	Proteína	Sangre	Daño/ Regeneración Tubular ascendente grueso		0.83 ± 0.03	+	290	84	1.24	95	61
Cistatina C	Proteína	Sangre	Alteraciones/Daño Glomerular o Daño/Regeneración/Dilatación Tubular		0.81 ± 0.02	+	244	224	1.22	95	54
Cistatina C	Proteína	Sangre	Daño tubular proximal		0.89 ± 0.02	+	289	132	1.23	95	64
Cistatina C	Proteína	Sangre	Alteraciones/ daño glomerular		0.89 ± 0.03	+	291	40	1.23	95	75
B2-Microglob	Proteína	Sangre	Daño glomerular proximal		0.81 ± 0.02	+	289	132	1.62	95	39
Proteína Total	Proteína	Sangre	Alteraciones/ daño glomerular		0.99 ± 0.01	-	291	40	0.93	95	95
Albumina	Proteína	Sangre	Alteraciones/ daño glomerular		0.98 ± 0.02	-	291	40	0.91	95	88
ALP	Proteína	Sangre	Alteraciones/ daño glomerular		0.95 ± 0.02	-	291	40	0.71	95	73
Natrium	ión	Sangre	Daño/ regeneración tubular distal		0.88 ± 0.05	-	290	22	0.98	95	64
Natrium	ión	Sangre	Mineralización tubular		0.95 ± 0.04	-	292	20	0.98	95	75
Kim1	ARNm	Riñón	Daño tubular proximal		0.99 ± 0.01	+	289	132	3.34	95	98
Clusterina	ARNm	Riñón	Daño tubular proximal		0.93 ± 0.02	+	281	132	1.52	95	77
SPP1	ARNm	Riñón	Daño tubular proximal		0.93 ± 0.02	+	289	132	2.66	95	78

FIGURA 6 (continuación)

Tmp1	ARNm	Riñón	Daño Tubular Proximal		0.91 ± 0.02	+	289	132	1.84	95	75
LCN2	ARNm	Riñón	Daño Tubular Proximal		0.87 ± 0.02	-	289	132	4.1	95	70
VEGF	ARNm	Riñón	Daño Tubular Proximal		0.82 ± 0.02	-	289	132	0.85	95	58
EGF	ARNm	Riñón	Daño Tubular Proximal		0.88 ± 0.02	+	289	132	0.8	95	70
CYR61	ARNm	Riñón	Daño/Regeneración/Dilatación Tubular		0.79 ± 0.02	-	244	215	1.82	95	52
Calb1	ARNm	Riñón	Hipertrofia del Aparato Yuxtaglomerular		1.00 ± 0.00	+	292	30	0.62	95	100
Cistatina C	ARNm	Riñón	Alteraciones/ Daño Glomerular		0.94 ± 0.03	+	291	40	1.29	95	75
KIM1	ARNm	Riñón	Daño/ Regeneración/ Dilatación Tubular		0.87 ± 0.02	+	244	215	2.9	95	78
Clusterina	ARNm	Riñón	Daño/ Regeneración/ Dilatación Tubular		0.82 ± 0.02	+	244	215	1.45	95	59
EGF	ARNm	Riñón	Daño/ Regeneración/ Dilatación Tubular		0.83 ± 0.02	-	244	215	0.8	95	59
Creatinina	Molécula	Sangre	Daño Tubular Proximal		0.73 ± 0.03	+	289	132	1.15	95	40
Creatinina	Molécula	Sangre	Alteraciones/ Daño Glomerular		0.53 ± 0.05	-	291	40	0.95	95	33
Creatinina	Molécula	Sangre	Daño/ Regeneración/ Dilatación Tubular		0.70 ± 0.02	+	244	215	1.15	95	31
Creatinina	Molécula	Sangre	Alteraciones/Daño Glomerular O Daño/Regeneración/Dilatación Tubular		0.71 ± 0.02	+	244	224	1.15	95	30
Creatinina	Molécula	Sangre	Daño/ Regeneración del Ducto Colector		0.85 ± 0.03	+	291	52	1.15	95	52

FIGURA 6 (continuación)

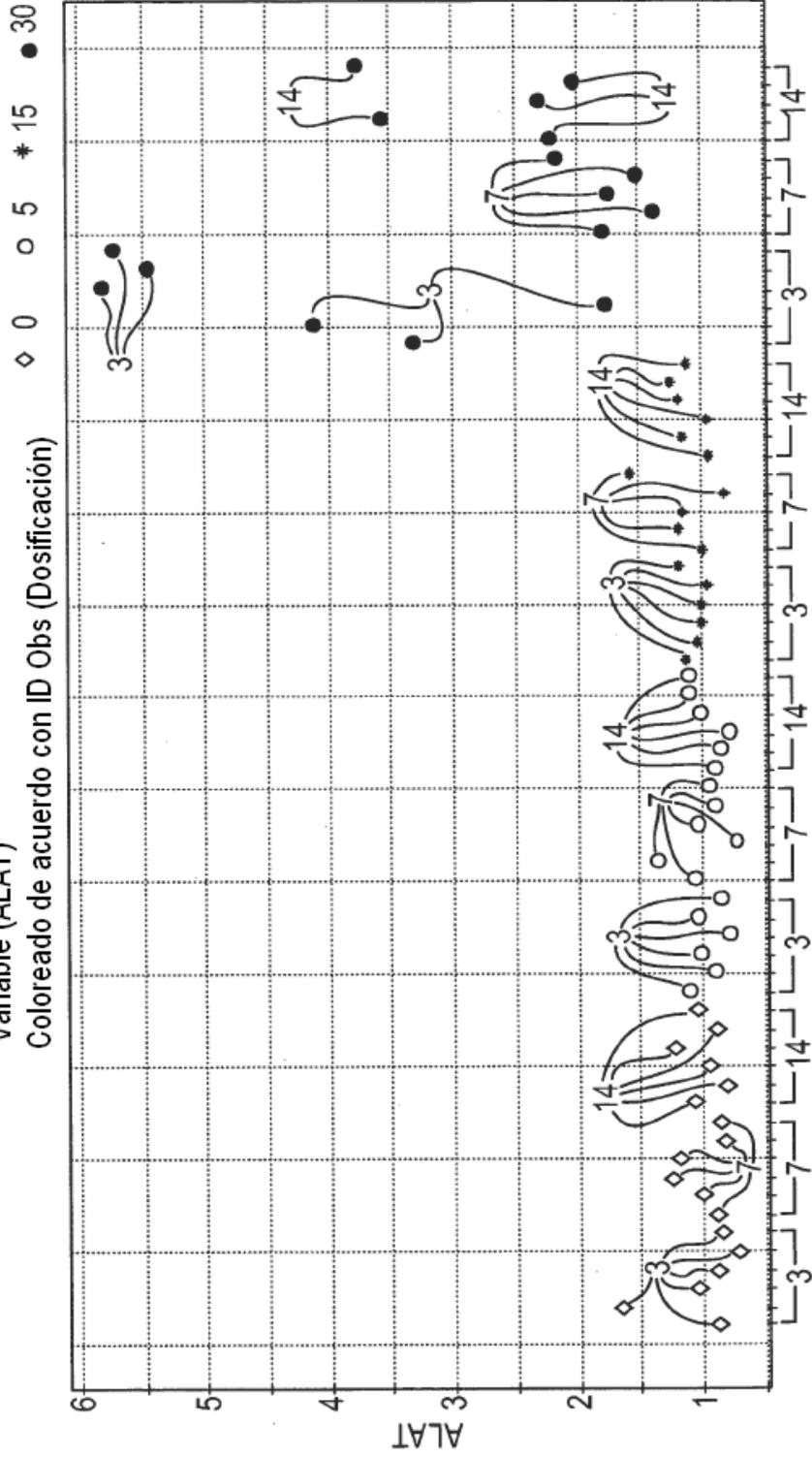
Creatinina	Molécula	Sangre	Daño/ regeneración tubular distal	0.83 ± 0.05	+	290	22	1.15	95	50
Creatinina	Molécula	Sangre	Daño/ regeneración tubular ascendente grueso	0.77 ± 0.03	+	290	84	1.15	95	43
Creatinina	Molécula	Sangre	Hipertrofia del Aparato Yuxttaglomerular	0.75 ± 0.05	+	292	30	1.15	95	13
Creatinina	Molécula	Sangre	Mineralización tubular	0.90 ± 0.05	+	292	20	1.15	95	30
Creatinina	Molécula	Sangre	Matriz hialina intratubular (proteínica, pigmentada)	0.67 ± 0.04	+	290	82	1.15	95	43
BUN	Molécula	Sangre	Daño tubular proximal	0.79 ± 0.03	+	289	132	1.20	95	51
BUN	Molécula	Sangre	Alteraciones/ daño glomerular	0.80 ± 0.04	+	291	40	1.20	95	55
BUN	Molécula	Sangre	Daño/ regeneración/dilatación tubular	0.70 ± 0.02	+	244	215	1.20	95	40
BUN	Molécula	Sangre	Alteraciones/Daño Glomerular o Daño/Regeneración/Dilatación Tubular	0.70 ± 0.02	+	244	224	1.20	95	39
BUN	Molécula	Sangre	Daño/regeneración del ducto colector	0.58 ± 0.04	+	291	52	1.20	95	38
BUN	Molécula	Sangre	Daño/regeneración tubular distal	0.73 ± 0.06	+	290	22	1.20	95	41
BUN	Molécula	Sangre	Daño/ regeneración tubular ascendente grueso	0.86 ± 0.03	+	290	84	1.20	95	60
BUN	Molécula	Sangre	Hipertrofia del Aparato Yuxttaglomerular	0.62 ± 0.06	+	292	30	1.20	95	10
BUN	Molécula	Sangre	Mineralización tubular	0.84 ± 0.06	+	292	20	1.20	95	45
BUN	Molécula	Sangre	Matriz hialina intratubular (proteínica, pigmentada)	0.80 ± 0.03	+	290	82	1.20	95	55

FIG. 7A HEPATOTOXICIDAD POR DIFERENTES BIOMARCADORES DE PROTEINA

segunda_prueba.DS1 segunda_prueba

Variable (ALAT)

Coloreado de acuerdo con ID Obs (Dosificación)



ID Obs (Punto de Tiempo)

SIMCA-P+ 11 - 27.02.2007 16:33:31

FIG. 7A (continuación) HEPATOTOXICIDAD POR DIFERENTES BIOMARCADORES DE PROTEINA

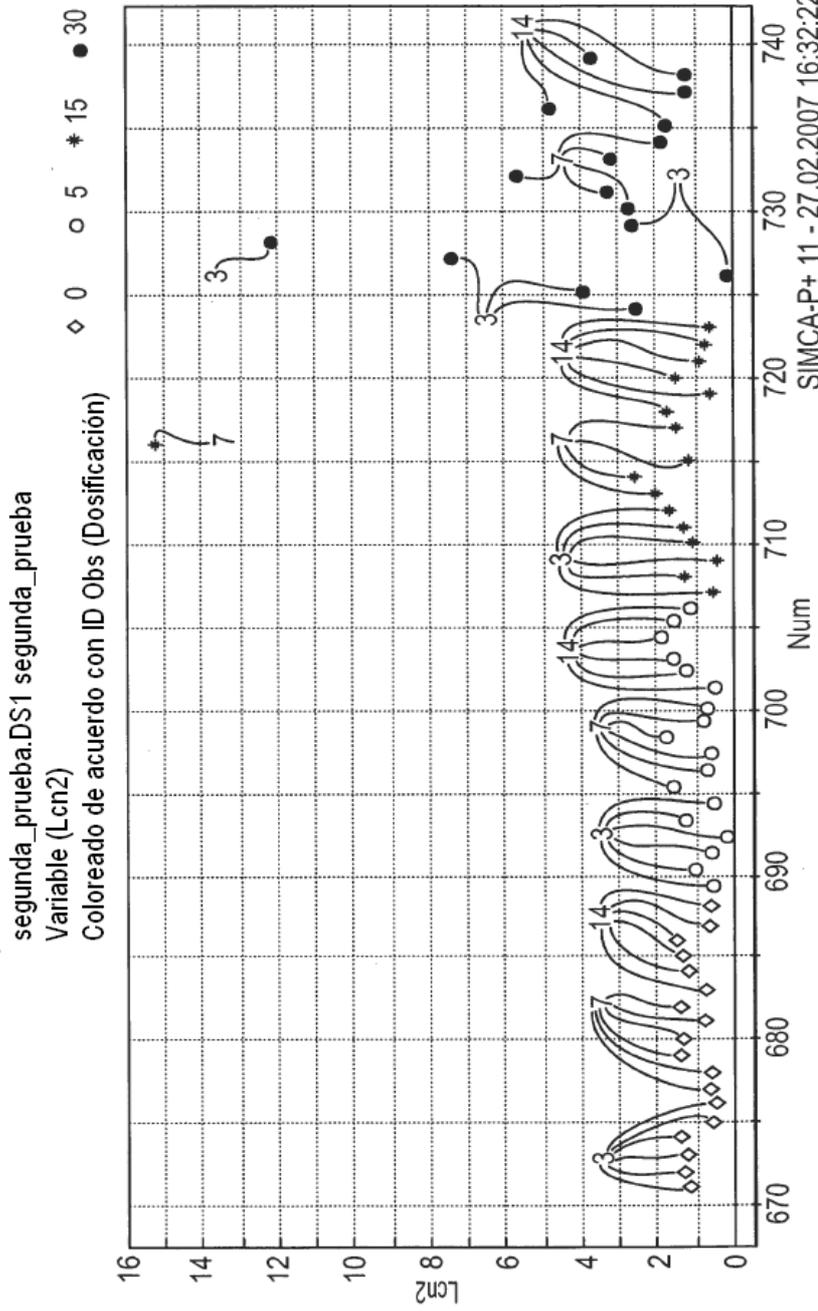


FIG. 7B HEPATOTOXICIDAD POR DIFERENTES BIOMARCADORES DE PROTEINA

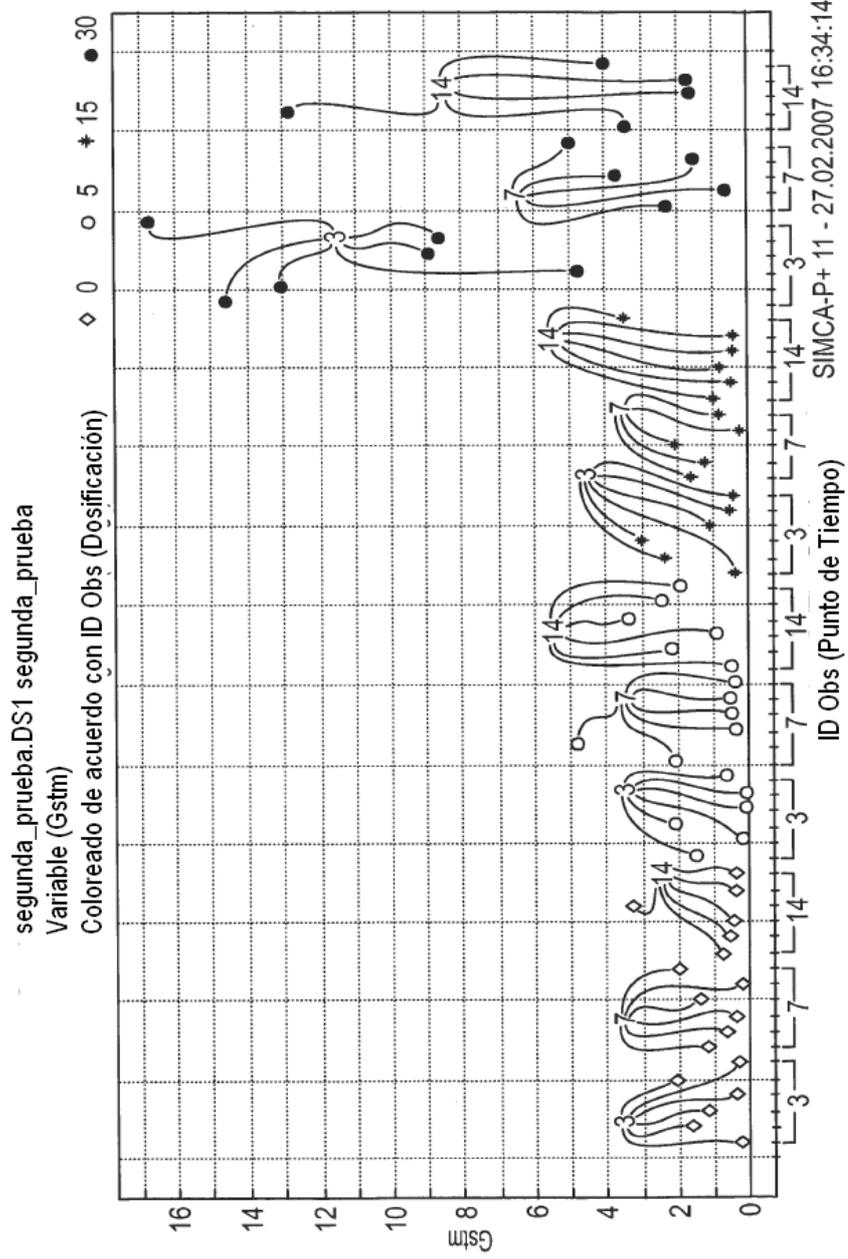


FIG. 7B (continuación) HEPATOTOXICIDAD POR DIFERENTES BIOMARCADORES DE PROTEÍNA

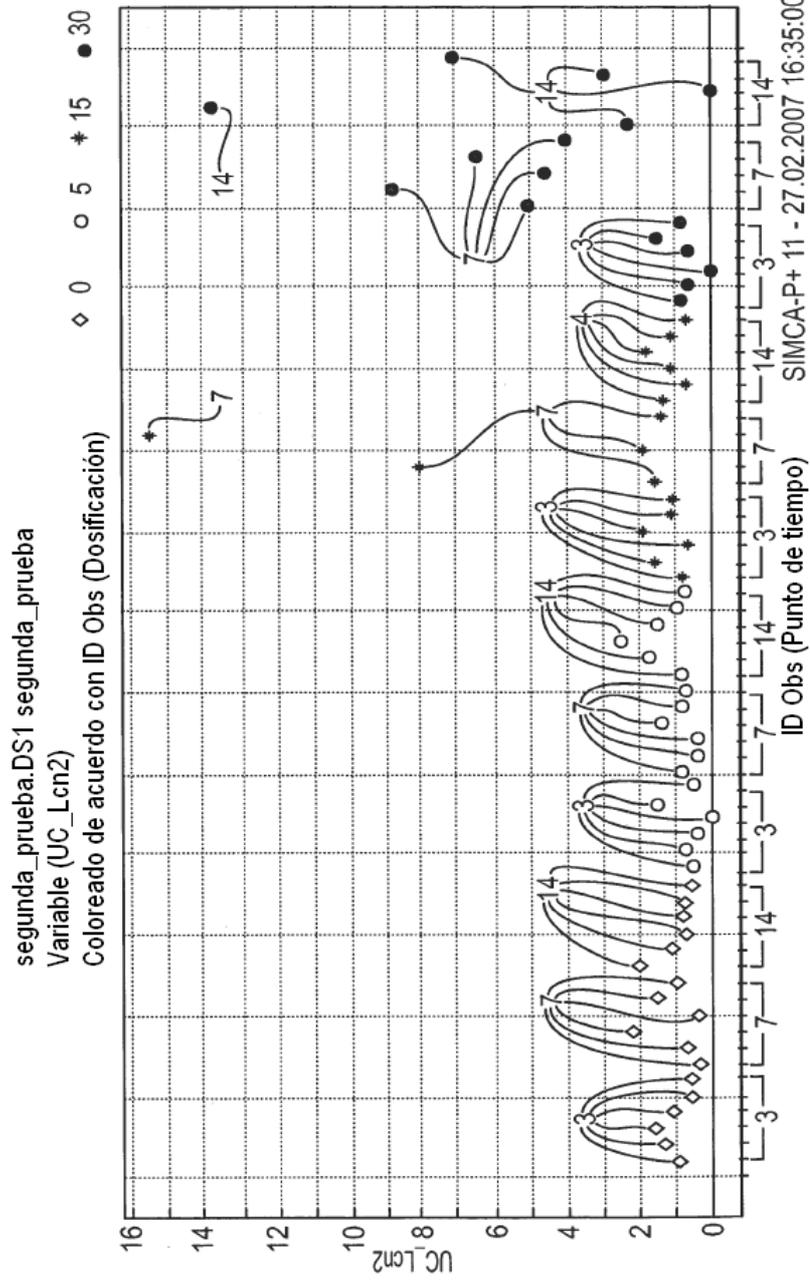


FIG. 8A LESIÓN DEL RIÑÓN POR DIFERENTES BIOMARCADORES DE PROTEÍNA Y PARÁMETROS DE QUÍMICA CLÍNICA

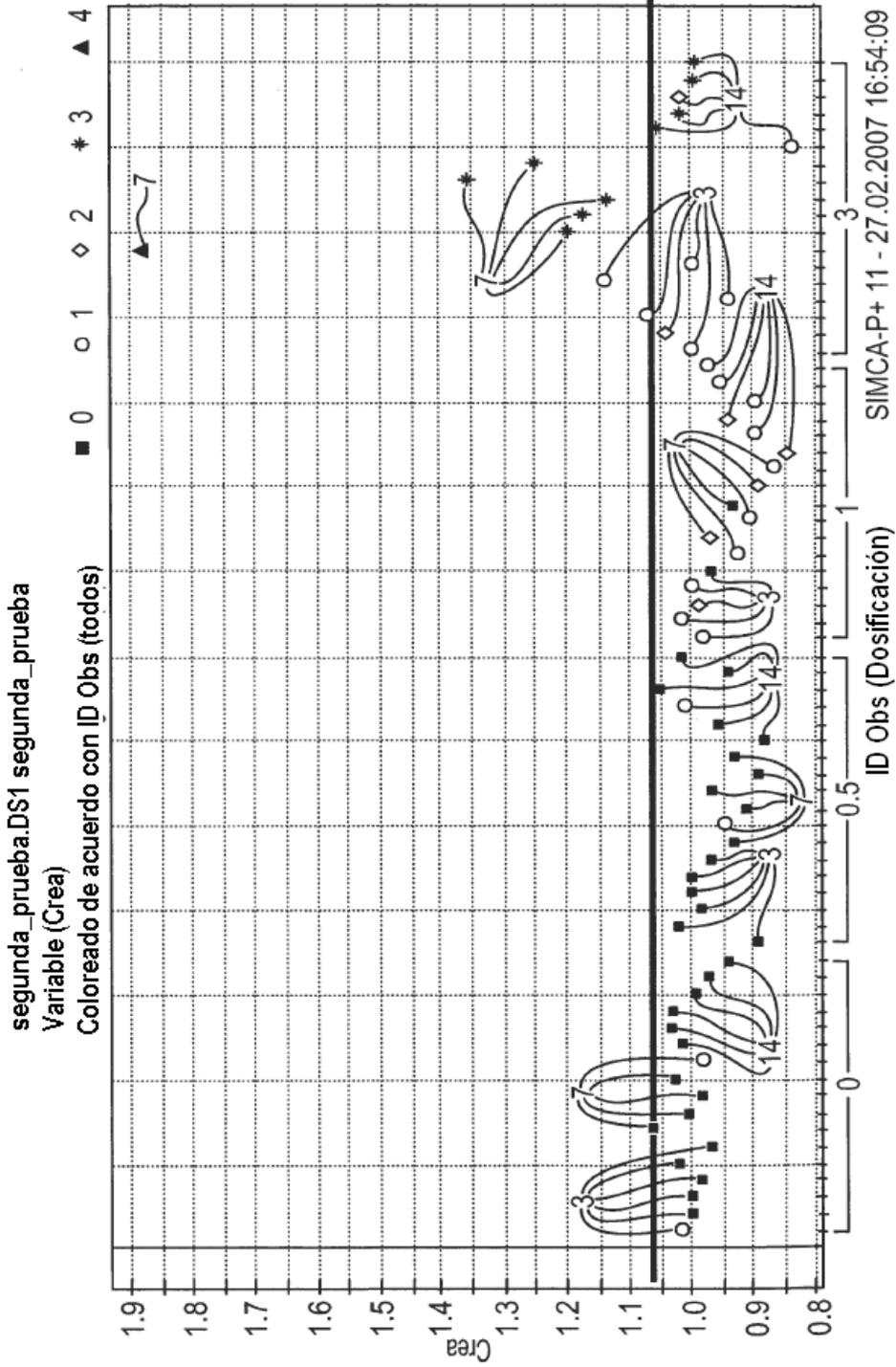


FIG. 8A(cont.) LESION DEL RIÑÓN POR DIFERENTES BIOMARCADORES DE PROTEINA Y PARAMETROS DE QUIMICA CLINICA

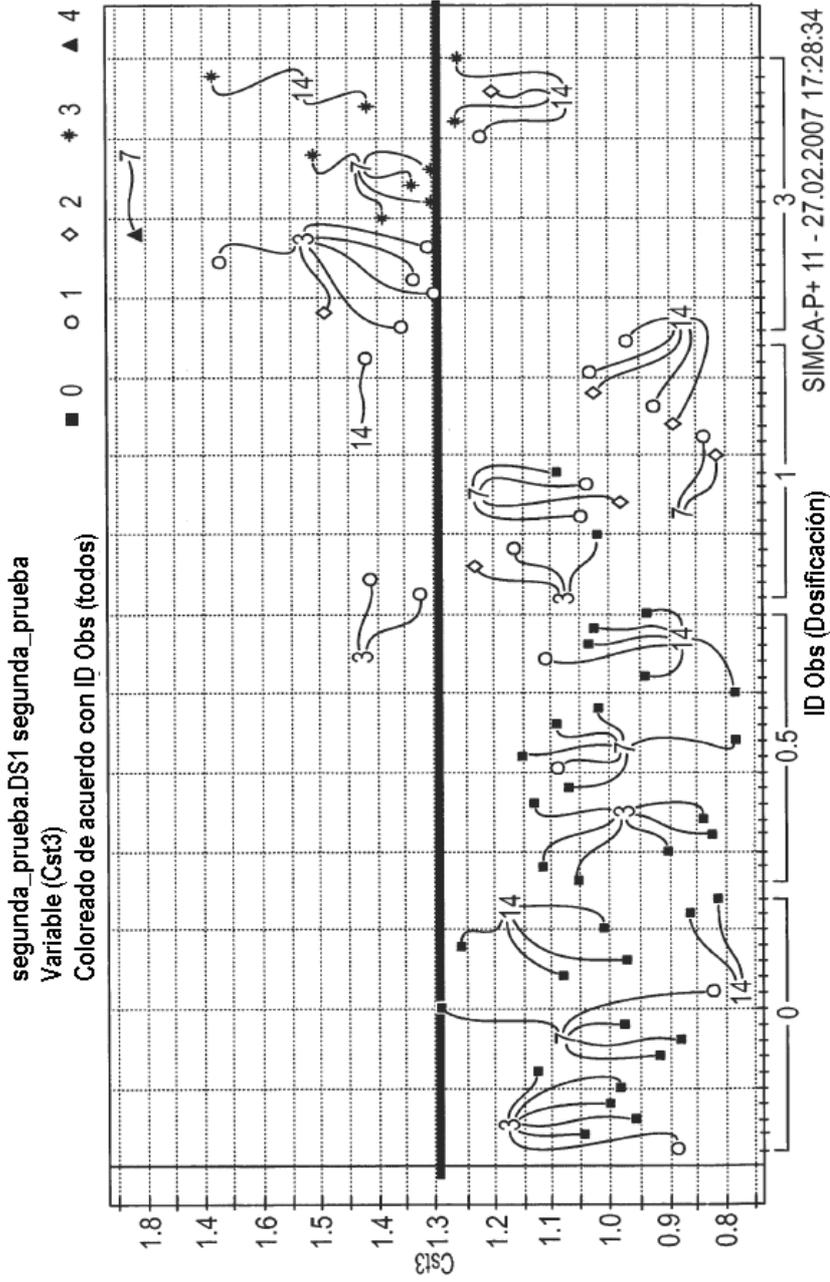


FIG. 8B LESIÓN DEL RIÑÓN POR DIFERENTES BIOMARCADORES DE PROTEÍNA Y PARÁMETROS DE QUÍMICA CLÍNICA

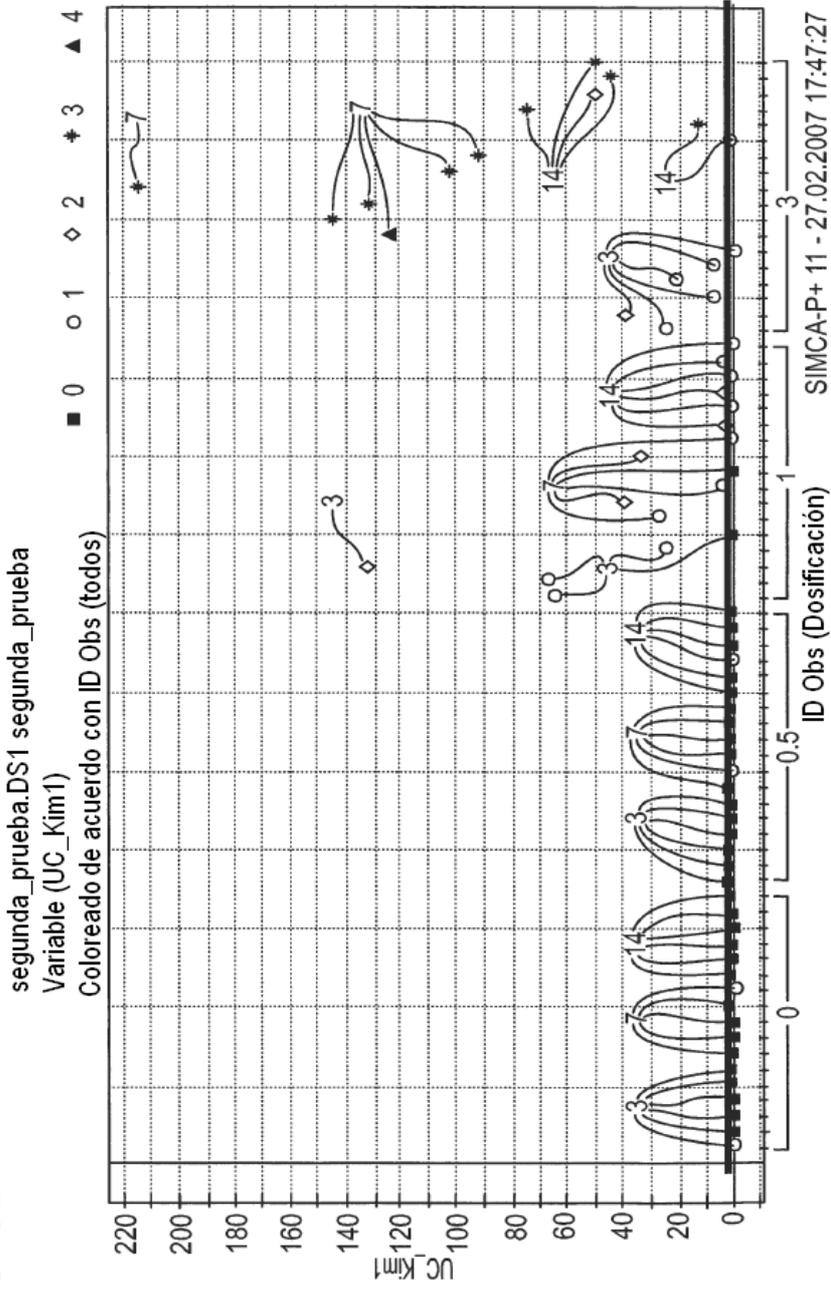


FIG. 8B(cont.) LESIÓN DEL RIÑÓN POR DIFERENTES BIOMARCADORES DE PROTEINA Y PARÁMETROS DE QUÍMICA CLÍNICA

segunda_prueba.DS1 segunda_prueba

Variable (UC_Lcn2)

Coloreado de acuerdo con ID Obs (todos)

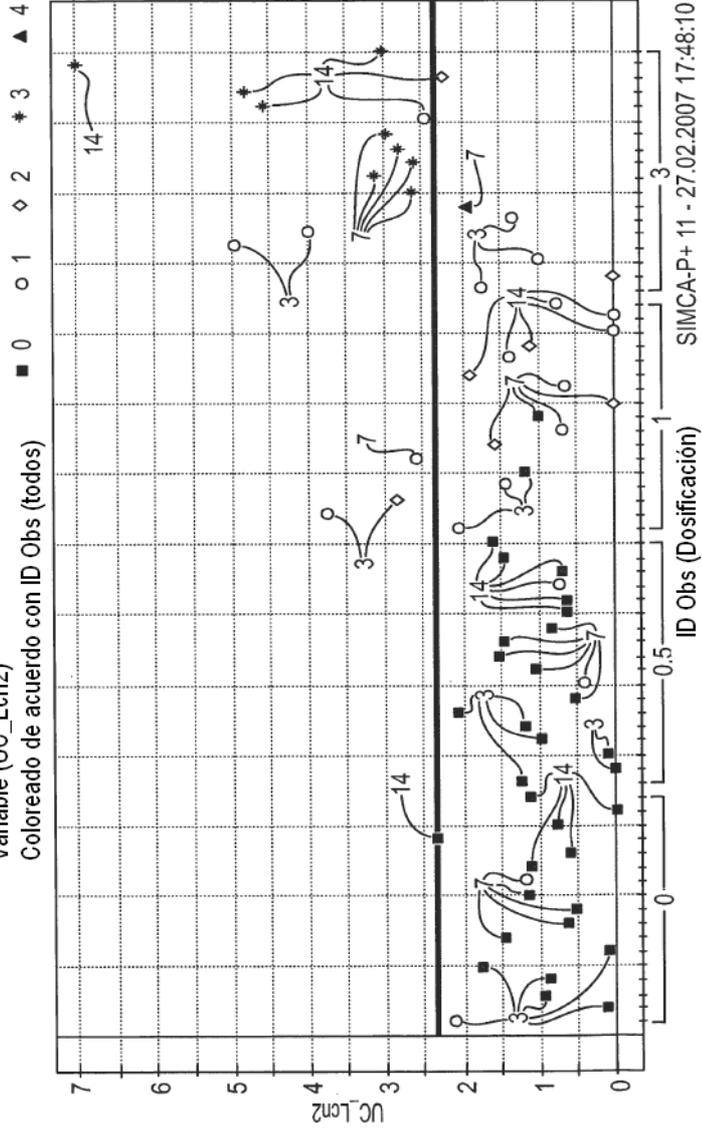


FIG. 8C LESIÓN DEL RIÑÓN POR DIFERENTES BIOMARCADORES DE PROTEÍNA Y PARÁMETROS DE QUÍMICA CLÍNICA

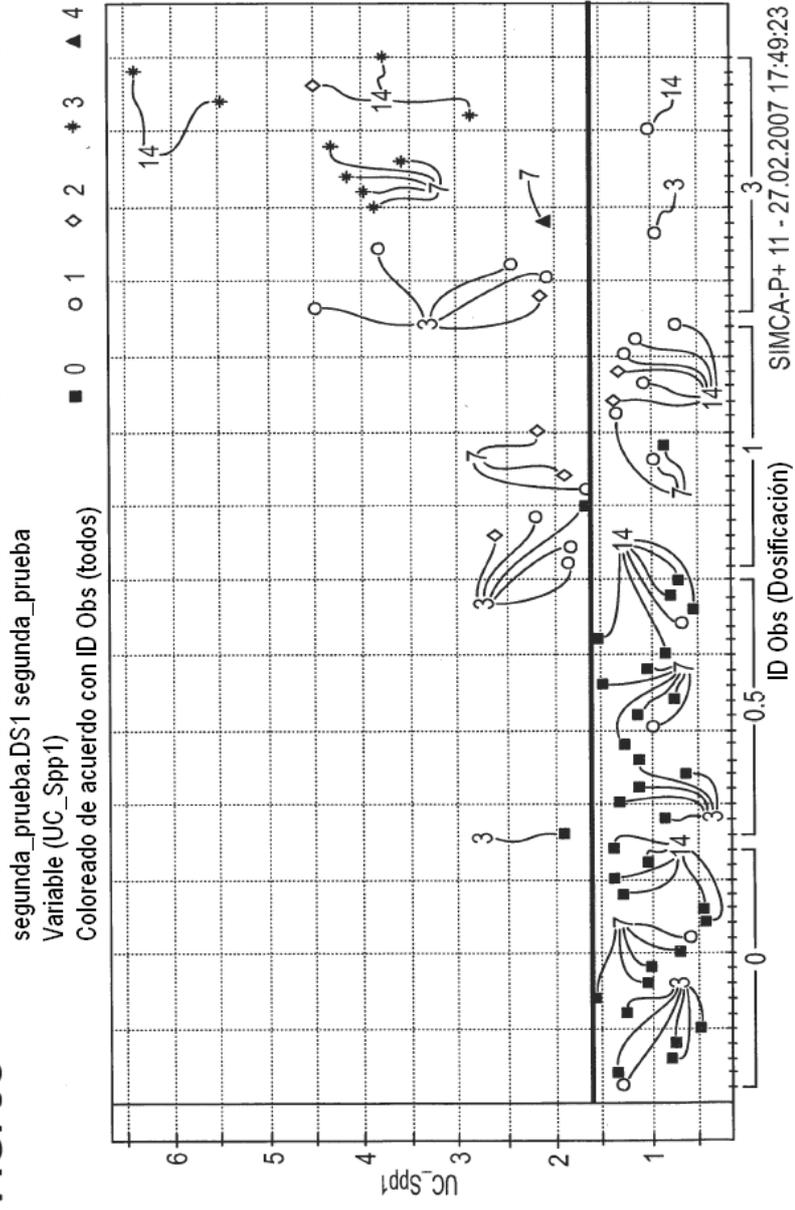


FIG. 8C(cont.) LESIÓN DEL RIÑÓN POR DIFERENTES BIOMARCADORES DE PROTEINA Y PARÁMETROS DE QUÍMICA CLÍNICA
segunda_prueba.DS1 segunda_prueba

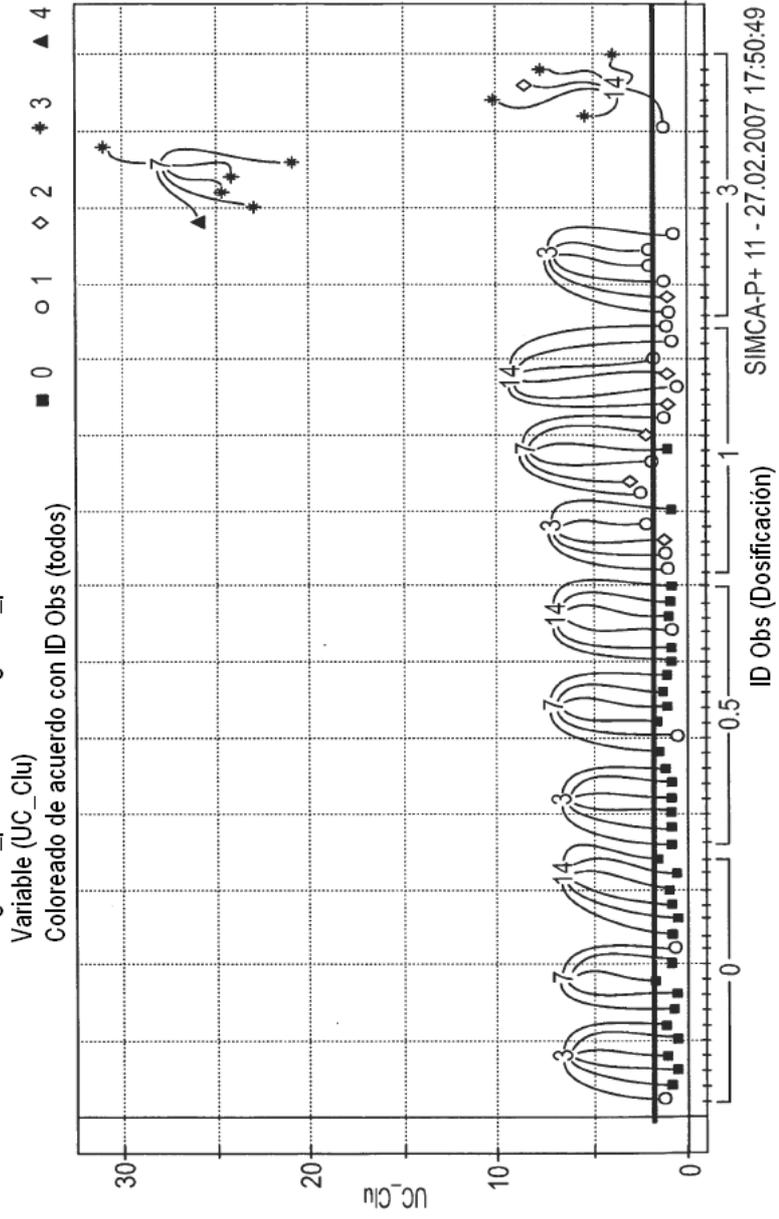


FIG. 9A LESIÓN DEL RIÑÓN POR TRANSCRIPCIÓN DE GENES DIFERENTES – ENSAYO DE ARNm DEL RIÑÓN

Histopatología PCR_Matriz_Cisplatino_02.DS1 Histopatología_PCR_Matriz_Cisplatino-02
Variable (Havcr1)

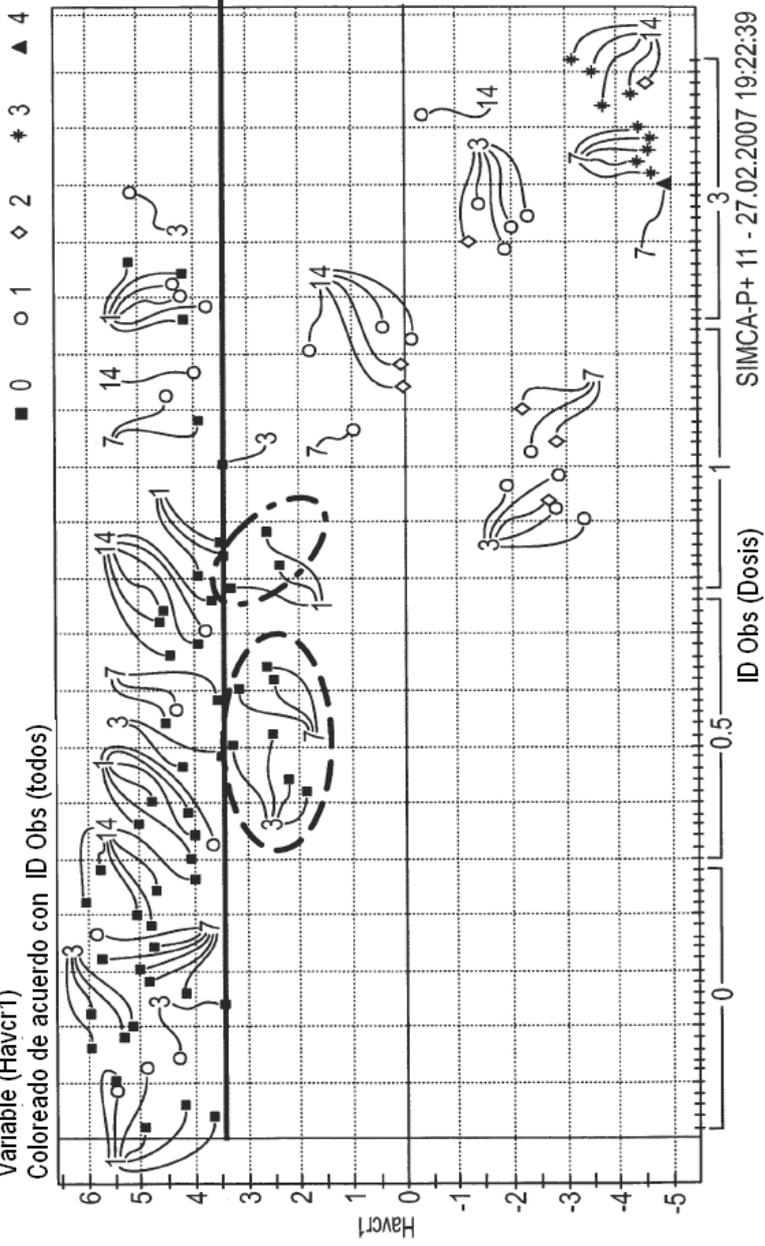


FIG. 9B LESIÓN DEL RIÑÓN POR TRANSCRIPCIÓN DE GENES DIFERENTES – ENSAYO DE ARNm DEL RIÑÓN
Histopatología_PCR_Matriz_Cisplatino_02.DS1 Histopatología_PCR_Matriz_Cisplatino-02

