

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 610**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2010** **E 10831836 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015** **EP 2506016**

54 Título: **Método de diagnóstico para detectar la lesión renal aguda a través del uso de la proteína de choque térmico de 72 como un biomarcador sensible**

30 Prioridad:

23.11.2009 MX MX09012633

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

29.10.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO (100.0%)**

**9 Piso de la Torre Rectoría, Ciudad Universitaria,
Delegación Coyacán
México, D.F. C.P. 04510, MX**

72 Inventor/es:

**BOBADILLA SANDOVAL, NORMA ARACELI y
BARRERA CHIMAL, JONATAN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 549 610 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

Método de diagnóstico para detectar la lesión renal aguda a través del uso de la proteína de choque térmico de 72 como un biomarcador sensible.

Campo de la invención

- 5 La presente invención se inscribe en el campo de la medicina clínica y se refiere a un método de diagnóstico para detectar Insuficiencia Renal Aguda (AKI), más específicamente se refiere a la demostración de que la proteína de choque térmico de 72 kDa (Hsp72) es un biomarcador no invasivo, sensible y temprano para detectar AKI y a los métodos para detectar a Hsp72 en muestras de orina.

Antecedentes de la invención

- 10 La Insuficiencia renal aguda es una causa importante de morbilidad y mortalidad en los pacientes hospitalizados por diferentes causas. Se calcula que la incidencia de la AKI varía del 5% en pacientes con función renal normal antes de alguna cirugía, hasta un 30%, en pacientes admitidos en unidades de cuidado intensivo (ICU). A pesar de los recientes avances en el diagnóstico y la terapéutica, la morbilidad y mortalidad asociada con AKI sigue siendo muy elevada (40 a 60% en pacientes en ICU) y no ha sido mejorada en forma considerable en las últimas cuatro
- 15 décadas, debido principalmente a que las herramientas disponibles para la detección temprana de la AKI son poco sensibles e inespecíficas (Clin J Am Soc Nephrol 3:1895-1901,2008). Debido a esto, la búsqueda de biomarcadores tempranos está ganando gran importancia. Por otra parte, estos nuevos biomarcadores podrían ser herramientas potenciales para la detección temprana de AKI y podrían ser también capaces de distinguir diferentes grados de lesión renal con el fin de detectar aquellos pacientes que están en riesgo de desarrollar enfermedad renal crónica,
- 20 debido a un episodio severo de AKI. Por lo tanto, el desarrollo de biomarcadores efectivos ayudará a la intervención oportuna para un tratamiento adecuado de la AKI, en los pacientes expuestos a desarrollarla como lo son los pacientes en las ICU, los que serán sometidos a cirugía cardíaca, pacientes de trasplante renal o aquellos que hayan desarrollado AKI y que el biomarcador permita estratificar la lesión, así como a detectar aquellos pacientes que estén en riesgo de desarrollar enfermedad renal crónica.
- 25 En la práctica clínica el diagnóstico de la AKI se establece con base en las elevaciones de la creatinina en suero y por estimaciones de la tasa de filtrado glomerular (GFR). A pesar de que la creatinina en suero es útil para la estimación de la función renal en pacientes con enfermedad renal crónica, en pacientes con AKI, no es un buen indicador por las siguientes tres razones: 1) Una gran cantidad del tejido renal puede estar lesionado sin elevaciones de la creatinina en suero, un claro ejemplo se presenta los donadores en el trasplante renal, que a pesar de perder
- 30 el 50% de la masa renal no presentan cambios en los niveles de creatinina en suero, 2) La concentración de la creatinina en suero depende de varios factores como no renales tales como; la conversión de creatina a creatinina en el músculo esquelético, la liberación de la creatinina al torrente sanguíneo, etc., por lo que la elevación de la creatinina en suero se da de forma tardía porque depende de su liberación y acumulación y 3) La creatinina en suero puede estar influenciada por otros factores como; el peso, la raza, el género, la edad, el consumo de fármacos, el
- 35 metabolismo muscular y la ingesta proteica. En cuanto a la determinación de la GFR, esta puede ser modificada por lesiones de tipo renal y no renal. Por ejemplo; la hipovolemia o alteraciones del grado de vasoconstricción o vasodilatación de la arteriola aferente causan una reducción en la TFG con una consecuente elevación de la creatinina en plasma, lo que no se correlaciona con daño tubular o renal. Todos estos factores dificultan la intervención temprana de los pacientes que desarrollan AKI y en consecuencia no se alcanza una mejor prognosis
- 40 (Clin Transl Sci 3,200-208; 2008).

Un biomarcador es una molécula biológica que se produce endógenamente y que puede ser un indicador objetivo para detectar un proceso biológico anormal. Adicionalmente puede ayudar a detectar si una intervención farmacológica está siendo útil para reducir la lesión provocada por el proceso patológico.

- 45 Específicamente, en pacientes con AKI, un biomarcador útil será aquel que ayude a detectar en forma temprana, precisa y sencilla la principal complicación estructural de la AKI que es la necrosis tubular aguda (ATN). La ATN se caracteriza por lesión tubular proximal severa debido a la pérdida del borde en cepillo y de la polaridad en el epitelio. Por estas características, es posible encontrar un biomarcador que se pueda detectar en las células desprendidas y que aparecerán en la orina, pudiendo de esta forma reflejar la lesión tubular asociada con este síndrome.

Los biomarcadores no solo ayudarán a diferenciar la ATN de otros tipos de lesión renal, sino que potencialmente pueden identificar la localización del daño tubular, la causa y el curso temporal de la lesión.

Varios estudios han propuesto proteínas y marcadores bioquímicos para la detección de ANT, dentro de los que se encuentran: la N-acetil-b-D-glucosaminidasa (NAG), la lipocalina de neutrófilos asociada a la gelatinasa (NGAL), la molécula de lesión renal -1 (Kim-1), la cistatina C y la interleucina 18 (IL-18) (Am J Physiol Renal Physiol 290:F517-F529) (J Am Soc Nephrol 18:904-912, 2007) (Am J of Transplantation 6:1639-1645;2006). En un informe reciente, realizado con 90 pacientes que fueron sometidos a cirugía cardíaca, se evaluó la utilidad diagnóstica de Kim-1, NAG y NGAL. Al determinar la capacidad de estas moléculas para la detección de AKI en forma inmediata o después de 3 horas de la cirugía cardíaca, utilizando una escala de 1, se encontró que la capacidad de Kim-1 fue 0.68 y 0.65 respectivamente, para NAG: 0.61 y 0.63 y para NGAL: 0.59 y 0.65. Para aumentar la sensibilidad de estos marcadores fue necesario combinar la determinación de estos tres marcadores, y de esta forma, tanto la sensibilidad como, la detección temprana de AKI, se incrementó a 0.75 y 0.78, respectivamente (Clin J Am Soc Nephrol 5:873-882, 2009). Esto apoya la idea de que se debe continuar con la búsqueda de biomarcadores con un mayor nivel de potencial de diagnóstico temprano y capaces de estratificar el daño por AKI.

Se ha informado de que durante los fenómenos de AKI, son activados varios mecanismos para compensar el estrés celular resultante, uno de ellos es el incremento en la expresión de la familia de proteínas de choque térmico (Hsp) (Experientia 18, 571-573, 1962) que ayudan a recuperar la homeostasis celular. Estas proteínas pertenecen a una familia multigénica con un peso molecular que varía entre los 10 hasta 150 kDa. Estas proteínas se clasifican de acuerdo con su peso molecular en 6 subfamilias: de 100-110 kDa, 90 kDa, 70 kDa, 60 kDa, de 40 kDa y la subfamilia de Hsp con peso molecular entre 18 y 30 kDa {Ann Med. 4:261-71, 1999}.

En particular la familia de las Hsp70 se compone de 4 isoformas, la Grp78, la mHsp95, Hsc70 y la isoforma inducible: Hsp72. Ésta última se expresa en respuesta al estrés celular y su inducción puede llegar a ser tan alta como el 15% de la proteína celular total (Cell Stress chaperones 4:309-316, 2003). Este hecho, en conjunto con la descamación celular del túbulo proximal de la nefrona que ocurre ante un fenómeno de AKI, fue utilizado como base para esta invención: que es la detección urinaria de Hsp72, como un biomarcador sensible de AKI, tanto a nivel de proteína, usando inmunoensayos y en el nivel de ARNm usando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR en tiempo real).

Müller divulga la detección de Hsp70/72 en la orina de niños sometidos a trasplantes y las ratas sometidas a isquemia (Müller T et al. "Urinary Heat Shock Protein-72 Excretion in Clinical and Experimental Renal Ischemia", Pediatric Nephrology, 2003, 18, 2, 97-99) Sin embargo, no demuestra la lesión renal en los niños sometidos a trasplantes. El posible daño renal debería ser evaluado, bien sea por la creatinina en suero incrementada o por evaluación histopatológica, que faltan en la publicación. Una situación similar ocurre con los animales de experimentación: los ensayos se realizaron en ratas sometidas a isquemia, tampoco mostraron daño renal. El documento no evalúa que la presencia de Hsp72 en la orina refleja cualquier grado de anormalidad funcional o estructural en el riñón, contrario de la presente invención. De hecho, de los niños sometidos a trasplante solamente los resultados de orina de tres de ellos son denominados, y estos sin especificar qué tipo de donante son, ya sea de donante vivo o de cadáver. Esto no apoya consideraciones serias hacia un nivel incrementado de Hsp72 indicativo de cualquier anormalidad, sabiendo que en el corto plazo después de trasplante de riñón el sistema inmune activa la expresión de Hsp72.

Zhang muestra que durante un proceso de isquemia/reperfusión renal en la rata, un incremento de los niveles de Hsp70 y Hsp27 sucede en el tejido renal (Zhang PL. et al, "Heat Shock Protein Expression is Highly Sensitive to Ischemia- Reperfusion Injury in Rat Kidneys", Annals of Clinical & Laboratory Science, 2008, 38, 1, 57-63). Esta publicación reconoce las dos como proteínas diferentes, aunque desafortunadamente no divulga el anticuerpo utilizado para la identificación. Es importante tener en cuenta que el comportamiento de Hsc70 después de la isquemia es muy diferente que el de la inducción de la Hsp72. De hecho, Zhang no menciona que la concentración de Hsp72 se eleva, que la detección en la orina de los animales probados habría sido aún menos probable. Es importante tener en cuenta que la inducción de proteínas de choque térmico en condiciones isquémicas es un fenómeno bien conocido en la técnica. Esto no se limita a Hsp72, como sucede con otras proteínas de choque térmico en además otros órganos. La función de estas proteínas es inducirse a sí mismas para restaurar la homeostasis celular.

Van Why divulga un incremento en los niveles de ARNm y proteínas de Hsp72 en todo el riñón de rata sometido a isquemia (Van Why SK, et al. "Induction and Intracellular Localization of HSP-72 after Renal Ischemia", AM, J.

Physiol. Renal Physiol., 1992, 263, F769-F775). La dicha inducción en el tejido renal cae dentro de las disposiciones anteriores. Además, Hsp72 se expresa abundantemente en la médula renal constitutivamente, de modo que Van Why pudiera medirlo; diferente que en la corteza renal en donde se induce bajo lesión renal aguda para ser medida en la orina de acuerdo con la presente invención.

- 5 La técnica de ELISA (ensayo de inmunosorbente enlazado a enzima) y el análisis por Western Blot han sido utilizados ampliamente para la detección específica de proteínas con el uso de anticuerpos, en diferentes tipos de muestras {Immunology 6th edition, 2007}.

La prueba de PCR en tiempo real es utilizada para la determinación cuantitativa de los niveles de ARNm de un gen específico.

- 10 Esta invención contribuye a resolver el problema que existe en la práctica clínica de ser incapaz la detección temprana de AKI y para estratificar el grado de lesión renal que el riñón sufrió, con el fin de hacer una intervención oportuna de los pacientes con una terapia efectiva.

Descripción de la invención

- 15 La presente invención se relaciona con un método de diagnóstico no invasivo para la detección temprana de la lesión renal aguda el desarrollo de insuficiencia renal aguda usando la concentración del biomarcador Hsp72 en muestras de orina. Este método es no invasivo, es confiable y de fácil realización.

En la presente invención, el método para detectar la AKI, comprende la obtención de una muestra de orina de un mamífero, preferentemente humano, y la cuantificación de la concentración del biomarcador, la proteína de choque térmico 72 (Hsp72) tanto a nivel de proteína como de ARNm.

- 20 La concentración del biomarcador se puede determinar a nivel de ARNm y/o niveles de proteína utilizando pruebas de inmunoensayos, tales como ELISA y análisis de Western Blot, sin que esto limite la invención.

El resultado de la cuantificación del biomarcador varía entre 40 y 533 veces comparado con los valores de control y este incremento depende de la intensidad de la lesión y el biomarcador Hsp72 en la orina se puede detectar desde las 3 horas después de que la lesión ha sido provocada en el riñón.

- 25 La cuantificación de Hsp72, es capaz de estratificar la intensidad de la lesión provocada por el incremento de los periodos de isquemia, lo cual es importante en la práctica clínica con el fin de detectar a los pacientes que hayan desarrollado lesión renal severa, lo que a su vez permitirá un oportuno seguimiento y, en consecuencia, podría ser de gran impacto, ya que puede evitar o reducir la complicación de la enfermedad renal crónica.

Ejemplos

- 30 Los siguientes ejemplos son para ilustrar la invención y en ningún caso son para limitarla.

- EJEMPLO 1.** Para demostrar la utilidad de la Hsp72 como biomarcador sensible y temprano de la AKI, se utilizó el modelo de isquemia/reperfusión (I/R) renal en la rata. Modelo de Isquemia/Reperfusión: Se utilizaron a lo largo del estudio ratas macho Wistar. Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/kg i.p), y se realizó una laparotomía y se disecaron los pedículos renales, después de esto se interrumpió el flujo sanguíneo a los riñones mediante la colocación de un clip en cada arteria renal durante 10, 20, 30, 45 y 60 minutos con el fin de evaluar distintos grados de lesión renal, desde un daño renal insignificante hasta un daño renal moderado y severo. Adicionalmente se incluyó un grupo de ratas que fue sometido a cirugía simulada que se utilizó como grupo control. Cada grupo estuvo conformado por 6 ratas. Al finalizar el tiempo de isquemia, los animales fueron suturados y se permitió una reperfusión renal durante 24 hr. Para determinar la utilidad de medir los niveles de ARNm de Hsp72 como biomarcador, se utilizaron 36 ratas divididas en 6 grupos; el grupo control y las ratas sometidas a isquemia bilateral de 10, 20, 30, 45 y 60 min, todos con reperfusión de 24 h. Se recolectó la orina con condiciones especiales para evitar la degradación de ARNm como se describe más adelante.

- De forma similar y para determinar la utilidad de la cuantificación de los niveles de proteína de Hsp72 como biomarcador temprano se incluyeron otras 33 ratas divididas en 11 grupos; el grupo control con cirugía simulada y las ratas con isquemia bilateral de 30 min y periodos de reperfusión de 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72, 96 y 120 h. Se

recolectó la orina para determinar la sensibilidad de los niveles de proteína de Hsp72 como un biomarcador temprano de AKI utilizando un método ELISA.

- 5 En todos los grupos, se estableció la función renal por depuración de la creatinina y la medición de flujo sanguíneo renal. La lesión estructural se evaluó mediante microscopía de luz y morfometría. Como marcadores de lesión tubular se midieron los niveles de NAG urinaria y proteinuria total. Para conocer si Hsp72 era inducida durante la isquemia en el riñón, se evaluaron los niveles de ARNm y proteína de Hsp72 en el riñón. Para determinar si Hsp72 es un biomarcador sensible y temprano para detectar diferentes grados de lesión renal, se cuantificaron los niveles de Hsp72 en la orina mediante ELISA y Western Blot.

EJEMPLO 2. Detección de la Hsp 72 mediante RT-PCR en tiempo real.

- 10 Para la detección de los niveles de ARNm de Hsp72, se sometieron a isquemia bilateral de 30 minutos, 30 ratas macho de la cepa Wistar que se dividieron en seis grupos, las ratas sometidas a cirugía simulada (grupo control) y las ratas sometidas a isquemia bilateral de 10, 20, 30, 45 y 60 min., y reperusión de 24 h. Una hora después de la cirugía, las ratas se colocaron en jaulas metabólicas durante 24 horas. Las jaulas metabólicas previamente habían sido tratadas con un inhibidor de ANR (RNase Zap, Ambion). En el tubo donde se recolectó la orina por 24 h, se
- 15 agregaron más tardes 300 µl de ARN (Ambion) y las muestras se centrifugan a 3000 rpm, durante 30 min. El sedimento urinario se resuspendió en regulador de fosfato pH=7.4 y nuevamente se centrifugaron a 13000 rpm durante 3 min. La extracción de ARN total se hizo de acuerdo con el método de Trizol dado por el fabricante (Invitrogen). La concentración del ARN se determinó por medio de absorbancia de UV a 260 nm y la integridad del ARN se corroboró en electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Cada ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN
- 20 mediante una reacción de transcriptasa reversa (RT) a 37°C durante 60 min. Los niveles de ARNm de Hsp72 se detectaron por PCR en tiempo real. Como gen de control se incluyó el ARN ribosomal 18S para corregir las variaciones en la eficiencia de amplificación.

EJEMPLO 3. Detección de la Hsp 72 mediante ELISA.

- 25 Para la detección de los niveles de proteína Hsp72 se utilizaron 36 ratas y se sometieron a isquemia bilateral de 10, 20, 30, 45 y 60 min. Una hora después de la cirugía, las ratas se colocaron en jaulas metabólicas durante 24 horas y se recolectó la orina. La orina debe ser utilizada inmediatamente para los ensayos de ELISA o Western Blot o de lo contrario debe ser almacenada a -80 C para evitar la degradación de la Hsp72. Para la cuantificación de Hsp72 por ELISA se utilizó el kit comercial Hsp70 High sensitivity ELISA Kit producido por Stressgene como se describe a continuación en forma breve:
- 30 1) Se agregan 100 µl de la muestra de orina en cada pozo de la placa de ELISA;
- 2) Se incuba la placa durante 2 h a temperatura ambiente y con agitación suave;
- 3) Se deben realizar 3 lavados de cada pozo con el regulador de lavado que se provee en el kit.
- 4) Se deben agregar 100 µl de anticuerpo primario (anti-Hsp72) y se incuba la placa durante 60 min. Al finalizar el período, se deben realizar 3 lavados, como se mencionó en el punto número 3.
- 35 5) Se deben agregar 100 µl de anticuerpo secundario acoplado a HRP y se incuban de nuevo a temperatura ambiente durante 60 min. Al término de la incubación se deben efectuar 3 lavados más.
- 6) Se deben agregar 100 µl de solución de sustrato (incluida en el kit) a cada pozo y la placa debe ser incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 7) Se deben agregar 100 µl de solución de detención (incluida en el kit);
- 40 8) La placa debe ser leída a 420 nm como se establece en las instrucciones del fabricante.

EJEMPLO 4. Detección de la Hsp 72 mediante Western Blot.

Se utilizaron las mismas muestras de orina de las ratas que se describieron en el apartado anterior. Cada orina debe ser diluida 1:1000 y solamente se utilizan 10 µl de la orina diluida. La orina diluida se mezcla con 10 µl de regulador de carga (SDS al 6%, glicerol al 15 %, Tris 150 mM, azul de bromofenol al 3%, β-mercaptoetanol al 2%, pH 7.6). Las

proteínas se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos y se separaron electroforéticamente en un gel SDS-PAGE al 8.5% y se electrotransfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EE.UU), previamente equilibrados con regulador de transferencia 1X (glicina 190mM, base Tris 2mM, SDS al 0.1%, 200 mL Metanol) en un trans-blot (células SD, BioRad) durante 60 min a 9V y se bloquean en TBS-T (Solución Salina regulada con Tris y tween) con reactivo de bloqueo al 5% (BIORAD) a temperatura ambiente. Después de la etapa de bloqueo, las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti-Hsp72 1:5000 (Stressgen). Después de la incubación, las membranas se lavaron 3 veces cada 10 minutos con TBS-T. Posteriormente el anticuerpo secundario IgG antirratón de cabra se incubaron con las membranas 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology Inc) durante 90 minutos a temperatura ambiente y las membranas se lavaron de nuevo durante 6 veces. La cantidad de Hsp72 fue detectada utilizando el kit disponible comercialmente ECL plus (GE Healthcare Life Sciences) y las bandas obtenidas se escanearon para el análisis de densitometría.

Resultados

Primero, se evaluó el efecto de la producción de diferentes períodos de isquemia bilateral (10 a 60 min) y 24 de perfusión sobre la función renal. Los cinco grupos de ratas sometidas a isquemia, desarrollaron disfunción renal, que se evidenció por la elevación progresiva de la creatinina en suero y una reducción de GFR calculada mediante la depuración de creatinina como se muestra en las Figuras 1A y 1B. La disfunción renal se asoció con una reducción del 10 al 30% en el flujo sanguíneo renal, sin cambios en la presión arterial media como se detalla en las Figuras 1C y 1D.

Los estudios de microscopía de luz revelaron que los diferentes periodos de isquemia bilateral y 24 de perfusión produjeron daño tubular en diferentes grados, de acuerdo al tiempo de isquemia provocado, como se muestra en las imágenes representativas de cada grupo (A) a la (F) de la Figura 2. Las lesiones se caracterizaron por la pérdida del borde en cepillo, dilatación tubular, desprendimiento celular y formación de cilindros. El número de cilindros por campo y el análisis del porcentaje del área tubular afectada, que se muestra en las Figuras 2G y 2H, revelaron que mientras mayor fue el tiempo de isquemia, mayor fue el grado de lesión tubular desarrollado, lo que significa que hubo un incremento progresivo en la lesión tubular y el número de cilindros que fue proporcional a la intensidad de la agresión. La lesión histológica evaluada por microscopía de luz es el estándar de oro para determinar el grado de lesión inducido por isquemia/reperfusión, por lo tanto, en las figuras posteriores se mostrará la correlación del biomarcador de Hsp72 y la lesión tubular.

Se evaluaron algunos los marcadores clásicos de lesión tubular y de estrés oxidativo tales como la excreción urinaria de proteínas, de N-acetil-beta-D-galactosaminidasa (NAG) y de H₂O₂. Como se representa en la Figura 3A, la elevación de NAG solo fue estadísticamente significativa después de 30 min de isquemia, lo que significa que este marcador fue incapaz de identificar la lesión renal inducida por un periodo inferior de isquemia (10 o 20 min). En cuanto al marcador de estrés oxidativo, la excreción urinaria de H₂O₂ se elevó desde los 10 min de isquemia, pero no fue suficientemente sensible para diferenciar varios grados de isquemia, especialmente entre los 20 y 60 min de isquemia Figura 3B. Finalmente, se observó que la proteinuria fue el mejor marcador para detectar diferentes grados de lesión renal como se representa en la Figura 3C. Para evaluar si la Hsp72 es inducida en el tejido renal durante diferentes periodos de isquemia, se determinaron los niveles de ARNm y de proteína de Hsp72 en el tejido renal, es decir una vez que se recolectó la orina, las ratas se sacrificaron y se obtuvo uno de los riñones para extraer el ARNm y las proteínas. Como se muestra en la Figura 4A y 4B, tanto los niveles de ARNm como de proteína de Hsp72, se incrementaron significativamente en el tejido renal de cada una de las ratas de los grupos con I/R. También se aprecia un incremento progresivo que delimita claramente los diferentes grados de lesión renal inducidos por diferentes períodos de isquemia/reperfusión. Estos resultados muestran que durante un fenómeno de isquemia/reperfusión hay un incremento en la expresión de Hsp72, que interesantemente y conveniente para nuestra invención es proporcional al grado de lesión inducido.

Con estos datos nos dimos a la tarea de investigar si esta proteína podía ser detectada en la orina de los animales que sufrieron lesión renal por isquemia/reperfusión, para desarrollar un método sensible y no invasivo. Para este propósito se determinaron los niveles de Hsp72 mediante la utilización de dos inmunoensayos. El primero fue por ELISA y el otro por análisis de Western Blot. La cuantificación urinaria de Hsp72 mediante ELISA reveló que esta proteína es un excelente marcador de la AKI, ya que puede ser detectada en la orina desde 10 min de isquemia, y muestra un incremento progresivo de acuerdo con el grado de lesión renal inducida por isquemia, alcanzando una inducción de 25 veces en las ratas sometidas a 60 min de isquemia en comparación con el control como se muestra en la Figura 4C. La elevación progresiva de este biomarcador correlacionó de forma significativa con el estándar de oro para la lesión isquémica, que es el análisis histopatológico. La Figura 5A muestra la correlación positiva entre la

cantidad de Hsp72 en orina y la formación de cilindros con una correlación de 0.83 y una $p < 0.0001$ y Figura 5B muestra la correlación entre la Hsp72 urinaria y el porcentaje del área afectada, siendo esta de 0.79 y $p < 0.0001$.

La otra estrategia que se utilizó para detectar los niveles de proteína de Hsp72 fue por análisis de Western Blot en las muestras de orina de los diferentes grupos. La imagen superior en la Figura 6A representa la autorradiografía del análisis de Western Blot y la gráfica inferior el análisis densitométrico de las bandas escaneadas. Como se puede observar, la I/R indujo un incremento significativo en los niveles urinarios de Hsp72 en las ratas que fueron sometidas a diferentes periodos de isquemia. Al igual que en el análisis por ELISA, la detección de Hsp72 fue estadísticamente significativa desde los 10 min de isquemia y se elevó en forma proporcional al grado de lesión renal inducida. La sensibilidad para detectar diferentes grados de lesión renal fue mayor con el Western Blot que con el ELISA, ya que el aumento de Hsp72 en el grupo de 10 minutos fue de 40 veces, con un incremento progresivo alcanzando 535 veces en el grupo con lesión renal severa de 60 min. La correlación entre la cantidad de Hsp72 en la orina y la formación de cilindros se muestra en la Figura 6B siendo de 0.9476, $p < 0.0001$. Estos resultados demuestran que la detección de Hsp72 urinaria es suficientemente sensible para detectar los diferentes grados de lesión renal, sin embargo la detección de esta proteína por un análisis de Western Blot fue superior con respecto al de ELISA (véase correlaciones). Adicionalmente es importante enfatizar que para el análisis de Western Blot, tan solo se necesita 0.1 μ l de orina, mientras que para el de ELISA se requieren 100 μ l.

Para explorar si la detección de Hsp72 no sólo se limita a su cuantificación a nivel de proteína, se decidió explorar la abundancia del ARNm de Hsp72 en la orina de ratas sometidas a isquemia. La integridad del ARN extraído se muestra en la Figura 7A. Los niveles urinarios de ARNm de Hsp72 se incrementaron en las ratas sometidas a isquemia con respecto al grupo control como se representa en la Figura 7B. Como sucedió en los niveles de proteína, los niveles de ARNm en la orina incrementaron de forma proporcional al grado de lesión inducida. Esto se corroboró con el estándar de oro y como se muestra en la Figura 7C, hubo una correlación significativa de 0.8509 entre los niveles de ARNm de Hsp72 y el número de cilindros por campo. Finalmente para evaluar la utilidad de Hsp72 como marcador temprano de la AKI se determinó la concentración urinaria de Hsp72 en ratas sometidas a 30 min de isquemia y periodos de perfusión desde 3 hasta 120 horas. La Figura 8 muestra la detección de Hsp72, comparada con otros marcadores de lesión tubular. Como se representa en la Figura 8C, se observó una elevación significativa de Hsp72 desde un período muy temprano (3 h de perfusión), alcanzando un pico a las 18 h de perfusión con una posterior reducción en la excreción urinaria de esta proteína, lo que correlaciona con la regeneración tubular después de 72 horas. Estos resultados muestran la utilidad de Hsp72 como biomarcador temprano para la detección de AKI.

Adicionalmente, el resultado de la cuantificación del biomarcador fue mayor que en el grupo control y el incremento observado depende de la intensidad de la lesión, resultado que se observa utilizando las tres diferentes metodologías. Es importante resaltar que Hsp72 en la orina se puede detectar desde las primeras 3 horas después de inducida la agresión renal.

EJEMPLO 5. Niveles urinarios de Hsp72 en donadores vivos de riñón sanos y en pacientes con AKI.

Se recolectaron muestras de cinco donadores de riñón sanos (controles) y de nueve pacientes con AKI séptica de la ICU en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán. El diagnóstico de la AKI se definió por un incremento de 0.3 mg/dl o más en la creatinina en suero respecto a la basal, de acuerdo con lo establecido por la clasificación de AKIN (Acute Kidney Injury Network). En los donadores sanos, se recolectó la primera muestra de orina del día un día previo a la nefrectomía, (consentimiento firmado). Todos los pacientes con sepsis se monitorizaron diariamente y cuando el diagnóstico de AKI se estableció, se recolectó una muestra fresca de orina drenando la bolsa de recolección de orina. Todas las muestras se congelaron y se almacenaron a -80°C hasta que los niveles de Hsp72 fueron analizados.

Niveles urinarios de Hsp72 en donadores sanos y en pacientes con AKI. (Resultados)

Para determinar si la Hsp72 es un biomarcador sensible para la detección de AKI en humanos, los niveles urinarios de esta proteína se analizaron por Western Blot en donadores sanos y fueron comparados con aquellos pacientes que desarrollaron AKI en la unidad de cuidados intensivos. La AKI se definió como un incremento en la creatinina en suero de al menos 0.3 mg/dL o un volumen urinario menor a 0.5 ml/kg/h durante 6 horas. La Tabla 1 muestra las características generales y la función renal de cinco donadores renales sanos y 9 pacientes con AKI séptica. En el grupo de pacientes con AKI, 5 fueron mujeres y 4 hombres con edad entre 24 y 84 años. En el momento de la admisión a la ICU, todos los pacientes mostraron valores normales de creatinina en suero, sin embargo, la creatinina

se incrementó de 0.55 ± 0.05 a 2.30 ± 0.52 mg/dl durante su estancia en la ICU, mostrando el desarrollo de AKI. Los niveles urinarios de Hsp72 se representan en la Figura 9. En la orina de donadores renales sanos la Hsp72 fue casi indetectable (33.7 ± 7.1 unidades arbitrarias), mientras que los niveles de Hsp72 se incrementaron en los pacientes con AKI (583.0 ± 85.1). Es de resaltarse que dos pacientes diagnosticados con AKI murieron durante su hospitalización y fueron de los que tuvieron los niveles más elevados de Hsp72.

Tabla 1. Características generales y función renal en donadores de riñón sanos y pacientes con lesión renal aguda séptica

Número de sujeto	Género	Edad (años)	Diagnósticos	SCr de línea base (mg/dL)	SCr en AKI (mg/dL)	Seguimiento después de muestreo (días)	Resultado/Último SCr (mg/dL)
Donantes vivos de riñones sanos							
1		27	Sano	0.82	NA	NA	NA
2		25	Sano	0.95	NA	NA	NA
3		32	Sano	0.85	NA	NA	NA
4		42	Sano	0.77	NA	NA	NA
5		35	Sano	0.56	NA	NA	NA
Pacientes con lesión renal aguda séptica							
1	Mujer	51	Neumonía adquirida en la comunidad y Obesidad mórbida	0.50	1.2	122	Recuperación/0.62
2	Hombre	49	Sepsis abdominal	0.60	3.42	28	Muerte
3	Hombre	24	Neumonía adquirida en la comunidad y Lupus sistémico	0.32	0.83	24	Sin recuperación/2.42
4	Mujer	39	Neumonía adquirida en la comunidad y Meningitis & Choque séptico	0.49	1.19	45	Recuperación /0.48
5	Mujer	84	Neumonía adquirida en la comunidad	0.73	1.14	1	Muerte
6	Hombre	34	Neumonía adquirida en la comunidad	0.75	1.86	61	Mejoría/1.12
7	Mujer	84	Neumonía adquirida en la comunidad y Fallo cardiaco	0.93	3.11	40	Recuperación/1.04
8	Mujer	35	Lupus sistémico y Neumonía adquirida en la comunidad	0.44	2.19	5	Mejoría/1.29
9	Hombre	46	Artritis séptica y Diabetes mellitus	0.72	5.75	138	Recuperación/0.77

Breve descripción de las figuras

- Figura 1. Parámetros de función renal en ratas con cirugía simulada y sometidos a isquemia de 10, 20, 30, 45 y 60 min y 24 h de reperfusión. La AKI fue evidenciada por un incremento en la creatinina en suero (A), junto con una reducción en la depuración de creatinina (B) y el flujo sanguíneo renal (C), sin cambios en la presión arterial media (D). * $p < 0.05$ vs. Grupo de simulación.
- Figura 2. Secciones histológicas subcorticales con una tinción de PAS del riñón de cada uno de los grupos. (A-F). Conteo del número de cilindros por campo; se cuantificaron 5 campos por rata (G). Porcentaje de área tubular lesionada determinada por la pérdida del borde en cepillo y polaridad, así como descamación celular. * $p < 0.05$ vs. Grupo de simulación.
- Figura 3. Cuantificación de marcadores de lesión tubular y estrés oxidativo. La excreción urinaria de NAG (A), proteínas (B) y H_2O_2 (C) fue elevada en los grupos con I/R versus el simulado. * $p < 0.05$ vs. Grupo de simulación.
- Figura 4. (A) Niveles de ARNm de Hsp72 en la corteza renal de ratas sometidas a I/R. (B) Análisis de Western Blot de los niveles de proteína de Hsp72 en corteza renal y su sobreexpresión en ratas sometidas a diferentes períodos de I/R. (C) Concentración urinaria de Hsp72. * $p < 0.05$ vs. Grupo de simulación.
- Figura 5. (A) Correlación positiva entre la cantidad de Hsp72 en orina y la formación de cilindros. (B) Correlación entre la cantidad de Hsp72 en orina y el % de túbulos afectados con una $r = 0.79$ y $p < 0.0001$.
- Figura 6. (A) Análisis por Western Blot de la concentración de Hsp72 en orina en ratas sometidas a isquemia bilateral. (B) Correlación entre la cantidad detectada de Hsp72 por Western Blot y la formación de cilindros.
- Figura 7. (A) Electroforesis en gel de agarosa que muestra la integridad del ARN extraído de orina. (B) Niveles de ARNm de Hsp72 en la orina de ratas sometidas a I/R. * $p < 0.01$ vs. Grupo de simulación (C) Correlación entre los niveles de ARNm de Hsp72 en orina y la formación de cilindros.
- Figura 8. Cuantificación de NAG urinaria, proteínas y Hsp72 en ratas sometidas a 30 min de isquemia bilateral y diferentes períodos de reperfusión: 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72, 96 y 120 h. * $p < 0.05$ vs. Grupo de simulación.
- Figura 9. Niveles urinarios de Hsp72 de donadores renales sanos y en pacientes con AKI, determinado por análisis Western Blot.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección temprana de la lesión renal aguda, que comprende determinar la concentración de proteína de choque térmico 72 (Hsp72) como biomarcador en una muestra de orina obtenida de un mamífero.
- 5 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho mamífero es humano.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicha Hsp72 en la muestra de orina se detecta después de tres horas después de que la lesión ha sido provocada en el riñón.
- 10 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicha concentración de proteína de choque térmico 72 permite estratificar la intensidad de la lesión provocada por periodos incrementados de la lesión renal aguda.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la concentración del biomarcador se determina en el nivel de ARNm usando inmunoensayos.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la concentración de biomarcador se determina en el nivel de proteína usando inmunoensayos.

15

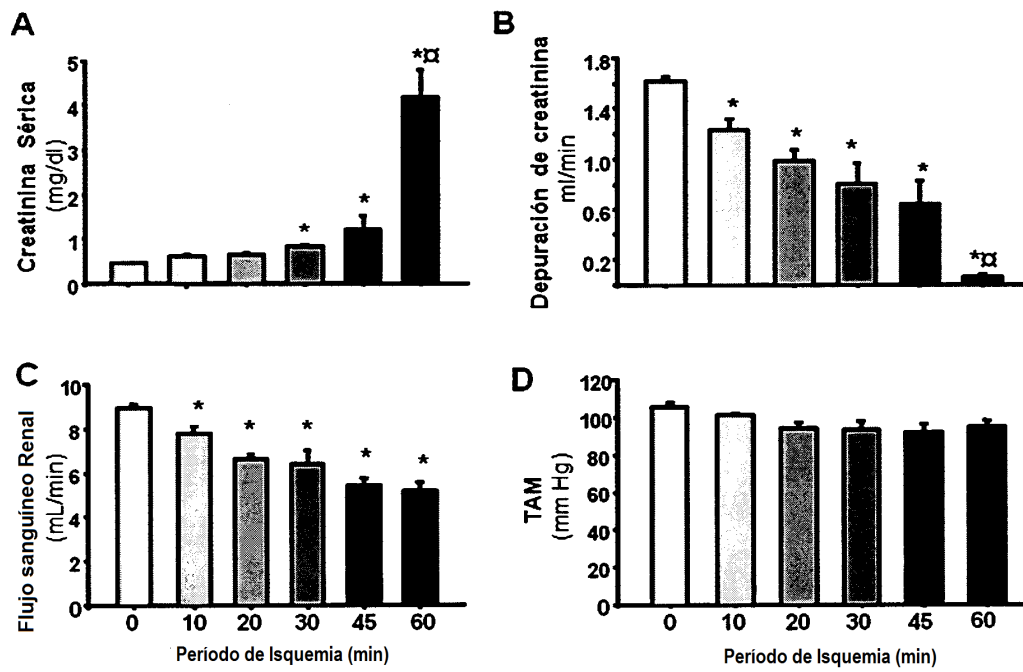


Figura 1

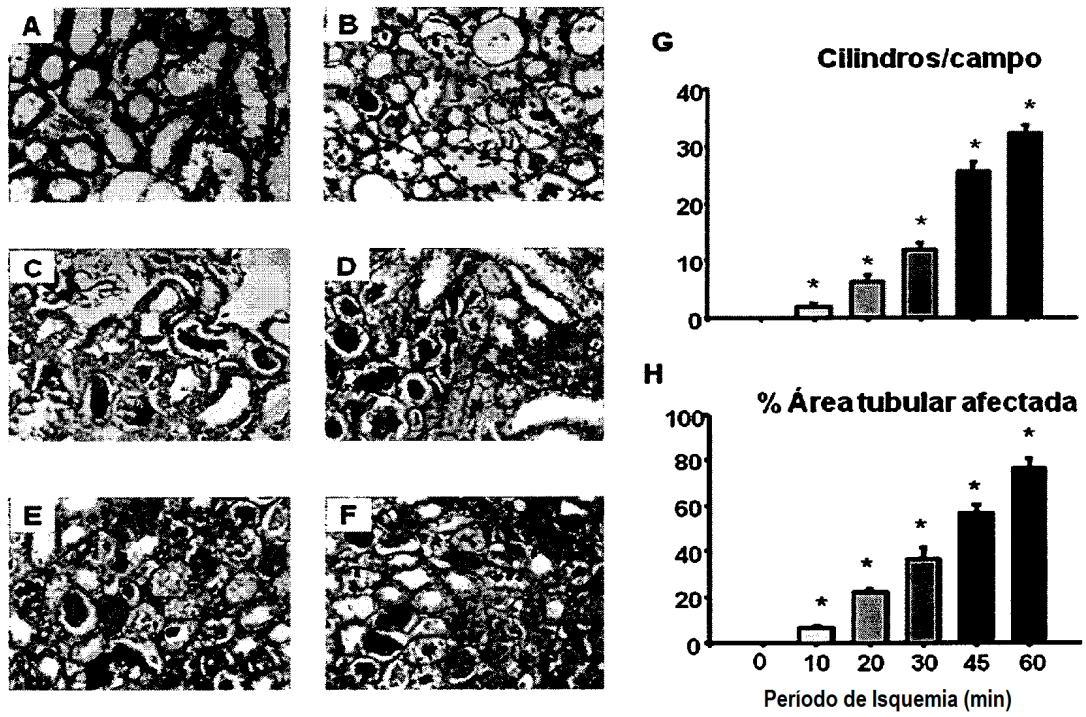


Figura 2

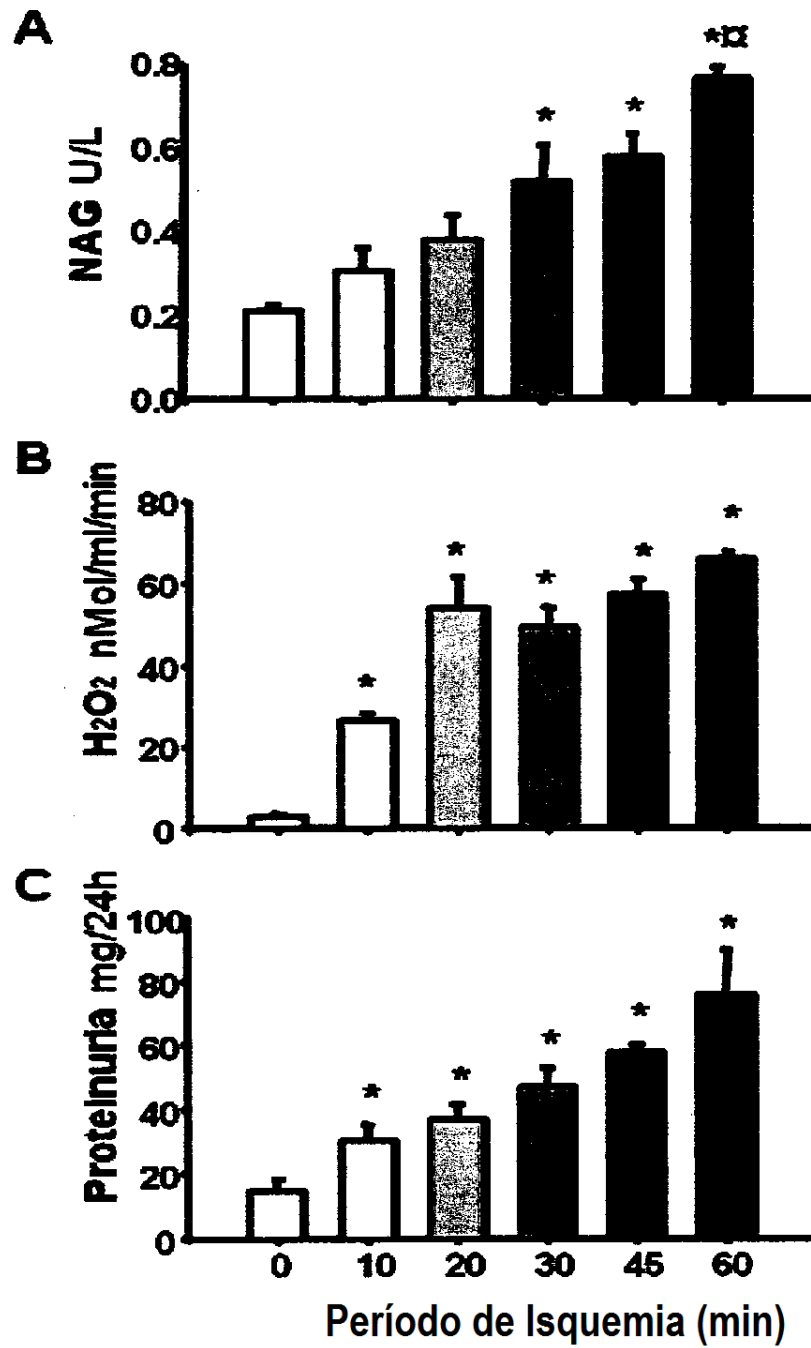


Figura 3

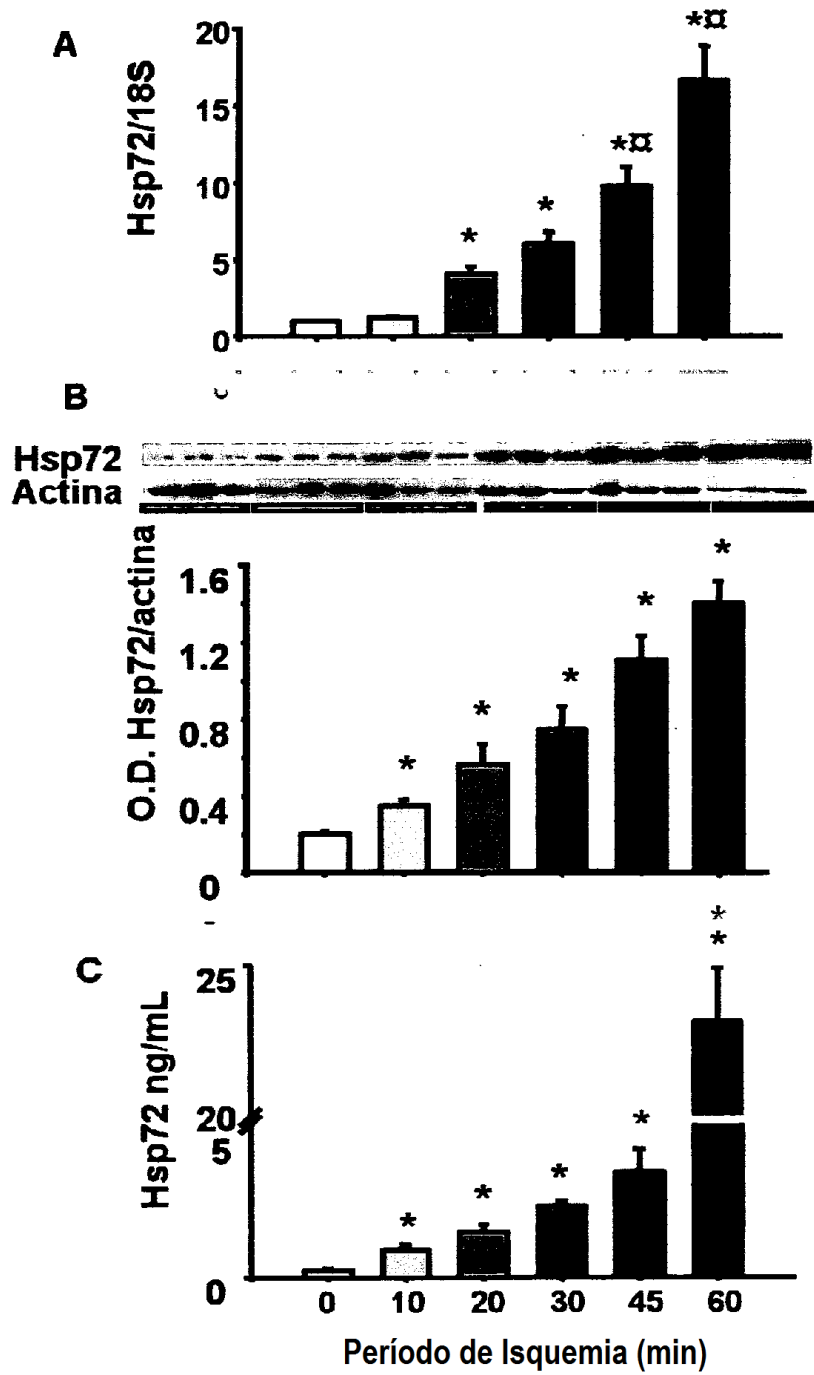


Figura 4

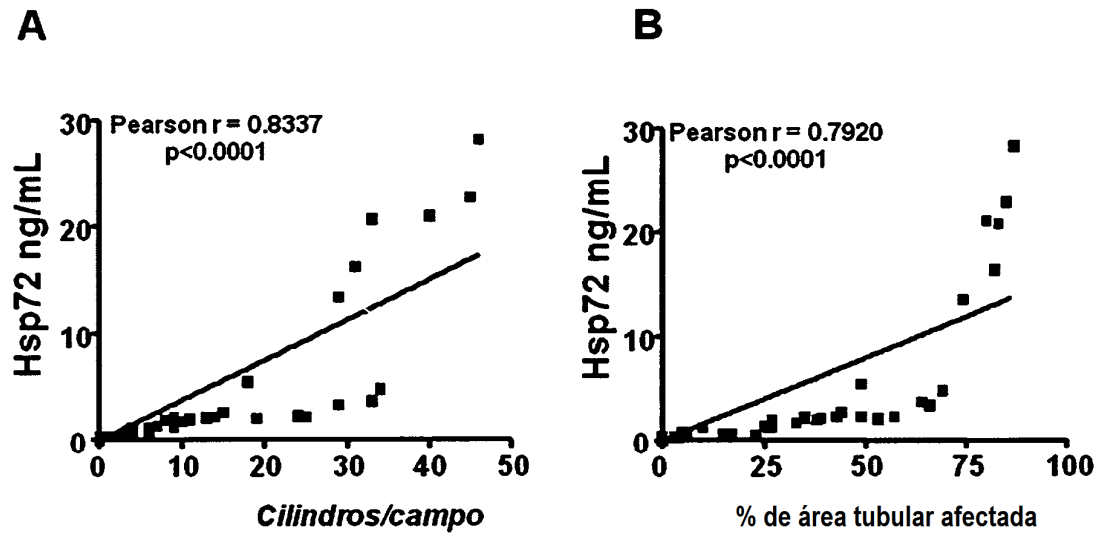


Figura 5

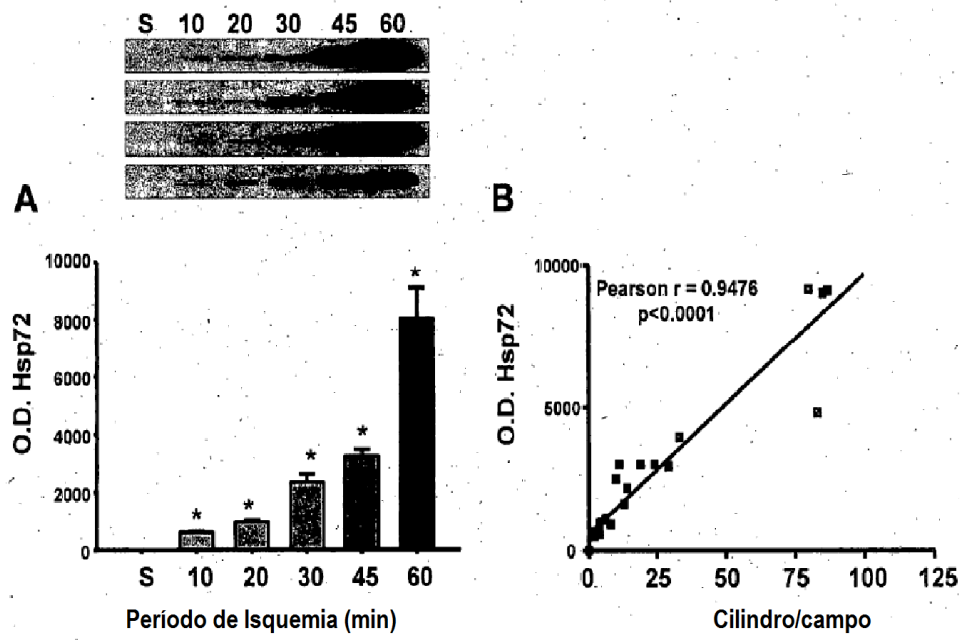


Figura 6

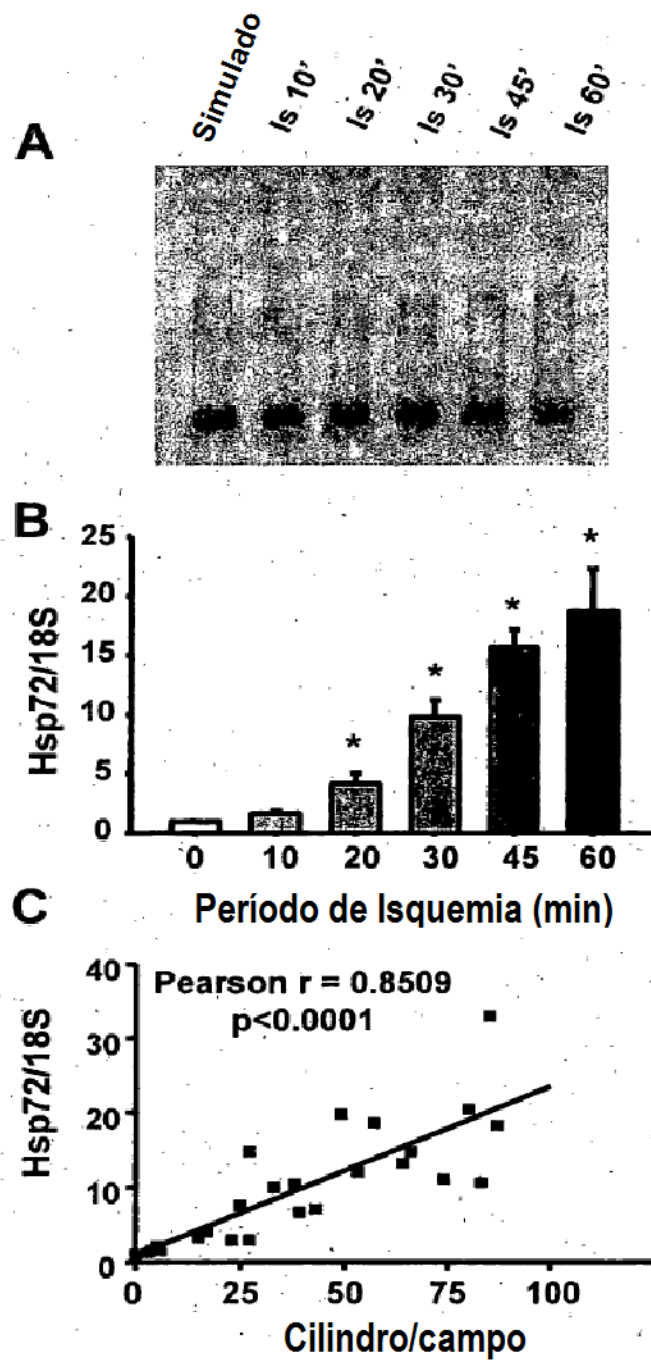


Figura 7

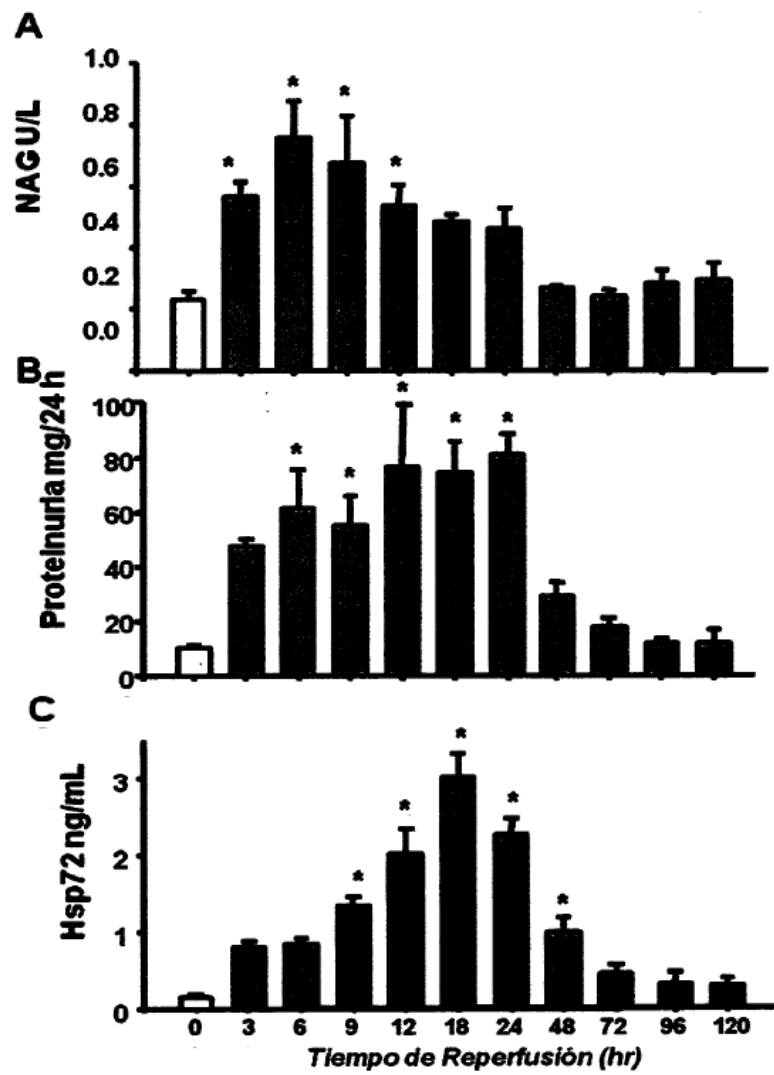


Figura 8

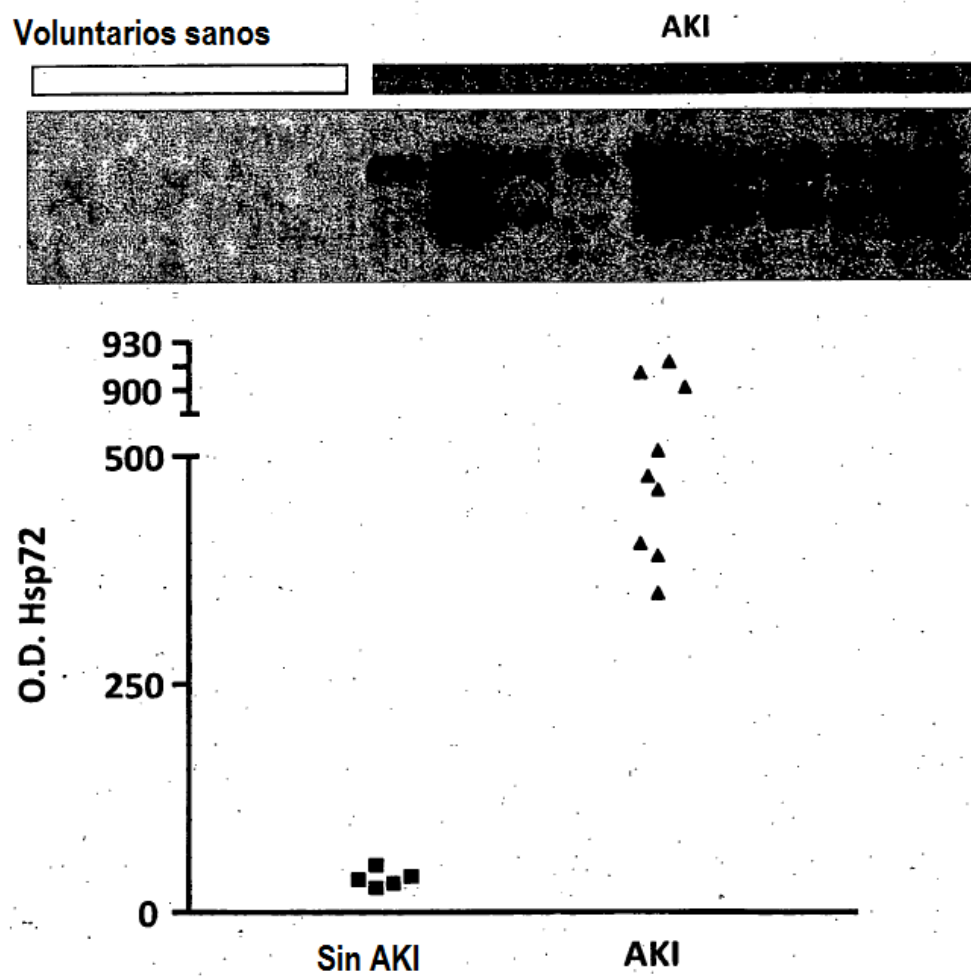


Figura 9