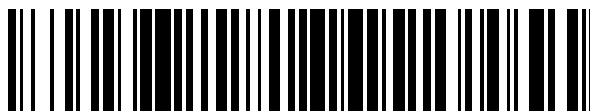


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 900**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2005 E 10186256 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2264459**

54 Título: **Método para la detección temprana de enfermedad y lesión renal**

30 Prioridad:

**07.06.2004 US 577662 P**  
**31.03.2005 US 96113**

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

**26.06.2019**

73 Titular/es:

**THE CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER**  
**(50.0%)**  
**3333 Burnet Avenue**  
**Cincinnati, Ohio 45229-3039, US y**  
**THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY**  
**(50.0%)**

72 Inventor/es:

**DEVARAJAN, PRASAD y**  
**BARASCH, JONATHAN M.**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 717 900 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 para la detección temprana de enfermedad y lesión renal

5 **Antecedentes de la invención**

La insuficiencia renal aguda (IRA) secundaria de una lesión de células tubulares renales, incluyendo una lesión isquémica o una lesión nefrotóxica sigue siendo un problema habitual y potencialmente devastador en la medicina clínica y la nefrología, con una tasa de mortalidad y morbilidad persistentemente alta a pesar de avances significativos en el tratamiento complementario. Estudios pioneros a lo largo de varias décadas han esclarecido los papeles de la vasoconstricción persistente, la obstrucción tubular, las alteraciones celulares estructurales y metabólicas y la respuesta inflamatoria en la patogenia de IRA. Aunque estos estudios han sugerido posibles enfoques terapéuticos en modelos animales, las labores de investigación en seres humanos han producido resultados decepcionantes. Las razones de esto pueden incluir la respuesta multidimensional del riñón a la lesión isquémica y nefrotoxinas, y una escasez de biomarcadores tempranos para IRA, con un retardo resultante del inicio de la terapia.

Se considera que un individuo tiene insuficiencia renal aguda cuando el valor de creatinina en suero del paciente (1) aumentó en al menos 0,5 mg/dl cuando el nivel de creatinina basal fue menor de 2,0 mg/dl; (2) aumentó en al menos 1,5 mg/dl cuando el nivel de creatinina en suero basal fue mayor de o igual a 2,0 mg/dl; o (3) aumentó en al menos 0,5 mg/dl, independientemente del nivel de creatinina en suero basal, como consecuencia de la exposición a agentes radiográficos.

Se cree que la introducción de terapia pronto en el proceso de enfermedad reducirá la tasa de mortalidad asociada con IRA y acortará el tiempo para tratamiento de diversos tipos de lesiones de células tubulares renales, incluyendo, pero sin limitación, lesiones renales isquémicas y nefrotóxicas. La identificación de un biomarcador temprano, fiable, para una lesión de células tubulares renales sería útil para facilitar la intervención terapéutica temprana y ayudar a guiar el desarrollo farmacéutico proporcionando un indicador de nefrotoxicidad.

El enfoque de laboratorio tradicional para la detección de enfermedad renal implicó determinar la creatinina en suero, nitrógeno de urea en sangre, eliminación de creatinina, electrolitos en orina, examen microscópico del sedimento de orina y estudios radiológicos. Estos indicadores no son solamente insensibles e inespecíficos, sino que tampoco permiten la detección temprana de la enfermedad. De hecho, aunque un aumento de la creatinina en suero está ampliamente considerado como el criterio de referencia para la detección de IRA, está claro ahora que hasta el 50 % de la función del riñón puede haberse perdido ya para cuando cambia la creatinina en suero.

Se han descrito anteriormente varios biomarcadores urinarios para lesión renal isquémica, incluyendo molécula de lesión renal-1 (KIM-1) y proteína rica en cisteína 61 (Cyr61). KIM-1 es una molécula de adhesión potencial implicada en la regeneración renal. En un modelo de rata de lesión de reperfusión por isquemia, se descubrió que KIM-1 estaba regulada positivamente 24-48 horas después de la lesión inicial, lo que la hace un marcador fiable pero algo tardío del daño a células tubulares. Estudios recientes han mostrado que KIM-1 puede detectarse en la biopsia renal y orina de pacientes con necrosis tubular aguda isquémica. Sin embargo, Esta detección se documentó en pacientes con daño renal isquémico establecido, tarde en el transcurso de la enfermedad. La utilidad de la medición de KIM-1 en orina para la detección de IRA temprana o lesión renal subclínica no se ha validado hasta la fecha.

Se ha descubierto que la proteína Cyr61 es una proteína rica en cisteína secretada que es detectable en la orina 3-6 horas después de lesión renal isquémica en modelos animales. Sin embargo, esta detección requirió una etapa de purificación por bioafinidad y concentración con perlas de heparina-sepharose, seguida de un protocolo de transferencia de Western. Incluso después de la purificación por bioafinidad resultaron evidentes varios péptidos de reacción cruzada inespecíficos. Por tanto, la detección de Cyr61 en la orina es problemática con respecto a la especificidad así como la naturaleza incómoda del procedimiento.

Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad urgente de identificar biomarcadores mejorados para lesiones renales isquémicas y nefrotóxicas tempranas.

Ohlsson *et al.* 2003 describen cómo los niveles en circulación de proteinasa 3 están aumentados en pacientes con vasculitis sistémica asociada con autoanticuerpos citoplásmicos antineutrofílicos en remisión. También se miden otros marcadores (Clinical and Experimental Immunology 2003; 131(3): 528-535).

Matthaeus *et al.* 2001 describen cómo la insuficiencia renal isquémica induce la expresión de proteína NGAL en túbulos proximales lesionados (Kidney and Blood Pressure Research 2001; 24(4-6): 342).

El documento EP1750500 se refiere al uso de NGAL como un producto terapéutico y en un método de tratamiento, reducción o alivio de una lesión seleccionada de una lesión isquémica, una lesión de reperfusión isquémica y una lesión inducida por toxina, a un órgano en un paciente.

El documento EP1616184 desvela NGAL como un biomarcador urinario temprano para lesión de células tubulares renales.

5 Kjeldsen *et al.* 1996 desvelan anticuerpos monoclonales para NGAL (Journal of Immunological Methods 1996, Vol. 198, 155-16).

Mishra *et al.* 2004 exploraron la expresión y excreción urinaria de NGAL en un modelo de ratón de lesión nefrotóxica inducida por cisplatino (Am J Nephrol 2004;24:307-315).

10 Mishra *et al.* 2003 indica NGAL como un biomarcador urinario temprano para lesión renal isquémica (J Am Soc Nephrol 2003; 4:2534-2543).

### Sumario de la invención

15 La invención es

1. Un método para la detección de aparición temprana de lesión de células tubulares renales (LCTR) que comprende detectar en muestras de suero sanguíneo tomadas de un paciente a intervalos seleccionados, un aumento de los niveles de NGAL que preceden al aumento de la creatinina en suero, poniendo en contacto 20 muestras de suero sanguíneo con un anticuerpo para NGAL para permitir la formación de un complejo del anticuerpo y NGAL y detectando el complejo de anticuerpo-NGAL.
2. El método según 1, en donde la detección de LCTR se produce en las primeras 24 horas de aparición.
- 25 3. El método según 1 o 2, en donde la LCTR resulta de la administración de nefrotoxinas, incluyendo antibióticos, agentes antiinflamatorios, agentes de radiocontraste y agentes quimioterapéuticos.
4. El método según 1 o 2, en donde la LCTR es una LCTR que se desarrolla a insuficiencia renal aguda (IRA) y es el resultado de que el paciente haya recibido un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en 30 cirugía cardíaca, cirugía de derivación cardiopulmonar, cirugía vascular, administración de un agente nefrotóxico y trasplante de riñón, o basándose en tener una afección seleccionada del grupo que consiste en lesión renal isquémica, alteración de la función cardíaca, ictus, traumatismo, septicemia, deshidratación, acontecimientos cardiovasculares y una lesión renal nefrotóxica.
- 35 5. El método según uno cualquiera de 1 a 4, en donde el método comprende además comparar un nivel detectado de NGAL en una muestra con un nivel de NGAL seleccionado para identificar que la LCTR puede progresar a insuficiencia renal aguda (IRA), en donde cuando el nivel detectado de NGAL es mayor que dicho nivel seleccionado de NGAL, el paciente se identifica como predispuesto a progresar a IRA como resultado de la LCTR.
- 40 6. El método según 5, en donde el nivel de NGAL seleccionado para identificar que LCTR puede progresar a IRA está por encima del nivel de NGAL detectado en suero sanguíneo obtenido de voluntarios sanos.
- 45 7. El método según uno cualquiera de los anteriores, para supervisar el progreso de un tratamiento o una intervención, en donde una reducción del nivel en suero sanguíneo de NGAL corresponde a un grado de mejora de la LCTR.
8. El método según uno cualquiera de los anteriores en donde la detección temprana de la aparición de LCTR reduce el tiempo para el tratamiento de la lesión y reduce el riesgo de desarrollar IRA clínica.
- 50 9. El método según uno cualquiera de los anteriores que comprende además evaluar el alcance de la lesión renal, en donde el alcance de la lesión renal se basa en una relación proporcional entre el alcance de la lesión y la cantidad de NGAL presente en el torrente sanguíneo del sujeto.
- 55 10. El método según uno cualquiera de los anteriores, en donde las muestras de suero sanguíneo tomadas de un paciente a intervalos seleccionados comprenden una muestra obtenida antes del tratamiento para determinar una medida inicial para un individuo.

### Breve descripción de los dibujos

60 La FIGURA 1 muestra análisis de Western de NGAL en orina en (Panel izquierdo) muestras obtenidas en diversos momentos como se muestra después de DCP de un sujeto que posteriormente desarrolló IRA y (Panel derecho) patrones de NGAL humanos recombinantes. Los pesos moleculares en kDa están a lo largo del margen izquierdo.

65 La FIGURA 2 muestra NGAL en orina (en ng/ml) en diversos momentos después de DCP en pacientes que posteriormente desarrollaron IRA (línea superior, IRA) frente a los que no (línea inferior, sin IRA). La barra

representa el momento cuando se detectó el aumento inicial de la creatinina en suero.

La FIGURA 3 muestra valores de NGAL en orina de la FIGURA 2 corregidos con respecto a excreción de creatinina en orina.

5 La FIGURA 4 muestra NGAL en orina (en ng/ml) en diversos momentos después de DCP en pacientes que posteriormente desarrollaron IRA (línea superior, IRA) frente a los que no (línea inferior, sin IRA), determinado mediante ELISA. La barra representa el momento cuando se detectó el aumento inicial de la creatinina en suero.

10 La FIGURA 5 muestra valores de NGAL en orina de la FIGURA 4 corregidos con respecto a excreción de creatinina en orina.

15 La FIGURA 6 muestra un gráfico de dispersión de todas las mediciones de NGAL en orina a las 2 horas después de DCP. Una línea discontinua arbitraria a 50 ng/ml ilustra la separación de valores en pacientes que desarrollaron IRA frente a los que no tenían IRA.

20 La FIGURA 7 muestra NGAL en suero (ng/ml) en diversos momentos después de DCP en pacientes que posteriormente desarrollaron IRA (línea superior, IRA) frente a los que no (línea inferior, sin IRA), determinado mediante ELISA. La barra representa el momento cuando se detectó el aumento inicial de la creatinina en suero.

La FIGURA 8 muestra un gráfico de dispersión de todas las mediciones de NGAL en suero a las 2 horas después de DCP en pacientes que desarrollaron IRA frente a los que no tenían IRA.

25 La FIGURA 9 muestra curvas de característica operativa del receptor (ROC) para determinar la potencia diferenciadora de mediciones de NGAL para el diagnóstico temprano de lesión renal aguda, con una curva de ROC para NGAL en orina a las 2 horas después de DCP.

30 La FIGURA 10 muestra curvas de característica operativa del receptor (ROC) para determinar la potencia diferenciadora de mediciones de NGAL para el diagnóstico temprano de lesión renal aguda, con una curva de ROC para NGAL en suero a las 2 horas después de DCP.

### Descripción detallada de la invención

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "lesión de células tubulares renales" significará una insuficiencia o disfunción renal o del riñón, bien repentina (aguda) o que empeora lentamente a lo largo del tiempo (crónica), que puede ser desencadenada por varios procesos de enfermedad o trastorno, incluyendo (pero sin limitación) para lesión de células tubulares renales; lesión renal isquémica (LRI), incluyendo lesión isquémica aguda y lesión isquémica crónica; insuficiencia renal aguda; toxicidad de lesión renal nefrotóxica (LRN) aguda, incluyendo septicemia (infección), choque, traumatismo, cálculos renales, infección renal, toxicidad farmacológica, venenos o toxinas, o después de inyección con un colorante de contraste yodado (efecto adverso); y para lesión renal nefrotóxica crónica: hipertensión de larga duración, diabetes, insuficiencia cardíaca congestiva, lupus o anemia falciforme. Ambas formas de insuficiencia renal pueden dar como resultado un trastorno metabólico con peligro para la vida.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "inmediato" en relación con un biomarcador de células tubulares renales es una proteína biomarcadora que puede aparecer en el suero sanguíneo en un periodo de 2 horas desde la aparición de lesión de células tubulares renales.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "aparición temprana" en relación con un biomarcador de células tubulares renales es una proteína biomarcadora que puede aparecer en el suero sanguíneo en las primeras 24 horas, más habitualmente en las primeras 6 horas, desde la aparición de lesión de células tubulares renales.

55 La presente invención proporciona un método para ensayar la presencia de un biomarcador de lesión de células tubulares renales presente en el suero sanguíneo de un sujeto en la aparición temprana de lesión de células tubulares renales. La detección temprana de la aparición de la lesión puede reducir el tiempo para el tratamiento de la lesión y puede reducir el riesgo de desarrollar insuficiencia renal aguda (IRA) clínica.

60 Un kit sencillo del lugar de atención que usa principios similares a los kits de ensayo de glucosa en sangre ampliamente utilizados, para la detección rápida de NGAL en suero en cabecera permitirá al especialista clínico diagnosticar rápidamente IRA e instituir rápidamente medidas terapéuticas y preventivas demostradas y eficaces. El uso del kit puede representar el tratamiento de referencia para todos los pacientes que están en riesgo de desarrollar IRA, incluyendo su uso en cirugía cardíaca, trasplante de riñón, ictus, traumatismo, septicemia, deshidratación y nefrotoxinas (antibióticos, agentes antiinflamatorios, agentes de radiocontraste y agentes quimioterapéuticos). En la práctica clínica actual, cuando se produce IRA en la situación de estas condiciones predisponentes, el diagnóstico se retarda mucho, y la mortalidad y morbilidad asociadas son inaceptablemente altas. Irónicamente, incluso de forma trágica, están ampliamente disponibles medidas preventivas y terapéuticas eficaces, pero casi nunca se administran

de una manera oportuna debido a la falta de biomarcadores tempranos de IRA. Se anticipa que múltiples mediciones en serie de NGAL serán indispensables no solamente para diagnosticar y cuantificar la lesión renal inicial, sino también para seguir la respuesta al tratamiento temprano y para predecir el resultado a largo plazo.

5 El biomarcador para lesión de células tubulares renales (que también se denominará biomarcador LCTR) es un biomarcador LCTR de aparición temprana que puede aparecer en las primeras 24 horas, más habitualmente en las primeras 6 horas, desde la aparición de lesión de células tubulares renales. Como tal, NGAL es un biomarcador LCTR de aparición temprana.

10 Un biomarcador LCTR eficaz es habitualmente una proteína secretada, por lo que puede ser excretada por el riñón a la orina o transportarse en el suero sanguíneo. Un biomarcador LCTR eficaz también es típicamente una proteína resistente a proteasa, tal como NGAL. El biomarcador LCTR puede ser un biomarcador de lesión renal isquémica (biomarcador LRI), un biomarcador de lesión renal nefrotóxica (biomarcador LRN), o una mezcla de los mismos. NGAL es un ejemplo tanto de un biomarcador LRI como de un biomarcador LRN.

15 El método de la invención puede usarse para detectar la aparición de lesión de células tubulares renales y para supervisar el tratamiento de la misma, para una amplia diversidad de acontecimientos que incluyen todas las variedades de aporte sanguíneo reducido a los riñones, alteración de la función cardíaca, procedimientos quirúrgicos, pacientes en unidades de cuidados intensivos y la administración de productos farmacéuticos, colorantes de radiocontraste u otras sustancias de medicamentos a un sujeto. La lesión de células tubulares renales puede ser una lesión renal isquémica, una lesión renal nefrotóxica u otra lesión que afecte a las células tubulares del riñón. El acontecimiento puede incluir la administración o ingesta de una gran y amplia diversidad de nefrotoxinas, incluyendo, pero sin limitación, quimioterapia de cáncer (cisplatino, ciclofosfamida, isosfamida, metotrexato),  
20 antibióticos (gentamicina, vancomicina, tobramicina), agentes antifúngicos (anfotericina), agentes antiinflamatorios (AINE), inmunosupresores (ciclosporina, tacrolimus) y agentes de radiocontraste. El método puede usarse para evaluar la nefrotoxicidad de compuestos tanto de nuevo desarrollo como bien conocidos.

La invención también proporciona un método y describe un kit para evaluar el alcance de la lesión renal basándose en una relación proporcional entre el alcance de la lesión, que puede variar desde la misma aparición de lesión de  
30 células tubulares renales, a IRA clínica, con la cantidad de NGAL presente en el suero sanguíneo del sujeto. La invención proporciona un medio para que un especialista clínico estime el grado de lesión renal en una evaluación inicial y supervise el cambio en el estado de la lesión (empeoramiento, mejora o mantenimiento) basándose en la cantidad detectada de NGAL en el suero sanguíneo.

35 Habitualmente, el especialista clínico establecería un protocolo de recogida y análisis de una cantidad de muestras de sangre nueva del paciente en intervalos seleccionados. Habitualmente la muestra de sangre se obtiene intermitentemente durante un periodo prescrito. El periodo de tiempo entre la toma de muestras intermitente puede estar dictado por la condición del sujeto y puede variar de una muestra cada 24 horas a una muestra tomada de forma continua, más normalmente habitualmente de cada 4 horas a cada 30 minutos. Una muestra de suero se aísla  
40 después habitualmente de la muestra de sangre por medios bien conocidos.

Usando los métodos y las técnicas descritos en el presente documento, puede analizarse y estimarse un nivel cualitativo del biomarcador LCTR presente en el suero y puede analizarse y medirse un nivel cuantitativo del biomarcador LCTR presente en el suero. El especialista clínico seleccionaría el método cualitativo, el método  
45 cuantitativo, o ambos, dependiendo del estado del paciente. Habitualmente, la cantidad de suero sanguíneo para recoger es menor de 1 mililitro y más habitualmente menor de 10  $\mu$ l. Una muestra típica puede variar de aproximadamente 1  $\mu$ l a aproximadamente 1 ml. Habitualmente, las mayores cantidades de una muestra de suero sanguíneo (aproximadamente 1 ml) se usan para ensayos cuantitativos. Habitualmente, estas cantidades pequeñas de suero están disponibles fácil y rápidamente de sujetos clínicos que son propensos a desarrollar IRA o han  
50 desarrollado IRA.

Una vez que se ha detectado un indicio de lesión de células tubulares renales o insuficiencia renal aguda y ha comenzado la intervención y el tratamiento de la enfermedad o afección, el especialista clínico puede emplear el método de la invención para supervisar el progreso del tratamiento o la intervención. Si se planea un tratamiento o  
55 cirugía que podría provocar lesión de células tubulares renales, el especialista clínico puede obtener una muestra de suero previa al tratamiento para determinar un valor basal para un individuo. Habitualmente, se tomarán y analizarán una o más muestras de suero posteriores al tratamiento subsiguientes para determinar la presencia del biomarcador LCTR a medida que el tratamiento de la lesión renal comienza y continúa. Si se ha obtenido un valor basal, estos valores posteriores al tratamiento pueden compararse con el valor basal para determinar la condición relativa del paciente. El tratamiento continúa hasta que no se detecte la presencia del biomarcador LCTR en muestras de suero  
60 posteriores al tratamiento subsiguientes. A medida que el tratamiento y la intervención alivian la afección, la expresión del biomarcador LCTR, y su presencia en el suero, se reducirán de forma correspondiente. El grado de alivio se expresará por un nivel reducido de forma correspondiente del biomarcador LCTR, tal como NGAL, detectado en una muestra. A medida que la lesión renal se acerca a la curación completa, el método puede usarse para detectar la ausencia completa del biomarcador LCTR, lo que señala la compleción del ciclo de tratamiento.  
65 Los estudios con modelos animales de acontecimiento de lesión isquémica o nefrotóxica han demostrado que se

produce NGAL en células tubulares renales en un periodo de minutos después del acontecimiento. Como se muestra en los ejemplos de la presente invención, la NGAL expresada por células tubulares renales se acumula rápidamente en la sangre y puede detectarse mucho antes que los ensayos de diagnóstico actuales disponibles para indicar daño de células renales. Ya que NGAL se detecta fácilmente en el suero en un periodo de 2 horas desde la lesión renal o el tratamiento nefrotóxico, la invención es adecuada para su uso como un diagnóstico de aparición temprana. El ensayo de NGAL de muestras de suero de un sujeto puede comenzar en un periodo de 30 minutos desde una lesión sospechada, ya que NGAL comienza a aparecer en el suero a niveles bajos y continúa aumentando a continuación. Por lo tanto, también es de gran utilidad iniciar el ensayo en cualquier momento en un periodo de 2 horas desde una lesión sospechada, cuando NGAL es claramente evidente en suero. Asimismo, es de utilidad ensayar en cualquier otro momento durante las primeras 24 horas después de una lesión sospechada, ya que NGAL es un marcador de lesión altamente fiable y fácilmente medido que aparece en el suero antes de que puedan detectarse cambios en otros parámetros, tales como creatinina. El ciclo de ensayo de NGAL con mayor preferencia es recoger muestras a intervalos durante el transcurso del tratamiento para supervisar los cambios en tiempo real en el estado de salud renal.

Los anticuerpos tanto monoclonales como policlonales que se unen con un biomarcador LCTR son útiles en los métodos de la presente invención. Los anticuerpos pueden prepararse por métodos conocidos en la técnica. Se describen anticuerpos monoclonales para un biomarcador LCTR preferido, NGAL, por ejemplo, en "Characterization of two ELISAs for NGAL, a newly described lipocalin in human neutrophils", Lars Kjeldsen *et al.*, (1996) *Journal of Immunological Methods*, Vol. 198, 155-16. Pueden obtenerse ejemplos de anticuerpos monoclonales para NGAL de la Antibody Shop, Copenhagen, Dinamarca, como HYB-211-01, HYB-211-02 y NYB- 211-05. Habitualmente, HYB-211-01 y HYB-211-02 pueden usarse con NGAL en sus formas tanto reducidas como sin reducir. Se describe un ejemplo de un anticuerpo policlonal para NGAL en "An Iron Delivery Pathway Mediated by a Lipocalin", Jun Yang *et al.*, *Molecular Cell*, (2002), Vol. 10, 1045-1056. Para preparar este anticuerpo policlonal, se inmunizaron conejos con proteína NGAL filtrada en gel recombinante. Los sueros se incubaron con perlas de GST-Sepharose 4B para retirar contaminantes, produciendo los anticuerpos policlonales en suero, como describen los solicitantes en Jun Yang *et al.*, *Molecular Cell* (2002).

Habitualmente, la etapa de detectar el complejo del anticuerpo de captura y el biomarcador LCTR comprende poner en contacto el complejo con un segundo anticuerpo para detectar el biomarcador.

El método para detectar el complejo del biomarcador LCTR y el anticuerpo primario comprende las etapas de separar cualquier material sin unir de la muestra de suero del complejo de anticuerpo de captura-biomarcador; poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-biomarcador con un anticuerpo secundario para detectar el biomarcador LCTR, para permitir la formación de un complejo entre el biomarcador LCTR y el anticuerpo secundario; separar cualquier anticuerpo secundario sin unir del complejo de biomarcador LCTR-anticuerpo secundario; y detectar el anticuerpo secundario del complejo de biomarcador LCTR-anticuerpo secundario.

Un kit para su uso en el método comprende habitualmente un medio que tiene fijado al mismo el anticuerpo de captura, por lo que la muestra de suero se pone en contacto con el medio para exponer el anticuerpo de captura a NGAL contenida en la muestra. El kit incluye un medio de adquisición que puede comprender un instrumento, tal como una espátula o una varilla sencilla, que tiene una superficie que comprende el medio. El medio de adquisición también puede comprender un recipiente para aceptar la muestra de suero, donde el recipiente tiene una superficie de contacto con el suero que comprende el medio. En otra realización habitual, el ensayo para detectar el complejo del biomarcador LCTR y el anticuerpo puede comprender un ELISA y puede usarse para cuantificar la cantidad de NGAL en una muestra de suero. En una realización alternativa, el medio de adquisición puede comprender un instrumento que comprende un casete que contiene el medio.

La detección temprana del biomarcador LCTR puede proporcionar un indicio de la presencia de la proteína en una muestra de suero en un periodo de tiempo corto. En general, un método de la presente invención puede detectar el biomarcador LCTR en una muestra de suero en un periodo de cuatro horas, más habitualmente en un periodo de dos horas y más habitualmente en un periodo de una hora, después de lesión de células tubulares renales. Preferentemente, el biomarcador LCTR puede detectarse en un periodo de aproximadamente 30 minutos después de lesión de células tubulares renales.

Puede realizarse un método de la presente invención para detectar el biomarcador de LCTR adaptando los métodos y kits conocidos en la técnica para la detección rápida de otras proteínas y ligandos en una muestra biológica. Se describen ejemplos de métodos y kits que pueden adaptarse a la presente invención en la patente de los Estados Unidos 5.656.503, expedida a May *et al.* el 12 de agosto de 1997, patente de los Estados Unidos 6.500.627, expedida a O'Conner *et al.* el 31 de diciembre de 2002, patente de los Estados Unidos 4.870.007, expedida a Smith-Lewis el 26 de septiembre de 1989, patente de los Estados Unidos 5.273.743, expedida a Ahlem *et al.* el 28 de diciembre de 1993, y patente de los Estados Unidos 4.632.901, expedida a Valkers *et al.* el 30 de diciembre de 1986.

Un método rápido de una etapa de detección del biomarcador LCTR puede reducir el tiempo para detectar la lesión de células tubulares renales. Un método habitual puede comprender las etapas de: obtener una muestra de suero sanguíneo que se sospecha que contiene el biomarcador LCTR; mezclar una parte de la muestra con un anticuerpo

de detección que se une específicamente con el biomarcador LCTR, para iniciar la unión del anticuerpo de detección con el biomarcador LCTR en la muestra; poner en contacto la mezcla de muestra y anticuerpo de detección con un anticuerpo de captura inmovilizado que se une específicamente con el biomarcador LCTR, no reaccionando de forma cruzada dicho anticuerpo de captura con el anticuerpo de detección, para unir el anticuerpo de detección con el biomarcador LCTR, y el biomarcador LCTR con el anticuerpo de captura, para formar un complejo detectable; retirar anticuerpo de detección sin unir y cualquier muestra sin unir del complejo; y detectar el anticuerpo de detección del complejo. El anticuerpo detectable puede marcarse con un marcador detectable, tal como un marcador radiactivo, enzima, colorante biológico, perla magnética o biotina, como es bien sabido en la técnica. El anticuerpo detectable puede unirse con un material de soporte, tal como una membrana, tira de plástico, placa de laboratorio de plástico tal como las usadas para ELISA u otros ensayos de alto rendimiento o cualquier otro material de soporte, tal como los usados en otros kits de diagnóstico bien conocidos en la técnica.

Para identificar genes potenciales y sus proteínas que pueden acompañar y marcar la aparición más temprana de lesiones de células tubulares renales, tales como lesiones renales isquémicas y nefrotóxicas, puede usarse un ensayo de micromatrices de ADNc para detectar cuál de un gran número de dianas génicas potenciales está regulada positivamente de forma notable. Utilizando esta técnica de exploración, la lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilos (NGAL) se identificó como un gen cuya expresión está regulada positivamente más de 10 veces en las primeras horas después de una lesión renal isquémica en un modelo de ratón.

NGAL pertenece a la superfamilia de la lipocalina de más de 20 proteínas secretadas estructuralmente relacionadas que se cree que transportan una diversidad de ligandos en un cáliz de barril  $\beta$ . La NGAL humana se identificó originalmente como una proteína de 25 kDa unida covalentemente con gelatinasa de neutrófilos humanos, donde representa una de las proteínas de gránulos secundarios de neutrófilos. Los estudios de clonación molecular han revelado que NGAL humana es similar al gen de 24p3 de ratón identificado por primera vez en cultivos primarios de riñones de ratón en los que se indujo proliferación. NGAL se expresa a niveles muy bajos en otros tejidos humanos, incluyendo riñón, tráquea, pulmones, estómago y colon. La expresión de NGAL está notablemente inducida en epitelios estimulados. Por ejemplo, está regulada positivamente en células epiteliales colónicas en áreas de inflamación o neoplasia, pero está ausente de áreas no implicadas intermedias o en lesiones metastásicas. Las concentraciones de NGAL están elevadas en el suero de pacientes con infecciones bacterianas agudas, el esputo de sujetos con asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica y el líquido bronquial del pulmón con enfisema. En todos estos casos, se postula que la inducción de NGAL es el resultado de interacciones entre células inflamatorias y el revestimiento epitelial, siendo evidente la regulación positiva de la expresión de NGAL tanto en neutrófilos como en el epitelio.

Se cree que la inducción de NGAL detectada representa una respuesta intrínseca novedosa de las células de túbulo proximales del riñón a lesiones de células tubulares renales, incluyendo lesiones tanto isquémicas como nefrotóxicas, y no procede únicamente de neutrófilos activados. En primer lugar, la respuesta es rápida, apareciendo NGAL en el suero en un periodo de 2 horas desde la lesión después de oclusión arterial renal, mientras que la acumulación de neutrófilos renales en este modelo de IRA isquémica se observa habitualmente en primer lugar a las 4 horas después de lesión. En segundo lugar, los patrones temporales de inducción de NGAL y acumulación de neutrófilos son divergentes. Se observó el máximo de expresión de ARNm y proteína de NGAL a las 12 horas de reflujo, mientras que la acumulación de neutrófilos alcanza un máximo a las 24 horas, momento en el cual la expresión de NGAL se ha reducido significativamente. En tercer lugar, no fue detectable ningún neutrófilo que expresara NGAL por inmunofluorescencia en las muestras de riñón examinadas). En cuarto lugar, se ha documentado que se produce inducción de ARNm y proteína de NGAL en células de túbulo proximales humanas cultivadas después de isquemia *in vitro*, con NGAL secretada al medio de cultivo en un periodo de 1 hora desde el agotamiento de ATP, en un sistema donde los neutrófilos están ausentes de forma absoluta. No obstante, puede haberse producido algo de contribución de neutrófilos de infiltración a la regulación positiva de NGAL observada. Es posible que pueda inducirse regulación positiva de NGAL en células de túbulo renales por la liberación local de citocinas de neutrófilos inmovilizados en la microcirculación poco después de lesión isquémica.

Un nombre antiguo para la NGAL es HNL. La patente de la técnica anterior 6.136.526 enseña un método para detectar HNL para distinguir una infección bacteriana de una infección vírica. Las infecciones provocan inflamación en el sentido clásico de inducción del sistema inmunitario atrayendo neutrófilos y otras células inmunitarias al sitio de infección. Cuando las células inmunitarias se infiltran en la región afectada, se liberan histaminas y una serie de citocinas proinflamatorias en los espacios intracelulares para inducir fagocitosis y destruir los organismos. Los neutrófilos activados también secretan NGAL en respuesta a infecciones bacterianas pero no infecciones víricas. Esta respuesta diferencial probablemente se deba a un resto de lipopolisacárido (LPS) en la superficie de bacterias, ya que NGAL se une con avidez a LPS. NGAL se difundirá después en capilares localizados cerca de un sitio infectado y, cuando alcance un nivel suficiente, puede detectarse en suero o plasma. No está claro lo pronto que los neutrófilos comienzan a secretar NGAL en respuesta a infección bacteriana, o cuánto se tarda antes de que la NGAL liberada de neutrófilos alcance niveles detectables en suero.

Esto está en contraste con la presente invención en varios aspectos. En primer lugar, hay poca o ninguna implicación de neutrófilos u otras células inmunitarias en la lesión isquémica o nefrotóxica temprana. En segundo lugar, las lesiones isquémicas o nefrotóxicas inducen expresión temprana y rápida de NGAL en células de los tejidos

afectados, tales como los que revisten los diversos segmentos de las nefronas. En tercer lugar, las células lesionadas del riñón liberan NGAL directamente a la orina, donde aparecen en un periodo de minutos desde la lesión. En cuarto lugar, la inflamación que se produce habitualmente 6-12 horas después de lesión isquémica o nefrotóxica es distinta de la provocada por una infección. La muerte celular inducida por lesión isquémica o nefrotóxica induce infiltrados que comprenden principalmente macrófagos que secretan citocinas proinflamatorias para promover la fagocitosis de residuos celulares en el tejido dañado. En quinto lugar, aunque se ha mostrado que se produce algo de acumulación de neutrófilos en modelos animales de lesión isquémica de riñón, esto comienza a suceder solo aproximadamente 4 horas después de la lesión y alcanza un máximo aproximadamente 24 horas después de la lesión. Por el contrario, la NGAL en orina alcanza un máximo a las 2-4 horas después de la lesión y se reduce significativamente a las 24 horas (1-3). Por tanto, los diferentes ciclos temporales de excreción urinaria de NGAL y acumulación de neutrófilos proporcionan argumentos contra una fuente inflamatoria de la NGAL en orina y suero después de lesión isquémica. En sexto lugar, aunque se ha mostrado acumulación de neutrófilos en modelos animales, esto nunca se ha mostrado ni demostrado en insuficiencia renal aguda humana. En séptimo lugar, los inventores han documentado acumulación de NGAL en células de túbulos renales cultivadas después de lesión isquémica *in vitro*, en un sistema donde los neutrófilos están ausentes de forma absoluta. Véase Rabb H y Star R. *Acute Renal Failure*, Molitoris BA y Finn WF (editores), WB Saunders, Filadelfia, 2001, pp89-100; Chiao *et al.* J Clin Invest 1997; 99:1165-1172; y Rabb H *et al.* Am J Physiol 1996; 271 F408-F413.

Se carece de una explicación adecuada de la inducción de NGAL por epitelios estimulados y sigue sin estar claro si NGAL es protectora o causa de lesión o incluso un espectador inocente. Las pruebas recientes sugieren que, al menos en un subconjunto de tipos celulares, NGAL puede representar una molécula proapoptótica. En la línea celular prolinfocítica B de ratón, la retirada de citocina dio como resultado una inducción notable de NGAL así como aparición de apoptosis. NGAL purificada produjo la misma respuesta proapoptótica que la privación de citocinas, incluyendo activación de Bax, lo que sugiere que NGAL es causa de muerte celular programada. NGAL también se ha ligado a la apoptosis en tejidos reproductores. Las células epiteliales de la glándula mamaria y el útero involucionantes expresan altos niveles de NGAL, coincidiendo en el tiempo con un periodo de máxima apoptosis. Es probable que NGAL regule un subconjunto de poblaciones celulares induciendo apoptosis. Los epitelios estimulados pueden regular positivamente NGAL para inducir la apoptosis de neutrófilos de infiltración, permitiendo de este modo que las células residentes sobrevivan a los estragos de la respuesta inflamatoria. Como alternativa, las células epiteliales pueden utilizar este mecanismo para regular su propia muerte. Sin embargo, es interesante observar que la inducción de NGAL después de lesión de reperfusión por isquemia renal se produce predominantemente en las células de túbulos proximales, y la apoptosis en las mismas circunstancias es principalmente un fenómeno de células de túbulos distales.

Otros estudios recientes han revelado que NGAL potencia el fenotipo epitelial. NGAL es expresada por el brote ureteral de rata penetrante y desencadena nefrogénesis estimulando la conversión de células mesenquimatosas a epitelios de riñón. Se ha mostrado que otra lipocalina, glicodelina, induce un fenotipo epitelial cuando se expresa en células de carcinoma de mama humano. Estos hallazgos son especialmente pertinentes para el riñón maduro, en el que una de las respuestas bien documentadas a lesión isquémica es la aparición notable de células epiteliales desdiferenciadas que revisten los túbulos proximales. Un aspecto importante de la regeneración y reparación renal después de lesión isquémica implica la readquisición del fenotipo epitelial, un proceso que recapitula varios aspectos del desarrollo normal. Esto sugiere que NGAL puede ser expresada por el túbulo dañado para inducir la reepitelización. El apoyo a esta noción procede de la identificación reciente de NGAL como una proteína de transporte de hierro que es complementaria de la transferrina durante la nefrogénesis. Se sabe bien que el suministro de hierro a células es crucial para el crecimiento y desarrollo celular, y esto es supuestamente crítico para la regeneración renal postisquémica al igual que lo es durante la ontogenia. Ya que NGAL parece unirse al hierro y transportarlo, también es probable que NGAL pueda actuar como un sumidero de hierro que se desprende de células epiteliales de túbulos proximales dañadas. Debido a que se ha observado que NGAL puede ser endocitada por el túbulo proximal, la proteína podría reciclar potencialmente hierro a células viables. Esto podría estimular el crecimiento y el desarrollo, así como retirar hierro, una molécula reactiva, del sitio de lesión tisular, limitando de este modo la citotoxicidad mediada por hierro.

NGAL es un biomarcador de suero novedoso para lesión renal nefrotóxica inducida por cisplatino que es más sensible que biomarcadores previamente descritos. Un ejemplo es la molécula de lesión de riñón 1 o KIM-1, una molécula de adhesión potencial implicada en la regeneración renal. En un modelo de rata de nefrotoxicidad por cisplatino, KIM-1 era detectable cualitativamente 24-48 horas después de la lesión inicial, lo que la hace un marcador algo tardío del daño a células tubulares. Se cree que NGAL se detecta fácilmente y de forma cuantitativa en un periodo de 3 horas después de la administración de cisplatino a dosis que se sabe que dan como resultado insuficiencia renal. Además, la detección de NGAL en orina y suero precede a la aparición de otros marcadores en la orina tales como NAG. La aparición de NGAL en la orina y el suero también precede al aumento de la creatinina en suero que se usa ampliamente para diagnosticar insuficiencia renal nefrotóxica.

Se cree que la NGAL en suero es evidente incluso después de dosis "subclínicas" leves de cisplatino, a pesar de niveles de creatinina en suero normales. Por tanto, la invención tiene importantes implicaciones para el control clínico de paciente con terapia de cisplatino. La eficacia del cisplatino depende de la dosis, pero la aparición de nefrotoxicidad con frecuencia dificulta el uso de dosis mayores para maximizar su potencial antineoplásico. La



nefrototoxicidad después del tratamiento con cisplatino es habitual y puede manifestarse después de una única dosis con insuficiencia renal aguda. Aunque se ha demostrado que varias maniobras terapéuticas son eficaces en el tratamiento de nefrototoxicidad inducida por cisplatino en animales, las experiencias humanas exitosas han sido en su mayoría anecdóticas. Una razón de esto puede ser la falta de marcadores tempranos para insuficiencia renal aguda nefrotóxica y por lo tanto un retardo en el inicio de la terapia. En la práctica clínica actual, la lesión renal aguda se diagnostica habitualmente midiendo la creatinina en suero. Sin embargo, es bien sabido que la creatinina es un indicador poco fiable y retardado durante cambios agudos en la función del riñón. En primer lugar, las concentraciones de creatinina en suero pueden no cambiar hasta que aproximadamente el 50 % de la función del riñón ya se ha perdido. En segundo lugar, la creatinina en suero no representa con precisión la función del riñón hasta que se ha alcanzado un estado estacionario, lo que puede requerir varios días. Por tanto, el uso de mediciones de creatinina en suero altera la capacidad tanto de detectar como de cuantificar el daño renal durante las fases tempranas de la lesión renal. Sin embargo, los estudios animales han sugerido que aunque la insuficiencia renal aguda nefrotóxica puede prevenirse y/o tratarse, existen unas "circunstancias oportunas" estrechas para conseguirlo, y el tratamiento debe instituirse muy pronto después de la lesión inicial. La falta de biomarcadores tempranos de la lesión renal ha alterado la capacidad de los especialistas clínicos para iniciar terapias potencialmente eficaces de una manera oportuna. El uso de NGAL en un sistema de ensayo también sería de utilidad para ensayar intervenciones terapéuticas o preventivas existentes o emergentes, y para la evaluación temprana del potencial nefrotóxico de otros agentes farmacéuticos. La detección de NGAL es un biomarcador en suero novedoso, no invasivo, temprano para daño de riñón inducido por cisplatino. La detección temprana puede permitir a los especialistas clínicos administrar intervenciones terapéuticas oportunas e instituir maniobras para evitar la progresión a insuficiencia renal nefrotóxica manifiesta.

La regulación positiva y el transporte en suero de NGAL pueden representar una respuesta rápida de células de túbulo renales a una diversidad de lesiones, y la detección de NGAL en el suero puede representar una herramienta clínica no invasiva ampliamente aplicable para el diagnóstico temprano de la lesión de células de túbulo.

NGAL es un biomarcador de suero sensible, no invasivo, para lesiones de células tubulares renales, incluyendo isquemia y nefrotoxicidad renal. El examen de la expresión de NGAL en el suero de pacientes con formas agudas, leves y tempranas de lesión de células tubulares renales, usando los métodos de detección rápida y sencilla de la invención, puede avisar y permitir a los especialistas clínicos instituir intentos de intervención oportunos en pacientes que experimentan insuficiencia renal aguda y avisar a los especialistas clínicos para que instituyan maniobras orientadas a la prevención de la progresión en pacientes con lesiones de células tubulares renales subclínicas, leves, (tales como una nefrotoxina, trasplantes de riñón, cirugía vascular y acontecimientos vasculares) para evitar IRA.

Solo en los Estados Unidos, se realizan aproximadamente 16.000 trasplantes de riñón cada año. Este número ha aumentado constantemente cada año. Aproximadamente 10.000 de estos son trasplantes de riñón procedente de cadáver y están en riesgo de IRA. Cada uno de estos pacientes se beneficiaría enormemente de mediciones de NGAL en serie, lo que podría representar cuidados rutinarios.

La lesión renal isquémica también se ha asociado con cirugía a corazón abierto, debido a la breve interrupción del flujo sanguíneo que es inherente en este procedimiento. Puede estimarse el número de cirugías a corazón abierto realizadas anualmente. En cualquier hospital de adultos moderadamente ocupado, se realizan aproximadamente 500 de dichas operaciones cada año. Dado que hay al menos 400 de dichos hospitales moderadamente ocupados solo en los Estados Unidos, se puede estimar de forma moderada que se realizan 200.000 cirugías a corazón abierto cada año. De nuevo, las mediciones de NGAL en serie tendrían un valor incalculable en estos pacientes y representarían el tratamiento de referencia.

## 50 Ejemplos de la invención

En los siguientes ejemplos de la invención, se estudiaron 71 niños que se sometieron a DCP. Se analizaron muestras en serie de orina y sangre mediante transferencias Western y ELISA para expresión de NGAL. La variable de resultado primario fue lesión renal aguda, definida como un aumento del 50 % en la creatinina en suero desde la medida inicial. Veinte pacientes (28 %) desarrollaron lesión renal aguda, pero el diagnóstico usando creatinina en suero fue posible solamente 1-3 días después de DCP. Por el contrario, NGAL en orina aumentó desde una medida inicial de  $1,6 \pm 0,3$  ng/ml a  $147 \pm 23$  ng/ml a las 2 horas después de DCP. NGAL en suero aumentó desde una medida inicial de  $3,2 \pm 0,5$  ng/ml a  $61 \pm 10$  ng/ml a las 2 horas después de DCP. El análisis univariante mostró una correlación significativa entre lesión renal aguda y los siguientes: NGAL en orina a las 2 horas, NGAL en suero a las 2 horas y tiempo de DCP. Por análisis multivariante, la NGAL en orina a las 2 horas después de DCP surgió como el predictor independiente más potente de lesión renal aguda. Una curva de ROC para la NGAL en orina a las 2 horas reveló un área bajo la curva de 0,998 y una sensibilidad de 1,00 y especificidad de 0,98 para un valor de punto de corte de 50 ng/ml. Las NGAL en orina y suero fueron biomarcadores tempranos novedosos, sensibles, específicos, altamente predictivos para lesión renal aguda después de cirugía cardíaca.

65 *Diseño del estudio:* La investigación fue aprobada por el Comité de Revisión Institucional del Centro Médico del

Hospital Infantil de Cincinnati. Se obtuvo consentimiento informado por escrito del tutor legal de cada paciente antes de su inclusión. Todos los pacientes que se sometieron a derivación cardiopulmonar (DCP) para corrección quirúrgica de cardiopatía congénita entre enero y noviembre de 2004 se incluyeron de forma potencial. Los criterios de exclusión incluyeron insuficiencia renal preexistente, diabetes mellitus, enfermedad vascular periférica y el uso de agentes nefrotóxicos antes o durante el periodo de estudio. Los inventores estudiaron por lo tanto una población homogénea de pacientes muy probablemente sin ninguna variable de confusión importante en los que la única lesión renal evidente sería el resultado de lesión de reperusión por isquemia después de DCP. Para minimizar el agotamiento de volumen postoperatorio, todos los pacientes recibieron al menos 80 % de sus necesidades de fluidos de mantenimiento durante las primeras 24 horas después de la cirugía y 100 % de mantenimiento posteriormente. Se recogieron muestras puntuales de orina y sangre en la medida inicial y en intervalos frecuentes durante cinco días después de DCP. Se obtuvieron muestras de orina cada dos horas durante las primeras 12 horas, y después una vez cada 12 horas. Se recogieron muestras de sangre a las 2 horas después de DCP, cada 12 horas durante el primer día y después una vez al día durante cinco días. Cuando el tiempo de DCP superó 2 horas, las primeras muestras de orina y suero postoperatorias se obtuvieron al final de DCP y esta muestra se consideró la recogida de 2 horas. También se obtuvieron orina y sangre de voluntarios adultos sanos para el establecimiento de valores de NGAL normales. Las muestras se centrifugaron a 2.000 g durante 5 min, y los sobrenadantes se almacenaron en alícuotas a -80 °C. Se midió la creatinina en suero en la medida inicial y se supervisaron de forma rutinaria en estos niños críticamente enfermos al menos dos veces al día en el periodo postoperatorio inmediato y al menos diariamente después del día tres postoperatorio.

*Métodos estadísticos:* Todos los resultados se expresan como medias  $\pm$  ET. Se utilizó el software estadístico SAS 8.2 para el análisis. Se usó un ensayo de *t* de dos muestras o ensayo de suma de rangos Mann-Whitney para comparar variables continuas, y se usaron el ensayo de Chi cuadrado o ensayo exacto de Fisher como se indica para comparar variables categóricas. Se generó una curva de característica operadora del receptor (ROC) convencional para NGAL en orina a las 2 y 4 horas después de DCP y para NGAL en suero a las 2 horas después de DCP. Estas se utilizaron para determinar las sensibilidades y especificidades en diferentes niveles de puntos de corte para NGAL en orina y suero. El área bajo la curva se calculó para determinar la calidad de NGAL como un biomarcador. Un área de 0,5 no es mejor que lo esperado al azar, mientras que un valor de 1,0 significa un biomarcador perfecto. Se realizaron múltiples análisis de regresión logística por etapas univariantes y multivariantes para evaluar predictores de lesión renal aguda. Las variables predictoras independientes potenciales incluyeron la edad, el sexo, la raza, el tiempo de DCP, cirugía cardíaca previa, diuresis, NGAL en orina a las 2 horas después de DCP y NGAL en suero a las 2 horas después de DCP. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró significativo.

*Características de los pacientes:* Los tutores de 100 pacientes proporcionaron sus consentimientos informados por escrito para la participación de sus hijos en este estudio. Se excluyeron veintinueve pacientes, todos debido al uso de nefrotóxica (ibuprofeno, inhibidores de ACE, gentamicina, vancomicina) antes o poco después de la cirugía. Por tanto, se incluyeron 71 pacientes en el estudio, cuyas características demográficas, diagnósticos y variables de resultado se muestran en la Tabla 1, a continuación. Todos los sujetos empezaron con función renal normal y niveles esencialmente indetectables de NGAL en la orina y el suero, al igual que controles sanos. Este diseño de estudio permitió la determinación del momento preciso de aparición de NGAL en la orina y el suero después de DCP. Los resultados indican que NGAL no es solamente un biomarcador temprano inmediato potente para lesión renal aguda, que precede a cualquier aumento de creatinina en suero en 1-3 días, pero también es un marcador diferenciador válido durante la duración completa del estudio.

TABLA 1. Características de los pacientes y resultados clínicos. \* $p < 0,05$  frente a controles.

Característica	Control	Lesión renal aguda
	N = 51	N = 20
Edad (años)	4,0 $\pm$ 0,7	2,1 $\pm$ 1,2*
Sexo (% de varones)	62 %	65 %
Raza (% de caucásicos)	88 %	85 %
Cirugía cardíaca previa	29 %	25 %
25 % de tiempo de DCP (minutos)	105 $\pm$ 8,6	179 $\pm$ 13,6*

Característica	Control	Lesión renal aguda
Cambio de creatinina en suero (%)	7,7 ± 1,8	99 ± 9,3*
Diagnóstico (n)		
Defecto septal ventricular	9	3
Tetralogía de Fallot	3	9
Defecto septal auricular	7	0
Coartación aórtica	5	1
Estenosis aórtica	6	0
Hemicardio izquierdo hipoplásico	2	3
Comunicación AV	3	2
Estenosis pulmonar	3	1
Transposición de las grandes arterias	4	0
Atresia tricuspídea	3	0
Doble salida del ventrículo derecho	2	0
Arteria coronaria izquierda anómala	1	0
Corazón triauricular	0	1
Obstrucción del infundíbulo VI	1	0
Insuficiencia mitral	1	0
Insuficiencia aórtica	1	0

\* $p < 0,05$  frente a controles.

5 Una virtud importante de este estudio es el reclutamiento potencial de una cohorte homogénea de niños sometidos a lesión de reperusión por isquemia renal durante corrección quirúrgica de cardiopatía congénita. Los pacientes en estos ejemplos estuvieron desprovistos de variables comórbidas habituales tales como enfermedad aterosclerótica, diabetes y uso de nefrotoxina, todos los cuales pueden confundir y viciar la identificación de biomarcadores tempranos para lesión renal aguda isquémica.

10 *Resultados clínicos:* El resultado primario, lesión renal aguda, definida como un aumento del 50 % o mayor en la creatinina en suero desde la medida inicial, se produjo en 20 de 71 pacientes en un periodo de tres días, produciendo una tasa de incidencia del 28 %. De estos, 8 pacientes presentaron un aumento de creatinina en suero en las 24-48 horas después de DCP, pero en los otros 12 pacientes, el aumento se retardó adicionalmente al periodo de 48-72 horas después de DCP. Por tanto, el diagnóstico de lesión renal aguda usando prácticas clínicas aceptadas en la actualidad podría realizarse solamente días después del acontecimiento instigante.

15 Basándose en el resultado primario, los sujetos se clasificaron como "control" o "lesión renal aguda". No hubo ninguna diferencia entre los dos grupos en sexo, raza o diuresis. Otras variables que se recogieron incluyeron la

edad, el tiempo de DCP, cirugía cardíaca previa, diuresis y creatinina en orina. Los niños que desarrollaron lesión renal aguda tendían a ser más jóvenes y con tiempo de DCP más largo, como se muestra en la TABLA 1 anterior. La lesión renal aguda fue más habitual en pacientes con un diagnóstico subyacente de hemicardio izquierdo hipoplásico, tetralogía de Fallot y comunicación AV, y fue menos común o ausente en pacientes con defecto septal auricular, defecto septal ventricular o cardiopatía valvular. La variable de resultado primario fue el desarrollo de lesión renal aguda, definida como un aumento del 50 % o mayor en la creatinina en suero desde la medida inicial.

### Ejemplo 1

*Análisis de Western para expresión y cuantificación de NGAL:* Se hirvieron alícuotas iguales (30  $\mu$ l) de cada muestra orina durante 10 min en tampón desnaturalizante y se sometieron análisis de transferencia de Western con un anticuerpo policlonal de cabra purificado por afinidad inducido contra NGAL humana (F-19, Santa Cruz Biotechnology). Se prepararon transferencias simultáneas en condiciones idénticas de transferencia y exposición con cantidades conocidas de NGAL humana recombinante, como patrones para cuantificación de NGAL en orina como se ha descrito previamente por Mishra *et al.* en Am J Nephrol 2004;24:307-315. Los resultados de las muestras y los resultados clínicos estuvieron ocultos para los investigadores de laboratorio hasta el final del estudio.

*Mediciones de NGAL en orina - análisis de Western:* NGAL fue prácticamente indetectable en la orina de todos los pacientes antes de la cirugía y en voluntarios sanos (n=10). La FIGURA 1 muestra una transferencia Western típica de un paciente que se somete a DCP. NGAL no se detecta a las 0 horas, o antes de DCP, pero aparece rápidamente en la orina a las 2 horas o menos y permanece detectable por transferencia Western durante al menos 12 horas.

*ELISA para cuantificación de NGAL:* Un ELISA sensible y reproducible para NGAL es un ejemplo de un método para proporcionar cuantificación precisa de las muestras y para confirmar los datos obtenidos por análisis de Western. De hecho, los resultados de ELISA se asemejan mucho a los obtenidos por análisis de Western, con una diferencia de menos de 20 %. La utilidad clínica de técnicas basadas en inmunotransferencia para la detección rápida de biomarcadores para lesión renal aguda está limitada por el factor temporal y variaciones en las condiciones de ensayo. Los inventores han modificado protocolos previamente publicados de NGAL procedente de neutrófilos como se describe en Kjeldsen *et al.* en J Immunol Methods 1996;198:155-164. En resumen, se recubrieron placas de microtitulación durante una noche a 4 °C con un anticuerpo monoclonal inducido contra NGAL humana (n.º HYB211-05, Antibody Shop). Todas las etapas posteriores se realizaron a temperatura ambiente. Las placas se bloquearon con tampón que contenía BSA 1 %, se recubrieron con 100  $\mu$ l de muestras (orina o suero) o patrones (concentraciones de NGAL que varían de 1-1000 ng/ml) y se incubaron con un anticuerpo monoclonal biotinilado contra NGAL humana (n.º HYB211-01B, Antibody Shop) seguido de HRP conjugada con avidina (Dako). Se añadió sustrato de TMB (BD Biosciences) para desarrollo de color, que se leyó después de 30 min a 450 nm con un lector de microplacas (Benchmark Plus, BioRad). Todas las mediciones se realizaron por triplicado y con ocultación.

### Ejemplo 2

En pacientes que nunca desarrollaron lesión renal aguda, hubo un aumento pequeño pero estadísticamente significativo de NGAL en orina a las 2 horas o la primera muestra disponible después de DCP (4,9 $\pm$ 1,5 ng/ml frente a 0,9 $\pm$ 0,3 ng/ml en la medida inicial,  $p$ <0,05) y 4 horas después de DCP (4,9 $\pm$ 1,2 ng/ml,  $p$ <0,05 frente a medida inicial). En notable contraste, los pacientes que posteriormente desarrollaron lesión renal aguda presentaron un aumento drástico de NGAL en orina en todos los puntos temporales examinados, como se muestra en la FIGURA 2. El patrón de excreción urinaria de NGAL se caracterizó por un máximo muy poco después del acontecimiento de precipitación (2-6 horas después de DCP), seguido de un aumento menor pero sostenido a lo largo de la duración completa del estudio. Este patrón general permaneció sin cambios cuando se normalizó la concentración de NGAL en orina con respecto a la excreción urinaria de creatinina (FIGURE 3).

### Ejemplo 3

Los niveles de NGAL en orina fueron uniformemente bajos en voluntarios sanos (2,2 $\pm$ 0,5 ng/ml, n=10) y en la medida inicial en todos los sujetos (1,6 $\pm$ 0,3 ng/ml, n=71). En pacientes que nunca desarrollaron lesión renal aguda, hubo un aumento pequeño pero estadísticamente significativo de NGAL en orina a las 2 horas después de DCP (5,9 $\pm$ 1,4 ng/ml,  $p$ <0,05 frente a medida inicial) y 4 horas después de DCP (5,6 $\pm$ 1,2 ng/ml,  $p$ <0,05 frente a medida inicial). Los pacientes que posteriormente desarrollaron lesión renal aguda presentaron un aumento notable de NGAL en orina en todos los puntos temporales examinados, como se muestra en la FIGURA 4. La excreción urinaria de NGAL alcanzó un máximo muy poco después de DCP, seguido de un aumento menor pero sostenido a lo largo de la duración completa del estudio. Los niveles de NGAL en orina fueron de 147 $\pm$ 23 ng/ml a las 2 horas de la primera muestra disponible, 179 $\pm$ 30 ng/ml a las 4 horas y 150 $\pm$ 30 ng/ml a las 6 horas después de DCP en el grupo de lesión renal aguda. Este patrón general permaneció uniforme cuando se normalizó la concentración de NGAL en orina con respecto a la excreción urinaria de creatinina, es decir, 138 $\pm$ 28 ng/mg de creatinina a las 2 horas, 155 $\pm$ 40 ng/mg a las 4 horas y 123 $\pm$ 35 ng/mg a las 6 horas después de DCP (FIGURA 5). Un diagrama de dispersión de las primeras mediciones de NGAL en orina postoperatorias disponibles reveló que los 20 pacientes que desarrollaron posteriormente lesión renal aguda presentaron un nivel por encima de un valor de punto de corte

arbitrario de 50 ng/ml, mientras que solamente 1 de cada 51 pacientes en el grupo de control mostraron un valor de NGAL por encima de este punto de corte arbitrario (FIGURA 6)

#### Ejemplo 4

5 *Mediciones de NGAL en suero - ELISA:* La NGAL en suero es un biomarcador temprano novedoso de lesión renal isquémica, similar a troponinas en isquemia miocárdica, y la detección de NGAL en suero es un ejemplo de la invención. Los niveles de NGAL en suero fueron uniformemente bajos en voluntarios sanos normales ( $2,5 \pm 0,8$ ,  $n=6$ ) y todos los sujetos de estudio antes de la cirugía ( $3,2 \pm 0,5$  ng/ml,  $n=71$ ). Los pacientes que nunca desarrollaron lesión renal aguda mostraron un aumento pequeño pero estadísticamente significativo de NGAL en suero a las 2 horas o la primera muestra disponible después de DCP ( $7,0 \pm 1,1$  ng/ml,  $p < 0,05$  frente a medida inicial) y 12 horas después de DCP ( $5,2 \pm 0,8$  ng/ml,  $p < 0,05$  frente a medida inicial). Los pacientes que posteriormente desarrollaron lesión renal aguda presentaron un aumento sorprendente de NGAL en suero en todos los puntos temporales examinados, como se muestra en la FIGURA 7. De forma similar a NGAL en orina, la NGAL en suero alcanzó un máximo muy poco después de DCP, seguido de un aumento menor pero sostenido a lo largo de la duración completa del estudio. Los niveles de NGAL en suero fueron  $61 \pm 10$  ng/ml a las 2 horas,  $54,7 \pm 7,9$  ng/ml a las 12 horas y  $47,4 \pm 7,9$  ng/ml a las 24 horas después de DCP en el grupo de lesión renal aguda. Un diagrama de dispersión de todas las mediciones de NGAL en suero (2 horas después de DCP) reveló que ninguno de los 51 pacientes en el grupo de control presentó un nivel por encima de un valor de punto de corte arbitrario de 50 ng/ml, mientras que la mayoría de pacientes que desarrollaron lesión renal aguda mostró un valor de NGAL en suero por encima de este valor (FIGURA 8). El ELISA descrito es un ejemplo de kits de diagnóstico de cabecera para NGAL.

#### Ejemplo 5

25 *NGAL para predicción de lesión renal aguda:* Un análisis univariante de los datos reveló que los siguientes resultados no fueron predictivos de lesión renal aguda: edad, sexo, raza, cirugía previa y diuresis. Hubo una correlación significativa entre lesión renal aguda (50 % o más de creatinina en suero) y lo siguiente: NGAL en orina a las 2 horas o la primera muestra disponible después de DCP ( $R=0,79$ ,  $p < 0,001$ ), NGAL en suero a las 2 horas o la primera muestra disponible después de DCP ( $R=0,64$ ,  $p < 0,001$ ) y duración de DCP ( $R=0,49$ ,  $p < 0,001$ ). Sin embargo, mediante análisis de regresión por etapas múltiple, solo la NGAL en orina a las 2 horas después de DCP surgió como el predictor independiente más potente de lesión renal aguda en esta cohorte ( $R=0,76$ ,  $p < 0,001$ ).

Se construyó una curva de ROC para determinar la potencia diferenciadora de las mediciones de NGAL en orina y suero para el diagnóstico temprano de lesión renal aguda. Para NGAL en orina, el área bajo la curva fue de 0,998 a las 2 horas después de DCP (FIGURA 9) y 1,000 a las 4 horas después de DCP (no mostrado). Para NGAL en suero, el área bajo la curva fue de 0,906 a las 2 horas después de DCP (FIGURA 10). Estos valores indican que NGAL tanto en orina como en suero son ensayos excelentes para el diagnóstico temprano de lesión renal aguda. Las sensibilidades, especificidades y valores predictivos obtenidos a diferentes niveles de punto de corte se enumeran en la TABLA 2. Para NGAL en orina, un punto de corte de 25 o 50 ng/ml proporciona excelente sensibilidad y especificidad tanto a las 2 horas como a las 4 horas después de DCP. Para NGAL en suero a las 2 horas después de DCP, la sensibilidad y especificidad son óptimas en el punto de corte de 25 ng/ml.

TABLA 2. Características de ensayo de NGAL en diversos valores de punto de corte.

Puntos de corte para NGAL en orina a las 2 h (ng/ml)	Sensibilidad	Especificidad	Valor predictivo positivo	Valor predictivo negativo
25	1,00	0,98	0,95	1,00
50	1,00	0,98	0,95	1,00
80	0,90	1,00	1,00	0,96
100	0,70	1,00	1,00	0,89

Puntos de corte para NGAL en orina a las 4 h (ng/ml)	Sensibilidad	Especificidad	Valor predictivo positivo	Valor predictivo negativo
25	1,00	0,96	0,91	1,00
50	0,95	1,00	0,95	0,98
80	0,70	1,00	1,00	0,89
100	0,65	1,00	1,00	0,88
Puntos de corte para NGAL en suero a las 2 h (ng/ml)	Sensibilidad	Especificidad	Valor predictivo positivo	Valor predictivo negativo
25	0,70	0,94	0,82	0,89
50	0,50	1,00	1,00	0,84
80	0,20	1,00	1,00	0,76

NGAL se expresa normalmente a niveles muy bajos en varios tejidos humanos, incluyendo riñón, tráquea, pulmones, estómago y colon (Cowland *et al*, Genomics 1997;45:17- 23.). La expresión de NGAL está notablemente inducida en epitelios lesionados. Por ejemplo, Las concentraciones de NGAL están elevadas en el suero de pacientes con infecciones bacterianas agudas, el esputo de sujetos con asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica y el líquido bronquial del pulmón con enfisema (Xu *et al*, Biochim Biophys Acta 2000;1482:298-307). La invención descrita en el presente documento surgió de observaciones en modelos animales de que NGAL es uno de los genes y proteínas más tempranos y más robustamente inducidos en el riñón después de lesión isquémica, y que NGAL se detecta fácilmente en la orina poco después de la isquemia. Véase Supavekin *et al*, Kidney Int 2003;63:1714-1724; Mishra *et al*, J Am Soc Nephrol 2003; 4:2534-2543; y Devarajan *et al*, Mol Genet Metab 2003;80:365-376. En el riñón postisquémico, NGAL está notablemente regulado positivamente en varios segmentos de nefrona y la proteína se acumula predominantemente en túbulos proximales donde se colocaliza con células epiteliales en proliferación. Estos hallazgos sugieren que NGAL puede ser expresada por el túbulo dañado para inducir la reepitelización. En apoyo de esta hipótesis está la reciente identificación de NGAL como un regulador de la morfogénesis epitelial en células de túbulos de riñón cultivadas y como una proteína de transporte de hierro durante la nefrogénesis (Gwira *et al*, J Biol Chem 2005 y Yang *et al*, Mol Cell 2002;10:1045-1056). Se sabe bien que el suministro de hierro a células es crucial para el crecimiento y desarrollo celular, y esto es supuestamente también crítico para la regeneración renal después de lesión isquémica. De hecho, hallazgos recientes indican que NGAL administrado de forma exógena alivia la lesión renal aguda isquémica en ratones desviando el equilibrio del destino de células tubulares hacia la supervivencia (Mishra *et al*, J Am Soc Nephrol 2004;15:3073-3082). Por tanto, NGAL ha surgido como un protagonista central en el campo de la IRA, no solamente como un biomarcador novedoso sino también como una maniobra terapéutica innovadora.

Aunque el diagnóstico urinario tiene varias ventajas, incluyendo la naturaleza no invasiva de la recogida de muestras y las relativamente pocas proteínas interferentes, también existen algunas desventajas. Estas incluyen la dificultad para obtener muestras de orina de pacientes con oliguria grave, los cambios potenciales en la concentración de biomarcadores en orina inducidos por el estado general de líquidos y terapia diurética, y el hecho de que varios biomarcadores urinarios han mostrado en el pasado sensibilidad o especificidad insuficiente (Rabb H. Am J Kidney Dis 2003;42:599-600.). El diagnóstico basado en suero ha revolucionado la medicina de cuidados intensivos. Ejemplos recientes incluyen la medición de troponinas para el diagnóstico temprano de e intervenciones oportunas en infarto agudo de miocardio y el valor de pronóstico de péptido natriurético de tipo B en pacientes con síndrome coronario agudo (Hamm *et al*, N Eng J Med 1997;337:1648-1653; y De Lemos *et al*, N Engl J Med 2001;345:1014-

1021). Hasta donde alcanza el conocimiento de los inventores, NGAL es el único biomarcador que se ha examinado tanto en suero como en orina para el diagnóstico temprano de lesión renal isquémica.

5 Los métodos y el uso de la invención son comparables a o superan la utilidad de varios otros biomarcadores para  
lesión renal isquémica, tales como los analizados en Hewitt *et al.*, J Am Soc Nephrol 2004;15:1677-1689; Herget-  
Rosenthal *et al.*, Kidney Int 2004;66:1115-1122; y Rabb, Am J Kidney Dis 2003;42:599-600). La mayoría de estudios  
presentados hasta la fecha han sido retrospectivos, han examinado biomarcadores en la fase establecida de IRA y  
se han restringido a solamente la orina y a solamente un método de detección. Se han medido en la orina varias  
10 proteínas tubulares, con resultados conflictivos e insatisfactorios (Westhuyzen *et al*, Nephrol Dial Transplant  
2003;18:543-551; Herget-Rosenthal *et al*, Clin Chem 2004;50:552-558; Han *et al*, Kidney Int 2002;62:237-244). La  
molécula de lesión de riñón 1 (KIM-1), una molécula de adhesión específica de riñón novedosa, es detectable  
mediante ELISA en la orina de pacientes con necrosis tubular aguda establecida. Además, se ha mostrado mediante  
transferencias Western que la isoforma 3 del intercambiador de hidrógeno y sodio (NHE3) aumenta en las fracciones  
15 de membrana de sujetos con IRA establecida (du Cheyron *et al.*, Am J Kidney Dis 2003;42:497-506). Sin embargo,  
la sensibilidad y especificidad de estos biomarcadores para la detección de lesión renal no se ha indicado. De las  
citocinas inflamatorias implicadas en IRA, se han demostrado niveles elevados de IL-6, IL-8 e IL-18 en pacientes con  
función de injerto retardada después de trasplantes de riñón procedente de cadáver (35, 36). Con la excepción de  
NGAL, ninguno de los biomarcadores se ha examinado de forma prospectiva para determinar su aparición en la  
orina durante la evolución de IRA isquémica. Un estudio prospectivo reciente ha demostrado que un aumento de  
20 cistatina C en suero precede al aumento de creatinina en suero en una población de pacientes seleccionada en alto  
riesgo de desarrollar IRA (Herget-Rosenthal *et al.*, Kidney Int 2004;66:1115-1122). Sin embargo, la IRA en estos  
sujetos fue multifactorial, debido a una combinación de etiologías isquémicas, prerrenales, nefrotóxicas y sépticas.  
Asimismo, ya que la cistatina C es principalmente un marcador de la tasa de filtración glomerular (TFG), puede  
inferirse que los niveles de cistatina C en suero aumentarán solamente después de que la TFG comience a  
25 descender. Por otro lado, NGAL se induce rápidamente en las células de túbulo del riñón en respuesta a lesión  
isquémica, y su aparición temprana en la orina y el suero es independiente de la TFG, pero es altamente predictiva  
de un descenso de TFG que puede producirse varios días después. Un pequeño aumento transitorio de NGAL en  
orina y suero en pacientes que no desarrollaron IRA fue coherente con observaciones previas de que la cirugía de  
derivación cardiopulmonar conduce a la liberación de NGAL a la circulación, probablemente de forma secundaria a  
30 la activación inflamatoria de leucocitos iniciada por el circuito extracorpóreo (Herget-Rosenthal *et al.*, Kidney Int  
2004;66:1115-1122).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para la detección de aparición temprana de lesión de células tubulares renales (LCTR) que comprende detectar en muestras de suero sanguíneo tomadas de un paciente a intervalos seleccionados, un aumento de los niveles de NGAL que preceden al aumento de la creatinina en suero, poniendo en contacto muestras de suero sanguíneo con un anticuerpo para NGAL para permitir la formación de un complejo del anticuerpo y NGAL y detectando el complejo de anticuerpo-NGAL.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en donde la detección de LCTR se produce en las primeras 24 horas de aparición.
- 15 3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en donde la LCTR resulta de la administración de nefrotoxinas, incluyendo antibióticos, agentes antiinflamatorios, agentes de radiocontraste y agentes quimioterapéuticos.
- 20 4. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en donde la LCTR es una LCTR que se desarrolla a insuficiencia renal aguda (IRA) y es el resultado de que el paciente haya recibido un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en cirugía cardíaca, cirugía de derivación cardiopulmonar, cirugía vascular, administración de un agente nefrotóxico y trasplante de riñón, o basándose en tener una afección seleccionada del grupo que consiste en lesión renal isquémica, alteración de la función cardíaca, ictus, traumatismo, septicemia, deshidratación, acontecimientos cardiovasculares y una lesión renal nefrotóxica.
- 25 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el método comprende además comparar un nivel detectado de NGAL en una muestra con un nivel de NGAL seleccionado para identificar que la LCTR puede progresar a insuficiencia renal aguda (IRA), en donde cuando el nivel detectado de NGAL es mayor que dicho nivel seleccionado de NGAL, el paciente se identifica como predisuesto a progresar a IRA como resultado de la LCTR.
- 30 6. El método según la reivindicación 5, en donde el nivel de NGAL seleccionado para identificar que LCTR puede progresar a IRA está por encima del nivel de NGAL detectado en suero sanguíneo obtenido de voluntarios sanos.
- 35 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para supervisar el progreso de un tratamiento o una intervención, en donde una reducción del nivel en suero sanguíneo de NGAL corresponde a un grado de mejora de la LCTR.
- 40 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la detección temprana de la aparición de LCTR reduce el tiempo para el tratamiento de la lesión y reduce el riesgo de desarrollar IRA clínica.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además evaluar el alcance de la lesión renal, en donde el alcance de la lesión renal se basa en una relación proporcional entre el alcance de la lesión y la cantidad de NGAL presente en el suero sanguíneo del sujeto.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las muestras de suero sanguíneo tomadas de un paciente a intervalos seleccionados comprenden una muestra obtenida antes del tratamiento para determinar una medida inicial para un individuo.



Figura 1

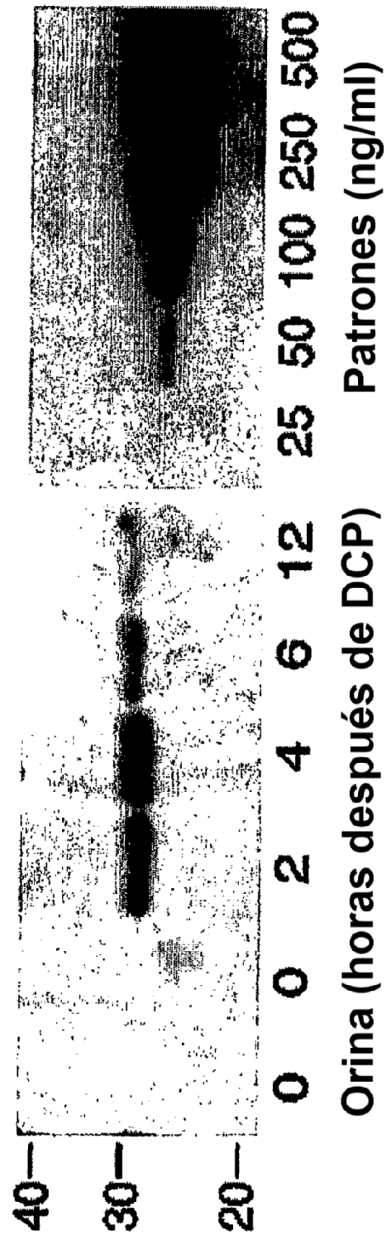


Figura 2

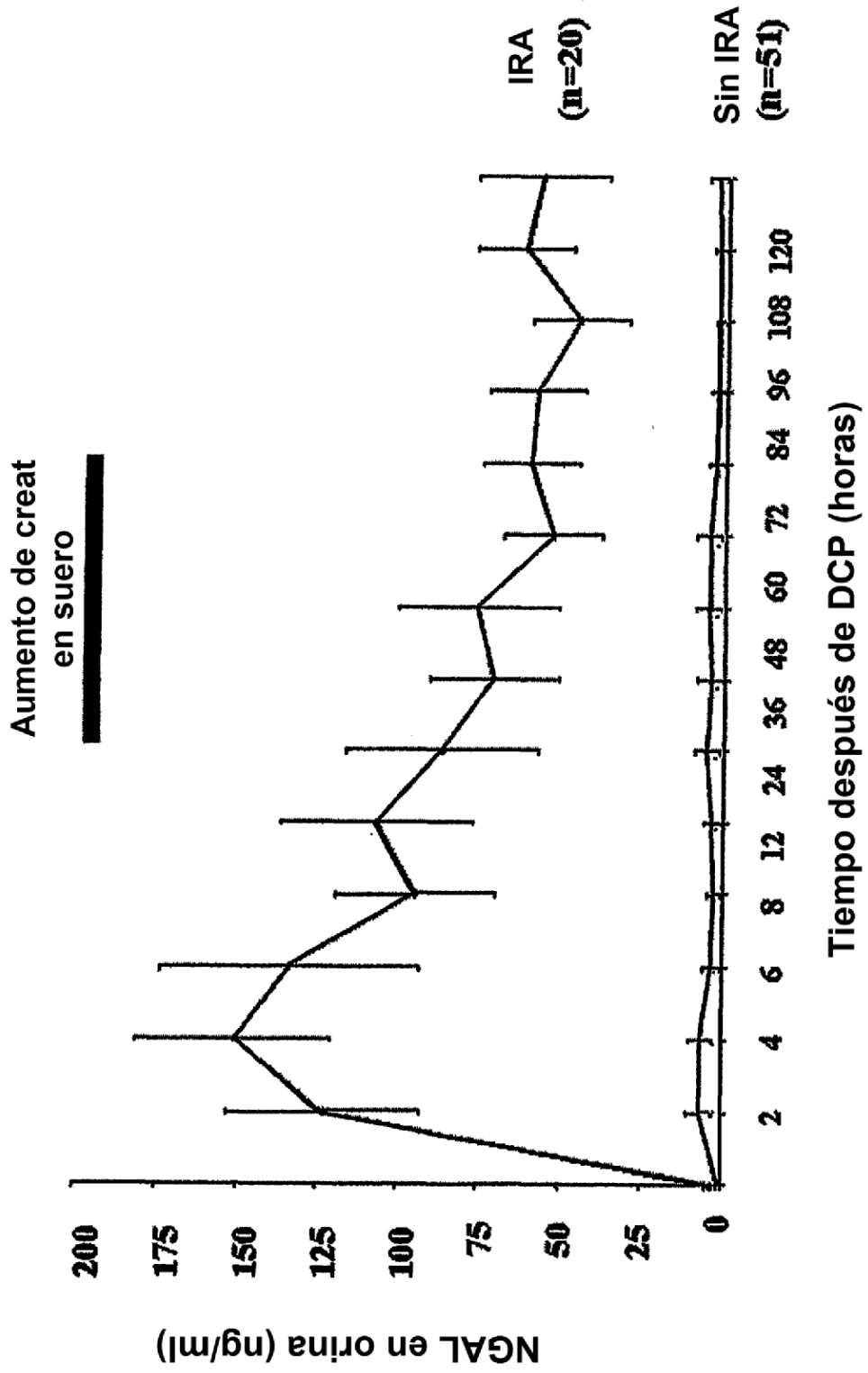


Figura 3

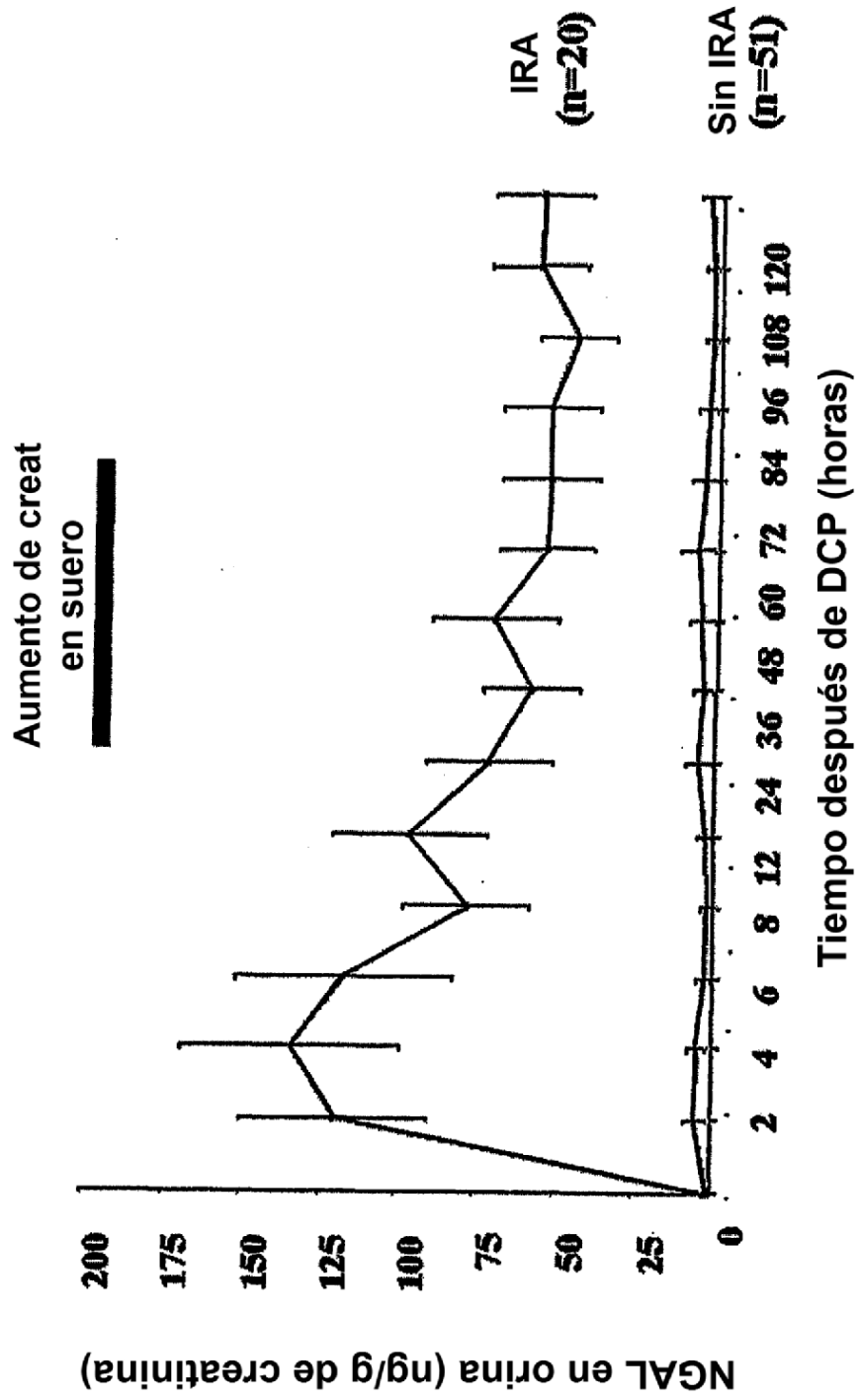


Figura 4

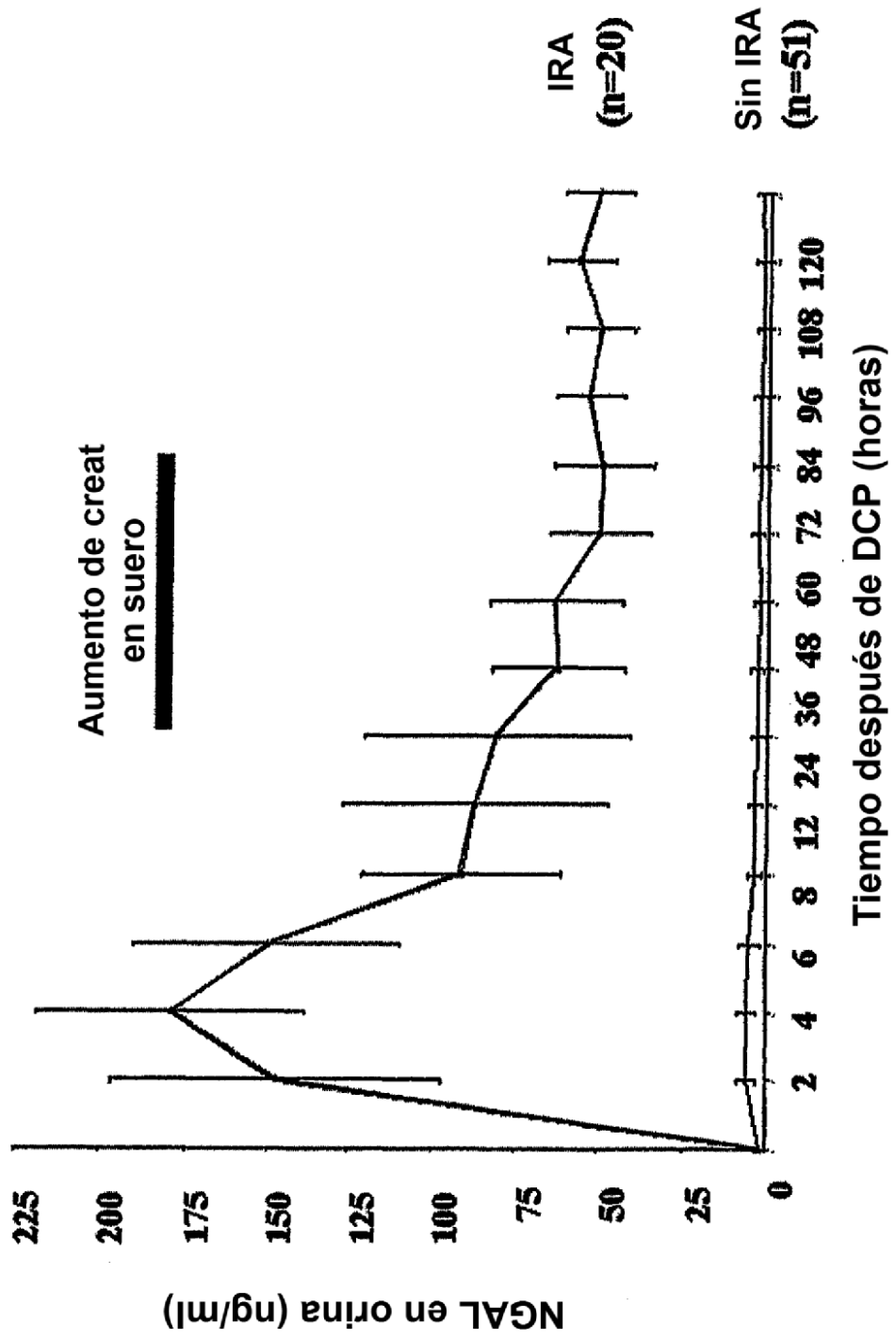


Figura 5

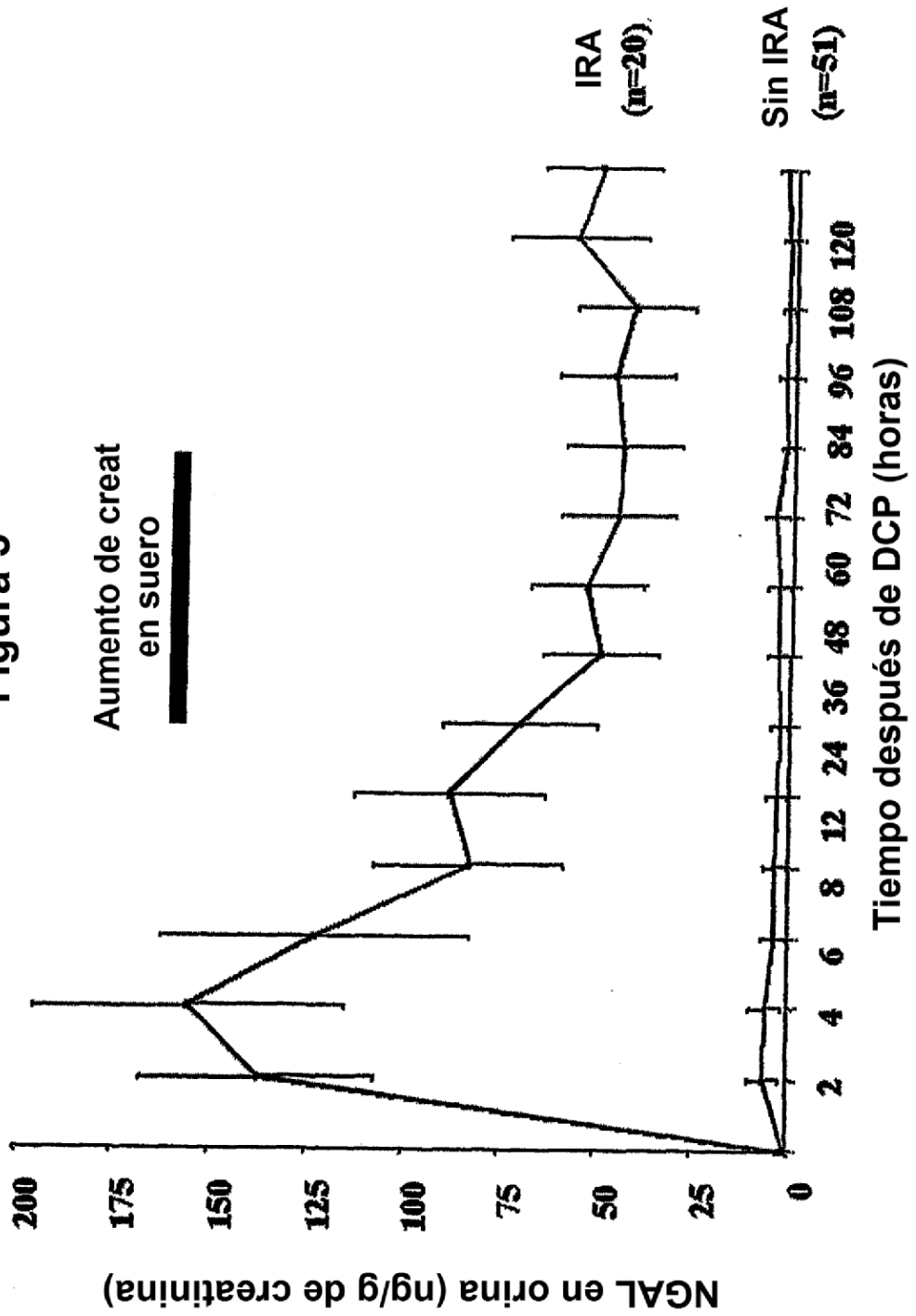


Figura 6

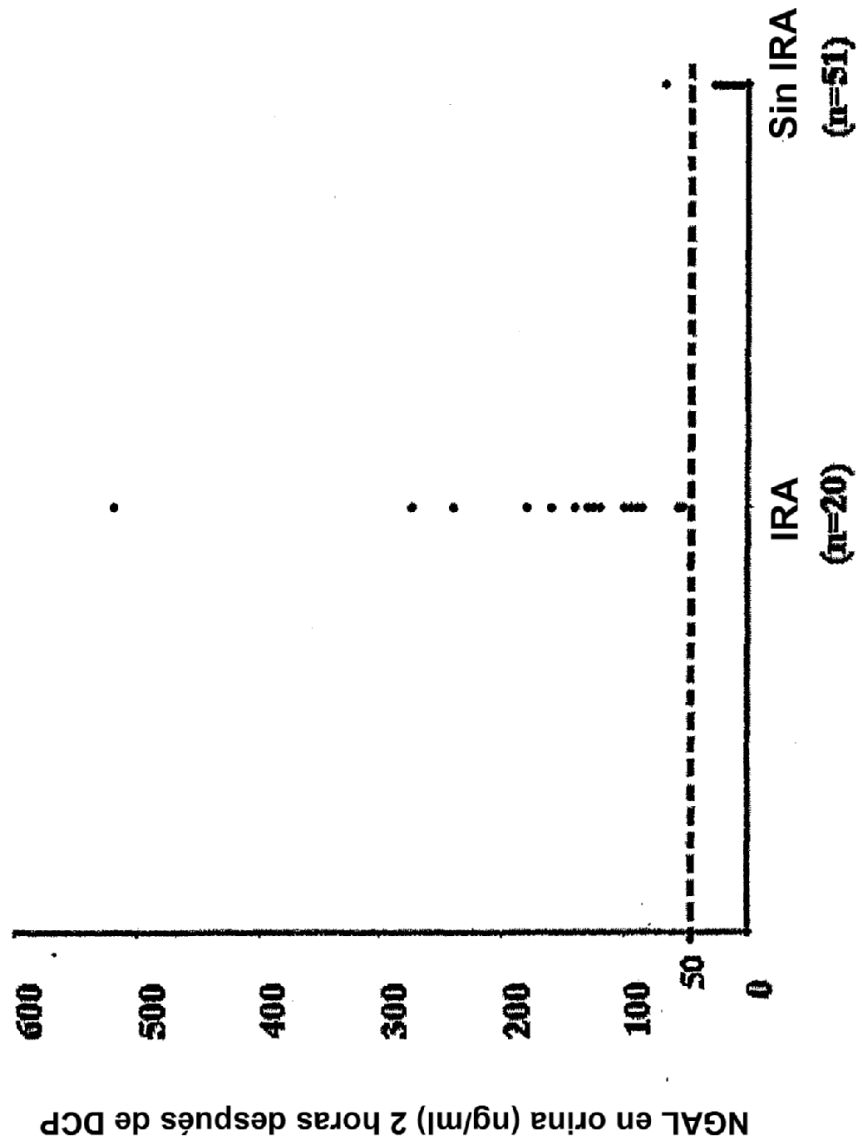


Figura 7

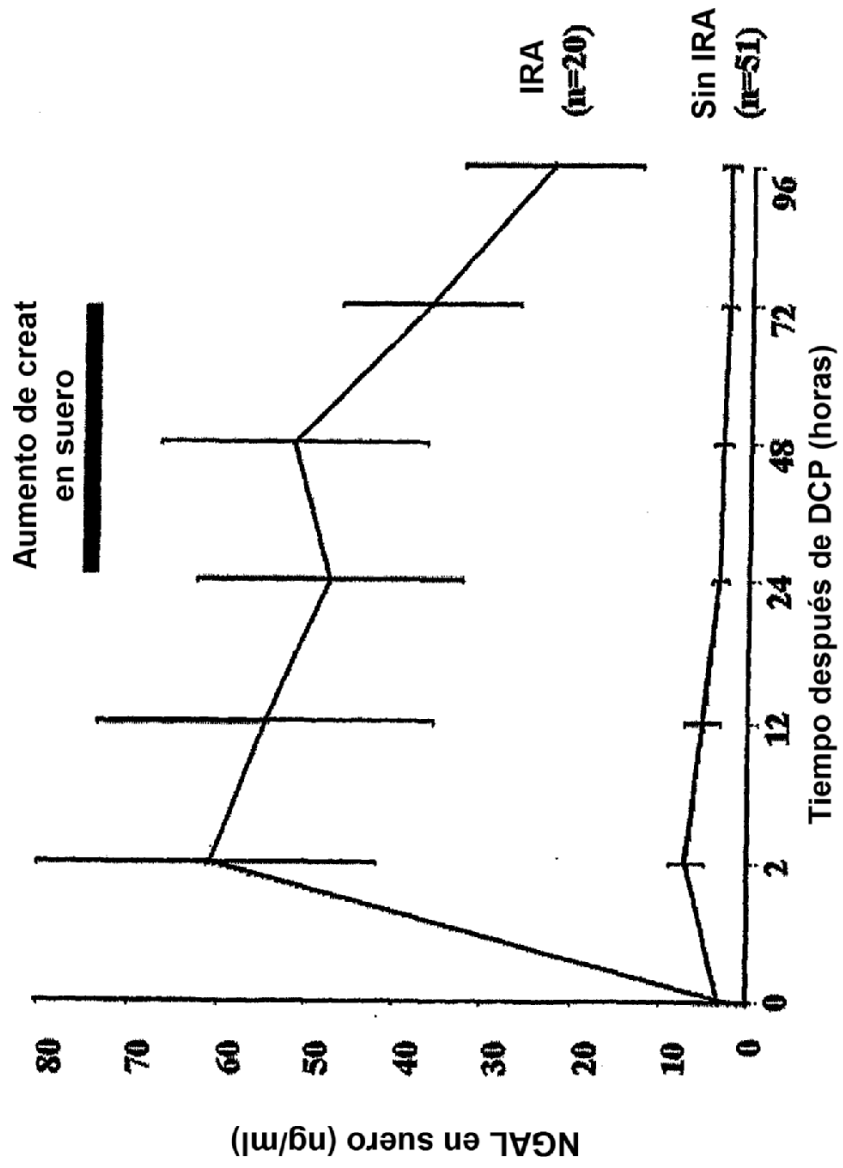
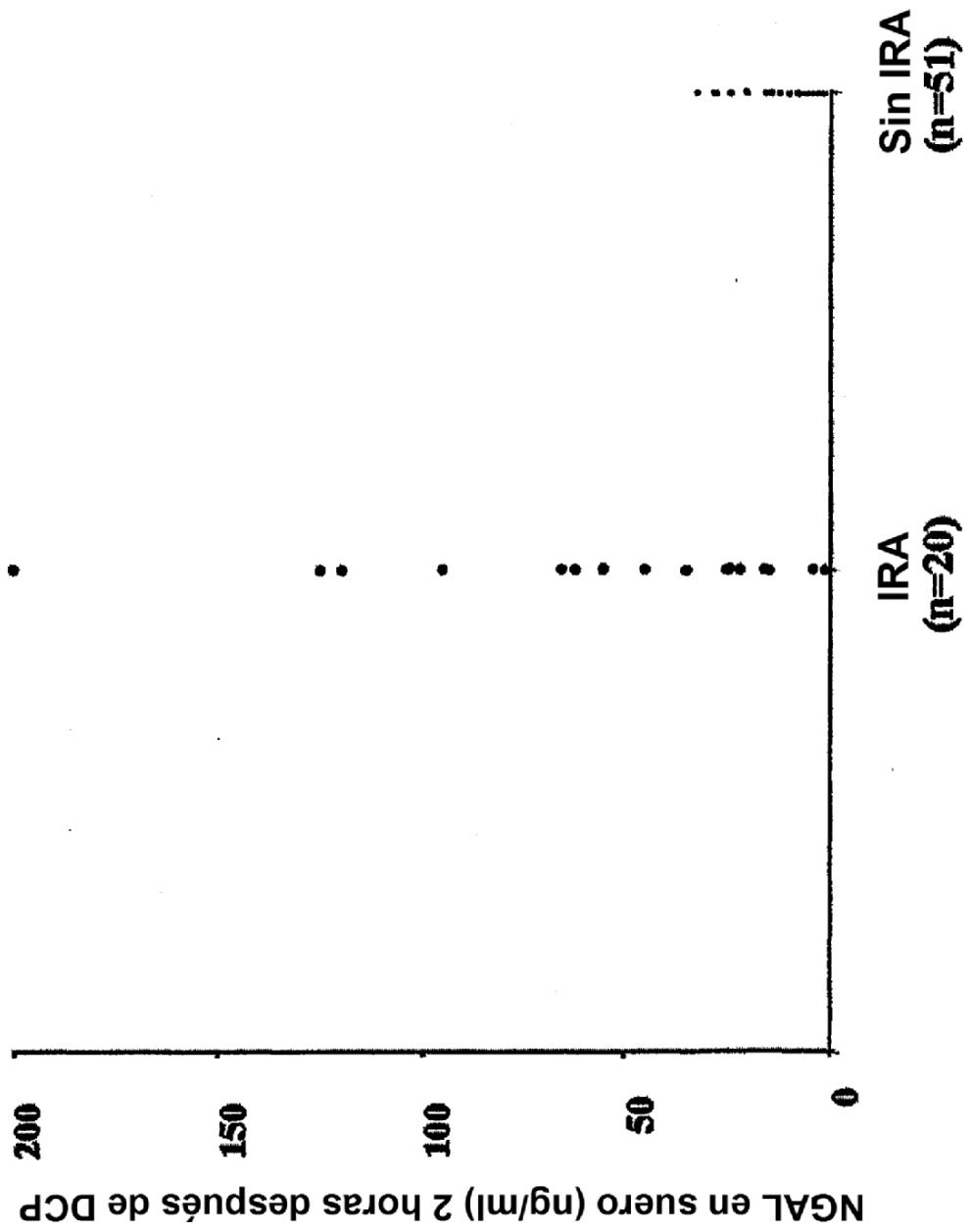


Figura 8





**Figura 9**  
ROC para NGAL en orina a las dos horas después de DCP

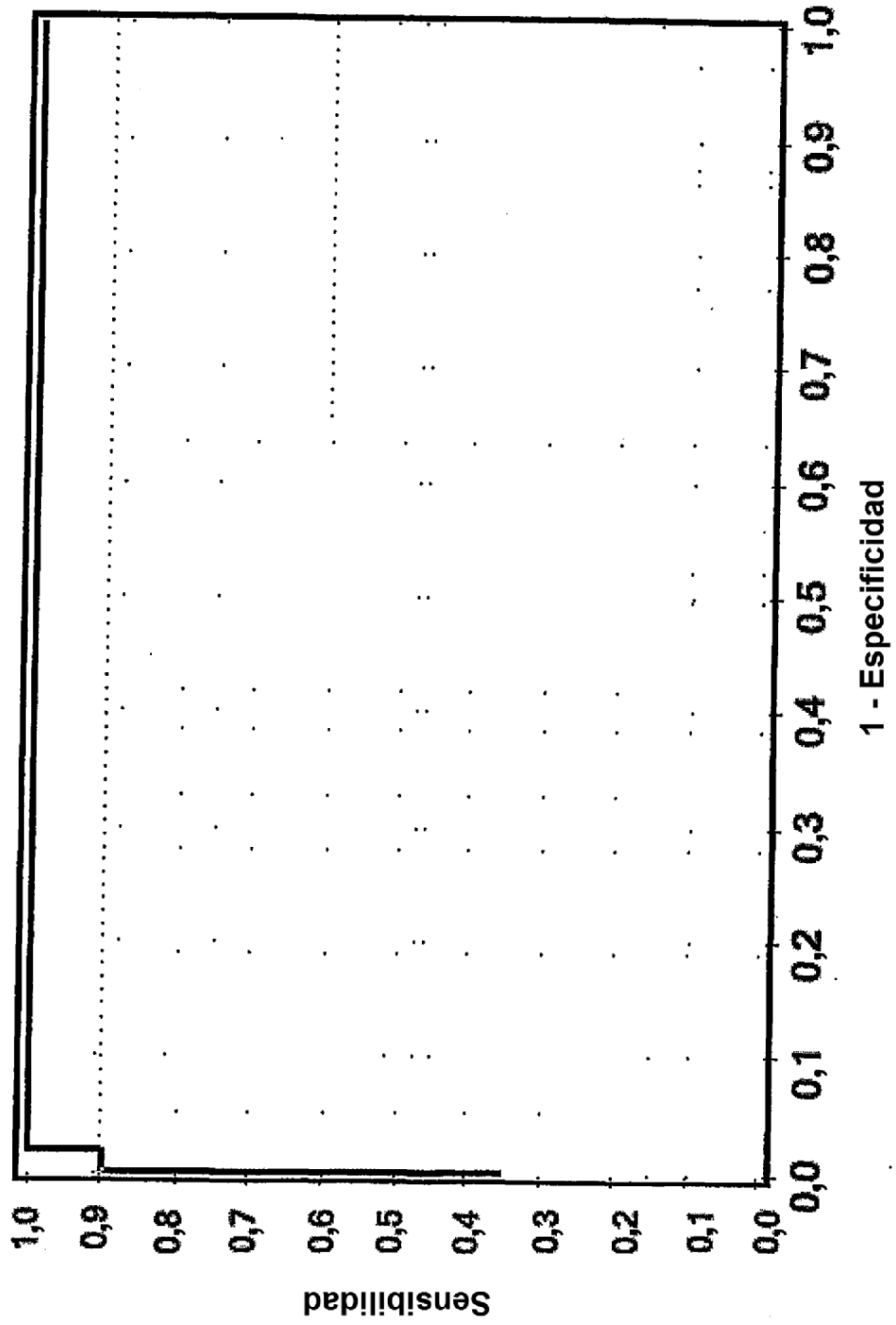


Figura 10

