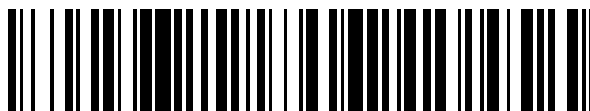


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 463**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/541 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2004** **E 08169401 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019** **EP 2083270**

54 Título: **Un método y kit para la detección de la instauración precoz de la lesión de células tubulares renales**

30 Prioridad:

27.03.2003 US 458143 P

04.11.2003 US 481596 P

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

31.01.2020

73 Titular/es:

CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER
(50.0%)

3333 Burnet Avenue

Cincinnati, Ohio 45229, US y

THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY
(50.0%)

72 Inventor/es:

DEVARAJAN, PRASED y
BARASCH, JONATHAN M.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 739 463 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

Un método y kit para la detección de la instauración precoz de la lesión de células tubulares renales

5 **Antecedentes**

10 El fallo renal agudo (FRA) secundario a una lesión de las células tubulares renales, incluyendo una lesión isquémica o una lesión nefrotóxica, sigue siendo un problema común y potencialmente devastador en medicina clínica y en nefrología, con un índice persistentemente alto de mortalidad y de morbilidad a pesar de los avances significativos en el cuidado de soporte. Estudios pioneros realizados a lo largo de varias décadas han arrojado luz sobre los papeles de la vasoconstricción persistente, la obstrucción tubular, las alteraciones celulares estructurales y metabólicas y la respuesta inflamatoria en la patogenia del FRA. Aunque estos estudios han sugerido posibles aproximaciones terapéuticas en modelos animales, los esfuerzos de investigación sobre la traducción en humanos han dado resultados decepcionantes. Las razones de esto pueden incluir la respuesta multifacética del riñón a la lesión isquémica y a las nefrotoxinas y una escasez de biomarcadores precoces para el FRA con un retraso resultante en el inicio de la terapia.

20 Se considera que un individuo tiene fallo renal agudo cuando el valor de creatinina en el suero del paciente: (1) o bien aumentó en al menos 0,5 mg/dL cuando el nivel basal de creatinina en suero era inferior a 2,0 mg/dL; (2) o bien aumentó en al menos 1,5 mg/dL cuando el nivel basal de creatinina en suero era superior o igual a 2,0 mg/dL; (3) o bien aumentó en al menos 0,5 mg/dL, independientemente del nivel basal de creatinina en suero, como consecuencia de la exposición a agentes radiográficos.

25 Se cree que la introducción de la terapia en un momento precoz del proceso morboso reducirá el índice de mortalidad asociado al FRA y acortará el tiempo para el tratamiento de diversos tipos de lesiones de las células tubulares renales, incluyendo, aunque sin limitación, lesiones renales isquémicas y nefrotóxicas. La identificación de un biomarcador precoz fiable para una lesión de las células tubulares renales sería de utilidad para facilitar la intervención terapéutica precoz y ayudaría a guiar el desarrollo farmacéutico al proporcionar un indicador de nefrotoxicidad.

30 La aproximación tradicional de laboratorio para la detección de la enfermedad renal implicaba la determinación de la creatinina sérica, del nitrógeno ureico en sangre, del aclaramiento de la creatinina y de los electrolitos urinarios, el examen microscópico del sedimento urinario y estudios radiológicos. Estos indicadores no solo no son sensibles ni específicos, sino que tampoco permiten la detección precoz de la enfermedad. Ciertamente, aunque una elevación en la creatinina sérica es ampliamente considerada como el "estándar de oro" para la detección del FRA, está claro ahora que puede haberse perdido ya hasta un 50% de la función del riñón para cuando cambia la creatinina sérica.

35 Se han descrito con anterioridad unos cuantos biomarcadores urinarios para la lesión renal isquémica, incluyendo la molécula-1 de lesión renal (KIM-1) y la proteína 61 rica en cisteína (Cyr61). KIM-1 es una molécula de adhesión putativa implicada en la regeneración renal. En un modelo en rata de lesión por isquemia-reperusión, se vio que KIM-1 sufría una regulación por incremento 24-48 horas después de la agresión inicial, lo que hizo de ella un marcador fiable, aunque algo tardío, de la lesión de las células tubulares. Estudios recientes han mostrado que KIM-1 puede ser detectada en la biopsia renal y en la orina de pacientes con necrosis tubular aguda isquémica. Sin embargo, esta detección fue documentada en pacientes con lesión renal isquémica establecida, en un momento avanzado del curso de la enfermedad. La utilidad de la medición de KIM-1 en orina para la detección del FRA precoz o de la lesión renal subclínica no ha sido validada hasta la fecha.

40 Se vio que la proteína Cyr61 era una proteína rica en cisteína segregada detectable en la orina 3-6 horas después de la lesión renal isquémica en modelos animales. Sin embargo, esta detección requería una etapa de purificación por bioafinidad y concentración con perlas de heparina-sefarosa, seguida de un protocolo de transferencia Western. Incluso después de la purificación por bioafinidad, eran aparentes varios péptidos no específicos de reacción cruzada. Así, la detección de Cyr61 en la orina es problemática con respecto a la especificidad, así como a la naturaleza engorrosa del procedimiento.

45 50 55 Yan li et al. desvelan "The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL" publicado en Journal of Biological Chemistry 2001; 276;40: 37258-65 que NGAL está presente en la orina de pacientes con cáncer renal y de vejiga. Matthaues et al. desvelan en "Acute ischemic renal failure induces expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and matrix metalloproteinase-9 in damaged tubuli" publicado en Kidney and Blood Pressure Research 2001; 24: 342 y en "Co-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and matrix metalloproteinase-9 in the postischemic rat kidney" publicado en Journal of the American Society of Nephrology 2001; 12: 787A que la expresión de la proteína NGAL se ha detectado por transferencia Western en túbulo proximales dañados después de insuficiencia renal isquémica aguda. Blaser et al desvelan en "A sandwich enzyme immunoassay for the determination of neutrophil lipocalin in body fluids" publicado en Clinica Chimica Acta 1995; 235;2: 137-145 que NGAL es detectable en la orina de sujetos sanos. Por lo tanto, se mantiene una necesidad urgente de identificar biomarcadores mejorados para las lesiones renales isquémicas y nefrotóxicas precoces.

Resumen

5 La presente divulgación se relaciona con un método para la detección de una lesión de las células de los túbulos renales en un mamífero, que comprende las etapas de: 1) obtener una muestra de orina de un sujeto mamífero; 2) poner en contacto una muestra de orina con un anticuerpo para un biomarcador de lesión de células de los túbulos renales, comprendiendo el biomarcador de lesión de las células de los túbulos renales NGAL, para permitir la formación de un complejo del anticuerpo y el biomarcador de lesión de las células de los túbulos renales; y 3) detectar el complejo anticuerpo-biomarcador.

10 La presente divulgación se refiere a un método de monitorización de la eficacia de un tratamiento para la lesión de células de los túbulos renales que comprende las etapas de 1) proporcionar un tratamiento a un sujeto mamífero que experimenta lesión renal isquémica; 2) obtener al menos una muestra de orina posterior al tratamiento del sujeto; y 3) detectar la presencia de un biomarcador para la lesión de las células de los túbulos renales en la muestra de orina post-tratamiento.

15 La presente divulgación se refiere además a un kit para su uso en la detección de la presencia de un biomarcador de aparición inmediata o precoz para la lesión de las células de los túbulos renales en el fluido urinario de un sujeto, comprendiendo: 1) un medio para adquirir una cantidad de una muestra de orina; 2) un medio que tiene fijado al mismo un anticuerpo de captura capaz de complejarse con un biomarcador de lesión de las células de los túbulos renales, siendo el biomarcador NGAL; y 3) un ensayo para la detección de un complejo del biomarcador de lesión de células de los túbulos renales y el anticuerpo de captura.

20 La presente divulgación también se refiere a un kit de ensayo de inmunosorción ligado a enzimas competitivo (ELISA) para determinar el estado de lesión de las células de los túbulos renales de un sujeto mamífero, que comprende un primer anticuerpo específico a un biomarcador de lesión de células de los túbulos renales para detectar su presencia en una muestra de orina del sujeto.

30 La presente divulgación se refiere además a un método de identificación del grado de una lesión de las células de los túbulos renales provocada por un evento, que comprende: 1) obtener al menos una muestra de orina de un sujeto mamífero; 2) detectar en la muestra de orina la presencia de un biomarcador para la lesión de las células de los túbulos renales; y 3) determinar el grado de lesión de las células de los túbulos renales basándose en el tiempo para el comienzo de la presencia del biomarcador LRI en la muestra de orina, con respecto al tiempo del evento.

35 La presente divulgación se refiere además a un método para la detección de una lesión de las células de los túbulos renales en un mamífero, que comprende las etapas de: 1) obtener una muestra de orina que comprende hasta 1 mililitro de la primera orina de un sujeto mamífero siguiendo una lesión sospechada de las células de los túbulos renales; 2) poner en contacto la muestra de orina con un anticuerpo para un biomarcador para la lesión de las células de los túbulos renales, para permitir la formación de un complejo del anticuerpo y el biomarcador; y 3) detectar el complejo anticuerpo-biomarcador.

40 Un biomarcador de lesión de las células de los túbulos renales preferido es NGAL.

Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1 muestra la inducción del ARNm NGAL del riñón del ratón después de una isquemia. El panel superior muestra una RT-PCR representativa con cebadores para la actina y la NGAL de ratón usando ARN extraído de riñones de ratones control (C) o después de varios períodos de reperfusión según se muestra (horas). La banda M contiene un marcador estándar de peso molecular. El panel inferior muestra el múltiplo de aumento en la expresión del ARNm NGAL en varios tiempos con respecto al control (CON). Los valores obtenidos por micromatriz (línea continua) frente a RT-PCR (línea discontinua) son medias +/- SD de al menos 3 experimentos.

50 La Figura 2A muestra la inducción de la proteína NGAL del riñón del ratón después de una isquemia unilateral. El panel superior muestra una transferencia Western representativa con muestras de riñones enteros obtenidas de ratones control (Con) o después de períodos de reperfusión según se muestra (horas), sondeadas con un anticuerpo policlonal para NGAL o un anticuerpo monoclonal para la tubulina (para demostrar igual carga de proteína). Los marcadores de peso molecular están a la izquierda. El panel inferior muestra el múltiplo de aumento en la expresión de la proteína NGAL a varios tiempos con respecto al control (CON). Los valores obtenidos por densitometría son medias +/- SD de al menos 3 experimentos.

60 La Figura 2B muestra la inducción de la proteína NGAL del riñón del ratón tras una isquemia bilateral. El panel superior muestra una transferencia Western representativa con muestras de riñones enteros obtenidas de ratones control (Con) o después de períodos de reperfusión según se muestra (horas), sondeadas con un anticuerpo policlonal para NGAL o un anticuerpo monoclonal para la tubulina (para demostrar igual carga de proteína). Los marcadores de peso molecular están a la izquierda. El panel inferior muestra el múltiplo de aumento en la expresión de la proteína NGAL a varios tiempos con respecto al control (CON). Los valores obtenidos por densitometría son medias +/- SD de al menos 3 experimentos.

La Figura 3 muestra la inducción de la proteína NGAL del riñón del ratón después de una isquemia. Resultados de la inmunohistoquímica representativa sobre secciones congeladas de riñones de ratón obtenidas de ratones control o tras períodos variables de reflujo según se muestra (horas), sondeadas con un anticuerpo policlonal para NGAL. "G" indica un glomérulo. El panel del extremo de la derecha es un aumento 100X y los otros paneles están a 20X.

5 La Figura 4A muestra la detección precoz de la proteína NGAL en la orina de ratones con FRA isquémico unilateral. Transferencia Western representativa de muestras de orina sin procesar (1-2 μ l por banda, normalizados para el contenido en creatinina) obtenidas en períodos de reperfusión según se muestra (horas), tras clampaje unilateral de la arteria renal. Los marcadores de peso molecular son mostrados a la derecha. Se sondearon las transferencias con NGAL (superior) o β 2-microglobulina (Beta2-M) (centro). Determinaciones de la N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) en orina a diversos períodos de reperfusión según se indica, de cinco animales para cinco animales. Los valores son medias +/- SD. *P < 0,05 frente al control en cada período de tiempo, ANOVA.

15 La Figura 4B muestra la detección precoz de la proteína NGAL en la orina de ratones con FRA isquémico bilateral. Transferencia Western representativa de muestras de orina sin procesar (1-2 μ l por banda, normalizados para el contenido en creatinina) obtenidas en períodos de reperfusión según se muestra (horas) tras clampaje bilateral de la arteria renal. Los marcadores de peso molecular son mostrados a la derecha. Se sondearon las transferencias con NGAL (superior) o β 2-microglobulina (Beta2-M) (centro). Determinaciones de la N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) en orina a varios períodos de reperfusión según se indica, de cinco animales para ocho animales. Los valores son medias +/- SD. *P < 0,05 frente al control en cada período de tiempo, ANOVA.

25 La Figura 5 muestra la detección de la proteína NGAL en la orina de ratones con isquemia renal subclínica. Transferencia Western representativa de muestras de orina sin procesar (1-2 μ l por banda, normalizados para el contenido en creatinina) obtenidas en períodos de reperfusión según se muestra (horas) tras 5, 10 o 20 min. de clampaje bilateral de la arteria renal. Los marcadores de peso molecular son mostrados a la izquierda. Estos animales exhibían creatininas séricas normales a las 24 h de reflujo.

30 La Figura 6 muestra la detección precoz de la proteína NGAL en la orina de ratas con FRA isquémico. Transferencia Western representativa de muestras de orina sin procesar (1-2 μ l por banda, normalizados para el contenido en creatinina) obtenidas en períodos de reperfusión según se muestra (horas) tras 30 min. de clampaje bilateral de la arteria renal en ratas. Los marcadores de peso molecular son mostrados a la izquierda. Estos animales exhibían un aumento significativo en la creatinina sérica a las 24 h de reflujo.

35 La Figura 7 muestra la inducción del ARNm NGAL tras isquemia *in vitro*. El panel superior muestra una RT-PCR representativa con cebadores para la NGAL humana usando ARN extraído de células epiteliales de los túbulos proximales renales (RPTEC) después de varios períodos de depleción parcial de ATP como se muestra (horas). La banda M contiene una escalera de ADN de 100 pb. El panel central muestra el múltiplo de aumento en la expresión del ARNm NGAL a varios tiempos con respecto al control (0), normalizada para la expresión de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los valores mostrados son medias +/- SD de al menos 3 experimentos en cada punto. El panel inferior muestra una transferencia Western representativa (de tres experimentos independientes) con muestras de RPTEC después de varios períodos de depleción parcial de ATP según se muestra, obtenidas de iguales cantidades de pellas celulares (Pel) o del medio de cultivo (Sup), sondeadas con un anticuerpo policlonal para NGAL. Los marcadores de peso molecular están a la izquierda.

45 La Figura 8A muestra la detección precoz de la proteína NGAL en la orina en ratones con lesión inducida por cisplatina. Transferencias Western representativas sobre muestras de orina no procesadas (1-2 μ l por banda, normalizados para el contenido en creatinina) obtenidas los días mostrados después de la administración de cisplatina, sondeadas con anticuerpo para β -2-microglobulina (panel superior) y NGAL (panel central). Los marcadores de peso molecular son mostrados a la izquierda.

50 La Figura 8B muestra las determinaciones de NAG en orina a distintos días tras la administración de cisplatina (n=4) en la Figura 8A. Los valores son medias +/- SD. *P < 0,05 frente al día 0.

55 La Figura 9 muestra que la administración de cisplatina da lugar a necrosis y apoptosis de las células tubulares. La tinción con hematoxilina-eosina mostró dilatación tubular, detritos lumbales y epitelio aplanado en los riñones tratados con cisplatina (panel central superior). A gran aumento, un túbulo marcado con un asterisco exhibía núcleos condensados intensamente teñidos (flecha), indicativos de apoptosis (panel superior derecho). Tinción TUNEL que muestra núcleos positivos a TUNEL en riñones tratados con cisplatina (panel central inferior). A gran aumento, el túbulo indicado por un asterisco exhibía núcleos fragmentados condensados (flecha) característicos de apoptosis (panel inferior derecho). Los paneles marcados como Gran Aumento corresponden a un aumento de 100X y los otros de 20X. Los resultados en ratones control son mostrados en los paneles superior e inferior izquierdos.

65 La Figura 10 muestra que la administración de cisplatina da lugar a una rápida inducción de la NGAL renal. Transferencias Western representativas de lisados de riñón de ratones tratados con cisplatina intraperitoneal (20 μ g/kg) y obtenidas a varios tiempos según se indica (horas), sondeadas con un anticuerpo policlonal para NGAL o un anticuerpo monoclonal para la tubulina. Los marcadores de peso molecular están a la izquierda.

5 La Figura 11 muestra que la administración de cisplatina da lugar a una rápida inducción de NGAL en las células epiteliales tubulares. Resultados de inmunohistoquímica representativa sobre secciones congeladas de riñón de ratones tratados con cisplatina intraperitoneal (20 µg/kg) y obtenidas a varios tiempos según se indica (horas), sondeadas con un anticuerpo policlonal para NGAL. G, glomérulo. El panel marcado como HP está a un aumento de 100X y los otros de 20X.

10 La Figura 12 muestra que la administración de 20 µg/kg de cisplatina da lugar a una rápida aparición de NGAL en la orina. Transferencia Western representativa (panel superior) de muestras de orina no procesadas (3-5 µl/banda, normalizados para el contenido en creatinina) obtenidas antes o a varios tiempos después de las inyecciones de cisplatina como se muestra. Se analizaron las mismas muestras de orina en cuanto a la excreción de NAG (panel central) y se sometió el suero de los mismos animales a la medición de la creatinina (panel inferior). *P<0,05 frente al control.

15 La Figura 13 muestra que la administración de 5 µg/kg de cisplatina da lugar a la rápida aparición de NGAL en la orina. Transferencia Western representativa (panel superior) de muestras de orina sin procesar (3-5 µl/banda, normalizados para el contenido en creatinina) obtenidas antes o a varios tiempos después de las inyecciones de cisplatina como se muestra. Se analizaron las mismas muestras de orina en cuanto a la excreción de NAG (panel central) y se sometió el suero de los mismos animales a la medición de la creatinina (panel inferior). *P<0,05 frente al control.

20 La Figura 14 muestra la cuantificación de la NGAL urinaria después de la cisplatina. Tinción con Azul de Coomassie (CB) (panel superior izquierdo) y análisis de Quimioluminiscencia Aumentada (ECL) de cantidades conocidas de NGAL purificada recombinante (panel superior derecho). Cuantificación de la excreción de NGAL urinaria a varios tiempos después de cisplatina a 20 µg/kg o a 5 µg/kg, determinada por análisis densitométrico de transferencias Western y comparaciones con transferencias Western de patrones definidos de NGAL purificada realizadas en idénticas condiciones.

25 La Figura 15 muestra en el panel A la medición de la NGAL en orina en pacientes con trasplantes de riñones de cadáveres (CAD, n=4) frente a trasplantes de donantes vivos relacionados (LRD, n = 6) (p < 0,005). El panel B muestra una correlación entre el tiempo de isquemia fría y la NGAL urinaria en CAD (p < 0,001, r = 0,98, análisis de Spearman). El panel C muestra una correlación entre el pico de creatinina en suero y la NGAL urinaria en CAD (p < 0,001, r =0,96, análisis de Spearman).

30 La Figura 16 muestra en el panel A los resultados de mediciones seriadas de la NGAL urinaria en pacientes después de una cirugía a corazón abierto, representados frente al tiempo post-bypass en horas (n=15). El panel B muestra una correlación entre el tiempo de bypass y la NGAL urinaria a las 2 horas en pacientes que desarrollaron FRA (n = 5) (p< 0,01, r = 0,76, análisis de Spearman). El panel C muestra una correlación entre los cambios en la creatinina sérica y la NGAL urinaria a las 2 horas en pacientes que desarrollaron FRA (p < 0,01, r = 0,66, análisis de Spearman).

Descripción detallada de la invención

35 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier realización que no caiga dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención. En toda esta solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones y manuscritos no publicados entre paréntesis. Se puede encontrar una cita bibliográfica completa para estas referencias al final de esta solicitud, precediendo a las reivindicaciones.

40 La presente divulgación proporciona un método y la utilización de un kit para estudiar la presencia de un biomarcador de lesión de las células tubulares renales presente en la orina de un sujeto en la instauración precoz de una lesión de las células tubulares renales. La detección precoz de la instauración de la lesión puede reducir el tiempo para el tratamiento de la lesión y puede reducir el riesgo de desarrollar un fallo renal agudo (FRA) clínico. La lesión de las células tubulares renales puede incluir, pero no se limita a, una lesión renal isquémica (LRI) o lesión renal nefrotóxica (LRN).

45 Un kit simple para diagnóstico inmediato que use principios similares a los kits ampliamente utilizados de diagnóstico de gestación en orina para la rápida detección clínica de la NGAL urinaria permitirá al clínico diagnosticar rápidamente el FRA e instituir rápidamente medidas terapéuticas y preventivas de probada eficacia. El uso del kit puede representar el estándar de asistencia para todos los pacientes que tengan riesgo de desarrollar FRA, incluyendo el uso en cirugía cardíaca, trasplante de riñón, accidente cerebrovascular, traumatismo, sepsis, deshidratación y nefrotoxinas (antibióticos, agentes antiinflamatorios, agentes de radiocontraste y agentes quimioterapéuticos). En la práctica clínica actual, cuando se produce un FRA en el marco de estas condiciones predisponentes, el diagnóstico se ve muy retrasado y la mortalidad y morbilidad asociadas son inaceptablemente altas. Irónica, e incluso trágicamente, se dispone ampliamente de medidas preventivas y terapéuticas efectivas, pero casi nunca se administran de forma oportuna debido a la falta de biomarcadores precoces del FRA. Se anticipa que se harán indispensables múltiples mediciones seriadas de la NGAL no solo para el diagnóstico y la cuantificación de

la lesión renal inicial, sino también para seguir la respuesta al tratamiento precoz y para predecir el resultado a largo plazo.

5 El biomarcador para la lesión de las células tubulares renales (al que también se hará referencia como biomarcador RTCI) puede ser un biomarcador RTCI inmediato, tales como la NGAL, que puede aparecer en la orina en las 2 horas de la instauración de la lesión de las células tubulares renales. Un biomarcador RTCI inmediato puede, como en el caso de la NGAL, estar presente en la primera producción de orina de un sujeto inmediatamente después de instaurarse la lesión de las células tubulares renales. El biomarcador RTCI puede ser también un biomarcador RTCI de instauración precoz que puede aparecer en las primeras 24 horas de la aparición de la lesión de las células tubulares renales. Como tal, la NGAL es el biomarcador RTCI de instauración precoz.

15 Un biomarcador RTCI efectivo es típicamente una proteína segregada, por lo cual puede ser segregado por el riñón a la orina. Un biomarcador RTCI efectivo es también típicamente una proteína resistente a proteasas, tales como la NGAL. Sin embargo, un biomarcador RTCI también puede ser una proteína sensible a proteasas, tanto como para que los fragmentos estables de la proteína puedan detectarse en la orina, tales como por los anticuerpos como se describen en lo sucesivo en el presente documento para la NGAL.

20 El biomarcador RTCI 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.

25 El método de la presente divulgación puede ser usado para detectar la instauración de una lesión de las células tubulares renales y para monitorizar su tratamiento, para una amplia variedad de sucesos que pueden incluir todas las variedades de suministro sanguíneo disminuid a los riñones, función cardíaca alterada, procedimientos quirúrgicos, pacientes en unidades de cuidados intensivos y la administración de productos farmacéuticos, tintes de radiocontraste u otras sustancias medicamentosas a un sujeto. La lesión de las células de los túbulos renales puede ser una lesión renal isquémica, una lesión renal nefrotóxica u otra lesión que afecte a las células de los túbulos del riñón. El evento puede incluir la administración o la ingesta de una gran y amplia diversidad de nefrotoxinas, incluyendo, pero no limitado a quimioterapia contra el cáncer (cisplatina, ciclofosfamida, isosfamida, metotrexato), 30 antibióticos (gentamicina, vancomicina, tobramicina), agentes antifúngicos (anfotericina), agentes anti-inflamatorios (AINE), inmunosupresores (ciclosporina, tacrolimo) y agentes de radiocontraste. El método puede usarse para evaluar la nefrotoxicidad tanto de compuestos desarrollados nuevamente como bien conocidos.

35 La presente divulgación proporciona también un método y un kit para valorar el grado de lesión renal en base a una relación proporcional entre el grado de lesión, que puede variar desde la misma instauración de la lesión de las células tubulares renales hasta el FRA clínico, y la cantidad de NGAL presente en la orina que produce el sujeto. La presente divulgación proporciona un medio para que un clínico estime el grado de lesión renal en una valoración inicial y monitorice el cambio en el estado de la lesión (empeoramiento, mejoría o sin alteración) en base a la cantidad detectada de NGAL en la orina.

40 Típicamente, el clínico establecerá un protocolo de recogida y análisis de una cantidad de muestra de orina fresca del paciente a intervalos seleccionados. Típicamente, se obtiene la muestra intermitentemente durante un período prescrito. El período de tiempo entre la toma intermitente de muestras puede estar dictado por la condición del sujeto y puede variar desde una muestra cada 24 horas hasta una muestra tomada de forma continua, más típicamente desde cada 4 horas hasta cada 30 minutos.

50 Utilizando los métodos y técnicas aquí descritos, se puede analizar y estimar un nivel cualitativo del biomarcador RTCI presente en la orina y se puede analizar y medir un nivel cuantitativo de biomarcador RTCI presente en la orina. El clínico seleccionará el método cualitativo, el método cuantitativo o ambos dependiendo del estado del paciente. Típicamente, la cantidad de orina que se ha de recoger es menor de 1 mililitro y más típicamente menor de 10 μ l. Una muestra típica puede variar entre aproximadamente 1 μ l y aproximadamente 1 ml. Típicamente, se usan las cantidades mayores de muestra de orina (aproximadamente 1 ml) para los ensayos cuantitativos. Típicamente, estas pequeñas cantidades de orina pueden ser fácilmente conseguidas de sujetos clínicos que o bien son propensos a desarrollar FRA o bien han desarrollado FRA.

55 Una vez se ha detectado una indicación de lesión de células tubulares renales o de fallo renal agudo y se ha iniciado la intervención y el tratamiento de la enfermedad o condición, el clínico puede emplear el método y el kit de la presente divulgación para monitorizar el progreso del tratamiento o de la intervención. Típicamente, se tomarán a continuación una o más muestras de orina posteriores al tratamiento y se analizarán en cuanto a la presencia del biomarcador RTCI a medida que se comienza y continúa el tratamiento de la lesión renal. Se continúa el tratamiento hasta que no se detecta la presencia de biomarcador RTCI en posteriores muestras de orina después del tratamiento. A medida que el tratamiento y la intervención mejoran la condición, se reducirán correspondientemente la expresión del biomarcador RTCI y su presencia en la orina. El grado de mejoría se expresará por un nivel correspondientemente reducido de biomarcador RTCI, tal como NGAL, detectado en una muestra. A medida que la 60 lesión renal se aproxima a una completa curación, el método puede ser usado para detectar la completa ausencia del biomarcador RTCI, lo que señala que se ha completado el curso de tratamiento.

Son útiles tanto anticuerpos monoclonales como policlonales que se unan a un biomarcador RTCI en los métodos y kits de la presente divulgación. Se pueden preparar los anticuerpos por métodos conocidos en la técnica. Se describen anticuerpos monoclonales para un biomarcador RTCI preferido, NGAL, por ejemplo, en "Characterization of two ELISAs for NGAL, a newly described lipocalin in human neutrophils", Lars Kjeldsen y col. (1996), Journal of Immunological Methods, Vol. 198, 155-16. Se pueden obtener ejemplos de anticuerpos monoclonales para NGAL de la Antibody Shop, Copenhagen, Dinamarca, como HYB-211-01, HYB-211-02 y NYB-2H-05. Típicamente, se pueden usar HYB-211-01 y HYB-211-02 con NGAL en sus formas tanto reducida como no reducida. Se describe un ejemplo de un anticuerpo policlonal para NGAL en "An Iron Delivery Pathway Mediated by a Lipocalin", Jun Yang y col., Molecular Cell, (2002), Vol. 10, 1045-1056. Para preparar este anticuerpo policlonal, se inmunizaron conejos con proteína NGAL recombinante filtrada por gel. Se incubaron los sueros con perlas de GST-Sefarosa 4B para eliminar los contaminantes, obteniéndose los anticuerpos policlonales en el suero, según describen los solicitantes en Jun Yang y col., Molecular Cell (2002).

15 Típicamente, la etapa de detección del complejo del anticuerpo de captura y el biomarcador RTCI consiste en poner en contacto el complejo con un segundo anticuerpo para detectar el biomarcador.

El método de detección del complejo del biomarcador RTCI y el anticuerpo primario consiste en las etapas siguientes: separar cualquier material no unido de la muestra de orina del complejo anticuerpo de captura-biomarcador; poner en contacto el complejo anticuerpo de captura-biomarcador con un segundo anticuerpo para detectar el biomarcador RTCI, para permitir la formación de un complejo entre el biomarcador RTCI y el segundo anticuerpo; separar cualquier segundo anticuerpo no unido del complejo biomarcador RTCI-segundo anticuerpo; y detectar el segundo anticuerpo del complejo biomarcador RTCI-segundo anticuerpo.

25 Un kit para su uso en el método típicamente incluye un medio que tiene fijado al mismo el anticuerpo de captura, mediante lo cual la muestra de orina contacta con el medio para exponer el anticuerpo de captura para la NGAL contenida en la muestra. El kit incluye un medio de adquisición que puede llevar un instrumento, tal como una espátula o una simple varilla, con una superficie que comprende el medio. El medio de adquisición puede también incluir un recipiente para aceptar la muestra de orina, donde el recipiente tiene una superficie de contacto con la orina que comprende el medio. En otra realización típica, el ensayo para detectar el complejo del biomarcador RTCI y el anticuerpo puede consistir en un ELISA y puede ser usado para cuantificar la cantidad de NGAL en una muestra de orina. En una realización alternativa, el medio de adquisición puede incluir un instrumento consistente en un cassette que contiene el medio.

35 La detección precoz del biomarcador RTCI puede proporcionar una indicación de la presencia de la proteína en una muestra de orina en un corto período de tiempo. En general, un método y un kit de la presente divulgación pueden detectar el biomarcador RTCI en una muestra de orina en cuatro horas, más típicamente en dos horas y más típicamente en una hora tras la lesión de las células tubulares renales. Preferiblemente, el biomarcador RTCI puede ser detectado en aproximadamente 30 minutos tras la lesión de las células tubulares renales.

40 Un método y un kit de la presente divulgación para detectar el biomarcador RTCI pueden ser realizados adaptando los métodos y kits conocidos en la técnica para la rápida detección de otras proteínas y ligandos en una muestra biológica. Se describen ejemplos de métodos y kits que se pueden adaptar a la presente divulgación en la Patente EE.UU. 5.656.503, concedida a May y col. el 12 de Agosto de 1997, en la Patente EE.UU. 6.500.627, concedida a O'Conner y col. el 31 de Diciembre de 2002, en la Patente EE.UU. 4.870.007, concedida a Smith-Lewis el 26 de Septiembre de 1989, en la Patente EE.UU. 5.273.743, concedida a Ahlem y col. el 28 de Diciembre de 1993, y en la Patente EE.UU. 4.632.901, concedida a Valkers y col. el 30 de Diciembre de 1986.

50 Un método rápido de una sola etapa de detección del biomarcador RTCI puede reducir el tiempo para la detección de la lesión de las células tubulares renales. Un método típico puede incluir las etapas de: obtener una muestra de orina que se sospecha que contiene el biomarcador RTCI; mezclar una porción de la muestra de orina con un anticuerpo de detección que se une específicamente al biomarcador RTCI para iniciar la unión del anticuerpo de detección al biomarcador RTCI en la muestra; poner en contacto la mezcla de muestra y anticuerpo de detección con un anticuerpo de captura inmovilizado que se une específicamente al biomarcador RTCI, cuyo anticuerpo de captura no tiene reacción cruzada con el anticuerpo de detección, para unir el anticuerpo de detección al biomarcador RTCI y el biomarcador RTCI al anticuerpo de captura y formar un complejo detectable; eliminar el anticuerpo de detección no unido y cualquier muestra no unida del complejo; y detectar el anticuerpo de detección del complejo. El anticuerpo detectable puede ser marcado con un marcador detectable, tal como un marcaje radioactivo, una enzima, un tinte biológico, una perla magnética o biotina, como es bien sabido en la técnica.

60 Para identificar genes potenciales y sus proteínas que pueden acompañar y marcar a la instauración más precoz de las lesiones de las células tubulares renales, tales como lesiones renales isquémicas y nefrotóxicas, se puede usar un ensayo de micromatriz de ADNc para detectar cuáles de un gran número de blancos de genes potenciales están marcadamente regulados por incremento. Utilizando esta técnica de cribado, se identificó la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) como un gen cuya expresión está regulada por incremento más de 10 veces en las primeras horas después de una lesión renal isquémica en un modelo de ratón.

La NGAL pertenece a la superfamilia de las lipocalinas de más de 20 proteínas segregadas estructuralmente relacionadas que se piensa transportan una variedad de ligandos en un cáliz en forma de barril β . La NGAL humana fue originalmente identificada como una proteína de 25 kDa covalentemente unida a la gelatinasa de los neutrófilos humanos, donde representa una de las proteínas de los gránulos secundarios de los neutrófilos. Estudios de clonación molecular han revelado que el NOAL humano es similar al gen 24p3 murino aislado por primera vez en cultivos primarios de riñones de ratón a los que se indujo a proliferar.

La NGAL se expresa en niveles muy bajos en otros tejidos humanos, incluyendo el riñón, la tráquea, los pulmones, el estómago y el colon. La expresión de la NGAL está marcadamente inducida en epitelios estimulados. Por ejemplo, está regulada por incremento en células epiteliales de colon en áreas de inflamación o neoplasia, pero está ausente de áreas no implicadas intermedias o en lesiones metastáticas. Las concentraciones de NGAL están elevadas en el suero de pacientes con infecciones bacterianas agudas, en el esputo de sujetos con asma o con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y en el fluido bronquial del pulmón enfisematoso. En todos estos casos, se postula que la inducción de la NGAL es el resultado de interacciones entre las células inflamatorias y el revestimiento epitelial, siendo evidente la regulación por incremento de la expresión de NGAL tanto en neutrófilos como en el epitelio.

Se cree que la inducción detectada de NGAL representa una nueva respuesta intrínseca de las células de los túbulos proximales del riñón a las lesiones de las células tubulares renales, incluyendo lesiones tanto isquémicas como nefrotóxicas, y que no deriva meramente de neutrófilos activados. En primer lugar, la respuesta es rápida, apareciendo la NGAL en la orina en las 2 horas de la lesión con la primerísima producción de orina tras oclusión de la arteria renal, mientras que la acumulación renal de neutrófilos en este modelo de FRA isquémico normalmente se observa primeramente a las 4 horas de la lesión. En segundo lugar, los patrones temporales de inducción de NGAL y acumulación de neutrófilos son divergentes. Se observó un máximo de ARNm NGAL y expresión proteica a las 12 horas del reflujo, mientras que la acumulación de neutrófilos da un pico a las 24 horas, hacia cuyo momento la expresión de NGAL ha declinado significativamente. En tercer lugar, no eran detectables neutrófilos que expresaran NGAL por inmunofluorescencia en las muestras de riñón examinadas (Figura 3). En cuarto lugar, se documentó que la inducción de ARNm NGAL y proteína ocurría en células de los túbulos proximales humanos cultivadas tras una isquemia *in vitro*, con secreción de NGAL a medio de cultivo en el plazo de 1 hora de la depleción de ATP, en un sistema en el que los neutrófilos están absolutamente ausentes. No obstante, puede haberse producido alguna contribución de neutrófilos infiltrantes a la regulación por incremento observada de la NGAL. Es posible que la regulación por incremento de la NGAL en las células de los túbulos renales pueda ser inducida por liberación local de citoquinas de neutrófilos atrapados en la microcirculación poco después de la lesión isquémica.

Ha faltado una explicación adecuada para la inducción de NGAL por los epitelios estimulados y el que la NGAL sea protectora o cercana a la lesión o incluso un espectador inocente sigue sin estar claro. La evidencia reciente sugiere que, al menos en un subgrupo de tipos celulares, la NGAL puede representar una molécula pro-apoptótica. En la línea de células linfocíticas pro-B del ratón, la retirada de citoquinas dio lugar a una marcada inducción de NGAL, así como a aparición de apoptosis. La NGAL purificada producía la misma respuesta proapoptótica que la privación de citoquinas, incluyendo la activación de Bax, lo que sugiere que NGAL está cercana a la muerte celular programada. También se ha ligado la NGAL a la apoptosis en los tejidos reproductores. Las células epiteliales de la glándula mamaria y del útero en involución expresan altos niveles de NGAL, coincidiendo temporalmente con un período de máxima apoptosis. Es probable que NGAL regule un subgrupo de poblaciones celulares induciendo apoptosis. Los epitelios estimulados pueden regular por incremento la NGAL para inducir apoptosis de los neutrófilos infiltrantes, permitiendo así que las células residentes sobrevivan a los estragos de la respuesta inflamatoria. Alternativamente, las células epiteliales pueden utilizar este mecanismo para regular su propia muerte. Sin embargo, es interesante observar que la inducción de NGAL después de una lesión por isquemia-reperusión renal se produce predominantemente en las células de los túbulos proximales y que la apoptosis en las mismas circunstancias es primariamente un fenómeno de las células de los túbulos distales.

Otros estudios recientes han revelado que la NGAL potencia el fenotipo epitelial. La NGAL es expresada por el brote ureteral penetrante de la rata y dispara la nefrogénesis estimulando la conversión de las células mesenquimales en epitelios renales. Otra lipocalina, la glicodelina, ha mostrado inducir un fenotipo epitelial cuando se expresa en células de carcinoma mamario humano. Estos hallazgos son especialmente pertinentes para el riñón maduro, donde una de las respuestas bien documentadas a la lesión isquémica es la notable aparición de células epiteliales desdiferenciadas que revisten los túbulos proximales. Un importante aspecto de la regeneración y reparación renal tras una 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 reepitelización. El soporte para esta noción deriva de la reciente identificación de NGAL como proteína transportadora de hierro que es complementaria de la transferrina durante la nefrogénesis. Es bien sabido que el suministro de hierro a las células es crucial para el crecimiento y el desarrollo celular y esto es presumiblemente crítico para la regeneración renal posterior a la isquemia justo como lo es durante la ontogenia. Como la NGAL parece unirse al hierro y transportarlo, es también probable que la NGAL pueda servir como contenedor para el hierro que se libera de las células epiteliales de los túbulos proximales dañados. Dado que se ha observado que la NGAL puede ser endocitada por el túbulo proximal, la proteína podría reciclar potencialmente el hierro hacia células viables. Esto podría estimular el crecimiento y el desarrollo, así como eliminar hierro, una molécula reactiva, del sitio de la lesión tisular, limitando así

la citotoxicidad mediada por hierro.

La NGAL es un nuevo biomarcador urinario para la lesión renal nefrotóxica inducida por cisplatina que es más sensible que los biomarcadores previamente descritos. Un ejemplo es la molécula-1 de lesión renal o KIM-1, una molécula de adhesión putativa implicada en la regeneración renal. En un modelo de rata de nefrotoxicidad por cisplatina, KIM-1 era cualitativamente detectable a las 24-48 horas de la agresión inicial, lo que hacía de ella un marcador algo tardío de daño celular tubular. Por el contrario, NGAL es fácil y cuantitativamente detectada en las 3 horas posteriores a la administración de cisplatina en dosis que se sabe dan como resultado fallo renal. Además, la detección de NGAL en orina precede a la aparición de otros marcadores en la orina, tales como NAG. La aparición de NGAL en la orina también precede al aumento en la creatinina sérica, que es ampliamente usado para diagnosticar el fallo renal nefrotóxico.

La NGAL urinaria es evidente incluso tras dosis "subclínicas" suaves de cisplatina, a pesar de niveles normales de creatinina en suero. Así, la presente divulgación tiene importantes implicaciones para el manejo clínico de pacientes con terapia de cisplatina. La eficacia de la cisplatina es dependiente de la dosis, pero la aparición de nefrotoxicidad obstaculiza con frecuencia el uso de dosis superiores para maximizar su potencial antineoplásico. La nefrotoxicidad después de un tratamiento con cisplatina es común y puede manifestarse tras una sola dosis con fallo renal agudo. Aunque diversas maniobras terapéuticas han demostrado ser eficaces en el tratamiento de la nefrotoxicidad inducida por cisplatina en animales, las experiencias humanas exitosas han sido en gran medida anecdóticas. Una razón para ello puede ser la falta de marcadores precoces para el fallo renal agudo nefrotóxico, y de aquí un retraso en la iniciación de la terapia. En la práctica clínica actual, la lesión renal aguda es típicamente diagnosticada midiendo la creatinina en suero. Sin embargo, es bien sabido que la creatinina es un indicador poco fiable y retardado durante los cambios agudos en la función renal. En primer lugar, las concentraciones de creatinina en suero pueden no cambiar hasta que se ha perdido ya aproximadamente un 50% de la función del riñón. En segundo lugar, la creatinina sérica no representa con precisión la función renal hasta haber alcanzado un estado estacionario, lo que puede requerir varios días. Por lo tanto, el uso de las mediciones de creatinina en suero afecta a la capacidad tanto de detectar como de cuantificar el daño renal durante las fases iniciales de la lesión renal. Sin embargo, los estudios con animales han sugerido que, mientras que se puede prevenir y/o tratar el fallo renal agudo nefrotóxico, existe una estrecha "ventana de oportunidad" para conseguirlo y que el tratamiento debe ser instaurado muy poco después de la agresión inicial. La falta de biomarcadores precoces de la lesión renal ha afectado a la capacidad de los clínicos para iniciar terapias potencialmente efectivas de un modo oportuno. El uso de NGAL en un sistema de ensayo tendría también un valor para el estudio de intervenciones terapéuticas o preventivas existentes o emergentes y para la evaluación precoz del potencial nefrotóxico de otros agentes farmacéuticos. La detección de la NGAL es un nuevo biomarcador urinario precoz no invasivo para el daño renal inducido por cisplatina. La detección precoz puede permitir a los clínicos administrar intervenciones terapéuticas oportunas e instituir maniobras que prevengan la progresión a fallo renal nefrotóxico manifiesto.

Se ha visto que la NGAL era fácil y rápidamente detectada como péptidos inmunorreactivos relativamente limpios en transferencias Western con tan solo 1 µl de la primera producción de orina no procesada tras isquemia renal tanto en ratones como en ratas. Más aún, la NGAL urinaria era evidente incluso después de una isquemia renal "subclínica" muy leve, a pesar de niveles normales de creatinina en suero. La detección de la NGAL en orina también precedía con mucho a la aparición de marcadores tradicionales en la orina, incluyendo β2-microglobulina y NAG.

La regulación por incremento y la excreción urinaria de NGAL pueden representar una rápida respuesta de las células tubulares renales a una variedad de agresiones y la detección de NGAL en la orina puede representar una herramienta clínica no invasiva ampliamente aplicable para el diagnóstico precoz de la lesión de las células tubulares.

NGAL es un biomarcador urinario sensible y no invasivo para lesiones isquémicas de las células tubulares renales, incluyendo isquemia renal y nefrotoxemia. El examen de la expresión de NGAL en la orina de pacientes con formas agudas, leves y precoces de lesión de las células tubulares renales usando los métodos y kits de detección rápidos y simples de la presente divulgación pueden alertar y permitir a los clínicos instituir esfuerzos oportunos de intervención en pacientes que experimentan fallo renal agudo, y alertar a los clínicos para instituir maniobras dirigidas a la prevención de la progresión en pacientes con lesiones subclínicas y sutiles de las células de los túbulos renales (tales como nefrotoxinas, trasplantes de riñón, cirugía vascular y sucesos cardiovasculares) a FRA manifiesto.

Solo en los Estados Unidos se realizan aproximadamente 16.000 trasplantes de riñón cada año. Este número ha continuado creciendo de manera constante cada año. Aproximadamente 10.000 de éstos son trasplantes de riñones de cadáveres y se hallan en riesgo de FRA. Cada uno de estos pacientes se beneficiaría enormemente de mediciones seriadas de NGAL, que podrían representar una asistencia rutinaria.

También se ha asociado la lesión renal isquémica a la cirugía a corazón abierto, debido a la breve interrupción del flujo sanguíneo que es inherente a este procedimiento. Se puede estimar el número de cirugías a corazón abierto realizadas anualmente. En cualquier hospital para adultos moderadamente activo, se realizan aproximadamente 500 operaciones de este tipo cada año. Dado que existen al menos 400 de tales hospitales moderadamente activos solo

en los Estados Unidos, se puede estimar por lo bajo que se realizan 200.000 cirugías a corazón abierto cada año. Una vez más, las mediciones seriadas de la NGAL serían invaluable en estos pacientes y representarían el estándar de asistencia.

5 Procedimientos experimentales

1. Modelos en ratón de la lesión renal por isquemia-reperfusión:

Utilizamos modelos murinos bien establecidos de lesión renal por isquemia-reperfusión, en los que se han documentado previamente las consecuencias estructurales y funcionales de breves periodos de isquemia renal (3-7). Resumiendo, se albergaron ratones Swiss-Webster machos (Taconic Farms, Germantown, NY) de 25-35 g de peso con un ciclo de 12:12 horas de luz:oscuridad y se les dejó libre acceso al alimento y al agua. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg intraperitonealmente) y se les puso sobre una mesa calefactora para mantener una temperatura rectal de 37°C. Se emplearon tres protocolos independientes: (a) isquemia unilateral, (b) isquemia bilateral con FRA y (c) isquemia bilateral subclínica leve. Para el primer grupo de experimentos (isquemia unilateral), se ocluyó el pedículo renal izquierdo con un clamp vascular atraumático durante 45 min., durante los cuales se mantuvo el riñón caliente y húmedo. Se retiró entonces el clamp, se observó el riñón en cuanto al retorno del flujo sanguíneo y se suturó la incisión. Se dejó que los ratones se recuperaran en una jaula calentada. A las 0, 3, 12 o 24 horas de reperfusión, el animal fue reanestesiado, se abrió la cavidad abdominal y se obtuvo sangre por punción de la vena cava inferior para la medición de la creatinina sérica mediante un kit de ensayo colorimétrico cuantitativo (Sigma, St. Louis, MO). Se sacrificaron los ratones con pentobarbital intraperitoneal. Se perfundió entonces el ventrículo izquierdo con 10 ml de PBS 1X y luego con 10 ml de paraformaldehído al 4% en PBS para conseguir la fijación *in situ* de los riñones. Se recogieron ambos riñones (el riñón derecho sirvió como control para cada animal). Se examinaron al menos tres animales por separado en cada uno de los periodos de reflujo. Se congeló instantáneamente una mitad de cada riñón en nitrógeno líquido y se guardó a -70°C hasta su posterior procesado; se fijó una muestra en formalina, se embebió en parafina se seccionó (4 µm). Se tiñeron las secciones de parafina con hematoxilina-eosina y se examinaron histológicamente. Los riñones clampados exhibían cambios morfológicos característicos resultantes de la lesión por isquemia-reperfusión, como se ha publicado previamente por otros (3-6) y por nosotros (2). Se embebió la otra mitad de cada riñón en compuesto OCT (Tissue-Tek) y se obtuvieron secciones congeladas (4 µm) para inmunohistoquímica.

Para el segundo grupo de experimentos (isquemia bilateral), se clamparon ambos riñones durante 30 min. y se examinaron a varios periodos de reflujo según se detalla a continuación. Se diseñó este grupo de ocho animales para representar el FRA y exhibían una elevación significativa en la creatinina sérica a las 24 horas después de la lesión.

Para el tercer grupo de experimentos (isquemia bilateral subclínica leve), se clamparon los dos riñones de animales por separado durante 5, 10 o 20 min. solamente y se examinaron a varios periodos de reperfusión como antes. Este grado muy leve de lesión fue diseñado para simular la isquemia renal subclínica y los ratones de este grupo no exhibían ninguna elevación en la creatinina sérica medida a las 24 horas de la lesión.

2. Modelo en rata de lesión renal por isquemia-reperfusión:

Utilizamos modelos de roedores bien establecidos de lesión renal por isquemia-reperfusión (2). Resumiendo, se anestesiaron ratas Sprague-Dawley machos de 200-250 g de peso (Taconic Farms, Germantown, NY) con ketamina (150 µg/g) y xilazina (3 µg/g) y se les sometió a oclusión bilateral de la arteria renal con clamps microvasculares durante 30 min. según se detalla en el protocolo del ratón. Se recogieron orinas de forma programada a las 3, 6, 9, 12 y 24 h de la reperfusión y se recogió sangre para la medición de la creatinina en el momento del sacrificio (24 h).

3. Aislamiento del ARN:

Se rompieron los tejidos de riñones enteros de ratones (o células cultivadas de los túbulos proximales humanos, véase más adelante) con un Rompedor de Tejidos (Biospec Products, Racine, WI). Se aisló el ARN total de los riñones control e isquémicos usando el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) y se cuantificó por espectrofotometría.

4. Procedimientos de micromatriz:

Se han publicado previamente descripciones detalladas de hardware procedimientos de micromatrices (3). Brevemente, para cada experimento, se hizo una transcripción inversa de 100 µg de ARN de riñón murino total purificado con transcriptasa inversa Superscript II (Life Technologies, Rockville, MD) en presencia de Cy3-dUTP (Amersham, Piscataway, NJ) para los controles y de Cy5-dUTP para las muestras isquémicas. Se purificaron las muestras de ADNc usando un filtro Microcon YM-50 (Millipore, Madison, WI) y se hibridaron con preparaciones de micromatrices que contenían 8.979 sondas de ratón verificadas por secuencia única (3). Se examinaron tres animales por separado durante cada uno de los periodos de reflujo y se realizaron al menos dos experimentos de micromatriz independientes por cada uno de los animales. Se escanearon las preparaciones de matriz usando un

escáner de micromatriz (GenePix 4000B, Axon Instruments, Foster City, CA) para obtener imágenes TIFF separadas para la fluorescencia Cy3 y Cy5. Se determinaron las intensidades de señal para Cy3 y Cy5 para genes individuales usando el programa de extracción de datos GenePix Pro 3,0 (Axon Instruments). Se completó el control de calidad y el análisis de datos como se ha descrito previamente (3).

5

5. Reacción en cadena de polimerasa con transcripción inversa semicuantitativa (RT-PCR):

Se hizo una transcripción inversa de igual cantidad (1 µg) de ARN total de riñones de ratones control y experimentales con transcriptasa inversa Superscript II (Life Technologies) en presencia de hexámeros aleatorios según las instrucciones del fabricante. Se realizó la PCR usando un kit (Roche, Indianapolis, IN) y los siguientes cebadores:

10

NGAL de ratón sentido 5'-CACCACGGACTACAACCAGTTCGC-3';

15

NGAL de ratón antisentido 5'-TCAGTTGTCAATGCATTGGTCGGTG-3';

NGAL humana sentido 5'-TCAGCCGTCGATACACTGGTC-3'; y

20

NGAL humana antisentido 5'-CCTCGTCCGAGTGGTGAGCAC-3'.

Se obtuvieron los pares de cebadores para β-actina y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de ratón y humanas de Clontech (La Jolla, CA). Reacciones de simulacro desprovistas de ADNc sirvieron como controles negativos. Se analizaron los productos de la PCR por electroforesis en gel de agarosa, seguida de tinción con bromuro de etidio, y se cuantificaron por densitometría. Se expresaron los múltiplos de cambios en la expresión del ARNm NGAL en los riñones isquémicos frente a los controles tras normalización para la amplificación con β-actina o GAPDH.

25

6. Inmunohistoquímica:

30

Se permeabilizaron secciones congeladas con un 0,2% de Tritón X-100 en PBS durante 10 min., se bloquearon con suero de cabra durante 1 h y se incubaron con anticuerpo primario para NGAL (dilución 1:500) durante 1 h. Se expusieron entonces las preparaciones durante 30 min. en oscuridad a anticuerpos secundarios conjugados con Cy5 (Amersham, Arlington Heights, IL) y se visualizaron con un microscopio fluorescente (Zeiss Axiophot) equipado con filtros de rodamina.

35

Para la colocalización de NGAL con Rab11, se incubaron primeramente secciones seriadas con anticuerpo NGAL o un anticuerpo monoclonal para Rab11 (dilución 1:500; Transduction Laboratories) y luego con anticuerpos secundarios conjugados con Cy5 (para NOAL) o Cy3 (para Rab11) y se visualizaron con filtros de rodamina o de fluoresceína, respectivamente. Para la colocalización de NGAL con antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), se coincubaron secciones con anticuerpo NGAL y un anticuerpo monoclonal para PCNA (dilución 1:500; Upstate) y se realizó la detección por tinción con inmunoperoxidasa (ImmunoCruz Staining System, Santa Cruz Biotechnology). Para el ensayo TUNEL, utilizamos el ApoAlert DNA Fragmentation Assay Kit Clontech). Se desparafinaron secciones de parafina con xileno y grados decrecientes de etanol, se fijaron con formaldehído al 4%/PBS durante 30 min. a 4°C, se permeabilizaron con proteinasa K a temperatura ambiente durante 15 min. y un 0,2% de Tritón X-100/PBS durante 15 min. a 4°C y se incubaron con una mezcla de nucleótidos y enzima TdT durante 60 min. a 37°C. Se finalizó la reacción con SSC 2X y se lavaron las secciones con PBS y se montaron con Crystal/mount (Biomedex, Foster City, CA). Se detectaron los núcleos apoptóticos positivos a TUNEL por visualización con un microscopio de fluorescencia.

40

45

50

7. Recogida de orina:

Se pusieron los ratones o las ratas en jaulas metabólicas (Nalgene, Rochester, NY) y se recogió la orina antes y cada hora después de la oclusión bilateral de la arteria renal. Se centrifugaron las muestras de orina a 5.000 x g para eliminar los restos y se analizó el sobrenadante por transferencia Western. Se midió la creatinina urinaria con un kit de ensayo colorimétrico cuantitativo (Sigma) para normalizar las muestras en cuanto a la determinación de la NGAL urinaria. Se obtuvo un kit de ensayo colorimétrico para la determinación de la N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) en la orina de Roche.

55

8. Cultivo celular:

60

Se obtuvieron células epiteliales de los túbulos proximales renales humanos (RPTEC) de Clonetics (San Diego, CA). Se cultivaron las células en Medio Basal para Células Epiteliales Renales suplementado con complejo REGM (0,5 µl/ml de hidrocortisona, 10 µg/ml de hEGF, 0,5 µg/ml de epinefrina, 6,5 µg/ml de triyodotironina, 10 µg/ml de transferrina, 5 µg/ml de insulina, 1 µg/ml de sulfato de gentamicina y un 2% de FBS), según las recomendaciones del fabricante.

65

9. Depleción leve de ATP de las células cultivadas:

Modificamos protocolos previamente escritos de isquemia *in vitro* por depleción de ATP con inhibidores de la fosforilación oxidativa (8, 9). El segundo día después de la confluencia, se incubaron las células RPTEC con 1 μ m de antimicina A (Sigma) durante períodos de tiempo variables hasta 6 h. Hemos mostrado previamente que esto da lugar a una depleción reversible parcial leve de ATP y no hay pérdida de la viabilidad celular en otros tipos de células epiteliales renales cultivadas tales como células MDCK (8) y 786-O (9). Se monitorizaron los niveles de ATP usando un kit de ensayo basado en luciferasa (Sigma) y se expresaron como porcentaje de los valores control. Se recogieron las células a varios tiempos de depleción de ATP y se analizaron en cuanto a la expresión del ARNm NGAL por RT-PCR y expresión de proteína NGAL por análisis Western. Se monitorizó también la secreción de NGAL al medio de cultivo.

10. Modelo en ratón para la nefrotoxicidad por cisplatina

Utilizamos un modelo murino bien establecido en el cual se habían documentado previamente las consecuencias estructurales y funcionales de la nefrotoxicidad inducida por cisplatina (12-14, 18). Brevemente, se albergaron ratones Swiss-Webster machos (Taconic Farms, Germantown, NY) de 25-30 g de peso con un ciclo de 12:12 horas de luz/obscuridad y se les dejó libre acceso al alimento y al agua. Se dio a los ratones una sola inyección intraperitoneal de cisplatina en una dosis de 5 μ g/kg o de 20 μ g/kg de peso corporal. Se ha visto previamente que la dosis mayor da lugar a necrosis y apoptosis de las células tubulares y a una alteración de la función renal en 3-4 días tras la inyección de cisplatina (12-14, 18). Se puso a los animales en jaulas metabólicas (Nalgene, Rochester, NY) y se recogió la orina antes y a varios tiempos (3, 12, 24, 48, 72 y 96 h) tras la cisplatina. En tiempos similares, se anestesió a los animales con pentobarbital sódico (50 mg/kg intraperitonealmente), se abrió la cavidad abdominal y se obtuvo sangre por punción de la vena cava inferior para la medición de la creatinina sérica usando un kit de ensayo colorimétrico cuantitativo (Sigma, St. Louis, MO). Se sacrificaron los ratones, se fijaron los riñones por perfusión *in situ* con paraformaldehído al 4% en PBS y se recogieron ambos riñones. Se congeló instantáneamente una mitad de cada riñón en nitrógeno líquido y se guardó a -70°C hasta su posterior procesamiento; se fijó una muestra en formalina, se embebió en parafina y se seccionó (4 mm). Se tiñeron las secciones de parafina con hematoxilina-eosina y se sometieron al ensayo TUNNEL. Se procesó el resto para transferencia Western. Se homogeneizaron los riñones enteros en tampón de lisis helado (Tris 20 mM, pH 7,4, sacarosa 250 mM, NaCl 150 mM, NP-40 al 1% e inhibidores de proteasas Complete® 1X) usando un homogeneizador Polytron. Se incubaron los homogenados sobre hielo durante 30 min., se centrifugaron a 1.000 x g durante 5 min. a 4°C para eliminar los núcleos y los restos celulares y se analizaron en cuanto al contenido en proteína mediante el ensayo Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA). Se embebió la otra mitad de cada riñón en compuesto OCT (Tissue-Tek) y se obtuvieron secciones congeladas (4 μ m) para inmunohistoquímica.

11. Expresión, purificación y transferencia Western de NGAL murina recombinante

Se clonó ADNc NGAL de ratón de longitud completa en el vector de expresión pGEX (Pharmacia, Nutley, No), se expresó como una proteína de fusión con glutatión-S-transferasa (GST) en bacterias y se purificó usando columnas de glutatión-sefarosa (Amersham), seguido de escisión con trombina como se ha descrito previamente (16, 19, 20). Se analizaron las proteínas por SDS-PAGE, seguido de tinción con azul de Coomassie o de transferencia Western con un anticuerpo policlonal para NGAL. Se determinaron las concentraciones de proteína usando el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA).

12. Cuantificación de la NGAL urinaria por transferencia Western

Se determinó la cantidad de NGAL en la orina por comparación con patrones definidos de NGAL purificada recombinante. Se realizaron análisis densitométricos de transferencias Western usando concentraciones conocidas de NGAL recombinante y volúmenes conocidos de orina en condiciones idénticas de transferencia y exposición.

Todos los agentes químicos fueron comprados a Sigma a menos que se especifique en contrario. Para la transferencia Western, se determinaron las concentraciones de proteína mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) y se cargaron iguales cantidades de proteína total en cada banda. Se usó anticuerpo monoclonal para α -tubulina (Sigma) a una dilución 1:10.000 para la confirmación de una igual carga proteica y se usó anticuerpo policlonal para NGAL a 1:500 (15), a menos que se especifique en contrario. Se consiguió la inmunodetección de proteínas transferidas usando quimioluminiscencia potenciada (Amersham), a menos que se especifique en contrario.

60 **Ejemplo 1**

NGAL es un pequeño polipéptido segregado resistente a proteasas detectable en la orina. Se ha visto la marcada regulación por incremento del ARNm NGAL y los niveles proteicos en el riñón murino posisquémico precoz. Se detectó la expresión de la proteína NGAL predominantemente en las células de los túbulos proximales, en una distribución citoplásmica punteada reminiscente de una proteína segregada. Ciertamente, se detectó NGAL fácil y rápidamente en la orina (ya en la primera producción de orina) tras una lesión isquémica en los modelos tanto de

ratón como de rata de FRA, en cuyo momento no se observó ninguna infiltración leucocitaria del riñón. Se continuó con el origen de la NGAL de las células tubulares en células cultivadas de túbulo proximal humano sometidas a lesión isquémica *in vitro*, donde el ARNm NGAL resultaba marcada y rápidamente inducida en las células y la proteína NGAL era fácilmente detectable en el medio de cultivo en una hora de depleción suave de ATP. Nuestros resultados indican que la NGAL puede representar un nuevo biomarcador urinario precoz para la lesión renal isquémica.

Identificación de nuevos genes regulados por incremento poco después de la lesión renal por isquemia-reperfusión:

Una investigación a nivel de genoma en cuanto a transcritos inducidos poco después de una lesión renal por isquemia-reperfusión en un modelo murino identificó siete biomarcadores precoces. Se examinaron tres ratones por separado en cada uno de los períodos de reperfusión (3, 12 y 24 h) y se realizaron al menos dos experimentos de micromatriz independientes por cada animal examinado. Una comparación de los perfiles de transcriptomas de los riñones control e isquémicos dio un pequeño subgrupo de siete genes que resultaban consistentemente inducidos más de 10 veces. Se ha confirmado muy recientemente que uno de estos transcritos, la proteína 61 rica en cisteína (Cyr61), es inducida por isquemia renal (1). Sorprendentemente, el comportamiento de los otros seis genes expresados diferencialmente es nuevo para la literatura del FRA. Elegimos seguir caracterizando uno de estos genes previamente no reconocidos, a saber, la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL).

Caracterización de los modelos animales de fallos renales precoces

Se usaron modelos murinos de lesión por isquemia-reperfusión en los que se han documentado las consecuencias estructurales y funcionales de breves períodos de isquemia renal (3-7). Los rasgos histopatológicos característicos de la lesión isquémica eran fácilmente evidentes en las muestras de reperfusión de 24 h tras isquemia tanto unilateral (45 min.) como bilateral (30 min.). Éstos incluían una pérdida de membranas del borde en cepillo, dilatación tubular, epitelio tubular aplanado, detritus lumenales y un infiltrado intersticial (Figura 1). La presencia de células apoptóticas fue documentada usando el ensayo TUNEL. La apoptosis se localizaba predominantemente en las células de los túbulo distales y en el segmento ascendente del asa de Henle, tanto en células desprendidas hacia la luz como en células unidas. También eran apoptóticas células ocasionales de los túbulo proximales, pero los glomerulos estaban esencialmente desprovistos de apoptosis: No se detectaron células positivas a TUNEL en los riñones control o en las muestras isquémicas donde se omitió TdT (no mostrado). Los anteriores cambios histológicos y apoptóticos estaban ausentes de los riñones sometidos a grados más suaves de isquemia (5, 10 o 20 min. de isquemia bilateral; no mostrado). Los niveles séricos de creatinina reflejaban los cambios histopatológicos observados. Así, los ratones con isquemia renal unilateral o grados leves de isquemia bilateral subclínica exhibían niveles séricos de creatinina que eran indistinguibles de los animales control, mientras que los ratones con isquemia bilateral durante 30 min. mostraban una elevación significativa de la creatinina sérica (Figura 1).

El ARNm NGAL está marcadamente inducido en el riñón pos-isquémico precoz:

Por análisis de micromatrices, se vio que NGAL resultaba consistentemente inducida $3,2 \pm 0,5$ veces, $11,1 \pm 1,2$ veces y $4,3 \pm 0,6$ veces a las 3, 12 y 24 h de reperfusión en el riñón murino isquémico en comparación con los riñones control del mismo animal (media +/- SD de tres animales en cada tiempo). Este hallazgo fue confirmado por RT-PCR semicuantitativa usando un protocolo de normalización con β -actina y GAPDH. No se observaron cambios significativos en la expresión del ARNm de β -actina o GAPDH en ninguno de los períodos de reperfusión examinados, como se ha descrito previamente (3). Sin embargo, utilizando cebadores específicos de ratón, detectamos una significativa regulación por incremento de la expresión del ARNm NGAL ($4,1 \pm 0,5$ veces, $9 \pm 0,6$ veces y $4,2 \pm 0,4$ veces a las 3, 12 y 24 h de reperfusión, respectivamente, donde los valores representan la media +/- SD de tres animales por separado). Estos resultados están ilustrados en la Figura 1 y concuerdan globalmente con los cambios detectados por el análisis de transcriptomas.

La proteína NGAL se sobreexpresa marcadamente en los túbulo proximal de riñones de ratón con isquemia precoz:

La expresión posisquémica de la proteína NGAL en el riñón va paralela a la del ARNm. Por análisis Western, NGAL era justamente detectable como un péptido inmunorreactivo de 25 kDa en riñones murinos control. La identidad de esta banda como NGAL fue establecida en un grupo separado de experimentos, donde la preincubación del anticuerpo primario con lipocalina de ratón recombinante bloqueaba por completo esta inmunoreactividad (no mostrado). En los experimentos isquémicos unilaterales, se indujo la expresión de NGAL 3-4 veces por densitometría en el riñón isquémico de tres animales por separado en las 3 h de la lesión, como se muestra en la Figura 2, Panel A. Esta respuesta aumentaba dramáticamente en los experimentos de isquemia bilateral de ocho animales por separado. La NGAL en estos ratones resultó inducida tres veces tras 3 h de reperfusión, con pico de más de 12 veces en las muestras de 24 h, y declinó a niveles normales hacia el período de recuperación de 72 h (Figura 2, Panel B).

Empleando técnicas inmunohistoquímicas, la proteína NGAL era apenas detectable en los riñones murinos control, pero está regulada por incremento predominantemente en los túbulos proximales en 3 h de isquemia, como se ilustra en la Figura 3. La identificación de los túbulos proximales en estas secciones se basó en la presencia de una membrana del borde en cepillo, en la razón del tamaño nuclear al celular y en la morfología celular. La NGAL inducida aparecía en una distribución citoplásmica punteada en las células de los túbulos proximales, reminiscente de una proteína segregada. Este patrón de expresión era idéntico en ambos modelos unilateral y bilateral de lesión por isquemia-reperfusión y era consistentemente evidente en cada animal estudiado. Los glomérulos estaban desprovistos de expresión de NGAL y no había evidencia de neutrófilos que expresaran NGAL. Dado que se ha visto que la NGAL en células cultivadas de tumor renal de Wilms se colocaliza al menos en parte con los endosomas (11), se examinó la distribución de NGAL y Rab11 (un marcador de endosomas en reciclaje tardíos) en secciones seriadas de riñón. Imágenes combinadas mostraron una significativa colocalización de NGAL con Rab11 (no mostrado). Para determinar la significación funcional de la mayor expresión de NGAL tras la isquemia, se examinaron secciones seriadas de riñón en cuanto a la expresión de NGAL, a los núcleos positivos a TUNEL o a los núcleos positivos a PCNA. Mientras que las células tubulares que sobreexpresaban NGAL no eran positivas a TUNEL (no mostrado), era evidente una colocalización significativa de NGAL y PCNA en las células proliferativas y regenerativas en el período de reflujo de 48 h (no mostrado).

La proteína NGAL es fácilmente detectada en la orina inmediatamente después de la inducción de FRA en ratones:

Este experimento demuestra la utilidad de la detección de NOAL en orina como biomarcador no invasivo precoz de lesión renal isquémica. Utilizando las concentraciones de creatinina en orina para equiparar la carga de muestra, NGAL estaba ausente de la orina antes de la isquemia. En sorprendente contraste, NGAL se manifestaba como una banda de 25 kDa en las 2 h de la lesión (ya en la primera producción de orina tras la isquemia) en todos los animales examinados, como se muestra en las Figuras 4A y 4B. La identidad de esta banda como NGAL fue establecida en un grupo aparte de experimentos, donde la preincubación del anticuerpo primario con lipocalina murina recombinante bloqueó por completo esta inmunoreactividad (no mostrado). NGAL era fácilmente detectable en tan solo 1 μ l de orina sin procesar por análisis Western y persistía durante toda la duración examinada (24 h de perfusión). Comparamos entonces la excreción de NGAL en orina con la de marcadores de lesión previamente establecidos, tales como β 2-microglobulina y NAG. Mientras que la NGAL urinaria era evidente en 2 h de isquemia, la β 2-microglobulina era detectable en las mismas muestras de orina solo después de 12 h de isquemia unilateral (Figura 4, Panel A) y 8 h de isquemia bilateral (Figura 4, Panel B). De forma similar, la excreción de NAG en orina estaba significativamente aumentada solo después de 12 h de isquemia unilateral (panel inferior de la Figura 4, Panel A) y 8 h de isquemia bilateral (panel inferior de la Figura 4, panel B) en comparación con animales control no isquémicos.

La proteína NGAL es fácilmente detectada en la orina incluso tras una isquemia renal leve en ratones:

Con objeto de determinar la sensibilidad de la detección de la NGAL en orina en ausencia de FRA manifiesto, empleamos protocolos mediante los cuales se sometieron grupos independientes de ratones a solo 5, 10 o 20 min. de oclusión bilateral de la arteria renal. Estos estudios fueron diseñados para valorar la excreción de NGAL en orina tras isquemia renal subclínica leve. La creatinina sérica medida después de 24 h de reflujo estaba dentro de los límites normales en todos estos ratones. Sorprendentemente, la NGAL era fácilmente detectada en tan solo 1 μ l de orina sin procesar en estos animales (Figura 5), aunque su aparición estaba algo retardada en comparación con los animales con FRA. Así, mientras que 30 min. de isquemia bilateral daban lugar a excreción de NGAL en orina en 2 h (Figura 4), los ratones con 20 o 10 min. de isquemia bilateral manifestaban NGAL urinaria después de 4 h y aquéllos con 5 min. de isquemia excretaban NGAL solo después de 6 h (Figura 5). Por lo tanto, la aparición de NGAL en la orina parece estar relacionada con la dosis y la duración de la isquemia renal.

Ejemplo 2

La proteína NGAL es fácilmente detectada en la orina inmediatamente después de la inducción del FRA en ratas:

Dado que existe un debate en cuanto a las diferencias de especies en las respuestas a la oclusión de la arteria renal (10), examinamos a continuación el comportamiento de NGAL en un modelo animal diferente, a saber, un modelo en rata bien establecido de lesión renal por isquemia-reperfusión. Usando las concentraciones de creatinina en orina para equiparar la carga de muestra, la NGAL estaba ausente de la orina antes de la isquemia renal en rata. En marcado contraste, la NGAL se manifestaba como un péptido inmunorreactivo de 25 kDa dentro de las 3 h de la lesión (ya en la primera producción de orina tras la isquemia), como se muestra en la Figura 6. En comparación, la creatinina sérica en este modelo de lesión isquémica estaba elevada solo después de 24 h de perfusión (no mostrado). Una vez más, la NGAL era detectable en 1 μ l de orina sin procesar y persistía durante la totalidad de la duración examinada (24 h de perfusión).

Ejemplo 3

El ARNm NGAL es inducido en células cultivadas de los túbulos proximales humanos tras isquemia leve precoz:

Para confirmar el origen de NGAL procedente de células de túbulo proximales isquémicos, modificamos protocolos previamente descritos de isquemia *in vitro* por depleción de ATP en células cultivadas de túbulo proximales humanos (RPTEC). La incubación en 1 μ M de antimicina dio lugar a una depleción parcial leve de ATP a aproximadamente un $83 \pm 3\%$ del control en 1 h, con una disminución más gradual a aproximadamente un $75 \pm 3\%$ del control hacia las 6 h (media \pm SD de cuatro experimentos). No eran discernibles consecuencias morfológicas de esta depleción leve de ATP. El ARNm NGAL era justamente detectable en las células en reposo. Sin embargo, después de una depleción parcial de ATP, era evidente una inducción rápida y dependiente de la duración del ARNm NGAL por RT-PCR, como se muestra en la Figura 7.

10 La proteína NGAL es fácilmente detectada en el medio tras isquemia precoz *in vitro*:

Examinamos a continuación la expresión de la proteína NGAL en células RPTEC y en el medio de cultivo después de una depleción leve de ATP. La proteína NGAL era detectable en células RPTEC control y su expresión aumentó tras la depleción de ATP de un modo dependiente de la duración, como se muestra en la Figura 7. No se encontró proteína inmunorreactiva NGAL en el medio de cultivo de las células control, pero la NGAL era fácilmente detectable en 1 hora de depleción leve de ATP. Se observaron más aumentos en la abundancia de proteína NGAL relacionados con la duración de la depleción de ATP. Estos resultados sugieren que la proteína NGAL inducida es rápidamente segregada al medio, de forma análoga a la rápida aparición de NGAL en la orina tras isquemia renal *in vivo*.

20 **Ejemplo 4**

La proteína NGAL es fácilmente detectada en la orina poco después de una nefrotoxicidad renal leve en ratones:

25 Para determinar si la nefrotoxicidad da lugar a la expresión de la proteína NGAL en la orina, sugiriendo así su utilidad como un biomarcador precoz no invasivo de lesión renal nefrotóxica, se indujo nefrotoxicidad con cisplatina en ratones. En un modelo murino establecido de nefrotoxicidad por cisplatina, se detectó fácilmente la NGAL en la orina en el plazo de 1 d de administración de cisplatina (Figura 8A, pista inferior). Por el contrario, la β 2-microglobulina urinaria era apenas detectable después de 2 d y no pudo ser detectada de manera fiable hasta el día 4 a 5 tras la cisplatina (Figura 8, Panel A, pista superior). De forma similar, no había evidencia de una mayor excreción urinaria de NAG hasta los días 4 y 5 tras la administración de cisplatina (Figura 8, Panel B).

La nefrotoxicidad por cisplatina se caracteriza por apoptosis y necrosis en las células de los túbulo renales:

35 Se dio a ratones una sola inyección intraperitoneal de cisplatina en una dosis de 5 mg/kg o de 20 mg/kg de peso corporal. Los resultados en ratones control y en los que recibieron la dosis mayor de cisplatina son mostrados en la Figura 9. La dosis mayor dio lugar a necrosis de las células tubulares, como evidencia la presencia de dilatación tubular, restos luminales y epitelio aplanado en secciones teñidas con hematoxilina-eosina (panel central superior). También se documentaron células tubulares que sufrían muerte celular programada, indicada por núcleos intensamente teñidos condensados (panel superior derecho). Se confirmó esto por un ensayo TUNEL, que mostró los núcleos fragmentados condensados característicos de la apoptosis (paneles inferiores central y derecho). No se detectaron necrosis o apoptosis en los riñones control (paneles superior e inferior izquierdos). Los riñones de ratones tratados con la dosis más baja de cisplatina también parecían normales, de forma similar a los controles no tratados (no mostrado). La Figura 9 es representativa de 5 experimentos independientes.

45 La proteína NGAL es rápidamente inducida en los túbulo renales por la cisplatina:

Dado que la NOAL es inducida tras lesión isquémica del riñón (17), se determinó la respuesta al daño nefrotóxico inducido por cisplatina. Por análisis Western, la NGAL era apenas detectable en lisados de riñón de ratones control, pero resultó rápidamente inducida en el plazo de 3 horas de administración de cisplatina (20 mg/kg), como se ilustra en la Figura 10. Hubo un aumento dependiente de la duración en la expresión de la NGAL renal, con un pico a las 48 horas y una regulación por incremento persistente durante hasta 96 horas. Estos resultados fueron confirmados por tinción de inmunofluorescencia, mostrada en la Figura 11. Los riñones recogidos a 3 (3h) (panel superior derecho) y 12 (12h) (panel inferior izquierdo) horas tras la inyección de cisplatina mostraron inducción de proteína NGAL. También se muestra en la Figura 11 una imagen de gran aumento de la sección recogida a las 12 horas (HP) (panel inferior derecho). La flecha en el panel inferior izquierdo indica la región mostrada en la imagen HP. La NGAL resultó inducida en el plazo de 3 horas de la inyección de cisplatina, predominantemente en las células de los túbulo proximales, pero estaba ausente en células de los ratones control (Con) (panel superior izquierdo). La identificación de los túbulo proximales en estas secciones se basó en la presencia de una membrana del borde en cepillo, en la razón del tamaño nuclear al celular y en la morfología celular. La NGAL inducida aparecía en una distribución citoplásmica punteada en las células de los túbulo proximales, reminiscente de una proteína segregada. La NGAL inducida aparecía en una distribución citoplásmica punteada en las células de los túbulo proximales, reminiscente de una proteína segregada. Este patrón de expresión era similar al observado en modelos murinos de lesión por isquemia-reperfusión (17). Los glomérulos estaban desprovistos de expresión NGAL y no había evidencia de neutrófilos que expresaran NGAL. La Figura 11 representa 5 animales en cada tiempo.

La proteína NGAL es fácilmente detectada en la orina tras una elevada dosis de cisplatina:

Se detectó la proteína NGAL en la orina tras una elevada dosis de cisplatina (20 mg/kg), demostrando así su utilidad como biomarcador precoz no invasivo de lesión renal nefrotóxica. Usando las concentraciones de creatinina en orina para equiparar la carga de muestra, la NOAL estaba esencialmente ausente de la orina antes de la isquemia. En sorprendente contraste, la NGAL urinaria era fácilmente detectada en el plazo de 3 horas desde la lesión por cisplatina (20 mg/kg) en todos los animales examinados, como se muestra en la Figura 12 (panel superior). Se estableció la identidad de esta banda como NGAL en un grupo aparte de experimentos, en donde la preincubación del anticuerpo primario con lipocalina murina recombinante bloqueó por completo esta inmunorreactividad (no mostrado). La NGAL era fácilmente detectable en tan solo 5 µl de orina sin procesar por análisis Western. Hubo un aumento dependiente de la duración en la excreción urinaria de NGAL, con un pico a las 48 horas y una regulación por incremento persistente durante hasta 96 horas. Comparamos entonces la excreción urinaria de NGAL con la de marcadores previamente establecidos de lesión, tales como NAG. Mientras que la NGAL urinaria era evidente en el plazo de 3 horas desde la cisplatina, la excreción urinaria de NAG estaba significativamente aumentada solo después de 96 horas de lesión (panel central). Más aún, la valoración de la función renal por mediciones de creatinina en suero mostró un cambio significativo solo después de 96 horas de cisplatina (panel inferior). La figura representa cinco experimentos independientes en cada tiempo.

Se detecta la proteína NGAL en la orina incluso después de una dosis baja de cisplatina:

Se sometieron grupos independientes de ratones a inyecciones de solo 5 mg/kg de cisplatina para determinar la sensibilidad de la detección de NGAL en orina tras una lesión nefrotóxica subclínica, como se muestra en la Figura 13. La NGAL era detectable en tan solo 5 µl de orina no procesada en estos animales (panel superior), aunque su aparición parecía ser cuantitativamente menor en comparación con animales con 20 mg/kg de cisplatina (Figura 12, panel superior). Por lo tanto, la aparición de NGAL en la orina guarda correlación con la dosis de nefrotoxina. Mientras que la excreción de NGAL en orina era evidente en 3 horas desde la cisplatina, la excreción urinaria de NAG en este grupo de animales no aumentaba significativamente incluso después de 96 horas de lesión (panel central). Más aún, la valoración de la función renal por mediciones de la creatinina en suero mostró que la creatinina sérica no estaba significativamente alterada incluso después de 96 horas de cisplatina a baja dosis (panel inferior). Este ejemplo demuestra que NGAL es un marcador más sensible de nefrotoxicidad renal que los actualmente en uso.

La excreción de NGAL en orina después de la cisplatina es dependiente de la dosis y de la duración:

Se cuantificó la excreción urinaria de NGAL para determinar su utilidad como indicador de la gravedad de una lesión renal tras la administración de cisplatina, como se muestra en la Figura 14. Esto requería la expresión y purificación de cantidades conocidas de NGAL para uso como patrón. El análisis de proteína NGAL recombinante por SDS-PAGE, seguido de tinción con azul de Coomassie, mostró una sola banda proteica del tamaño apropiado (panel superior izquierdo). La transferencia Western de alícuotas de concentración conocida reveló un aumento lineal en la intensidad de señal en el rango de 3-100 ng/ml (panel superior derecho). Se determinó entonces la cantidad de NGAL en la orina por comparación con estos patrones definidos de NGAL purificada recombinante. Después de 20 µg/kg de cisplatina, hubo un aumento dependiente de la duración en la excreción urinaria de NGAL (panel inferior). Se evidenció una respuesta similar, aunque algo debilitada, en animales tratados con dosis de cisplatina que daban lugar a lesión nefrotóxica subclínica.

Ejemplo 5

Se obtuvieron muestras de orina de pacientes dos horas después de un trasplante de riñón, que es un modelo humano predecible de lesión renal isquémica, como se muestra en la Figura 15. Los pacientes (n=4) que recibieron riñones de cadáveres guardados en hielo durante un período de tiempo previo a la implantación tenían un aumento de la NGAL urinaria, que fue fácilmente cuantificado por transferencia Western y ELISA, en comparación con pacientes (n=6) que recibieron riñones de donantes vivos relacionados (panel A). Hubo una correlación significativa entre la NGAL urinaria y el tiempo de isquemia fría, lo que indica que la excreción de NGAL es proporcional al grado de lesión renal (panel B) ($r=0,98$, análisis de Spearman). Hubo también una correlación significativa entre la NGAL urinaria y el pico de creatinina en suero (panel C). ($r=0,96$, análisis de Spearman). Es importante enfatizar que la NGAL urinaria medida en las dos horas siguientes al trasplante era predictiva de FRA, como refleja el pico de creatinina en suero, que se produjo varios días después. La orina de los controles humanos normales o de los pacientes con fallo renal crónico contenía cantidades casi indetectables de NGAL, lo que indica que la regulación por incremento de la NGAL urinaria es específica de la lesión renal aguda (no mostrado). Además, la orina de pacientes con infecciones del tracto urinario y rechazo de trasplante de riñón (dos trastornos relacionados con neutrófilos) contenía solo cantidades mínimas de NGAL (no mostrado), fácilmente distinguibles de las cantidades significativamente mayores en trasplantes de riñones de cadáveres (>100 ng/ml). Estos datos demuestran que NGAL es un nuevo biomarcador urinario precoz para la lesión renal aguda después de un trasplante de riñón.

Ejemplo 6

Se obtuvieron muestras de orina seriadas prospectivamente de quince pacientes después de una cirugía a corazón abierto, con los resultados mostrados en la Figura 16. Se cuantificó la NGAL urinaria por transferencia Western y ELISA y se vio que estaba elevada en cinco de estos quince pacientes (panel A). Cada línea representa un paciente. Se muestra el % de cambio en la creatinina sérica con respecto a la línea basal a la derecha del panel A. Los mismos cinco pacientes desarrollaron fallo renal agudo posoperatorio, definido como un aumento del 50% o más en la creatinina sérica con respecto a la línea basal, dando una tasa de incidencia de aproximadamente el 33%. En los 10 pacientes que no desarrollaron fallo renal agudo, hubo un pequeño aumento precoz en la excreción urinaria de NGAL (valores a las 2 horas de $6,0 \pm 2,0$ ng/mg de creatinina) que se normalizó rápidamente a niveles casi indetectables en las 12 horas posteriores a la cirugía (panel A). En marcado contraste, los pacientes que desarrollaron posteriormente fallo renal agudo exhibían un aumento de más de 10 veces en el valor de 2 horas para la NGAL urinaria (75 ± 10 ng/mg de creatinina) y un aumento de más de 20 veces en el valor de 4 horas para la NGAL urinaria (120 ± 12 ng/mg de creatinina). Hubo una correlación entre la cantidad de NGAL urinaria y el tiempo de bypass cardiopulmonar, lo que indica que la excreción de NGAL es proporcional al grado de lesión renal (panel B) ($r=0,76$, análisis de Spearman). Hubo también una correlación significativa entre la NGAL urinaria y el pico de creatinina sérica (panel C) ($r=0,66$, análisis de Spearman). Es importante enfatizar una vez más que la NGAL urinaria medida en las dos horas siguientes a la cirugía cardíaca era predictiva de FRA, según refleja el pico de creatinina en suero, que apareció varias horas o incluso días después. Estos datos muestran que NGAL es un nuevo biomarcador urinario precoz para la lesión renal aguda tras una cirugía a corazón abierto, y su cuantificación es predictiva del fallo renal agudo en esta población altamente susceptible.

Referencias

1. Muramatsu Y, Tsujie M, Kohda Y, Pham B, Perantoni AO, Zhao H, Jo S-K, Yuen PST, Craig L, Hu X, Star RA: Early detection of cysteine rich protein 61 (CYR61, CCN1) in urine following renal ischemia reperfusion injury. *Kidney Int* 62:1601-1610, 2002.
2. Yoshida T, Kurelia M, Beato F, Min H, Ingelfinger JR, Stears RL, Swinford RD, Gullans SR, Tang SS: Monitoring changes in gene expression in renal ischemia-reperfusion in the rat *Kidney Int* 61: 1646-1654, 2002.
3. Supavekin S, Zhanh W, Kucherlapati R, Kaskel FJ, Moore LC, Devarajan P: Differential gene expression following early renal ischemia-reperfusion. *Kidney Int* 63:1714-1724, 2003.
4. Nogae S, Miyazaki M, Kobayashi N, Saito T, Abe K, Saito H, Nakane PK, Nakanishi Y, Koji T: Induction of apoptosis in ischemia-reperfusion model of mouse kidney: Possible involvement of Fas. *J Am Soc Nephrol* 9:620-631, 1998.
5. Daemen MARC, Van de Ven MWCM, Heineman E, Buurman WA: Involvement of endogenous interleukin-10 and tumor necrosis factor-K in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 67: 792-800, 1999.
6. Kelly KJ, Plotkin Z, Dagher PC: Guanosine supplementation reduces apoptosis and protects renal function in the setting of ischemic injury. *J Clin Invest* 108:1291-1299, 2001.
7. Burne NJ, Rabb H: Pathophysiological contributions of fucosyltransferases in renal ischemia reperfusion injury. *J Immunol* 169:2648-2652, 2002.
8. Feldenberg LR, Thevananther S, del Rio M, De Leon M, Devarajan P: Partial ATP depletion induces Fas- and caspase-mediated apoptosis in MDCK cells. *Am J Physiol* 276 (Renal physiol 45):F837-F846, 1999.
9. Devarajan P, De Leon M, Talasazan F, Schoenfeld AR, Davidowitz EJ, Burk RD: The von Hippel-Lindau gene product inhibits renal cell apoptosis via Bel-2-dependent pathways. *J Biol Chem* 276: 40599-40605, 2001.
10. Molitoris BA, Weinberg JM, Venkatachalam MA, Zager RA, Nath KA, Goligorsky MS: Acute renal failure II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F1-F12, 2000.
11. Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N: Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta* 1482:272-283, 2000.
12. Megyesi J, Safirstein RL, Price PM: Induction of p21WAF1/CIP/SDI in kidney tubule cells affects the course of cisplatin-induced acute renal failure. *J Clin Invest* 101: 777-782, 1998.
13. Shiraiishi F, Curtis LM, Truong L, Poss K, Visner GA, Madsen K, Nick HS, Agarwal A: Heme oxygenase-I gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *Am J Physiol* 278: F726-F736, 2000.
14. Ramesh G, Reeves WB: TNF- α -mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest* 110: 835-842, 2002.

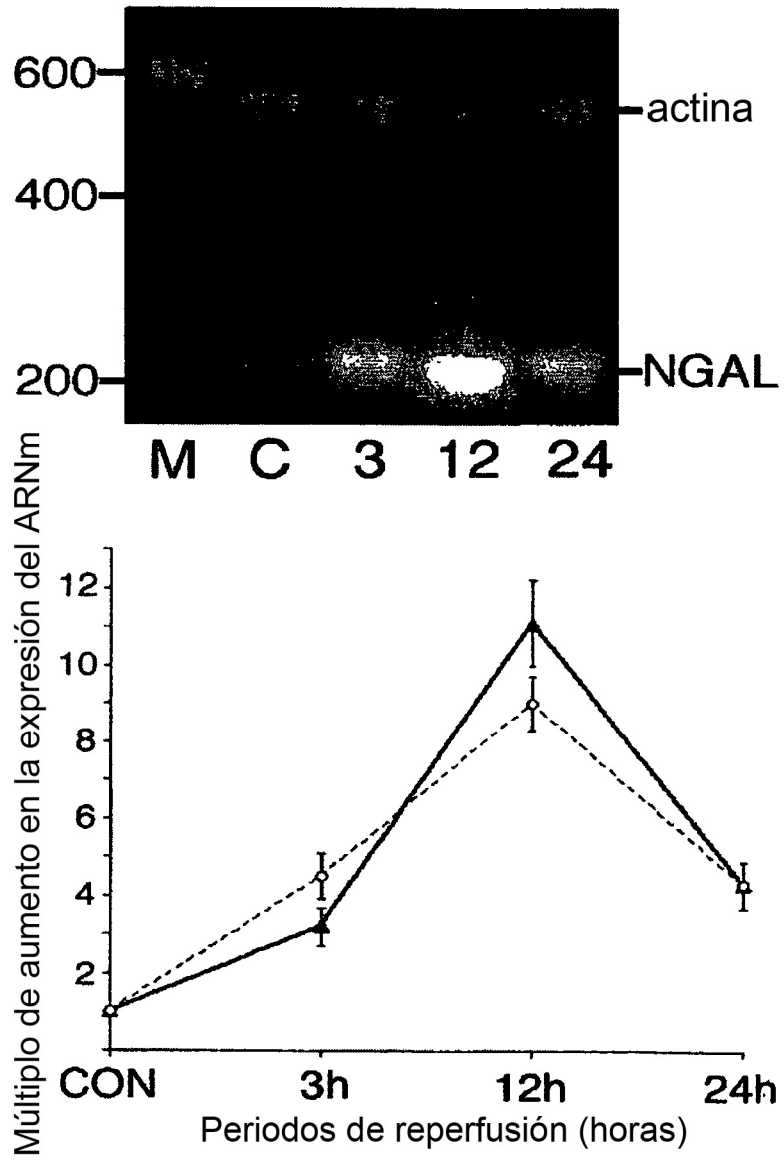
15. Muramatsu Y, Tsujie M, Kohda Y, Pham B, Perantoni AO, Zhao H, Jo S-K, Yuen PST, Craig L, Hu X, Star RA: Early detection of cysteine rich protein 61 (CYR61, CCN1) in urine following renal ischemic reperfusion injury. *Kidney Int* 62: 1601-1610, 2002.
- 5
16. Yang J, Goetz D, Li J-Y, Wand W, Mori K, Setlik D, Du T, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Strong R, Barasch J: An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell* 10:1043-1056, 2002.
17. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P: Identification of NGAL as a novel urinary biomarker for ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 14:2534-2543, 2003.
- 10
18. Tsuruya K, Ninomiya T, Tokumoto M, Hirakawa M, Masutani K, Taniguchi M, Fukuda K, Kanai H, Kishihara K, Hirakata H, Iida M: Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney Int* 63: 72-92, 2003.
- 15
19. Bundgaard J, Sengelov H, Horregaard N, Kjeldsen L: Molecular cloning and expression of a cDNA encoding Ngal: a lipocalin expressed in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 1468-1475, 1994.
20. Del Rio M, Imam A, De Leon M, Gomez G, Mishra J, Ma Q, Parikh S, Devarajan P: The death domain of kidney ankyrin interacts with Fas and promotes Fas-mediated cell death in renal epithelia. *J Am Soc Nephrol* 15:41-51, 2004.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de una lesión de células tubulares renales en un paciente humano provocada por un evento, el dicho evento seleccionándose del grupo que consiste en suministro sanguíneo disminuido a los riñones, función cardiaca alterada, procedimientos quirúrgicos, pacientes en unidades de cuidados intensivos y la administración de productos farmacéuticos, tintes de radiocontraste u otras sustancias medicamentosas a un paciente humano, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5 1) poner en contacto una muestra de orina obtenida de un paciente humano con un anticuerpo para un biomarcador de lesión de las células de los túbulos renales, consistiendo el biomarcador en NGAL, para permitir la formación de un complejo del anticuerpo y la NGAL; y
- 10 2) detectar el complejo anticuerpo-NGAL.
2. El método según la reivindicación 1, donde se obtiene intermitentemente una pluralidad de muestras de orina del sujeto.
- 15 3. El método según la reivindicación 2, donde las muestras de orina se obtienen de manera continua.
4. El método según la reivindicación 1, donde la etapa de detección del complejo anticuerpo-NGAL comprende poner en contacto el complejo con un segundo anticuerpo para detectar la NGAL.
- 20 5. El método según la reivindicación 1, para monitorizar adicionalmente la eficacia de un tratamiento para la lesión de células tubulares renales, que comprende las etapas de:
- 25 3) poner en contacto al menos una muestra de orina postratamiento del paciente humano que experimenta la lesión de células tubulares renales y que recibe tratamiento de la misma con un anticuerpo de captura para NGAL, para permitir la formación de un complejo del anticuerpo y la NGAL; y
- 4) detectar el complejo anticuerpo-NGAL en la muestra de orina postratamiento.
- 30 6. El método según la reivindicación 5, donde la etapa de detección del complejo anticuerpo-NGAL comprende las etapas de:
- (4i) separar cualquier material no unido de la muestra de orina del complejo anticuerpo de captura-NGAL;
- (4ii) poner en contacto el complejo anticuerpo de captura-NGAL con un segundo anticuerpo para detectar la NGAL, para permitir la formación de un complejo entre NGAL y el segundo anticuerpo;
- 35 (4iii) separar cualquier segundo anticuerpo no unido del complejo NGAL-segundo anticuerpo; y
- (4iv) detectar el segundo anticuerpo del complejo NGAL-segundo anticuerpo.
7. El método según la reivindicación 5, donde la etapa 3) comprende la etapa de poner en contacto la muestra de orina con un medio que tiene fijado al mismo el primer anticuerpo de captura.
- 40 8. Uso de un kit, que comprende:
- 1) un medio para adquirir una cantidad de una muestra de orina;
- 45 2) un medio que tiene fijado al mismo un anticuerpo de captura capaz de acomplejarse con NGAL; y
- 3) un ensayo para la detección de un complejo de NGAL y el anticuerpo de captura, en un método según la reivindicación 1.
9. El uso según la reivindicación 8, donde la cantidad de la muestra de orina es menos de 1 ml, más típicamente de menos de 10 microlitros.
- 50 10. El uso según la reivindicación 8, donde el medio de adquisición comprende un instrumento que comprende una superficie, comprendiendo la superficie el medio.
11. El uso según la reivindicación 8, donde el medio de adquisición comprende un recipiente para aceptar la muestra de orina, donde la superficie de contacto con la orina del recipiente comprende el medio.
- 55 12. El uso según la reivindicación 8, donde el ensayo comprende un ELISA.
13. El uso según la reivindicación 8, donde el medio de adquisición comprende un instrumento que comprende un cassette que contiene el medio.
- 60 14. El uso según la reivindicación 8, donde el kit es un kit para diagnóstico inmediato.
- 65 15. El uso según la reivindicación 14, donde el medio para adquirir la muestra de orina está diseñado para una cantidad de la muestra de orina de menos de 1 ml, más típicamente de menos de 10 microlitros.

16. El uso de un kit para diagnóstico inmediato según la reivindicación 15, donde el medio de adquisición comprende un instrumento que comprende una varilla de inmersión, comprendiendo la superficie de la varilla de inmersión el medio.
- 5 17. El uso del kit para diagnóstico inmediato según la reivindicación 15, donde el ensayo comprende un ensayo colorimétrico con varilla de inmersión.
18. Uso de un kit de ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) competitivo que comprende un anticuerpo específico para NGAL, para detectar su presencia en una muestra de orina del ser humano en un método según la reivindicación 1.
- 10
19. El uso según la reivindicación 18 para someter a ensayo una muestra de orina que puede comprender una cantidad de fluido de aproximadamente 1 mililitro o menos.
- 15 20. Un método de identificación del grado de una lesión de células tubulares renales, provocada por un evento, el dicho evento seleccionándose del grupo que consiste en suministro sanguíneo disminuido a los riñones, función cardíaca alterada, procedimientos quirúrgicos, pacientes en unidades de cuidados intensivos y la administración de productos farmacéuticos, tintes de radiocontraste u otras sustancias medicamentosas a un paciente humano, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 20
- 1) detectar en al menos una muestra de orina de un paciente humano la presencia de un biomarcador de lesión de las células de los túbulos renales, consistiendo dicho biomarcador en NGAL; y
- 2) determinar el grado de la lesión de células tubulares renales basándose en el momento de la instauración de la presencia de la NGAL en la muestra de orina, con respecto al momento del suceso.
- 25
21. El método según la reivindicación 1, en donde la etapa 1) comprende poner en contacto una muestra de orina que comprende hasta 1 mililitro de orina de un paciente humano con el anticuerpo para NGAL, para permitir la formación de un complejo del anticuerpo y NGAL.

FIGURA 1



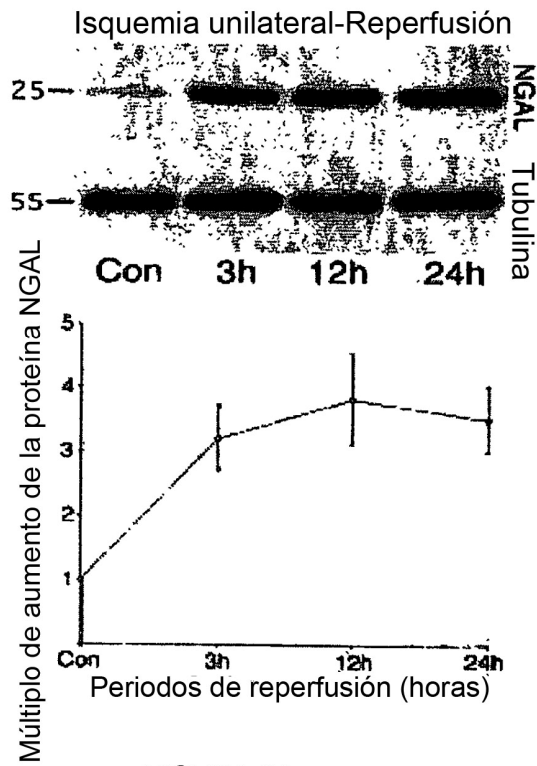


FIGURA 2A

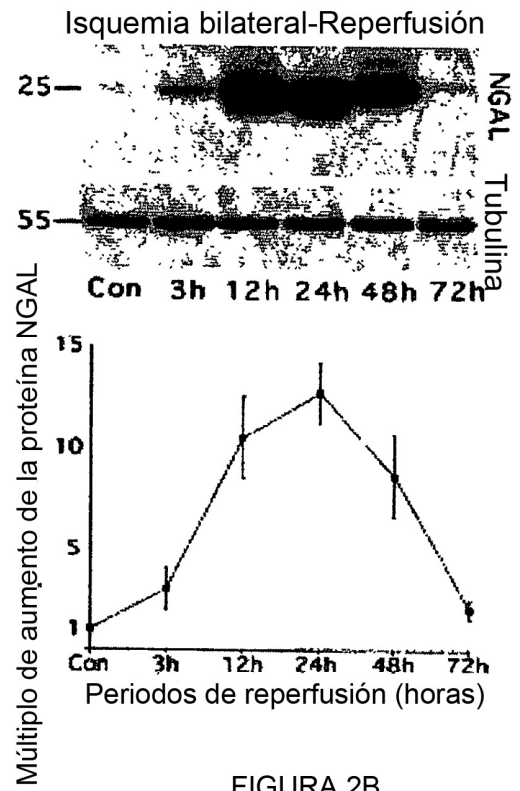


FIGURA 2B

FIGURA 3

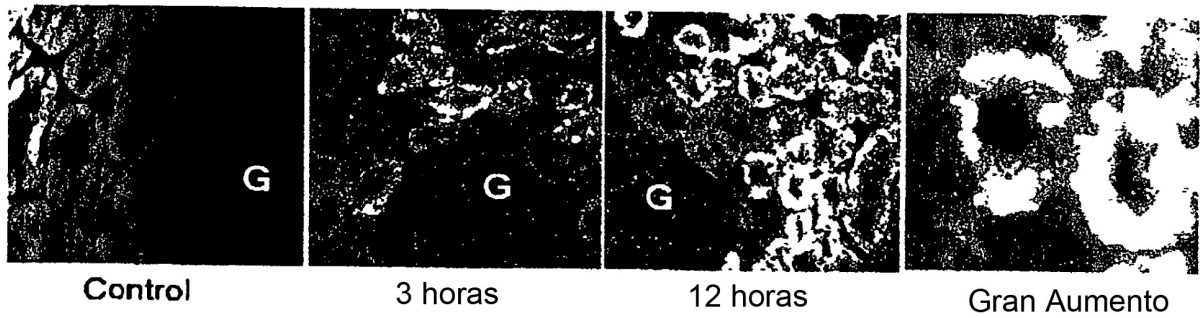


FIGURA 4A

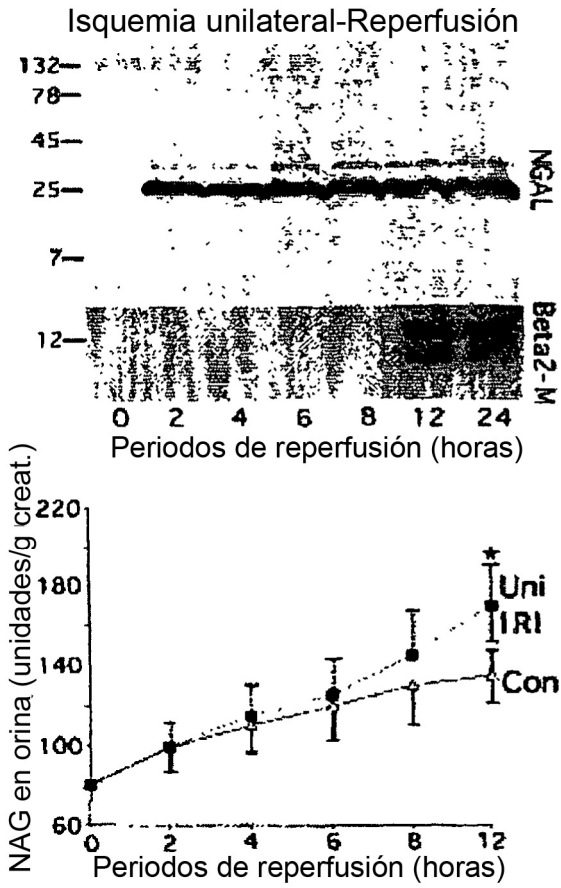


FIGURA 4B

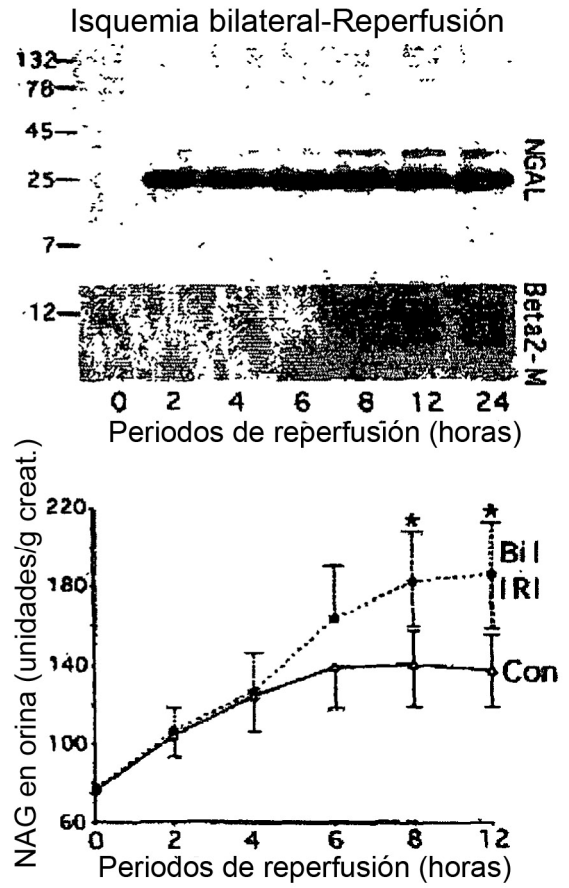


FIGURA 5

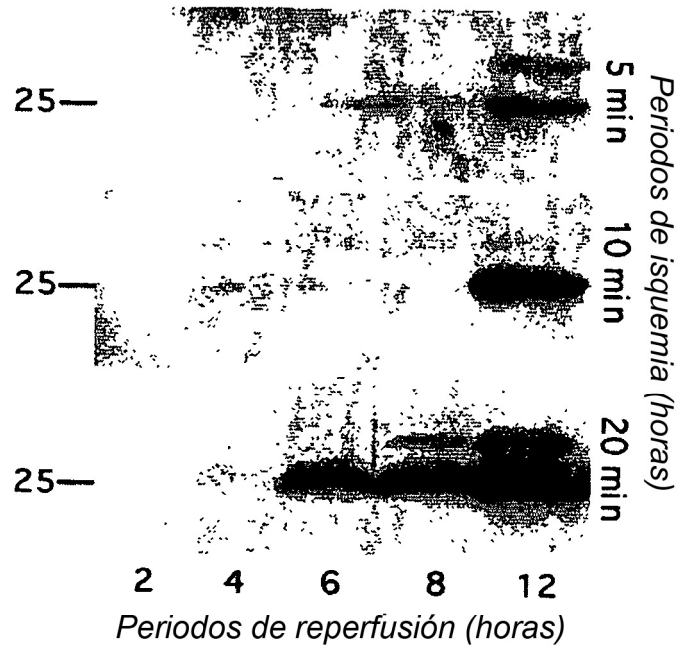


FIGURA 6

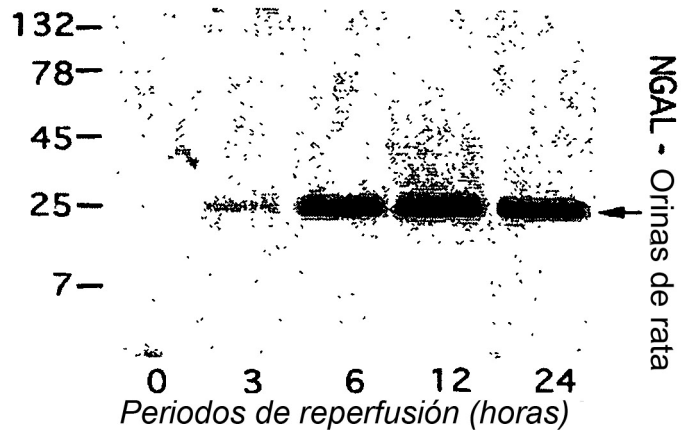


FIGURA 7

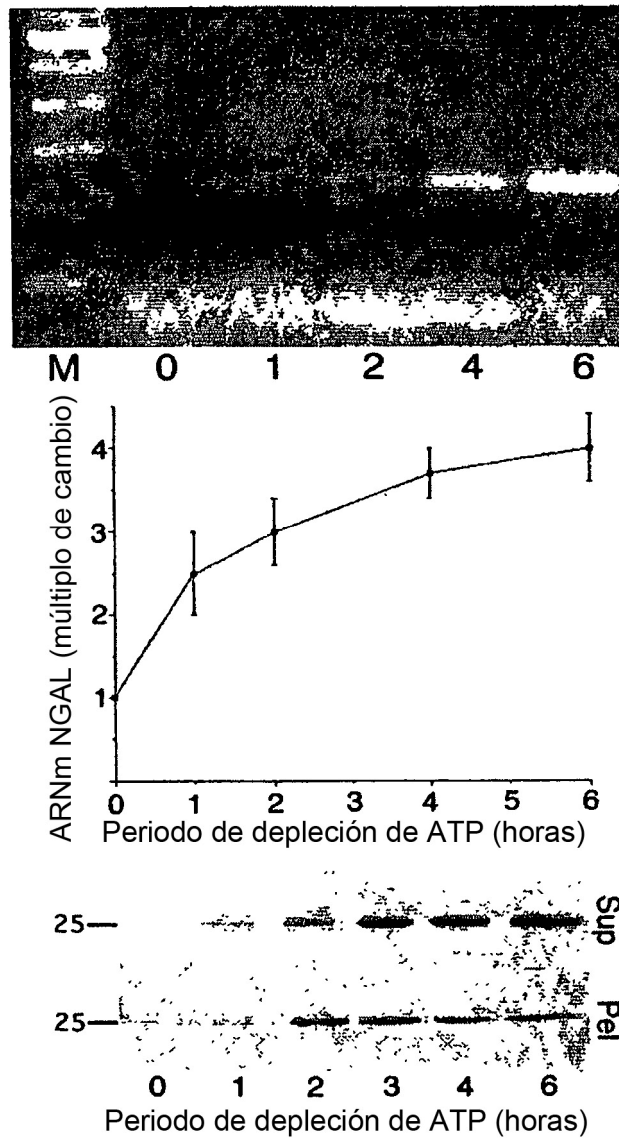


FIGURA 8A

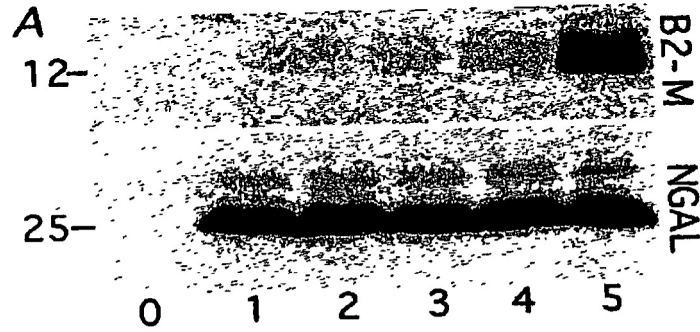


FIGURA 8B

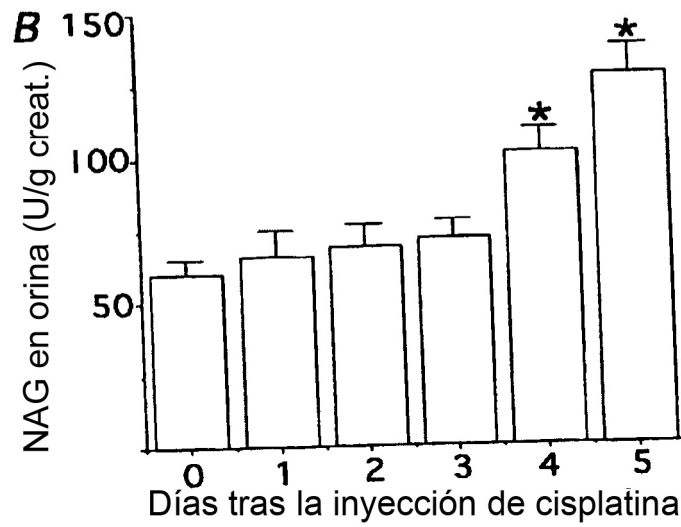


FIGURA 9

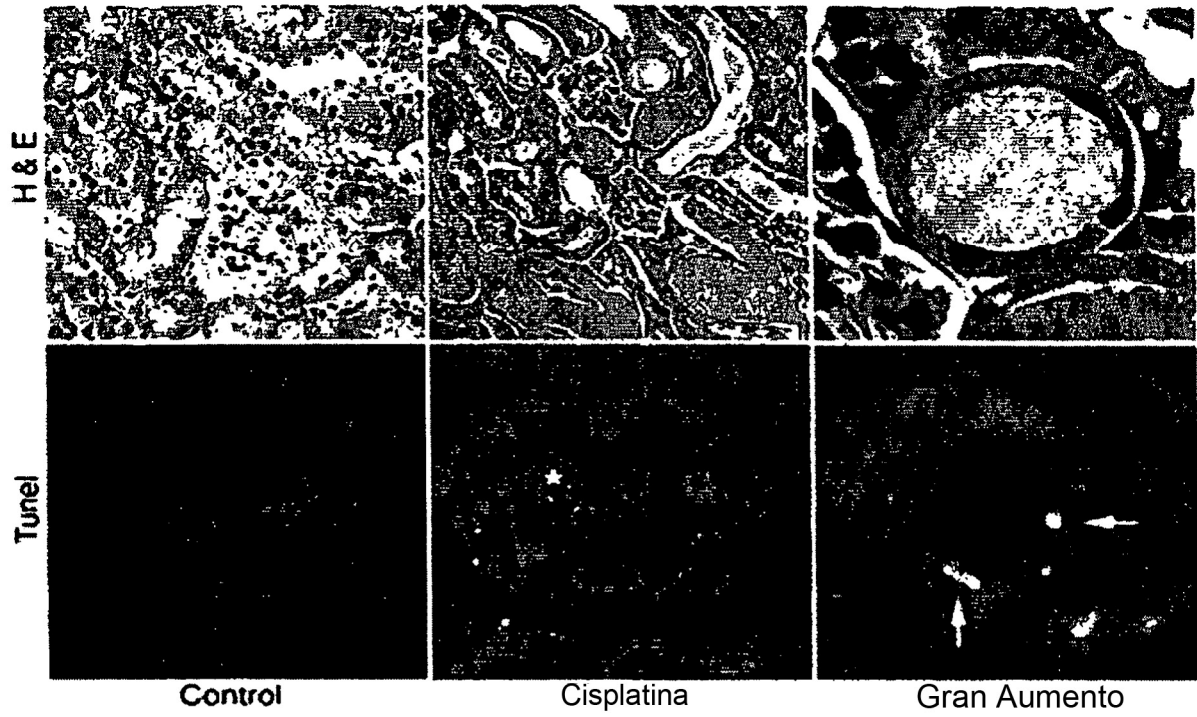


FIGURA 10

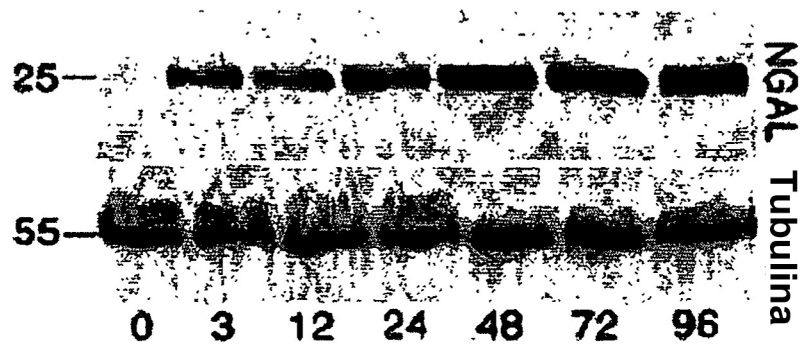


FIGURA 11

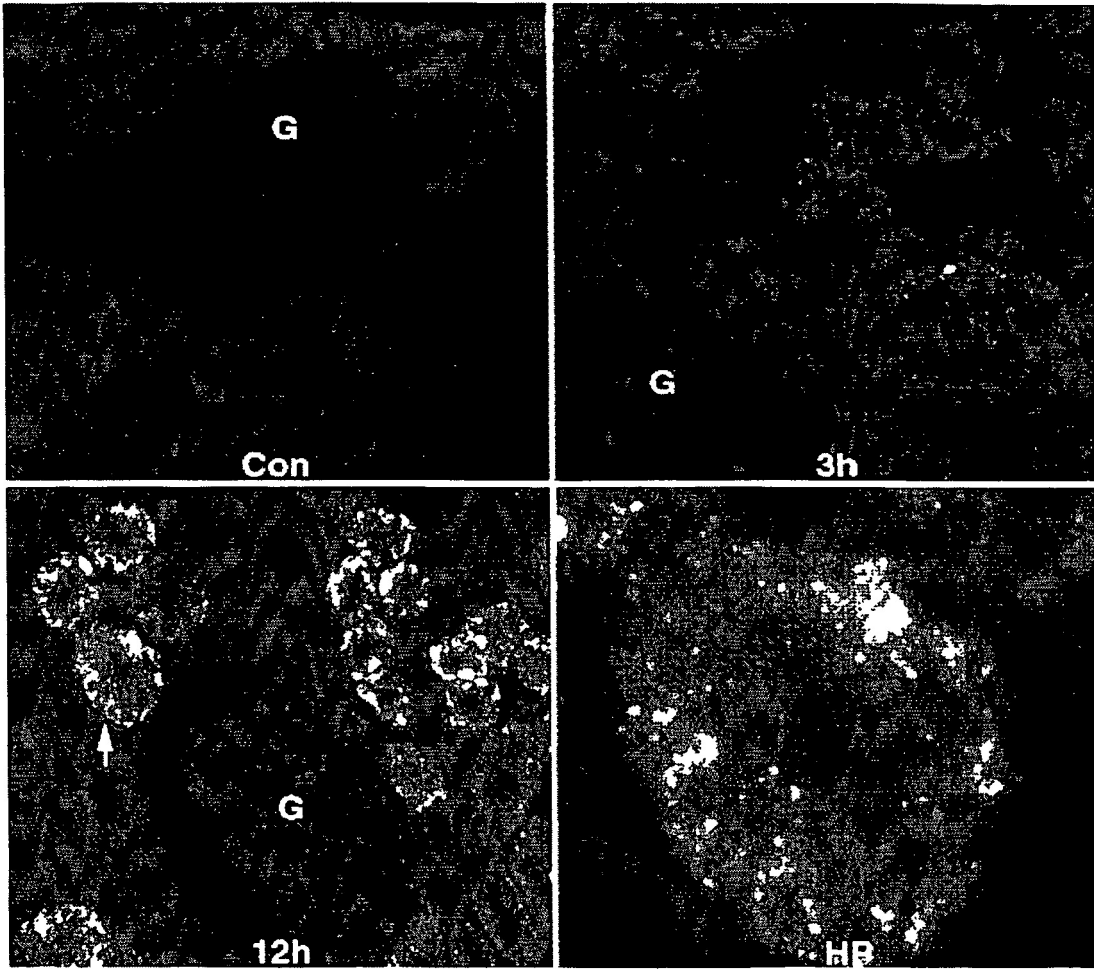


FIGURA 12

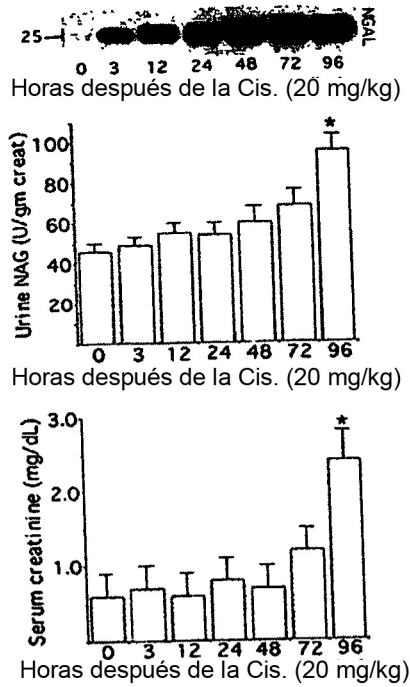


FIGURA 13

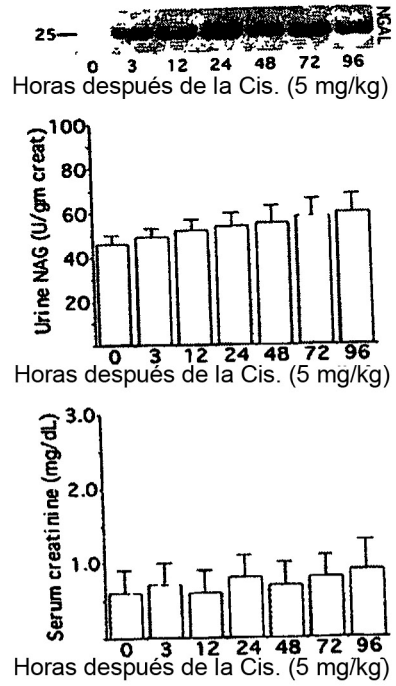


FIGURA 14

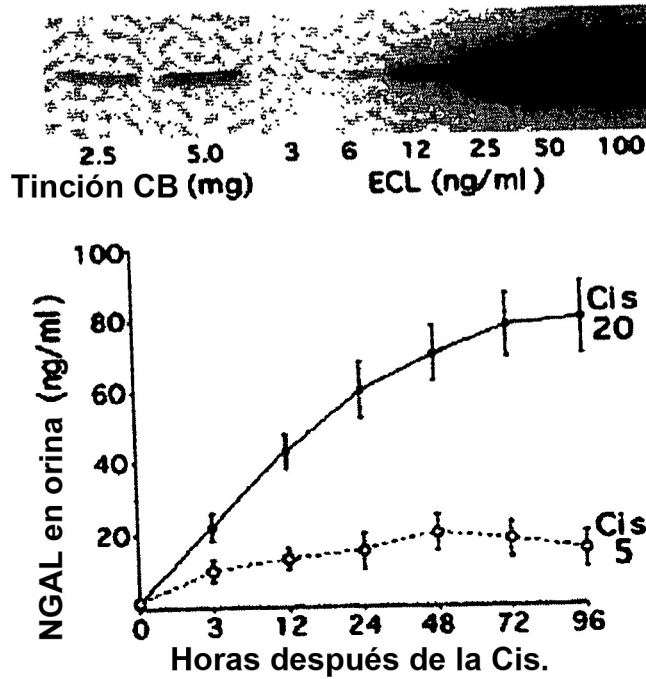


FIGURA 15

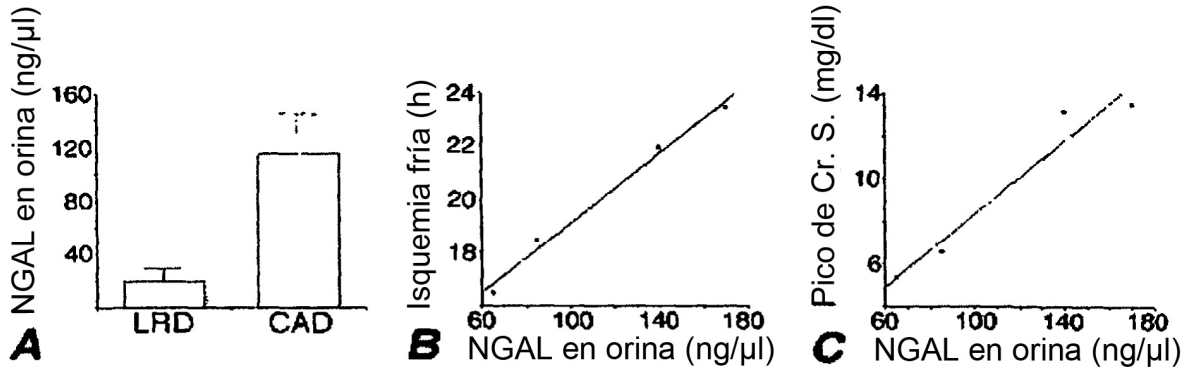


FIGURA 16

