

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 006**

51 Int. Cl.:

A61M 1/34 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2012 PCT/US2012/000240**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12154218**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2012 E 12782210 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2707055**

54 Título: **Reducción del receptor soluble de urocinasa en la circulación**

30 Prioridad:

09.05.2011 US 201161457665 P

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

05.06.2020

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF MIAMI (100.0%)
1600 N.W. 10th Avenue
Miami, FL 33136, US**

72 Inventor/es:

REISER, JOCHEN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 765 006 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

Reducción del receptor soluble de urocina en la circulación

5 **APOYO GUBERNAMENTAL FEDERAL**

La presente invención se realizó con el apoyo del gobierno con la subvención DK073495 y DK089394 otorgada por el National Institutes of Health. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la presente invención.

10 **Antecedentes**

Un objetivo es reducir el nivel (por ejemplo, cantidad o concentración según se mide antes y después del tratamiento) del receptor soluble de urocina (suPAR) circulante como terapia para la enfermedad renal o su prevención.

15 La glomeruloesclerosis focal y segmentaria (FSGS) es una causa importante de enfermedad renal en fase terminal. Afecta tanto a los riñones nativos como a los injertos de riñón trasplantados. Comienza en los glomérulos renales. En la fase temprana de FSGS, se dirige principalmente al epitelio visceral (también llamado podocitos) que comprende células con procesos podocitarios para regular el funcionamiento de la barrera de filtración renal. Generalmente, el borramiento de los procesos podocitarios de podocitos marca la primera etapa ultraestructural que se asocia con la
 20 pérdida de proteínas plasmáticas en la orina. Si bien se han identificado defectos genéticos en los podocitos para la FSGS hereditaria, también hay casos que tienen lugar en ausencia de defectos genéticos o con recidiva posterior al trasplante en aproximadamente el 30 % de los pacientes que reciben un injerto de riñón. Estas observaciones condujeron a la sugerencia de que el desarrollo de FSGS puede asociarse con un "factor de permeabilidad de FSGS" en la circulación del paciente (véase Savin et al., Translational Res. 151:288-292, 2008). Tanto la proteína A de estafilococos como la galactosa tienen una alta afinidad por el factor de permeabilidad de FSGS. La eliminación *ex vivo* del cuerpo de un sujeto mediante plasmaféresis o la unión a la proteína A estafilocócica mejoró la proteinuria en
 25 pacientes con FSGS. Cuando a un paciente con un síndrome nefrótico resistente a los corticosteroides, inmunosupresión y plasmaféresis se le administró galactosa oral, su síndrome nefrótico entró en remisión durante más de dos años (De Smet et al., Nephrol. Dial. Transplant. 24:2938-2940, 2009). Esto llevó a la hipótesis de que las interacciones entre el factor de permeabilidad de FSGS en la circulación y los restos de galactosa en el glucocálix glomerular podrían inducir un síndrome nefrótico.

Pero en otro caso, no hubo mejoría de la proteinuria cuando a un paciente dependiente de diálisis se le administró galactosa (Savin et al., 2008). La plasmaféresis parece haber mejorado la proteinuria solo por un corto tiempo y requirió
 35 intervención temprana. Además, la identificación molecular del factor de permeabilidad de FSGS era incierta porque la eficacia equivalente de su eliminación por la proteína A y la inmunoglobulina antihumana de oveja, lo que implicaba que el factor incluía un determinante de inmunoglobulina, parecía contradecir la determinación de un peso molecular menor de 100 kDa por fraccionamiento por tamaño (Dantal et al., J. Am. Soc. Nephrol. 9:1709-1715, 1998).

40 Dantal et al. (N Engl J Med 330(1):7-14, 1994) indican una columna de proteína A-Sepharose para el tratamiento con plasmaféresis de pacientes con glomeruloesclerosis focal y segmentaria (FSGS).

El documento WO 2010/054189 divulgó un papel para suPAR en la patogénesis de la enfermedad renal proteinúrica. Pero no reveló la eliminación *ex vivo* de suPAR por un proceso extracorpóreo como terapia y/o prevención de la
 45 enfermedad renal. Para la presente invención, los anticuerpos neutralizantes no son necesariamente necesarios.

Dantal et al. (1998) se alejó de la eliminación extracorpórea del factor de permeabilidad de FSGS utilizando un cartucho de inmuoafinidad advirtiendo: "La inmuoadsorción de plasma en columnas que contienen inmunoglobulinas antihumanas o proteína A de oveja no ofrece un enfoque realista para el tratamiento de pacientes con FSGS debido
 50 a su efecto transitorio y su coste" (página 1715). Por lo tanto, era necesaria una tecnología más duradera y menos costosa para mejorar la proteinuria y/o evitar la insuficiencia renal.

En un estudio multicéntrico, la concentración de suPAR ahora se ha determinado en sueros recogidos de pacientes con enfermedad glomerular. suPAR está significativamente elevado en pacientes con FSGS, y se encuentra que posee
 55 características de un factor de permeabilidad de FSGS. El suPAR se puede eliminar ahora de la circulación de un sujeto que necesita tratamiento para proporcionar una terapia deseable para la enfermedad renal y/o su prevención.

Compendio

60 Es un objetivo eliminar el receptor soluble de urocina (suPAR) circulante como al menos terapia para la enfermedad renal o su prevención.

La invención es como se define en las reivindicaciones. En una realización, se proporciona un cartucho inmunosorbente específico para suPAR. El cartucho comprende: (i) una entrada; (ii) un soporte, que puede ser una
 65 matriz sólida; (iii) uno o más anticuerpos específicos de suPAR o porciones funcionales de los mismos que están unidos al soporte; (iv) una salida; (v) un alojamiento que contiene el soporte en el mismo; y (vi) una ruta de fluido a

través del alojamiento que conecta la entrada y la salida. suPAR en una fase fluida de sangre, plasma o suero que comprende componentes sanguíneos solubles, entra en la entrada, sigue la ruta del fluido a través del alojamiento, y sale por la salida. suPAR se une a los anticuerpos, o porciones funcionales de los mismos, en un complejo inmune. El complejo se inmoviliza al soporte a través de los anticuerpos, o porciones funcionales de los mismos. Los anticuerpos, o porciones funcionales de los mismos, pueden estar unidos de forma reversible o irreversible al soporte. El cartucho puede unirse de aproximadamente 2 µg a aproximadamente 10 µg de suPAR. El soporte puede ser al menos una membrana permeable a fluidos, una o más fibras porosas, o una pluralidad de partículas. El alojamiento puede configurarse para separación por filtración de membrana o cromatografía en columna. El envase aséptico rodea el alojamiento para mantenerlo, la entrada, y la salida en condiciones estériles y apirógenas.

Otra realización es el uso del cartucho inmunosorbente para reducir extracorpóreamente la cantidad o la concentración de suPAR que circula en la sangre de un sujeto. La reducción se mide comparando el nivel de suPAR antes y después de dicho tratamiento.

También se describe la eliminación de suPAR de la circulación de un sujeto (por ejemplo, *ex vivo*). Una fase fluida, que está compuesta por suPAR y otras proteínas plasmáticas (por ejemplo, albúmina y/o inmunoglobulinas), se pone en contacto con uno o más anticuerpos específicos de suPAR, o porciones funcionales de los mismos, en condiciones de unión. La mayor parte de suPAR circulante puede unirse en complejos inmunes de forma selectiva con preferencia a las otras proteínas plasmáticas en la fase fluida. Los complejos inmunes, que están compuestos por suPAR unido a los anticuerpos, o porciones funcionales de los mismos, se separan de las otras proteínas plasmáticas que no forman complejos en la fase fluida. Al menos algunas de las otras proteínas plasmáticas en la fase fluida, por separado o sustancialmente junto con todas las células sanguíneas, se devuelven entonces a la circulación del sujeto. El complejo puede inmovilizarse sobre un soporte antes de la etapa de separación. En la sangre obtenida del sujeto, las proteínas plasmáticas pueden separarse sustancialmente de las células sanguíneas (por ejemplo, eritrocitos, leucocitos y trombocitos) después de la etapa de contacto, antes de la etapa de contacto, antes de la etapa de separación, o después de la etapa de contacto y antes de la etapa de separación. Se pueden añadir uno o más anticoagulantes (por ejemplo, heparina, citrato, oxalato, EDTA) a la fase fluida. La separación del complejo de otras proteínas plasmáticas puede realizarse mediante filtración por membrana o cromatografía en columna. El suPAR en plasma puede eliminarse de la circulación en diez a 20 rondas de unión entre una fase fluida y uno o más anticuerpos específicos de suPAR, o porciones funcionales de los mismos, seguido de la separación de al menos algunas de las otras proteínas plasmáticas. En una sola ronda, se puede eliminar del sujeto de al menos aproximadamente el 20 % a al menos aproximadamente el 30 % de suPAR circulante. La fase fluida puede mantenerse en condiciones estériles y apirógenas.

Como también se describe, el riesgo de FSGS o su recidiva se evalúa en un sujeto. Se obtiene una fase fluida que contiene proteínas plasmáticas de un sujeto. La fase fluida se pone en contacto con un cultivo *in vitro* de podocitos humanos diferenciados. Después de la inducción por una o más de las proteínas plasmáticas, se determina la actividad de la integrina β3 en los podocitos. Para una proteína plasmática que aumenta la actividad de la integrina β3, al menos un nivel alterado de la proteína plasmática, o una mutación en la proteína plasmática, es un factor de riesgo para FSGS o su recidiva en el sujeto. El factor de riesgo puede ser suPAR.

Se describe además la monitorización del receptor soluble de urocinasa (suPAR) durante su extracción de un sujeto. Se toma una muestra de la circulación de un sujeto antes de la extracción, se extrae suPAR de la circulación del mismo sujeto, y se toma otra muestra de la circulación del sujeto después de la extracción. SuPAR se mide en las muestras, que se pueden convertir en medidas de suPAR en la sangre según la fuente de la muestra, y se comparan. La comparación de las mediciones antes y después de la extracción debería mostrar una reducción de la cantidad o la concentración de suPAR circulante en el sujeto. La concentración reducida puede ser equivalente a menos de aproximadamente 3,0 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 2,5 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 2,0 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 1,5 ng/ml de sangre, o menos de aproximadamente 1,0 ng/ml de sangre en la circulación de un sujeto.

Se describe plasma o sangre humana, que está fuera del cuerpo. Se agota el receptor soluble de urocinasa (suPAR) a una concentración de menos de 1 ng/ml.

Se describen nuevos fragmentos del receptor soluble de urocinasa (suPAR). Uno o más de ellos tienen un peso molecular de aproximadamente 22 kDa a aproximadamente 45 kDa. Su presencia está asociada con la aparición de glomeruloesclerosis focal y segmentaria (FSGS).

Los objetivos adicionales serán evidentes para un experto en la técnica a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones, y generalizaciones con respecto a las mismas.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra que suPAR existe en múltiples formas en el suero de FSGS y en gran medida no está unido a la albúmina. Para examinar el suPAR en sueros de pacientes con FSGS, se realizó inmunoprecipitación incubando un anticuerpo monoclonal anti-uPAR con sueros de FSGS, seguido de inmunotransferencia con un

anticuerpo policlonal anti-uPAR. Mientras que se observó una banda principal a aproximadamente 22 kDa, también se encontraron otras dos bandas más débiles a aproximadamente 40 kDa y 45 kDa.

La Figura 2 enumera los porcentajes de glomérulos de integrina $\beta 3$ activa (tinción de AP5) en sujetos sanos (Control), glomeruloesclerosis focal y segmentaria (FSGS) primaria o recurrente, enfermedad de cambio mínimo (MCD) y nefropatía membranosa (MN). $P < 0,05$ para FSGS primaria frente a Control; $P < 0,01$ para FSGS recurrente frente a Control.

La Figura 3 enumera la puntuación de patología para los riñones expuestos a suPAR de tipo silvestre o mutante E134A. La alteración histopatológica de los riñones se puntúa semicuantitativamente como un valor entero de 0 a 4. La morfología de los riñones que estuvieron expuestos al mutante E134A es normal. En contraste, se observan múltiples anomalías de los fenotipos de riñón en ratones que sobreexpresan suPAR de tipo silvestre. La tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y ácido peryódico de Schiff (PAS) reveló características patológicas tal como adhesión de penacho glomerular, hiper celularidad, hiperlobulación y mesangiolisis.

La Figura 4 enumera la puntuación de patología para los riñones expuestos a suPAR de tipo silvestre y tratados con anticuerpo de bloqueo (Mab) de uPAR cada dos días hasta cuatro semanas; los ratones control recibieron la misma cantidad de isotipo IgG (Con) ($n = 4$ para cada grupo). La alteración histopatológica de los riñones se puntúa semicuantitativamente como un valor entero de 0 a 4. La tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y ácido peryódico de Schiff (PAS) indican que no hay lesión renal manifiesta con los ratones modificados por suPAR que recibieron anticuerpo anti-uPAR. En contraste, los ratones que recibieron el isotipo IgG muestran daños renales significativos que recuerdan a la FSGS en la fase temprana, similar a lo observado con los ratones modificados por suPAR de tipo silvestre.

La Figura 5 enumera la distribución de edad (años) y sexo para la población de estudio.

La Figura 6 enumera los valores de P del análisis de regresión múltiple de suPAR en la cohorte FSGS-CT.

La Figura 7 enumera las características iniciales de los pacientes en la cohorte FSGS-CT después del tratamiento. Los pacientes se asignaron al azar a la ciclosporina (CSA) o la combinación del brazo de dexametasona/micofenolato mofetilo (MMF).

La Figura 8 enumera las características iniciales de la cohorte PodoNet por etiología. Los pacientes con FSGS se dividen en subgrupos genético/familiar (Gen/Fam) y no genético.

La Figura 9 enumera las características iniciales de la cohorte PodoNet por tratamiento: Pacientes con FSGS tratados con micofenolato mofetilo (MMF) y otros.

Descripción de realizaciones específicas

El plasma es el componente líquido de sangre entera, que contiene: proteínas disueltas, lípidos, y carbohidratos; células suspendidas tales como eritrocitos, leucocitos y trombocitos; iones y otras moléculas pequeñas; y otros componentes solubles. El suero es plasma sin fibrinógeno y otros factores de coagulación.

La sangre, que contiene preferiblemente un anticoagulante, se puede separar por centrifugación en una fase fluida (por ejemplo, plasma) y células sanguíneas. Los componentes proteicos de la sangre incluyen albúmina, inmunoglobulinas, lipoproteínas y factores de coagulación (por ejemplo, fibrinógeno). El receptor soluble de urocinasa (suPAR) está contenido en una fase fluida de la sangre, plasma, suero, orina o su equivalente. Por ejemplo, la fase fluida puede ser una muestra que contiene sangre, plasma, suero, orina o su equivalente, que puede diluirse o concentrarse antes del procesamiento. Por lo tanto, el nivel equivalente de suPAR en sangre puede necesitar multiplicarse o dividirse de su nivel en una muestra utilizando un factor de dilución o concentración, respectivamente. Se prefiere que suPAR se elimine selectivamente en un grado de al menos diez veces en comparación con una o más proteínas sanguíneas tales como albúmina, inmunoglobulinas, lipoproteínas y factores de coagulación. Por ejemplo, en la sangre, un nivel fisiológico normal de suPAR puede ser inferior a aproximadamente 3 ng/ml, lo que está relacionado con la edad de un paciente humano, y el límite para "normal" puede aumentar en los ancianos.

El receptor de urocinasa (uPAR) es una proteína anclada a glucosilfosfatidilisitol (GPI), que se ha identificado como receptor celular para urocinasa y también es un orquestador de señalización versátil a través de la asociación con otros receptores de membrana, incluyendo las integrinas y las moléculas de la matriz. uPAR tiene tres dominios DI, DII y DIII numerados desde el extremo amino al extremo carboxilo del polipéptido. Se libera de la membrana plasmática de la célula mediante la escisión del ancla GPI y se puede encontrar como suPAR en fluidos biológicos. SuPAR puede escindirse adicionalmente en el enlazador entre los dominios DI y DII, liberando así, por ejemplo, el fragmento DI, DII o DIIDIII. Por lo tanto, suPAR puede variar en peso molecular de 20 kDa a 50 kDa en la circulación dependiendo del grado de glucosilación y proteólisis. Aquí, la eliminación *ex vivo* de suPAR de la circulación de un sujeto puede ser un tratamiento terapéutico y/o preventivo eficaz para proteinuria, enfermedad renal, enfermedad glomerular, insuficiencia renal, rechazo de injerto renal, o una combinación de los mismos. Esto es distinto de la administración *in vivo* de anticuerpos, o porciones funcionales de los mismos, a un sujeto para neutralizar suPAR circulante.

En una realización, se proporciona un cartucho inmunosorbente específico para suPAR circulante. El cartucho está compuesto por una entrada; un soporte, que puede ser una matriz sólida; uno o más anticuerpos específicos de suPAR o porciones funcionales de los mismos que están unidos al soporte; una salida; un alojamiento que contiene el soporte de sangre, plasma o suero que comprende componentes sanguíneos solubles, entra en la entrada, sigue la ruta de fluido a través del alojamiento, y sale por la salida. Las células sanguíneas preferiblemente no pasan a través del

cartucho; por lo tanto, pueden separarse de los componentes sanguíneos solubles y seguir una ruta alternativa que evita el cartucho. El suPAR se une a los anticuerpos, o porciones funcionales de los mismos, en un complejo inmune, y el complejo puede inmovilizarse en el soporte. El cartucho puede unirse de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 30 µg de suPAR, de aproximadamente 2 µg a aproximadamente 10 µg de suPAR, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 20 µg de suPAR, o cualquier combinación de los mismos. El soporte puede ser al menos una membrana permeable a fluidos, una o más fibras porosas, o una pluralidad de partículas. Los anticuerpos, o porciones funcionales de los mismos, pueden estar unidos de forma reversible o irreversible al soporte. El alojamiento puede configurarse para separación por filtración de membrana o cromatografía en columna. El envase aséptico rodea el alojamiento para mantenerlo, la entrada, y la salida en condiciones estériles y apirógenas.

En otra realización, el suPAR circulante se elimina de un sujeto *ex vivo* y se separa de otras proteínas plasmáticas (por ejemplo, albúmina y/o inmunoglobulinas), en el que al menos algunas de las otras proteínas plasmáticas se devuelven en una fase fluida. Una fase fluida, que está compuesta por suPAR y otras proteínas plasmáticas, se pone en contacto con uno o más anticuerpos específicos de suPAR, o porciones funcionales de los mismos, en condiciones de unión. La mayor parte de suPAR se une en complejos inmunes de forma selectiva con preferencia a las otras proteínas plasmáticas en la fase fluida. Las células sanguíneas se separan preferiblemente de los componentes sanguíneos solubles. Los complejos inmunes, que están compuestos por suPAR unido a los anticuerpos, o porciones funcionales de los mismos, se separan de las otras proteínas plasmáticas que no forman complejos en la fase fluida. La separación puede estar en formato heterogéneo u homogéneo. Al menos algunas de las otras proteínas plasmáticas en la fase fluida, por separado o sustancialmente junto con todas las células sanguíneas, se devuelven entonces a la circulación del sujeto. El complejo puede inmovilizarse sobre un soporte antes de la etapa de separación. En la sangre obtenida del sujeto, las proteínas plasmáticas pueden separarse sustancialmente de las células sanguíneas (por ejemplo, eritrocitos, leucocitos y trombocitos) después de la etapa de contacto, antes de la etapa de contacto, antes de la etapa de separación, o después de la etapa de contacto y antes de la etapa de separación. Opcionalmente, se pueden añadir uno o más anticoagulantes (por ejemplo, heparina, citrato, oxalato, EDTA) a la fase fluida. La separación puede realizarse mediante filtración por membrana o cromatografía en columna. El suPAR en plasma se puede eliminar de la circulación en dos a 50 rondas, de cinco a diez rondas, de diez a 20 rondas, de 20 a 30 rondas, o cualquier combinación de las mismas, entre una fase fluida y uno o más anticuerpos específicos de suPAR, o porciones funcionales de los mismos, seguido de la separación de al menos algunas de las demás proteínas plasmáticas. En una sola ronda, al menos aproximadamente el 10 % de suPAR circulante, al menos aproximadamente el 20 % de suPAR circulante, al menos aproximadamente el 30 % de suPAR circulante, al menos aproximadamente el 40 % de suPAR circulante, al menos aproximadamente el 50 % de suPAR circulante, o cualquier intervalo entre los mismos (por ejemplo, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 20 %, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 30 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 40 %, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 50 %, o cualquier combinación de los mismos) puede eliminarse de la circulación. La fase fluida puede mantenerse en condiciones estériles y apirógenas.

La unión específica entre suPAR circulante y los anticuerpos, o porciones funcionales de los mismos, forma un complejo inmune. El complejo inmovilizado en el soporte puede eliminar suPAR de la circulación. El cartucho está adaptado preferiblemente para su uso en aféresis y se inserta en un aparato apropiado para el mismo. Durante la aféresis, la sangre se puede extraer inicialmente del cuerpo a través de una aguja o un catéter previamente implantado. El plasma puede separarse de las células en sangre usando un separador: por ejemplo, centrifugación de flujo discontinuo, centrifugación de flujo continuo, o filtración selectiva por tamaño. La eliminación de suPAR es preferiblemente un proceso extracorpóreo en relación con el cuerpo del sujeto, en el que al menos algunas de las proteínas plasmáticas distintas de suPAR, por separado o sustancialmente junto con todas las células sanguíneas, se devuelven al mismo.

El suPAR inmovilizado puede separarse de al menos algunas de las otras proteínas plasmáticas (por ejemplo, albúmina y/o inmunoglobulinas) en la fase fluida. Las piezas del cartucho (por ejemplo, entrada, salida y alojamiento) pueden fabricarse de vidrio, polipropileno, poliestireno o acero inoxidable. El soporte puede formarse por separado del alojamiento o como parte integral del mismo. Al menos una membrana permeable a fluidos, una o más fibras porosas, y una pluralidad de partículas son ejemplos del soporte, que puede fabricarse a partir de agarosa, alúmina, celulosa, dextrano, poli(acrilamida), poli(acrilato), poli(amida) y sílice. Una bomba externa puede proporcionar presión de línea a través del tubo flexible al cartucho y, de este modo, controlar el caudal de una fase fluida a través de una membrana o una columna. Se puede extraer sangre de la circulación de un sujeto, procesarla extracorpóreamente (es decir, separar las proteínas y las células plasmáticas, después eliminar suPAR de las proteínas plasmáticas), y el resto de las proteínas plasmáticas y las células sanguíneas regresan por separado o juntas a la circulación del sujeto.

La especificidad de un agente de unión (por ejemplo, anticuerpo, aptámero, péptido, ligando de uPAR tal como uPA) para suPAR puede confirmarse en comparación con la unión no específica del agente de unión a otra proteína plasmática (preferiblemente proteína no transportadora que tiene características químicas y abundancia similar a suPAR). El agente de unión puede reconocer un epítipo de suPAR, que puede o no estar involucrado en la interacción con la integrina β3. La unión entre suPAR y los anticuerpos, o porciones funcionales de los mismos, después se realizan etapas opcionales de lavado, unión y separación (en cualquier orden) en condiciones apropiadas de fuerza iónica, disolvente, pH, presión, temperatura, caudal, etc. Por ejemplo, la fase fluida puede estar compuesta además por sales (fuerza iónica), vehículo acuoso (disolvente) y tampón (pH). La unión y/o fijación puede mejorarse

5 aumentando el tiempo de incubación, bloqueando las interacciones no específicas, uniéndose en solución antes de la unión a la matriz sólida, pasando la fase fluida repetidamente a través del soporte (por ejemplo, de dos a 50 veces, de cinco a diez veces, de diez a 20 veces, de 20 a 30 veces, o cualquier combinación de los mismos), regenerando el cartucho mediante elución de suPAR unido a partir de anticuerpos, o porciones funcionales de los mismos, entre
 10 rondas, o cualquier combinación de los mismos. Al menos aproximadamente el 10 % de suPAR circulante, al menos aproximadamente el 20 % de suPAR circulante, al menos aproximadamente el 30 % de suPAR circulante, al menos aproximadamente el 40 % de suPAR circulante, al menos aproximadamente el 50 % de suPAR circulante, o cualquier intervalo entre los mismos (por ejemplo, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 20 %, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 30 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 40 %, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 50 %, o cualquier combinación de los mismos) puede eliminarse cada vez. Para un tratamiento eficaz, suPAR puede reducirse a una concentración equivalente a menos de aproximadamente 3,0 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 2,5 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 2,0 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 1,5 ng/ml de sangre, o menos de aproximadamente 1,0 ng/ml en la circulación de un sujeto.

15 El sujeto puede ser un ser humano u otro mamífero. Un sujeto afectado con al menos glomeruloesclerosis focal y segmentaria (FSGS), una enfermedad glomerular, un trastorno caracterizado por proteinuria, enfermedad renal en fase terminal, o síntomas de los mismos; que podría rechazar un injerto de riñón o está en riesgo de rechazo del injerto, y aquellos que tienen un riñón nativo que experimenta insuficiencia pueden necesitar tratamiento.
 20 Opcionalmente, se puede seleccionar un subconjunto de pacientes (por ejemplo, que tienen el polimorfismo Leu33Pro en el gen de integrina $\beta 3$ humana, heterocigoto y/u homocigoto; el equivalente al menos a aproximadamente 3 ng de suPAR por ml de sangre en la circulación; o ambos) puede seleccionarse para el tratamiento.

25 suPAR puede reducirse a un nivel equivalente a menos de aproximadamente 3,0 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 2,5 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 2,0 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 1,5 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 1,0 ng/ml de sangre en la circulación de un sujeto, o cualquier intervalo entre los mismos (por ejemplo, de aproximadamente 3,0 ng/ml a aproximadamente 2,0 ng/ml de sangre, de aproximadamente 2,0 ng/ml a aproximadamente 1,0 ng/ml de sangre, o sus equivalentes).

30 Un cartucho inmunosorbente, que es específico para suPAR en relación con otras proteínas solubles en la sangre, puede usarse para eliminar suPAR de la circulación de un sujeto. Como alternativa, el cartucho inmunosorbente puede usarse para reducir la cantidad o la concentración de suPAR que circula en la sangre de un sujeto. La reducción puede medirse comparando el nivel de suPAR antes y después del tratamiento.

35 El riesgo de FSGS o su recidiva se puede evaluar en un sujeto. Se obtiene una fase fluida que contiene proteínas plasmáticas de un sujeto. La fase fluida se pone en contacto con un cultivo *in vitro* de podocitos humanos diferenciados. Después de la inducción por una o más de las proteínas plasmáticas, se determina la actividad de la integrina $\beta 3$ en los podocitos. Para una proteína plasmática que aumenta la actividad de la integrina $\beta 3$, al menos un nivel alterado de la proteína plasmática, o una mutación en la proteína plasmática, es un factor de riesgo para FSGS o su recidiva en
 40 el sujeto. El factor de riesgo puede ser suPAR.

Aún una realización adicional es monitorizar el receptor soluble de urocinasa (suPAR) durante su extracción de un sujeto. Se toma una muestra de la circulación de un sujeto antes de la extracción, se extrae suPAR de la circulación del mismo sujeto, y se toma otra muestra de la circulación del sujeto después de la extracción. SuPAR se mide en las
 45 muestras, que se pueden convertir en medidas de suPAR en la sangre según la fuente de la muestra, y se comparan. La comparación de las mediciones antes y después de la extracción debería mostrar una reducción de la cantidad o la concentración de suPAR circulante en el sujeto. La concentración reducida puede ser equivalente a menos de aproximadamente 3,0 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 2,5 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 2,0 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 1,5 ng/ml de sangre, o menos de aproximadamente 1,0 ng/ml en la
 50 circulación de un sujeto.

Como alternativa, se puede tomar una muestra de la circulación de un sujeto antes y/o después del trasplante de riñón. El riñón no se trasplanta o el riesgo de recidiva de la enfermedad renal disminuye al eliminar suPAR de la circulación. En una primera alternativa, se toma una muestra antes del trasplante y se puede trasplantar un riñón cuando el nivel de suPAR en la circulación del mismo sujeto está por debajo de un nivel de corte predeterminado (por ejemplo, equivalente a menos de aproximadamente 3,0 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 2,5 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 2,0 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 1,5 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 1,0 ng/ml de sangre, o cualquier intervalo entre los mismos, tal como de aproximadamente 3,0 ng/ml a aproximadamente 2,0 ng/ml de sangre, de aproximadamente 2,0 ng/ml a aproximadamente 1,0 ng/ml de sangre, o sus equivalentes). En una segunda alternativa, se toma una muestra después del trasplante (por ejemplo, a intervalos de al menos cada semana, al menos cada dos semanas, al menos cada cuatro semanas, al menos cada seis semanas, o al menos cada ocho semanas) y el nivel de suPAR en la circulación del mismo sujeto se mantiene por debajo de un nivel de corte predeterminado (por ejemplo, equivalente a menos de aproximadamente 3,0 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 2,5 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 2,0 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 1,5 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 1,0 ng/ml de sangre, o cualquier intervalo entre los mismos, tal como de aproximadamente 3,0 ng/ml a aproximadamente 2,0 ng/ml de sangre, de aproximadamente

2,0 ng/ml a aproximadamente 1,0 ng/ml de sangre, o sus equivalentes). En una tercera alternativa, se toman muestras tanto antes como después del trasplante de riñón como en lo anterior. En las tres alternativas, si el nivel de suPAR está por encima del nivel de corte, entonces suPAR puede eliminarse de la circulación del sujeto.

- 5 La eliminación de suPAR circulante puede combinarse con uno o más tratamientos inmunosupresores (por ejemplo, corticosteroides con o sin ciclofosfamida, ciclosporina, micofenolatos y/o rituximab); bloqueando el sistema de renina-angiotensina, bloqueadores de los canales de calcio, betabloqueantes y diuréticos; y reduciendo los lípidos. Por el contrario, debido a que no se requiere necesariamente un tratamiento complementario, solo la eliminación de suPAR
10 circulante puede ser eficaz y puede haber una condición para no usar uno o más de los tratamientos inmunosupresores, antihipertensivos e hipolipemiantes.

La administración *in vivo* de anticuerpos, o porciones funcionales de los mismos, específicos para suPAR y/o plasmaféresis (es decir, dilución limitada de todas las proteínas plasmáticas) puede evitarse mediante el uso de los métodos descritos anteriormente. Por lo tanto, puede haber una condición para no usar dichos tratamientos junto con
15 la eliminación de suPAR circulante.

La terminología utilizada para describir realizaciones específicas no pretende ser limitante de la invención. Como se usa en el presente documento, las formas singulares tal como "un" y "una" y "el/la" están destinadas a interpretarse como "al menos uno" e incluir formas plurales tales como "más de uno" y "pluralidad" a menos que el contexto lo
20 indique claramente de otra manera. Además, en la medida en que los términos "que incluye" e "incluye" y "que tiene" y "tiene" y "con" o variantes de los mismos se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, dichos términos pretenden ser inclusivos de una manera similar a la definición de "que comprende" en el presente documento.

El término "aproximadamente" significa dentro de un rango de error aceptable para el valor particular según lo
25 determinado por un experto en la técnica, que dependerá en parte de cómo se determine o se cuantifique el valor, es decir, limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, el término puede significar dentro de una o más de una desviación estándar por la práctica en la técnica. Como alternativa, "aproximadamente" puede significar un rango de hasta el 20 %, hasta el 10 %, hasta el 5 %, o hasta el 1 % de un valor dado. Como alternativa, particularmente con respecto a los sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud, dentro de
30 5 veces, o dentro de 2 veces de un valor dado. Cuando se describen valores particulares en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, a menos que se indique de otro modo, se debe asumir el término "aproximadamente" dentro de un rango de error aceptable para el valor particular.

Como se usa en el presente documento, "proteinuria" se refiere a proteínas que pasan a través de podocitos que han
35 sufrido daños o a través de una barrera mediada por podocitos que normalmente no permitiría el paso de proteínas. Dicho daño estructural puede visualizarse *in vitro* o *in vivo*. En el cuerpo de un sujeto, "proteinuria" puede referirse a la presencia de una cantidad excesiva de proteína sérica (por ejemplo, albúmina) en la orina. La proteinuria puede ser un síntoma de síndromes renales, urinarios y nefróticos (es decir, proteinuria mayor de 3,5 gramos al día), eclampsia, lesiones tóxicas de los riñones, distrés pancreático, y con frecuencia es un síntoma de diabetes mellitus. Con
40 proteinuria grave, puede desarrollarse hipoproteinemia general y esto da como resultado una disminución de la presión oncótica (ascitis, edema, hidrotórax).

El término "específico" de "específicamente" en el contexto de la unión de anticuerpo se refiere a una interacción
45 bimolecular entre una porción funcional (es decir, la unión al antígeno) del anticuerpo y una porción afín del antígeno que selecciona suPAR (por ejemplo, DII, DIII, un epítipo que puede o no estar involucrado en la interacción con la integrina $\beta 3$) en presencia de una mezcla de otras proteínas séricas (por ejemplo, albúmina). Aquí, el anticuerpo, o porción funcional del mismo, puede no necesariamente neutralizar la activación de la integrina $\beta 3$ y el borrado del proceso podocitario en los podocitos. Preferiblemente, se une un epítipo de suPAR accesible en la circulación. En condiciones de reacción apropiadas para la unión, el anticuerpo, o la porción funcional del mismo, se une a suPAR y
50 no se une significativamente a otra proteína sérica (por ejemplo, albúmina) que podría estar presente. La especificidad del anticuerpo, o la porción funcional del mismo, para suPAR es mayor que la proteína A o una lectina para un factor de permeabilidad de FSGS. La unión específica de suPAR puede tener lugar en solución o en un sustrato. El formato de reacción requiere la separación de la proteína unida de otras proteínas de suero (por ejemplo, albúmina) para eliminar suPAR de la circulación del sujeto. Pero la inmovilización de un complejo inmune que contiene suPAR no es
55 necesariamente necesaria para la separación porque los formatos tanto homogéneos como heterogéneos son alternativas posibles para el procesamiento.

La eliminación se puede controlar con una señal detectable asociada con la unión de suPAR. Las señales detectables
60 pueden ser directas o indirectas, están unidas a cualquier parte de un complejo unido, están medidas competitivamente, están amplificadas o combinaciones de las mismas. Se puede interponer una etapa de bloqueo o lavado para mejorar la sensibilidad y/o especificidad. La unión del anticuerpo o suPAR a un sustrato antes, después o durante la unión da como resultado la captura de una especie previamente no unida. Dicha inmovilización (es decir, unión reversible o irreversible) se unirá de forma estable al sustrato en condiciones de lavado. Las técnicas de detección incluyen la unión de anticuerpos (por ejemplo, ELISA o RIA), resonancia magnética, espectroscopía de masas, microscopía electrónica de ultraestructura celular y/o marcado fluorescente o tinción histoquímica de células y
65 tejidos con o sin separación por fraccionamiento bioquímico, electroforesis en gel, y/o cromatografía líquida.

Aquí, "un sujeto que necesita tratamiento" se refiere a un sujeto, incluyendo un ser humano u otro mamífero, que está afectado con un trastorno caracterizado por proteinuria, está en riesgo de padecer o experimenta insuficiencia renal, ha recibido un injerto de riñón, o cualquier combinación de los mismos. Un trastorno caracterizado por proteinuria incluye, por ejemplo, enfermedades renales o glomerulares, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis focal y segmentaria, enfermedad de cambio mínimo, síndromes nefróticos, preeclampsia, eclampsia, lesiones renales, enfermedades vasculares por colágeno, estrés, ejercicio extenuante, proteinuria ortostática benigna (postural), glomeruloesclerosis focal y segmentaria, nefropatía IgA, nefropatía IgM, glomerulonefritis membranoproliferativa, nefropatía membranosa, enfermedad renal en fase terminal, sarcoidosis, síndrome de Alport, diabetes mellitus, daño renal debido a fármacos, enfermedad de Fabry, infecciones, aminoaciduria, síndrome de Fanconi, nefrosclerosis hipertensiva, nefritis intersticial, enfermedad de células falciformes, hemoglobinuria, mieloma múltiple, mioglobinuria, cáncer, granulomatosis de Wegener, y enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo 1. Un "sujeto que necesita tratamiento" puede verse afectado por uno o más de los trastornos anteriores, puede ser un heterocigoto para el polimorfismo Leu33Pro en el gen de integrina $\beta 3$ humano, puede ser un homocigoto para el polimorfismo Leu33Pro en el gen de la integrina $\beta 3$ humana, puede tener al menos aproximadamente 3 ng de suPAR por ml de sangre en la circulación, o cualquier combinación de los mismos.

Como se define en el presente documento, "una cantidad eficaz" es una cantidad de agente de unión específico suficiente para producir un resultado terapéutico o preventivo. Las composiciones pueden administrarse una de una o más veces al día a una o más veces por semana; incluyendo una vez cada dos días. El experto en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis y el tiempo requeridos para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos anteriores, la salud general y/o la edad (por ejemplo, al menos aproximadamente 40 años, al menos aproximadamente 45 años, al menos aproximadamente 50 años, al menos aproximadamente 55 años, al menos aproximadamente 60 años) del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de la invención puede incluir un tratamiento único o una serie de tratamientos. Para un tratamiento eficaz, suPAR puede reducirse a una concentración equivalente a menos de aproximadamente 3,0 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 2,5 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 2,0 ng/ml de sangre, menos de aproximadamente 1,5 ng/ml de sangre, o menos de aproximadamente 1,0 ng/ml en la circulación de un sujeto.

El receptor de urocinasa (uPAR) incluye la proteína unida a la membrana, precursores, mutantes, variantes funcionales, cualquier isoforma o análogo, etc. en particular de seres humanos u homólogos de otros mamíferos. Las formas solubles de los mismos se conocen como uPAR soluble. Los términos "activo" y "actividad" con respecto a uPAR soluble se refieren a una porción soluble de uPAR que tiene una función biológica o inmunológica de uPAR nativo. Como se usa en el presente documento, "biológico" se refiere a una función que corresponde a una actividad natural de suPAR tal como su implicación en rutas de señalización, activación de integrina $\beta 3$, borramiento del proceso podocitario, inducción de proteinuria, o cualquier combinación de los mismos.

Como se usa en el presente documento, el término "variante" puede abarcar una secuencia de aminoácidos relacionada con suPAR de tipo silvestre. Esta definición puede incluir, por ejemplo, una variante alélica, de corte y empalme o polimórfica. Una variante de especie es un homólogo que varía entre las diferentes especies. Una "variante" también puede ser resultado de una o más mutaciones en la secuencia de aminoácidos, tales como sustituciones, inserciones, deleciones, dominios duplicados, y dominios barajados cuya función puede o no estar alterada. Cada una de estas alteraciones puede tener lugar en solitario, o en combinación con las demás, una o más veces en una secuencia de aminoácidos dada. Una variante "funcional" tiene al menos una actividad biológica de suPAR tal como la activación de la integrina $\beta 3$, borramiento del proceso podocitario, inducción de proteinuria, o cualquier combinación de los mismos.

Como se usa en el presente documento, el término "fragmento" es una porción de la secuencia de aminoácidos de suPAR, o una variante de la misma. Un "fragmento" puede tener al menos aproximadamente diez residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 20 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 30 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 40 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 50 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 70 residuos de aminoácidos contiguos, 80 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 90 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 100 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 120 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 140 residuos de aminoácidos contiguos, 160 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 180 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 270 residuos de aminoácidos contiguos de longitud, o cualquier rango o número entero en los mismos. El "fragmento" es más corto que los aproximadamente 280 residuos de la secuencia de aminoácidos de longitud completa de suPAR. Los "fragmentos superpuestos", como se usan en el presente documento, se refieren a fragmentos de péptidos contiguos que comienzan hacia el extremo amino y terminan hacia el extremo carboxilo de suPAR. Un "fragmento superpuesto" comparte de uno a cinco residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente tres residuos de aminoácidos contiguos, o al menos aproximadamente diez residuos de aminoácidos contiguos con el siguiente fragmento de péptido.

Como se usa en el presente documento, un "derivado" es una modificación, por ejemplo, mediante glucosilación, pegilación, fosforilación, sulfatación, reducción/alquilación, acilación, acoplamiento químico, o tratamiento con formalina suave de suPAR, o una variante del mismo. Como alternativa, un "derivado" puede modificarse para contener un marcador detectable, tanto directa como indirectamente, incluyendo, pero sin limitación, un radioisótopo, etiqueta fluorescente, giratoria o enzimática.

Se conocen anticuerpos, o porciones funcionales de los mismos, específicos para suPAR. Se pueden usar la unión, retirada o detección. Los anticuerpos policlonales o monoclonales se obtienen inmunizando a los animales (por ejemplo, pollo, hámster, ratón, rata, conejo, cabra, caballo) con un antígeno relacionado con suPAR, y opcionalmente se purifica por afinidad contra el mismo antígeno o epítipo afin. El antígeno puede ser suPAR nativo, un fragmento del mismo producido por proteólisis enzimática o ingeniería genética, polipéptido de fusión que contiene un epítipo suPAR, o polipéptido traducido o sintetizado *in vitro* que contiene al menos uno o más epítopos suPAR unidos por un anticuerpo. Por lo tanto, los anticuerpos generados originalmente contra uPAR, dominio DII y/o DIII, o un fragmento de los mismos, pueden ensayarse para determinar su especificidad contra suPAR nativo. Los anticuerpos pueden seleccionarse para aquellos que se unen a suPAR en la circulación, pero no neutralizan la activación de la integrina $\beta 3$ y el borramiento del proceso podocitario. Las porciones funcionales de anticuerpo pueden ser fragmentos preparados por proteólisis enzimática o ingeniería genética; el anticuerpo humanizado y el anticuerpo monocatenario pueden prepararse trasplantando regiones hipervariables desde el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo a un marco responsable de la conformación general. Se pueden obtener otros tipos de agentes de unión (por ejemplo, aptámero, péptido, ligando uPAR tal como uPA) cribando una biblioteca combinatoria para un miembro que se une específicamente al antígeno (por ejemplo, biblioteca de presentación de fagos). El antígeno para generar anticuerpos anti-suPAR específicos, o porciones funcionales de los mismos, puede ser un uPAR de longitud completa o cualquier fragmento del mismo (véase la definición anterior). Los anticuerpos, o porciones funcionales de los mismos, que se unen específicamente a suPAR tienen una unión baja o no detectable a otras proteínas plasmáticas. Las porciones funcionales de anticuerpos específicos para suPAR se definen incorporando las definiciones anteriores de variante, actividad, funcional, fragmento y derivado. Las células, que incluyen hibridomas, pueden usarse para producir estos anticuerpos, o porciones funcionales de los mismos.

Los anticuerpos se unen específicamente a suPAR con alta afinidad (Kd). Por ejemplo, un anticuerpo humano, de conejo, de ratón, quimérico o humanizado puede unirse a suPAR con una Kd menor de 10^{-5} , menor de 10^{-6} , menor de 10^{-7} , menor de 10^{-8} , menor de 10^{-9} , menor de 10^{-10} , menor de 10^{-11} M, o cualquier rango o valor en los mismos. Las mediciones de afinidad y/o avidéz se pueden medir con un aparato KinExA™ y/o BIACORE™.

Se apreciará que las realizaciones específicas no están limitadas a una forma particular de anticuerpos (por ejemplo, porciones funcionales de los mismos) o un método particular para generarlos y obtenerlos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-suPAR, o porciones funcionales de los mismos, pueden ser un anticuerpo de longitud completa (por ejemplo, que tiene una región Fc humana intacta), o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o Dab). Los Dabs son pequeñas porciones funcionales de anticuerpos humanos. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse en hibridomas que los secretan. Las porciones funcionales de los mismos pueden ser anticuerpos escindidos proteolíticamente o producidos en una célula recombinante transfectada con un casete de expresión génica que codifica un fragmento de anticuerpo.

La proteinuria puede ser causada principalmente por una o más alteraciones de proteínas estructurales involucradas en el mecanismo celular de filtración. Las causas fisiopatológicas de la proteinuria se pueden dividir en los siguientes grupos principales: (1) alteraciones genéticamente determinadas de las estructuras que forman la "unidad de filtración glomerular", como la membrana basal glomerular, los podocitos, o el diafragma cortado; (2) procesos inflamatorios, ya sea causados directamente por procesos autoinmunes o inducidos indirectamente por microbios; (3) daño de los glomérulos causado por agentes; o (4) como resultado final de una lesión tubulointersticial progresiva que finalmente da como resultado la pérdida de la función de toda la nefrona.

EJEMPLO 1

Aumento de suPAR en sueros de pacientes con FSGS

El receptor soluble de urocinasa (suPAR) se midió por ELISA en sueros de pacientes con enfermedad glomerular. Para los pacientes trasplantados, se midieron los niveles de suPAR a partir de sueros previos al trasplante, a menos que se indique de otro modo. Se encontró que los niveles séricos de suPAR estaban significativamente elevados en pacientes con FSGS en comparación con sujetos sanos. En contraste, faltaba alguna variación significativa de suPAR en pacientes con enfermedad de cambio mínimo (MCD), ya sea en recaída (RLP) o remisión (REM), nefropatía membranosa (MN) o preeclampsia. $P < 0,05$ para FSGS frente a MN o preeclampsia, respectivamente; $P < 0,001$ para FSGS frente a Sanos, MCD RLP, MCD o REM, respectivamente. Después, FSGS se estratificó en tres subpoblaciones diferentes: FSGS primaria, FSGS recurrente en el aloinjerto y FSGS sin recidiva después del trasplante. Se identificaron niveles significativamente más altos de suPAR en suero en los sueros previos al trasplante de pacientes que posteriormente desarrollaron FSGS recurrente en comparación con aquellos pacientes de trasplante sin recidiva. $P < 0,01$ para FSGS recurrente frente a FSGS no recurrente o FSGS primaria sin trasplante respectivamente.

Se realizó un estudio longitudinal para evaluar los niveles de suPAR en suero en pacientes con FSGS recurrente y no recurrente desde su extracción de sangre previa al trasplante hasta un año después del trasplante. Se encontraron niveles de suPAR significativamente más altos en pacientes con FSGS recurrente al año después del trasplante ($P < 0,001$ para FSGS recurrente frente a FSGS no recurrente), lo que indica que los pacientes que se predijeron y desarrollaron recidiva de FSGS mantienen un suPAR más alto un año después del trasplante niveles en comparación con aquellos pacientes con FSGS sin recidiva. Además, al comparar los niveles previos al trasplante con los niveles posteriores al trasplante (6-12 meses), el suPAR en suero aumentó aún más en ocho de los 13 pacientes con FSGS recurrente, pero no en pacientes con FSGS no recurrente. Se analizó el tamaño de la varianza y se encontró suPAR a 3000 pg/ml o más en 45 de 63 pacientes con FSGS, pero solo en cuatro de 11 pacientes con MN, uno de cada siete pacientes con preeclampsia y en ninguno de los 25 pacientes con DCM (Tabla 1).

TABLA 1: Niveles de suPAR

	FSGS	MCD	MN	PE	valor de P*
suPAR ≥ 3000 pg/ml	45	0	4	1	
suPAR < 3000 pg/ml	18	25	7	6	P $< 0,0000$
* Prueba exacta de Fisher para FSGS frente a otros grupos en su conjunto					

Aunque los niveles de suPAR se correlacionan con la presencia de proteinuria, no hubo correlación entre los niveles de suPAR en suero previos al trasplante y el grado de proteinuria después del trasplante (Pearson $r = 0,16$, $P = 0,50$). Además, los niveles de suPAR no se correlacionan con la tasa de filtración glomerular estimada (eGFR), ni en sueros previos al trasplante (eGFR < 15) (Pearson $r = 0,36$, $P = 0,16$) ni en sueros posteriores al trasplante (eGFR > 60 en promedio) (Pearson $r = 0,10$, $P = 0,58$). No se encontraron diferencias significativas de eGFR entre FSGS recurrente y FSGS no recurrente, ni antes ni después del trasplante (es decir, desde un mes hasta un año después del trasplante). Estos hallazgos también sugieren que el alto nivel sérico de suPAR antes del trasplante está asociado con la recidiva de FSGS después del trasplante. En resumen, estos datos muestran que suPAR aumenta específicamente en FSGS pero no en otras enfermedades glomerulares analizadas con afectación podocitaria tales como MCD y MN, ni en preeclampsia, una enfermedad proteinúrica causada en gran medida por disfunción endotelial.

Dado que se han informado múltiples formas de suPAR debido a la escisión del dominio o al corte y empalme alternativo, se identificaron las formas de suPAR existentes en la sangre de pacientes con FSGS. Los sueros de FSGS se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-uPAR. Se encontró un fragmento suPAR predominante a aproximadamente 22 kDa, junto con otras dos formas a aproximadamente 45 y aproximadamente 40 kDa, aunque a niveles de expresión mucho más bajos (Figura 1). En contraste, los sujetos sanos no muestran una fuerte expresión de suPAR en sus sueros. A continuación, se determinó si suPAR está unido a la albúmina o circula libremente en la sangre. Para definir si el suPAR en suero se une a la albúmina, los sueros de FSGS se inmunoprecipitaron con un anticuerpo de albúmina humana específico. Los precipitados se secan entonces con anticuerpo antiadiponectina, así como con anticuerpo anti-uPAR. Si bien se pudo detectar la adiponectina (una proteína unida a albúmina), no se detectó suPAR. Además, la inmunoprecipitación de sueros de FSGS con un anticuerpo monoclonal anti-uPAR seguido de inmunotransferencia con un anticuerpo de albúmina humana no detectó albúmina en los precipitados, lo que sugiere que suPAR en la sangre de pacientes con FSGS no está unido en gran medida a la albúmina. Como control, la división del anticuerpo de albúmina de la transferencia Western y la reinmunotransferencia con anticuerpo anti-uPAR indica la presencia de uPAR en los precipitados.

Como ligando de uPAR, los niveles de urocinasa (uPA) a menudo se encuentran elevados en pacientes con cáncer con niveles más altos de suPAR. Por lo tanto, los niveles séricos de uPA también se midieron en esta cohorte de enfermedad glomerular. Curiosamente, a diferencia del suPAR sérico, no se observaron diferencias en los niveles séricos de uPA observados entre los grupos: Sanos, MCD RLP, MCD REM, primaria, FSGS recurrente o FSGS no recurrente. Estos hallazgos, junto con los datos obtenidos de estudios previos con ratones en ratones nulos con uPA, sugieren que, en contraste con el cáncer, uPA no parece ser crucial para la lesión glomerular no inflamatoria mediada por suPAR tal como FSGS.

suPAR se une y activa la integrina $\beta 3$ en los podocitos

En los podocitos, uPAR se une a la integrina $\beta 3$. Además, se sabe que suPAR se asocia con la integrina $\beta 1$ y $\beta 2$. Por lo tanto, se investigó si suPAR también puede unirse a la integrina $\beta 3$. Usando la coimmunoprecipitación de suPAR y la integrina $\beta 3$, se encontró que suPAR interactúa con la integrina $\beta 3$ de una manera similar al comportamiento de la uPAR unida a la membrana. GFP-E1F1B, que codifica un factor de inicio de la traducción, y Flag-Raver, que codifica una ribonucleoproteína de unión a PTB 1, se utilizaron como controles de unión negativos.

Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que suPAR podría activar la integrina $\beta 3$, de manera similar a la uPAR unida a la membrana en los podocitos. La actividad de la integrina $\beta 3$ se mide usando el epítipo de activación que reconoce anticuerpos tales como el anticuerpo anti-integrina $\beta 3$ AP5. Los podocitos humanos diferenciados se incubaron con sueros de FSGS recurrente que contenían suPAR de alto nivel (5 %) en ausencia o en presencia de un anticuerpo de bloqueo de uPAR monoclonal y el péptido cycloRGDfV, que bloquea la actividad de integrina $\beta 3$. La proteína suPAR humana recombinante se usó como control positivo, mientras que el suero bovino sirvió como control negativo.

Veinticuatro horas después, la expresión y localización de la señal AP5, correspondiente a la integrina $\beta 3$ activada, se analizó mediante tinción inmunofluorescente. Los podocitos humanos muestran un nivel bajo de activación de la integrina $\beta 3$ cuando se cultiva en suero bovino o suero de sujetos sanos. En contraste, la incubación con sueros de pacientes con FSGS recurrente (es decir, ricos en suPAR) o con suPAR recombinante, induce fuertemente la activación en un patrón (señal AP5) que resalta áreas de adherencias focales, que se sabe que es la ubicación de la integrina $\beta 3$. Esta activación podría bloquearse por inhibidores específicos, anticuerpo de bloqueo de uPAR, o cycloRGDFV.

La actividad de la integrina $\beta 3$ en riñones con enfermedad glomerular se estudió en una cohorte de biopsias de pacientes (Figura 2). Se detectó tinción de AP5 en glomérulos en siete de nueve pacientes con FSGS idiopática, y en todos los pacientes con FSGS recurrente. Además, se encontró una fuerte correlación entre el grado de esclerosis focal y el número de glomérulos positivos para AP5 ($r = 0,65$, $P < 0,01$). En contraste, no se observó una señal AP5 débil o solo en glomérulos de riñón sano o en MCD y MN, lo que sugiere que la actividad de integrina $\beta 3$ de podocitos inducida es una característica específica de FSGS.

Para demostrar que el suPAR circulante afecta el riñón trasplantado al activar la integrina $\beta 3$ de podocitos, se detectó la presencia de la señal AP5 en los podocitos mediante tinción inmunofluorescente doble con sinaptopodina, un marcador de podocitos, en biopsias de injerto posteriores al trasplante. Se encontró que la actividad de la integrina $\beta 3$ era baja en los podocitos de injerto antes de la reperusión, mientras que aumentó notablemente dos horas después de la reperusión en FSGS recurrente ($n = 2$), pero no en FSGS no recurrente ($n = 2$). Además, la señal AP5 es mayor en las biopsias posteriores al trasplante en FSGS recurrente ($n = 3$) que en pacientes con injertos no recurrentes ($n = 5$). Como controles, la señal AP5 apenas se aprecia en las secciones renales normales ($n = 2$) y no aumenta en las biopsias de trasplante renal en los rechazos agudos mediados por linfocitos T ($n = 3$). En conjunto, estos hallazgos sugieren que el aumento de la actividad de la integrina $\beta 3$ de podocitos es una característica tanto de FSGS nativa como recidiva de FSGS.

Los niveles séricos individuales de suPAR y la actividad de integrina $\beta 3$ de podocitos determinan la respuesta al tratamiento de la plasmaféresis en los FSGS recurrente.

Para definir mejor la relación entre suPAR y la actividad de la integrina $\beta 3$ de podocitos, se realizó un análisis FACS para determinar la actividad de la integrina $\beta 3$ (usando el anticuerpo AP5) en podocitos humanos cultivados incubados con sueros de sujetos normales, y con los sueros previos al trasplante de pacientes con FSGS no recurrente y FSGS recurrente. Para estudiar adicionalmente los efectos de los sueros de pacientes que contienen suPAR sobre la actividad de la integrina $\beta 3$ de podocitos (AP5), se incubaron podocitos humanos diferenciados con sueros agrupados de sujetos normales ($n = 5$), sueros previos al trasplante de pacientes con FSGS no recurrente ($n = 10$), y con FSGS recurrente ($n = 15$). Después, las células se analizaron mediante análisis FACS para determinar la actividad de la integrina $\beta 3$ (tinción de AP5 según lo medido por la intensidad de fluorescencia media, MFI). Se descubrió que los sueros previos al trasplante de FSGS recurrente tenían una actividad de integrina $\beta 3$ significativamente elevada, en comparación con sueros de FSGS no recurrente y sujetos normales ($P < 0,001$ para sueros de FSGS recurrente frente a sueros de FSGS no recurrente o frente a sujetos normales). En general, los niveles de suPAR se correlacionan bien con la actividad de la integrina $\beta 3$ de podocitos visualizada con el anticuerpo A5.

Después, se determinó si inhibir suPAR podría reducir la actividad de AP5 en los podocitos. La incubación conjunta de sueros previos al trasplante de FSGS recurrente con anticuerpo anti-uPAR o con cycloRGDFv da como resultado una reducción significativa de la actividad de la integrina $\beta 3$ de podocitos inducida por sueros de FSGS. $P < 0,01$ para las células tratadas conjuntamente con cycloRGDFv frente a sueros de FSGS recurrente en solitario; $P < 0,001$ para las células tratadas conjuntamente con anticuerpo monoclonal anti-suPAR frente a sueros de FSGS recurrente en solitario. Tanto el bloqueo directo de suPAR como el antagonista de la integrina $\beta 3$ cycloRGDFv bloquean la activación de la integrina $\beta 3$ inducida de otro modo por el suero previo al trasplante de pacientes con FSGS recurrente.

El estándar actual de atención para el FSGS recurrente es la plasmaféresis, que usualmente consiste en un volumen de plasma de 1,5 litros (l) que se somete a aféresis antes del reemplazo con albúmina al 5 %. Para determinar si suPAR podría eliminarse mediante fésis, se recogieron sueros de pacientes con FSGS recurrente ($n = 4$) justo antes y después de un ciclo único de plasmaféresis, después se ensayaron los niveles de suPAR. La plasmaféresis podría eliminar suPAR del suero de pacientes con FSGS ($P < 0,01$). Los podocitos humanos se incubaron con los sueros de pacientes con FSGS recurrente ($n = 6$), que se recogieron antes o después de varias plasmaféresis para determinar su actividad de integrina $\beta 3$ en los podocitos. La actividad de la integrina $\beta 3$ de podocitos causada por los sueros de FSGS se redujo significativamente por plasmaféresis ($P < 0,001$ para la actividad de AP5 de podocitos con sueros pre-féresis frente a sueros post-féresis). Para comprender los efectos de la plasmaféresis en el resultado clínico del paciente, se estudiaron cuatro casos clínicos de pacientes con FSGS recurrente que recibieron plasmaféresis después del trasplante. Los pacientes ($n = 4$) tenían niveles séricos elevados de suPAR antes del trasplante. Después de los tratamientos de plasmaféresis en serie, dos pacientes alcanzaron una remisión clínica con niveles de suPAR en suero por debajo de 2000 pg/ml. Es importante destacar que, sus sueros también perdieron la capacidad de inducir la actividad de integrina $\beta 3$ de podocitos. La plasmaféresis redujo el suPAR en suero a un nivel normal y disminuyó la actividad de la integrina $\beta 3$ a un rango normal. En contraste, los otros dos pacientes permanecieron en recidiva a pesar de la plasmaféresis. Sus niveles séricos de suPAR todavía eran altos y sus sueros todavía causaban una fuerte

actividad de integrina $\beta 3$ de podocitos. La plasmaféresis no logró normalizar el nivel de suPAR en suero y, más importante aún, no pudo reducir la actividad de la integrina $\beta 3$ a un valor en el rango fisiológico. Estos hallazgos sugieren que los efectos estabilizadores de la enfermedad de la plasmaféresis dependen de la reducción de suPAR sérico individual a niveles que modulan bruscamente la actividad de la integrina $\beta 3$ de podocitos. Por lo tanto, se necesitaba una mejora para eliminar suPAR de la circulación de pacientes refractarios al tratamiento por plasmaféresis.

Dado que algunos pacientes con FSGS que tenían niveles altos similares de suPAR en sus sueros previos al trasplante no desarrollaron FSGS recurrente y tenían una baja señal AP5 después del trasplante en podocitos de injerto, se examinó la reactividad de la integrina $\beta 3$ del injerto. En una cohorte de 333 pacientes con enfermedad renal en fase terminal (ESKD) que recibieron un trasplante en las Islas Canarias en España, 105 injertos eran heterocigotos y 11 injertos eran homocigotos para el polimorfismo PIA₂ (Tabla 2). El polimorfismo PIA₂ codifica una integrina $\beta 3$ que es susceptible a una fuerte activación. Presumiblemente, estos pacientes son particularmente sensibles cuando se trata de niveles elevados de suPAR en sangre y el estado de PIA₂ podría considerarse como un segundo acierto para FSGS inducida por suPAR, explicando por qué los pocos pacientes con niveles similares de suPAR (altos o bajos) varían en la forma en que la enfermedad de FSGS varía antes y después del trasplante.

Tabla 2: Genotipado de PIA₂ de polimorfismos de Integrina $\beta 3$ en donantes para ESKD

Genotipado	Injertos en ESKD (n = 331)	Control (n = 100)
LL	212 (64,1 %)	66 (66,0 %)
LP (heterocigoto)	108 (32,6 %)	32 (32,0 %)
PP (homocigoto)	11 (3,3 %)	2 (2,0 %)

La inyección de suPAR provoca deposición glomerular y proteinuria

Para determinar si suPAR es una causa o consecuencia de FSGS, se establecieron tres modelos murinos diferentes de enfermedad renal: (1) inyección de suPAR recombinante en ratones knockout de uPAR (Plaur^{-/-}), (2) modelo de liberación de suPAR endógeno en ratones de trasplante híbrido, y (3) ratones genéticamente modificados que sobreexpresan suPAR en la sangre.

En primer lugar, se determinó si suPAR circulante exógeno podría depositarse en los riñones y causar albuminuria. A los ratones Plaur^{-/-} se les inyectó con dosis crecientes de suPAR de ratón recombinante por vía intravenosa. La inyección de dosis baja a 2 μ g y 10 μ g no causó albuminuria, lo que es consistente con una concentración fisiológica (baja) de suPAR en la sangre de sujetos sanos (n = 4 en cada grupo). Pero las dosis de 20 μ g y superiores conducen a la inducción de albuminuria transitoria en 24 horas (n = 4 en cada grupo) que se resolvió en 2-3 días. P <0,01 para ratones inyectados con 20 μ g de suPAR en 24 h frente a ratones inyectados con otras dosis, o frente a otros puntos de tiempo. Se sacrificaron los ratones Plaur^{-/-} inyectados con suPAR y se extirparon sus riñones para inmunotinción. Se observó una deposición prominente de suPAR cerca de podocitos en ratones Plaur^{-/-} que habían recibido 20 μ g de suPAR, pero no en ratones Plaur^{-/-} que recibieron solo 2 μ g. Además, esta deposición se asoció con un aumento en la actividad de la integrina $\beta 3$ en podocitos, como lo demuestra el aumento en el etiquetado de AP5 que dependía de nuevo de la dosis de suPAR.

suPAR causa enfermedad podocitaria en riñones de donante Plaur^{-/-}

En segundo lugar, se determinó si un mayor nivel de suPAR endógeno causa enfermedad renal en ratones de tipo silvestre. Se ha demostrado que el LPS aumenta el suPAR en la sangre de sujetos humanos a través de la liberación de monocitos. Por lo tanto, se determinó si LPS también podría mejorar los niveles sanguíneos de suPAR en ratones. De hecho, la inyección de LPS causó un fuerte aumento de suPAR en sueros y orina de ratones (n = 6) hasta cinco veces por encima de los niveles observados en ratones de control (n = 6). Los niveles séricos de suPAR aumentan significativamente durante 24 h, disminuyen 48 h después de la inyección de LPS, pero aún son significativamente más altos en comparación con los controles. P <0,001 para ratones inyectados con LPS a las 24 h frente al control de PBS, y frente a las 0 h. P <0,01 para ratones inyectados con LPS a las 48 h frente a las 0 h. En orina, los niveles de suPAR inducidos por LPS fueron más altos y alcanzaron su punto máximo 48 h después de LPS. P <0,001 para ratones inyectados con LPS a las 48 h frente a 0 h, y frente a control de PBS en cualquier punto. P <0,01 para ratones LPS a las 24 h frente a 0 h. Se generaron ratones híbridos renales en los que se extirpó un riñón de ratones de tipo silvestre y después se injertó un riñón Plaur^{-/-}. Estos ratones híbridos se recuperaron completamente en los 14 días posteriores a la cirugía y tenían una función y estructura renal normales. Después, se inyectó a cinco ratones híbridos una dosis baja única de LPS para estimular suPAR; tres ratones híbridos se inyectaron con PBS como control negativo. Veinticuatro horas después, se extirparon los riñones para el análisis EM. Las barreras de filtración normales estaban presentes en riñones tanto de injerto como nativos en ratones híbridos de control negativo. La inmunohistoquímica de uPAR muestra un bajo nivel de expresión de uPAR en glomérulos del riñón nativo de tipo silvestre, pero ninguno en el riñón de Plaur^{-/-} trasplantado. En contraste, los ratones híbridos inyectados con LPS muestran un borramiento significativo del proceso podocitario tanto en el riñón nativo como en el riñón injertado Plaur^{-/-}. Los ratones híbridos inyectados con PBS muestran bajos niveles de expresión de uPAR en glomérulos del riñón nativo de tipo silvestre y ninguno en el riñón Plaur^{-/-} trasplantado. Con los ratones inyectados con LPS, sin embargo, la inmunohistoquímica

indica una fuerte expresión de uPAR en los glomerulos del riñón nativo de tipo silvestre. Curiosamente, también se observa una fuerte señal de suPAR en el riñón Plaur^{-/-} trasplantado, lo que indica depósitos de suPAR inducidos endógenamente en el riñón. También hubo borramiento prominente del proceso podocitario de podocitos en Plaur^{-/-} así como en el riñón de tipo silvestre. Dado que los ratones Plaur^{-/-} generalmente están protegidos de la proteinuria inducida por LPS y el borramiento de podocitos, el borramiento de podocitos del injerto Plaur^{-/-} se explica mejor por suPAR depositado que proviene del huésped de tipo silvestre que conduce a la activación excesiva de la integrina $\beta 3$ de podocitos en el injerto.

La elevación prolongada de suPAR circulante provoca glomerulopatía de tipo FSGS

En tercer lugar, para explorar si la elevación prolongada de suPAR en los sueros de ratones causa una glomerulopatía progresiva, se diseñaron ratones de tipo silvestre que impulsan la expresión de suPAR de la piel. Se preparó un plásmido suPAR de ratón basándose en una secuencia codificante conocida para suPAR secretado, que contiene los dominios DI y DII. Como control, se generó un mutante de suPAR deficiente en unión a integrina $\beta 3$. Este mutante tiene una mutación puntual en el dominio DII y se denominó E134A. Los plásmidos se administraron a la piel de los ratones mediante electroporación *in vivo* en la piel. Ambas formas de suPAR de ratón se expresan igualmente bien después de la electroporación. GFP-EIF1B se usa como control de unión negativo. La expresión de la proteína se confirma por inmunotransferencia separada para la proteína etiquetada con Flag o para la proteína etiquetada con GFP. Para investigar si suPAR podría inducir una enfermedad glomerular progresiva, se usó la administración *in vivo* de genes de suPAR para mejorar la expresión de suPAR en los sueros de ratones electroporados. Los niveles de suPAR en sueros y orina comienzan a aumentar dos días después de la electroporación, que se repitió una vez por semana para una elevación sostenida de los niveles de suPAR en sangre durante el transcurso del periodo de tiempo analizado. El nivel sérico de suPAR alcanza su pico después de una semana. $P < 0,05$ el día 7 frente al día 0 (antes de la electroporación inicial). Comparativamente, se observa más suPAR en la orina. $P < 0,001$ para los días 7, 14 y 28 frente al día 0; $P < 0,05$ para el día 28 frente al día 7. No se observa diferencia en el nivel de suPAR en sangre u orina para suPAR de tipo silvestre o el mutante de suPAR E134A, que sirve como control ($n = 4$ en cada grupo).

Se recogió orina diariamente antes y después de la administración del gen suPAR para la medición de albúmina y creatinina. Coincidiendo con el aumento de suPAR en los sueros de ratones, se indujo albuminuria y persistió durante el curso de la investigación de cuatro semanas. La albúmina de orina aumenta significativamente el día 7 después de la electroporación de suPAR inicial, y alcanza su punto máximo el día 14 en ratones que expresan suPAR de tipo silvestre. En contraste, no se observa albuminuria significativa en ratones que expresan E134A, lo que sugiere que la unión de suPAR a la integrina $\beta 3$ es una característica importante de la lesión renal inducida por suPAR. $P < 0,05$ para ratones diseñados con suPAR el día 7 frente a antes del tratamiento. $P < 0,01$ para ratones diseñados con suPAR el día 14 frente a antes del tratamiento, o frente a ratones tratados con E134A el día 7 o el día 14.

Se seleccionan al azar cinco glomerulos de cada ratón y la extensión del borramiento del proceso podocitario se evalúa semicuantitativamente relacionando la longitud de la membrana basal glomerular cubierta por procesos borrados con la longitud total de la membrana basal glomerular. Si bien el borramiento grave y prolongado del proceso podocitario se encuentra después de cuatro semanas en ratones diseñados con suPAR de tipo silvestre, no se encuentra borramiento significativo en ratones diseñados con el mutante E134A. Por lo tanto, se observó un borramiento prominente del proceso podocitario compatible con la enfermedad glomerular en la ultraestructura de los podocitos solo en ratones que expresan suPAR capaz de unirse a la integrina $\beta 3$. Para estudiar si la glomerulopatía inducida por suPAR se comporta más como MCD o FSGS, los riñones se analizaron mediante microscopía óptica e histoquímica. Las anomalías en la morfología renal se observan tan pronto como dos semanas después de la sobreexpresión inicial del gen suPAR y se agravan durante cuatro semanas. La tinción con H&E y PAS reveló características de una glomerulopatía progresiva, incluyendo hiperplasticidad, expansión mesangial, mesangiólisis y adhesiones de penacho ocasionales. Cabe observar que, la deposición de complejo inmune no se detectó en ninguno de los ratones analizados. La puntuación histopatológica semicuantitativa reveló índices de una glomerulopatía progresiva que recuerda a la FSGS temprana. Es importante destacar que, estos cambios estaban ausentes en ratones que expresan el mutante de suPAR E134A incapaz de unirse a la integrina $\beta 3$ (Figura 3).

Para estudiar adicionalmente el efecto causante de la enfermedad de suPAR, se bloqueó su acción. Se administró un anticuerpo monoclonal anti-uPAR a ratones diseñados para expresar altos niveles de suPAR en suero. Se trataron con anticuerpos de bloqueo de uPAR cada dos días hasta cuatro semanas, los ratones de control recibieron la misma cantidad de isotipo IgG ($n = 4$ para cada grupo). Se recogió orina todos los días de ambos grupos y se ensayó para determinar la proteína total y la creatinina. Si bien se encontró un aumento de la proteinuria en ratones con suPAR elevado en suero que recibieron control de isotipo IgG, la administración del anticuerpo anti-uPAR protegió a los ratones de la enfermedad renal inducida por suPAR elevado en suero. $P < 0,05$ para ratones suPAR que recibieron control de isotipo el día 7 frente a antes de la electroporación inicial el día 0, o frente a ratones tratados con anticuerpo anti-uPAR el día 7; $P < 0,01$ para ratones suPAR que recibieron control de isotipo el día 21 frente al día 0, o frente a ratones tratados con anticuerpo anti-uPAR el día 21. El examen morfológico de los riñones en ratones que recibieron cuatro semanas de tratamiento anti-uPAR indica mejores puntuaciones histopatológicas en comparación con aquellos animales que recibieron anticuerpo de control de isotipo (Figura 4). Según lo indicado por la tinción H&E y PAS, no hay daño renal manifiesto con los ratones diseñados con suPAR que recibieron anticuerpo anti-uPAR. En contraste, los ratones que recibieron anticuerpos de control muestran daños renales significativos que recuerdan a la FSGS en

una fase temprana, similar a lo observado con los ratones modificados por suPAR de tipo silvestre. El análisis EM semicuantitativo muestra estructuras del proceso podocitario de podocitos significativamente mejoradas en el grupo de tratamiento con anticuerpo anti-uPAR (es decir, solo borramiento focal), en contraste con los ratones con sobreexpresión de suPAR que recibieron anticuerpo de control y desarrollaron borramiento grave del proceso podocitario. P <0,01 para el control de isotipo IgG frente a ratones tratados con anticuerpo anti-uPAR en la relación del proceso podocitario pie borrado frente a la longitud total de GBM medida. En conjunto, estos datos sugieren que la neutralización de la acción de suPAR puede mejorar la lesión renal inducida por suPAR.

ANÁLISIS

El presente estudio demuestra que suPAR es un factor sérico circulante que puede causar FSGS. Esta conclusión se basa en los estudios en seres humanos que muestran niveles séricos elevados de suPAR en una población de pacientes con FSGS pediátricos y adultos y en modelos animales con sobreexpresión de suPAR diseñada que desarrollan una enfermedad renal característica de FSGS. Los altos niveles de suPAR en suero previos al trasplante están asociados con la presencia de FSGS nativo y también constituyen un riesgo significativamente mayor de FSGS recurrente después del trasplante. Un año después del trasplante de riñón, los niveles de suPAR permanecen significativamente elevados en pacientes que desarrollan recidiva de FSGS. El mecanismo de lesión causado por suPAR asociado a FSGS es a través de la activación de la integrina $\beta 3$ en los podocitos, un evento suficiente para iniciar el borramiento del proceso podocitario de los podocitos y proteinuria. El nivel de actividad de la integrina $\beta 3$ del podocitos que es impulsado por suPAR depende de la cantidad de suPAR en suero individual y posiblemente también de la modificación postraduccional de suPAR (es decir, el estado de glucosilación), y parece ser independiente de los niveles séricos totales de uPA, que está en contraste con las asociaciones suPAR-uPA en algunas formas de cáncer. Por lo tanto, la interferencia en la patogénesis al eliminar suPAR de la circulación puede proteger a un sujeto de una lesión podocitaria mediada por suPAR. El nivel de suPAR debe reducirse a un nivel (medido como una cantidad absoluta, concentración en la circulación, o cantidad relativa en comparación con otra proteína sérica) suficiente para detener o ralentizar la patogénesis de la enfermedad al reducir la actividad de la integrina $\beta 3$ de podocitos.

Desde la primera descripción clínica de la recidiva del síndrome nefrótico después del trasplante de riñón, ha habido una creciente evidencia que sugiere la presencia de un factor de permeabilidad/FSGS circulante, tanto para FSGS nativo como para FSGS trasplante. Savin y sus colegas propusieron la existencia de una proteína de glicol de 30 a 50 kDa en pacientes con FSGS, que podría eliminarse mediante plasmaféresis. Pero la identidad molecular y los mecanismos de acción no han sido aclarados hasta ahora. Basándose en la demostración de que el uPAR unido a la membrana producido por los podocitos se induce en FSGS para activar patológicamente la integrina $\beta 3$, causando así el borramiento del proceso podocitario y la proteinuria, se adoptó un enfoque candidato y se examinó el papel de suPAR circulante en FSGS. Después de observar altos niveles de suPAR en suero en los FSGS previos y posteriores al trasplante, se crearon modelos murinos que podrían explorar la causa o naturaleza del efecto de suPAR. Curiosamente, se encontraron diferentes formas de suPAR que corresponden a diferentes fragmentos de dominio en los sueros de pacientes con FSGS, que tienen pesos moleculares que varían de 22 kDa a 45 kDa. Esto está cerca del rango molecular (de 30 kDa a 50 kDa) del factor de permeabilidad de FSGS predicho a partir del trabajo de Savin et al.

El presente estudio proporciona un predictor medible del riesgo de FSGS en pacientes con FSGS antes y después del trasplante. Como tal, aproximadamente el 75 % de los pacientes con FSGS tienen niveles elevados de suPAR en comparación con otras enfermedades glomerulares tales como MN, MCD y preeclampsia. Esto concuerda con la patología conocida que involucra anticuerpos del receptor de fosfolipasa A2 en MN y angiopoyetina tipo 4 o c-mip en MCD. Dado que suPAR es detectable tanto en sujetos humanos sanos como en ratones normales, los niveles fisiológicos de suPAR o las combinaciones fisiológicas del dominio suPAR no parecen ser dañinos. Pero puede haber otros factores en los pacientes con FSGS que los hacen susceptibles a la enfermedad o su recidiva. Otra pregunta interesante es, ¿por qué algunos pacientes con FSGS sin niveles elevados de suPAR todavía desarrollan FSGS, así como FSGS recurrente? Una respuesta obvia sería que suPAR puede actuar en concierto con uPAR de podocitos y esto podría conducir a FSGS incluso en ausencia de niveles más altos de suPAR. Por lo tanto, puede garantizarse reducir el nivel de suPAR en la circulación de un sujeto por debajo de los niveles fisiológicos.

MÉTODOS

Pacientes

Se recogieron sueros de 78 pacientes con FSGS, 25 pacientes con enfermedad de cambio mínimo (MCD), siete pacientes con preeclampsia, 16 pacientes con nefropatía membranosa (MN), y 22 sujetos normales. Cabe apreciar que se incluyeron dos pares de gemelos idénticos. En cada caso, mientras uno no estaba afectado, su hermano gemelo tenía FSGS. Estos pacientes se incluyeron en siete centros médicos diferentes. El estudio fue aprobado por la junta de revisión institucional de cada centro participante. Para los pacientes con FSGS de trasplante, la edad al trasplante era de $28,1 \pm 15,7$ años para FSGS no recurrente, $26,6 \pm 15,7$ años para FSGS recurrente. La relación hombre frente a mujer era de 16:8 para FSGS no recurrente y 15:15 para FSGS recurrente. Todos los pacientes trasplantados recibieron inducción inmunosupresora y mantenimiento, así como atención previa y posterior al trasplante (Renal Transplant Protocols, Royal Infirmary of Edinburgh, 4ª Edición, 2007). La recidiva se definió como

una relación de proteína de orina con respecto a creatinina en la mancha puntual >3,5 g/g durante los primeros 30 días después del trasplante. Para aquellos pacientes con proteinuria renal nativa en el momento del trasplante, se colocó una endoprótesis en el riñón trasplantado para medir la proteinuria del trasplante y después se retiró en la clínica ambulatoria 2-3 semanas más tarde.

5 Genotipado de *ITGB3* para PIA₂

El genotipado para el polimorfismo de integrina β3 PIA₂ (Leu33Pro) se realizó en donantes para pacientes con trasplante de riñón como se ha informado previamente (Salido et al., J. Am. Soc. Nephrol. 10:2599-2605, 1999).

10 Modelos murinos

Inyección de suPAR recombinante en ratones Plaur^{-/-}

15 Para determinar si el suPAR circulante podría depositarse en el riñón y afectar la función de ultrafiltración renal, se inyectaron i.v. dosis crecientes: 2 µg, 10 µg o 20 µg de suPAR de ratón recombinante (R&D Systems) en ratones Plaur^{-/-} (hembra, 20 ± 2,0 g) a través de la vena de la cola. Los ratones Plaur^{-/-} estaban originalmente en un fondo mixto del 75 % de C57BL/6 y el 25 % de 129, pero se retrocruzaron en ratones C57BL/6 durante diez generaciones antes de cualquier uso. Se recogió la orina antes de la inyección y cada 12 horas después de la inyección para el análisis de albúmina y creatinina. Veinticuatro horas después de la inyección, los ratones Plaur^{-/-} se sacrificaron y los riñones se congelaron para inmunofluorescencia.

Ratón híbrido, trasplante y liberación de suPAR mediada por LPS

25 Para determinar si el suPAR inducido endógenamente podría causar daño podocitario, se estableció un modelo de ratón híbrido a través de trasplante de riñón cruzado. (n = 10). El riñón del lado derecho se recogió en bloque de ratones Plaur^{-/-}. Este riñón Plaur^{-/-} se diseñó como el riñón donante, mientras que los ratones de tipo silvestre con el riñón derecho nativo extirpado fueron los receptores. Tenían un nivel inicial de uPAR en el glomérulo y un bajo nivel de suPAR en la sangre. La cirugía de trasplante se realizó siguiendo un protocolo previamente publicado con una ligera modificación (Coffman et al., J. Immunol. 151:425-435, 1993; Han et al., Microsurgery 19:272-274, 1999). En resumen, bajo anestesia, el riñón del lado derecho, el uréter se recogió en bloque, incluyendo la arteria renal con un pequeño manguito aórtico y la vena renal con un pequeño manguito caval de los ratones Plaur^{-/-} (hembra, 20 ± 2,0 g) (Han et al., 1999). Los injertos se perfundieron *in situ* con 0,5 ml de lactato de Ringer frío que contenía 10 U/ml de heparina.

35 Se realizó una anastomosis entre los manguitos vasculares y la aorta abdominal del receptor y la vena cava inferior utilizando la técnica de sutura de extremo a lado. Finalmente, para la anastomosis del uréter, la vejiga receptora se perforó con una aguja de 21 g, el uréter se atravesó, y el tejido periuretial se cosió a la pared exterior de la vejiga. La supervivencia del injerto de riñón fue seguida por exámenes diarios de la salud general de los animales y los injertos se monitorizaron mediante la medición de creatinina sérica en sangre y nitrógeno de urea. Catorce días después de la cirugía, no se observó rechazo en ninguno de los ratones trasplantados.

45 Catorce días después de la cirugía, se sacrificaron dos animales por microscopía de luz y electrónica para analizar la integridad estructural de los riñones nativos y trasplantados. Cinco ratones híbridos se trataron con lipopolisacárido (LPS) (Sigma) a 10 mg/kg de peso corporal, i.p. para inducir niveles de suPAR en la sangre, mientras que tres ratones híbridos recibieron la misma cantidad de PBS que los controles. Veinticuatro horas después del tratamiento con LPS, se extrajeron tanto los riñones nativos como los trasplantados para microscopía electrónica e inmunotinción para suPAR.

50 Mutagénesis de sitio dirigido

La mutagénesis de sitio dirigido con los kits de mutagénesis de sitio dirigido QuikChange® II XL (Stratagene) siguiendo el protocolo del fabricante. El plásmido que lleva el ADNc de suPAR de ratón (N.º de acceso de GenBank BC010309) se usó como plantilla. Se generaron diferentes pares de cebadores destinados a mutar la secuencia suPAR en DII. Después de la mutagénesis del sitio, los mutantes uPAR recién creados se cotransfectaron en las células HEK con plásmido de integrina β3 de ratón, respectivamente. Después, se realizó una inmunoprecipitación conjunta para observar la capacidad de unión de diferentes mutantes de suPAR con integrina β3. El mutante de suPAR que se encontró deficiente en la unión de la integrina β3 (es decir, E134A) se eligió entonces para su uso posterior.

60 Entrega de genes *in vivo* y electroporación

65 Para investigar si la elevación sostenida de suPAR podría causar una enfermedad glomerular progresiva y FSGS, los plásmidos que codifican suPAR de ratón se expresaron en ratones de tipo silvestre. Bajo anestesia, se inyectó un plásmido que codifica suPAR (dominios DI-DII) (40 µg en PBS) por vía intradérmica y bilateralmente en las patas traseras, seguido de electroporación *in vivo* con el sistema de administración de ADN Derma Vax™ (Cyto Pulse Sciences). Para el control, se generó un ratón mutante con el plásmido suPAR, E134A, que era deficiente en la unión

de la integrina $\beta 3$, como se ha descrito anteriormente. La administración génica se hizo una vez por semana hasta seis semanas. Se recogieron sangre y orina antes y después de cada administración génica para su análisis. Cada semana se sacrificaron cuatro ratones para examinar los riñones.

5 Estudios de bloqueo

Para confirmar adicionalmente el efecto de suPAR, se eligieron aleatoriamente cuatro ratones sometidos a administración de genes suPAR *in vivo* para recibir anticuerpo uPAR monoclonal anti-ratón (R&D Systems, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$), mientras que los otros cuatro ratones recibieron la misma cantidad de control de isotipo IgG. En primer lugar, el anticuerpo anti-uPAR se administró un día después de la administración inicial del gen suPAR, seguido de una vez cada tres días hasta cuatro semanas. La orina se recogió diariamente, y el riñón se recogió para su examen cuatro semanas después de la administración génica inicial.

suPAR en suero y medición de uPA

La concentración de suPAR circulante en sujetos humanos se cuantificó mediante el kit de inmunoensayo uPAR humano Quantikine (R&D Systems) siguiendo el protocolo del fabricante. El suPAR de ratón se evaluó mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) interno (Tjwa et al., J. Clin. Invest. 119:1008-1018, 2009). La concentración de uPA en suero se midió mediante el kit ELISA para uPA IMUNBIND (American Diagnostic).

Citometría de flujo

Para cuantificar la actividad de la integrina $\beta 3$ en los podocitos humanos, se realizó la citometría de flujo en un instrumento FACScan y se analizó con el software Cellquest (Becton Dickinson). Brevemente, los podocitos humanos completamente diferenciados se trataron con sueros humanos (5 %) o proteína recombinante suPAR durante 24 h. Posteriormente, las células se eliminaron de las placas de cultivo y se resuspendieron. Se añadió el anticuerpo AP5 (1:50) y se incubó durante 30 m a temperatura ambiente (TA). Después de un lavado suficiente con el tampón de flujo, las células se incubaron adicionalmente con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón de cabra Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, 1:500) durante 20 m. Las células se fijaron con paraformaldehído al 2 % (PFA) y se analizaron usando FACScan (Becton Dickinson). Las células incubadas con el isotipo IgG1 se usaron como control de tinción negativa.

Cultivo y transfección celular

Los podocitos humanos condicionalmente inmortalizados se cultivaron como se ha descrito previamente (Saleem et al., J. Am. Soc. Nephrol. 13:630-638, 2002). En resumen, los podocitos proliferaron y se mantuvieron a 33 °C en medio RPMI-1640 (Invitrogen), que contenía FBS al 10 % e insulina transferrina-selenio al 1 % (Sigma). Los podocitos cultivados se sembraron en cubreobjetos y se permitió la diferenciación durante 14 días a la temperatura restrictiva del crecimiento de 37 °C antes de cualquier tratamiento. Para estudiar el efecto de diferentes sueros sobre los podocitos, se eliminó el medio de podocitos convencional y se cambió a medio RPMI-1640 que contenía sueros humanos al 4 %. La proteína suPAR humana recombinante (R&D Systems) se utilizó a 1 mg/ml. Para investigar los efectos celulares inducidos por suero debido a la activación de la ruta de la uPAR-integrina $\beta 3$, se incubó conjuntamente un anticuerpo monoclonal anti-uPAR (R&D Systems, 1 mg/ml) y cycloRGDFV (Biomol, 1 mg/ml), un inhibidor de la integrina $\alpha\beta 3$ con sueros de FSGS recurrente respectivamente. Veinticuatro horas después del tratamiento, los podocitos humanos se fijaron con PFA al 4 % antes del marcado de inmunofluorescencia. Para estudiar la interacción de suPAR y la integrina $\beta 3$, se cultivaron células 293 de riñón embrionario humano (HEK) en medio DEME que contenía FBS al 10 % a 37 °C. En el 90 % de confluencia, las células se cotransfectaron con plásmidos uPAR unido a membrana de ratón etiquetado con GFP o Flag (N.º de acceso de Genbank NM_011113) o suPAR (N.º de acceso de Genbank BC010309) junto con los plásmidos que transportan integrina $\beta 3$ de ratón (N.º de acceso de Genbank NM_016780), GFP-E1F1B, que codifica un factor de inicio de la traducción, y Flag-Raver, que codifica una ribonucleo-proteína. La unión a PTB 1 también se cotransfectó para servir como control de unión negativa para estudios de coinmunoprecipitación posteriores. La transfección se realizó con Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Veinticuatro horas después de la transfección, las células HEK se cosecharon para su uso posterior.

55 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Para analizar la actividad de la integrina $\beta 3$ en podocitos humanos cultivados, el cubreobjetos con podocitos fijados se incubó con un tampón de bloqueo (suero de cabra al 5 %, suero de burro al 5 %) (véase la sección Cultivo celular para más detalles) durante 30 m a TA, después con el anticuerpo AP5 (GTI, 1:50) durante 1 h. Después del lavado tres veces con PBS durante 3 m cada uno, el anticuerpo secundario, IgG anti-ratón de cabra Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, 1:1000) se añadió y se incubó durante 45 m. Después, el cubreobjetos se lavó con PBS y se contratiñó la actividad de peroxidasa con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 3 mM, Invitrogen) durante 5 m. Las secciones se deshidrataron y se montaron en Bio Mount (Bio Optica). La especificidad del etiquetado de anticuerpos se demostró por la falta de tinción después de sustituir PBS y las inmunoglobulinas de control adecuadas (Invitrogen) por el anticuerpo primario.

Para investigar la expresión de la actividad de uPAR e integrina $\beta 3$ en glomérulos de ratón, se cortaron criosecciones de los bloques de tejido renal incorporados con OCT y se fijaron en acetona fría durante 10 m. La sección se incubó con tampón de bloqueo durante 30 m, después con anticuerpo de ratón (1:1, para inmunotinción doble con uPAR) o conejo (1:100, para inmunotinción doble con AP5) anti-sinaptopodina (obsequios del Dr. Peter Mundel, Universidad de Miami) durante 1 h. Después del lavado con PBS, la sección se incubó adicionalmente con el anticuerpo uPAR anti-ratón de cabra (R&D Systems, 1:50) o el anticuerpo AP5 (1:50) durante 1 h, seguido del dúo de anticuerpos secundarios (Alexa Fluor® 488 y Alexa Fluor® 546, Invitrogen) correspondiente con los dos anticuerpos primarios durante 45 m. Finalmente, la sección se lavó en serie con PBS y H₂O antes de montarla para el análisis por imagen. Las imágenes se adquirieron por un microscopio confocal Leica TCS SP5 o un microscopio de fluorescencia Leica DMI6000B.

Para examinar la actividad de la integrina $\beta 3$ glomerular en seres humanos, se realizó una tinción inmunofluorescente doble en los podocitos. Se obtuvo tejido renal a partir de biopsias renales de FSGS primaria (n = 9), FSGS recurrente después del trasplante (n = 6), MCD (n = 5) y MN (n = 5). El polo sano de tres riñones nefrectomizados con tumores se usó como control. Las muestras se fijaron en PFA al 4 % y se incluyeron en parafina. Las secciones se cortaron, se desparafinaron y se rehidrataron, después se trataron con radiación de microondas en tampón de citrato 10 mM (pH 6,0) para recuperar antígenos. Posteriormente, las secciones se incubaron con avidina al 0,5 % (Sigma) y biotina al 0,01 % (Sigma) para suprimir la actividad de unión a avidina endógena, y con peróxido de hidrógeno al 3 % para bloquear la peroxidasa endógena. Después, las secciones se incubaron secuencialmente con el anticuerpo primario AP5 (GTI, 1:50) durante 1 h, la IgG secundaria anti-ratón de cabra biotinilada (Invitrogen), y con la estreptavidina marcada con peroxidasa (Invitrogen).

Inmunoprecipitación y transferencia Western

Se realizó una inmunoprecipitación conjunta para examinar la interacción entre suPAR y la integrina $\beta 3$ siguiendo los protocolos publicados (Wei et al., Nature Med. 14:55-63, 2008). Brevemente, 24 horas después de la transfección con los plásmidos deseados marcados con GFP o Flag, las células HEK se lisaron en tampón RIPA (Boston Bioproducts) que contenía un cóctel inhibidor de proteasa (Roche) durante 30 m en hielo. Después de la centrifugación a 14.000 rpm durante 20 m, el sobrenadante (es decir, el lisado) se recogió y se midió su concentración de proteína total. Los lisados que portaban aproximadamente 500 mg de proteína total se incubaron después con las perlas de Flag, gel de afinidad anti-Flag M2 (Sigma) durante una noche a 4 °C para extraer la proteína de fusión de Flag y su interactoma. Después del lavado cinco veces con tampón de lisis RIPA durante 10 m cada una, se recogieron las perlas Flag mediante centrifugadora, se resuspendieron en el tampón de muestra NuPAGE LDS (Invitrogen) y se incubaron a 70 °C durante 10 m. Después de una breve centrifugación, los eluatos (el sobrenadante que contiene la proteína de fusión Flag y su interactoma) se recogieron entonces para la transferencia Western.

Para la transferencia Western, los eluatos, así como los lisados HEK que sirvieron como controles de entrada de coinmunoprecipitación, se cargaron en el gel Bis-Tris al 4-12 % NuPAGE (Invitrogen) para electroforesis. Tras la separación, las proteínas se transfirieron a la membrana de PVDF. Después, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios anti-Flag (Sigma, 1:1000) o anti-GFP (Abcam, 1:1000) después del bloqueo con leche al 5 % durante 1 h a TA o durante una noche a 4 °C. Después de un lavado suficiente en la solución salina tamponada con Tris/Tween-20 al 0,2 % (TBST), después, la membrana se incubó con anticuerpo secundario anti-ratón de cabra (1:10.000 para Flag) o anti-conejo de cabra (1:10.000 para GFP) (Promega). Finalmente, las transferencias se incubaron con sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Thermo Scientific) durante 5 m y se expusieron a película de autorradiografía Kodak (Kodak). Después, la película se desarrolló utilizando un procesador Kodak X-OMAT 2000A (Kodak).

Se usó inmunoprecipitación para determinar la presencia de suPAR en sueros humanos. Para cada reacción, se diluyeron 30 ml de suero humano de sujetos sanos o pacientes con FSGS recurrente con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) en un volumen total de 500 ml y se incubaron con 20 ml de perlas de agarosa de Proteína A/G PLUS (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 h a 4 °C. Después de la centrifugación, las perlas se eliminaron y se añadieron al sobrenadante 3 mg de anticuerpo anti-humano uPAR (R&D Systems) de ratón, así como 20 ml de perlas de agarosa de proteína A/G PLUS. La mezcla se incubó durante una noche a 4 °C antes del lavado cinco veces con PBS durante 10 m cada vez. Después, el sobrenadante, en lo sucesivo en el presente documento denominado pull-down de uPAR, se resuspendió en tampón de muestra LDS y se eluyó de las perlas de agarosa de Proteína A/G PLUS. Para detectar la presencia de suPAR en sueros de pacientes con FSGS recurrente, el pull-down uPAR se cargó en un gel Bis-Tris al 4-12 % NuPAGE, se transfirió a la membrana PVDF y después se transfirió con un anticuerpo policlonal uPAR anti-humano de conejo (Santa Cruz, 1:200). Para saber si el suPAR en suero está en forma libre o unido a la albúmina, el pull-down de uPAR se cargó en el gel Bis-Tris al 4-12 % NuPAGE, y se transfirió contra un anticuerpo de albúmina anti-humano de ratón (Abcam, 1:1000). Se cargó un ml de suero humano como control positivo para la albúmina humana. Para la inmunoprecipitación inversa, el suero humano se sometió a pull-down por el anticuerpo de albúmina anti-humano anterior, y los precipitados se inmunotransfirieron con anticuerpo uPAR anti-humano de conejo (Santa Cruz, 1:200) o anticuerpo de adiponectina anti-humano de conejo (Abcam, 1:1000) respectivamente.

Microscopía electrónica de transmisión, microscopía óptica e histoquímica

Se realizó TEM como se describe por Wei et al. (2008). Los tejidos de riñón de ratón se examinaron y se puntuaron por un nefropatólogo de manera ciega de acuerdo con un sistema de puntuación descrito previamente (Crowley et al., J. Clin. Invest. 119:943-953, 2009). En resumen, los tejidos renales fijos se incrustaron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y ácido peryódico de Schiff (PAS). Las secciones de riñón se clasificaron basándose en la presencia y la gravedad de las anomalías en los glomérulos, los túbulos, los vasos y el intersticio. La gravedad de las anomalías patológicas renales se calificó utilizando una escala semicuantitativa, en la que 0 representaba ninguna anomalía, y 1+, 2+, 3+ y 4+ representaban anomalías leves, moderadas, moderadamente graves, y graves, respectivamente. Se obtuvo una puntuación histológica para cada riñón sumando los grados individuales para los glomérulos, los túbulos y el intersticio más un punto para determinar la presencia de daño vascular o estenosis arterial. El porcentaje de glomerulosclerosis se define como el número de glomérulos con evidencia de esclerosis dividido por el número total de glomérulos en la sección.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA unidireccional o prueba t de Student pareada o no pareada. Se rechazó la hipótesis nula a un valor de P de 0,05. Los valores se presentan como media \pm D.E. a menos que se indique de otro modo.

EJEMPLO 2

En este estudio, se evaluaron las implicaciones de suPAR en suero sobre la etiología de la FSGS primaria, la respuesta a la terapia, y la progresión de la enfermedad. El suPAR circulante se analizó en dos cohortes de FSGS primaria distintas, tratadas médicamente y probadas con biopsia que contenían niños y adultos. Setenta pacientes pertenecían al ensayo clínico aleatorizado de FSGS con base en América del Norte (FSGS-CT) y 94 pacientes pertenecían al consorcio europeo para el estudio del síndrome nefrótico resistente a los esteroides (PodoNet).

Se encontró que los niveles circulantes de suPAR estaban notablemente elevados en la mayoría de los pacientes con FSGS tanto en las cohortes de FSGS-CT (84,3 %) como PodoNet (55,8 %), en comparación con los sujetos de control (5,4 %) ($P < 0,0001$). En los subgrupos FSGS-CT, los niveles séricos de suPAR aumentaron mínimamente en pacientes tratados con ciclosporina, pero disminuyeron significativamente en pacientes tratados con micofenolato mofetilo (MMF) (5064 pg/ml \pm 292 pg/ml frente a 4113 pg/ml \pm 264 pg/ml, $P < 0,01$). Además, una disminución en los niveles séricos de suPAR en el transcurso de 26 semanas de tratamiento se asoció con el logro de una remisión completa estable. En la cohorte PodoNet, los pacientes con FSGS familiar o genética debido a una mutación *NPHS2* tuvieron niveles de suPAR más altos que los casos no genéticos.

Este estudio muestra que los niveles de suPAR están elevados en pacientes geográficamente y étnicamente diversos y en pacientes con tipos genéticos/familiares y no familiares de FSGS. El cambio en suPAR circulante a lo largo del tiempo inducido por diferentes regímenes terapéuticos y la correlación con el estado de remisión respalda el papel de suPAR en la patogénesis de FSGS.

Niveles de suPAR circulantes elevados en cohortes de FSGS distintas

La suPAR circulante se midió en 110 sujetos de control, 70 pacientes con FSGS primaria de la cohorte FSGS-CT, y 94 pacientes con FSGS primaria de la cohorte PodoNet (Figura 5). Los sujetos de control tenían la misma edad que los pacientes con FSGS de PodoNet. No hubo diferencias significativas en la distribución por sexo en los grupos. En comparación con los sujetos de control, los niveles séricos de suPAR en pacientes con FSGS aumentaron notablemente en ambas cohortes de FSGS ($P < 0,001$ para FSGS-CT frente a control, PodoNet frente a control, FSGS-CT frente a PodoNet). Usando un valor de corte de 3000 pg/ml para definir una concentración anormal, el nivel inicial de suPAR circulante se elevó en el 84 % de los pacientes con FSGS en FSGS-CT en comparación con el 56 % de los pacientes con FSGS en PodoNet. El nivel medio de suPAR fue mayor en la cohorte FSGS-CT que en la cohorte PodoNet (4588 pg/ml \pm 203 pg/ml frente a 3497 pg/ml \pm 195 pg/ml, $P < 0,0001$).

Características de los pacientes con FSGS-CT

Los niveles de suPAR circulante, medidos a partir de sueros recogidos al inicio (W01) y después de 26 semanas (W26) de tratamiento, se analizaron para determinar la correlación con las variables demográficas y creatinina sérica, albúmina sérica, tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) o proteinuria (Up/c). Si bien no se encontró que la variable analizada fuera predictiva para el nivel de suPAR en W01, la albúmina sérica tanto al inicio como a las 26 semanas, y Up/c a las 26 semanas se correlacionaron con el nivel de suPAR a las 26 semanas (Figura 6).

Para explorar el efecto del tratamiento sobre los niveles de suPAR en la circulación, se analizaron muestras en pacientes que fueron asignados aleatoriamente al brazo CSA o MMF/dexametasona del ensayo. Al inicio, no hubo diferencias entre los dos brazos de tratamiento en edad al momento del muestreo, edad al inicio de la enfermedad, género, raza, proteinuria, albúmina sérica, creatinina sérica, o eGFR (Figura 7), así como los niveles de suPAR circulante mediante análisis univariado. Después de 26 semanas, sin embargo, el nivel de suPAR fue

significativamente mayor en el brazo CSA que en el brazo MMF del estudio ($P < 0,01$). Al examinar la alteración desde el inicio hasta las 26 semanas, el nivel de suPAR aumentó en el brazo CSA, pero disminuyó en el brazo MMF y los cambios en los niveles de suPAR entre los dos brazos fueron significativos ($P < 0,05$). En línea con la alteración de suPAR desde el inicio a las 26 semanas entre los dos grupos, también hubo una disminución significativamente mayor en Up/c ($P < 0,05$) y creatinina sérica ($P < 0,001$) en pacientes asignados al brazo MMF en comparación con el brazo CSA.

El resultado clínico para los pacientes con FSGS-CT se consideró favorable si lograron la remisión completa en la semana 26. De los 70 pacientes en la cohorte FSGS-CT con muestras disponibles para el análisis de suPAR, nueve lograron la remisión completa en la semana 26 independientemente de tratamiento. Aunque no hubo un cambio general significativo en los niveles de suPAR, suPAR aumentó claramente desde el inicio a la semana 26 en los cuatro pacientes cuya proteinuria reapareció en la semana 52, mientras que el nivel de suPAR disminuyó en los cinco pacientes que alcanzaron una remisión estable durante al menos seis meses. La misma tendencia se observó en pacientes que lograron una remisión completa en la semana 52.

Para explorar aún más las alternancias en los niveles de suPAR circulante en respuesta a la terapia, los pacientes se estratificaron en respondedores cuyo suPAR en suero se elevó al inicio pero se redujo a menos de 3000 pg/ml después de 26 semanas de tratamiento, y no respondedores cuyo suPAR permaneció alto (a o por encima) 3000 pg/ml) después de 26 semanas de tratamiento. En total, hubo nueve respondedores: seis del brazo MMF y tres del brazo CSA. No hubo diferencia de Up/c entre respondedores y no respondedores al inicio. Pero Up/c disminuyó drásticamente desde el principio ($6,43 \pm 1,84$) hasta el final del tratamiento ($0,33 \pm 0,15$, $P < 0,001$ frente al valor inicial) y se estabilizó hasta 78 semanas ($0,61 \pm 0,25$, $P < 0,001$ frente al valor inicial) para los respondedores de suPAR, mientras que se redujo en menos del 40 % para los no respondedores de suPAR ($4,95 \pm 0,49$ al inicio frente a $3,06 \pm 0,62$ al final del tratamiento, $P < 0,001$).

En la cohorte FSGS CT, ninguno de los pacientes analizados para determinar los niveles de suPAR tenía una enfermedad causante de una mutación genética en *NPHS2*, *INF2*, o *PLCE1*.

Características de los pacientes con FSGS PodoNet

En la cohorte PodoNet, el análisis de regresión múltiple mostró que los niveles de suPAR circulante se correlacionaron con creatinina sérica ($P < 0,01$) y eGFR ($P < 0,05$), pero no con proteinuria, o con la edad al inicio de la enfermedad, edad en el muestreo, o con el sexo en la cohorte PodoNet. Como había un número sustancial de casos familiares o pacientes con FSGS con una mutación genética definida (*NPHS2*), esta cohorte se estratificó adicionalmente en dos subgrupos, FSGS familiar/genética frente a no genética (Figura 8). No hubo diferencias con respecto a la edad al inicio de la enfermedad, la edad en el muestreo, el desglose por sexo, eGFR, o el nivel de albúmina y creatinina sérica entre los dos subgrupos. Sin embargo, la proteinuria fue mayor en el subgrupo familiar/genético. Curiosamente, el nivel de suPAR circulante fue significativamente mayor en el grupo FGSS familiar o genética, en comparación con los niveles en los casos no genéticos de FSGS primaria ($P < 0,05$).

En contraste con FSGS-CT, cuando los pacientes se asignaron aleatoriamente a terapia CSA o MMF, el tratamiento en PodoNet fue a discreción de los médicos tratantes. Para los fines del presente análisis, los pacientes se agruparon de acuerdo con la medicación que recibieron en el momento del muestreo de sangre: MMF o un inhibidor de la calcineurina. La Figura 9 analiza las características de los pacientes que recibieron MMF y los que no. En general, no hubo diferencias significativas entre los dos grupos en función de sus características demográficas o mediciones de laboratorio (por ejemplo, proteinuria, albúmina sérica, eGFR y creatinina sérica). Los niveles de suPAR circulante, sin embargo, fueron significativamente más bajos en el grupo tratado con MMF ($P < 0,05$). Se observó el mismo patrón en pacientes que recibieron MMF y prednisona, en comparación con los que recibieron otros medicamentos. En contraste, no se observó diferencia en el nivel de suPAR entre los pacientes que recibieron CSA y los que no tuvieron CSA. Finalmente, el nivel de suPAR circulante fue significativamente menor en los pacientes que recibieron MMF y prednisona, en comparación con los pacientes que recibieron CSA y prednisona ($P < 0,05$).

ANÁLISIS

Se encuentran niveles elevados de suPAR en FSGS primaria. SuPAR podría entrar en el glomérulo y unirse a y activar la integrina $\beta 3$ en la base de podocitos para causar el borramiento del proceso podocitario y proteinuria. Se concluye lo siguiente: (1) los niveles de suPAR circulante estaban marcadamente elevados en la mayoría de los pacientes con FSGS primaria en dos cohortes distintas; (2) la terapia con MMF se asoció con una disminución de suPAR sérico con el tiempo; (3) una disminución en los niveles de suPAR en el transcurso de 26 semanas de tratamiento en el FSGS-CT se asoció con una remisión completa clínicamente estable; y (4) en pacientes con FSGS primaria, los niveles de suPAR fueron significativamente más altos en casos familiares o aquellos con una mutación de podocina definida.

Una fortaleza principal de este estudio es la determinación de los niveles de suPAR en plasma en una muestra heterogénea grande de pacientes con amplios antecedentes étnicos y raciales. Los pacientes estaban bien caracterizados con fenol, normalmente con información sobre la respuesta al tratamiento y la función renal. Además, la cohorte PodoNet incluye un subconjunto considerable de pacientes con una causa genética de FSGS. Los niveles

consistentemente altos de suPAR en la circulación subrayan el papel potencial de esta molécula en la patogénesis de todas las formas de FSGS primaria.

5 Usando un valor de corte de ≥ 3000 pg/ml, el nivel de suPAR se elevó en un 56-84 % de los pacientes con FSGS en estas dos cohortes distintas. Por lo tanto, un alto nivel de suPAR en suero es un rasgo característico en la mayoría de los casos de FSGS. Las diferencias en el nivel medio de suPAR y el número de pacientes con una concentración anormalmente alta entre las cohortes FSGS-CT y PodoNet pueden reflejar la edad más joven del grupo europeo y las diferencias raciales y étnicas. Las niñas en la cohorte PodoNet tenían niveles de suPAR más altos que los pacientes masculinos. Las diferencias de género también se han documentado en otro estudio que detalló niveles elevados de suPAR. Este fenómeno, que no se observó en los pacientes estadounidenses con FSGS-CT, merece más estudio. Similar a los hallazgos de nuestro informe anterior compuesto por una mezcla de pacientes con FSGS primaria heterogéneos que contenía aquellos en tratamiento médico y aquellos que recibieron un trasplante de riñón, este estudio muestra que los niveles elevados de suPAR en suero se correlacionan con la presencia pero no con la cantidad de proteinuria. En la cohorte FSGS-CT, los niveles de suPAR circulante al inicio no se correlacionaron con ninguna de las variables analizadas. En contraste, suPAR a las 26 semanas se correlacionó con albúmina sérica y Upc a las 26 semanas. Esto sugiere que los cambios en el nivel de suPAR circulante en respuesta al tratamiento pueden reflejar la causa subyacente del curso y proceso de la enfermedad de FSGS. Esto se ve reforzado por la observación de que una disminución clara del nivel de suPAR a < 3000 pg/ml dentro de los primeros seis meses de tratamiento fue predictivo de una remisión sustancial lograda durante los 12 meses posteriores. En el último escenario, los valores de suPAR también podrían ser útiles como biomarcadores de la actividad de la enfermedad de FSGS.

Este estudio de dos cohortes distintas de FSGS primaria sugiere que las mediciones en serie de los niveles de suPAR pueden proporcionar un biomarcador útil de respuesta al tratamiento. A diferencia de la cohorte PodoNet, en la que la naturaleza y el momento de la terapia no se coordinaron con el muestreo de sangre para las mediciones de suPAR, la FSGS CT ofreció la oportunidad única de evaluar el efecto de los diferentes tratamientos porque las muestras de suero y plasma se obtuvieron antes y después de 26 semanas del tratamiento con MMF o ciclosporina A. Las observaciones indican que la terapia con MMF se asoció con una disminución significativa en los niveles de suPAR en contraste con el inhibidor de calcineurina que aumentó la concentración de suPAR en suero. Esto está respaldado por los datos de la sección transversal de la cohorte PodoNet en la que los pacientes tratados con MMF exhibieron niveles de suPAR significativamente más bajos que los pacientes tratados con terapia con inhibidor de calcineurina. Estos hallazgos sugieren que, si bien los inhibidores de calcineurina pueden tener un efecto beneficioso en pacientes con FSGS, MMF podría tener un efecto biológico diferente en las células que producen uno o más factores circulantes. Esto plantea la posibilidad de que los dos agentes tengan objetivos terapéuticos distintos y puedan actuar sinérgicamente en el tratamiento de la enfermedad glomerular.

La relación y las diferencias clínicas en la patogénesis y las respuestas al tratamiento entre casos genéticos y no genéticos de FSGS primaria ha sido durante mucho tiempo tema de discusión. Se informó que la recidiva después del trasplante también podría ocurrir en FSGS genética. En el estudio de pacientes con FSGS con mutación *NPHS2*, Caridi et al. descubrieron que los resultados posteriores al trasplante de estos pacientes, incluida la posibilidad de recidiva de proteinuria y respuesta a la plasmaféresis, fueron similares a la FSGS idiopática clásica. Su estudio sugirió que podría existir un factor de permeabilidad circulante en pacientes con FSGS con mutación *NPHS2*, así como en aquellos sin una causa genética. De hecho, el mismo grupo analizó además cinco pacientes con SRNS autosómico recesivo (*NPHS2*) para determinar la actividad de la permeabilidad glomerular en suero (Palb), y encontró una alta Palb previa al trasplante en todos los casos, equivalente a los valores observados en la FSGS idiopática. También encontraron que la proteinuria posterior al trasplante se asoció con Palb alta, y ambas podrían disminuir por plasmaféresis. En la cohorte PodoNet, los niveles de suPAR circulante fueron significativamente mayores en FSGS familiar y FSGS con mutaciones *NPHS2* documentadas. Este estudio sugiere que suPAR puede ser un factor FSGS común que se superpone a los cambios genéticos subyacentes (por ejemplo, mutaciones asociadas a FSGS en *NPHS1* y *TRPC6*).

En conclusión, después de la identificación inicial de suPAR como factor de permeabilidad circulante en FSGS primaria, este estudio de dos cohortes FSGS distintas confirma que un alto nivel circulante de suPAR es característico de la mayoría de los pacientes con FSGS primaria. Aunque se justifican estudios adicionales, este estudio sugiere el posible papel adicional de suPAR como un biomarcador independiente de la progresión de la enfermedad de FSGS y/o la capacidad respuesta.

MÉTODOS

Cohorte de ensayo clínico de FSGS (FSGS-CT)

60 FSGS-CT es un estudio controlado aleatorio que comparó la eficacia de la ciclosporina (CSA) con la combinación de micofenolato mofetilo (MMF) y dexametasona. Los criterios de inclusión clave fueron edad de 2-40 años, eGFR > 40 ml/mín por $1,73$ m², FSGS comprobada por biopsia, y resistencia a la terapia con corticosteroides. Los criterios de exclusión incluyeron FSGS secundaria, obesidad o terapia experimental previa. Todos los sujetos recibieron lisinopril o losartán en aquellos intolerantes al inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina. Los sujetos se trataron durante 52 semanas. El resultado primario fue la normalización de la proteinuria definida como una relación proteína

en orina:creatinina (Up/c) <0,2 en una muestra de la primera orina de la mañana después de 52 semanas de tratamiento activo con los medicamentos del estudio. El resultado secundario principal se basó en el nivel de proteinuria a las 78 semanas, seis meses después de la interrupción de los fármacos del estudio. Los sujetos fueron vistos 11 veces durante el periodo de tratamiento y, en cada visita, se midió la presión arterial y se obtuvieron sangre y orina para determinar la creatinina sérica, eGFR, albúmina, concentración de colesterol y proteinuria (Gipson et al., *Kidney Int'l* 80:868-878, 2011). Las muestras de suero recogidas al inicio (W01) y 26 semanas (W26) en tratamiento (n = 35 en cada brazo) se recuperaron del NIDDK Biorepository para la medición de suPAR.

Cohorte PodoNet

PodoNet es un consorcio para el estudio clínico, genético y experimental del síndrome nefrótico resistente a esteroides (SRNS). Los criterios de inclusión son niños (edad 0-18 años) con SRNS basado en protocolos de gestión en los centros médicos participantes y adultos con SRNS familiar. Los pacientes que fueron incluidos en este estudio tenían FSGS comprobada por biopsia (n = 94). El tratamiento de los sujetos se determinó clínicamente y se gestionó por su médico tratante.

Sujetos de control

Se obtuvieron muestras de plasma de 110 niños y adolescentes caucásicos sanos (mujeres = 55), que tenían 0-18 años de edad. Estos sujetos se reclutaron de la escuela primaria o secundaria en Rostock, y de la Medical Faculty of the University of Rostock, Alemania. Los niños que presentaron en el University Children's Hospital Rostock un estudio de diagnóstico antes de una cirugía menor o secundaria a enfermedades no inflamatorias como epilepsia y quejas ortostáticas también aptos. Niños con trastornos del crecimiento, antecedentes de fractura o desnutrición reciente, infecciones agudas, concentración sérica elevada de la proteína C reactiva (≥ 5 mg/l) o creatinina (≥ 2 SD) al momento de la inscripción, así como aquellos con trastornos metabólicos, enfermedades inflamatorias crónicas, y enfermedades renales o hepáticas, se excluyeron. El estudio fue aprobado por el Hospital Ethics Committee (HV-2009-003), y se obtuvo el consentimiento informado de los padres y/o participantes, si es apropiado. El suero y el plasma con EDTA se dividieron en alícuotas, después se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis. Los niveles de suPAR en controles de adultos sanos se incluyeron en el estudio original.

Ensayo de suPAR en suero

La medición de suPAR en suero se realizó usando un kit de inmunoensayo de uPAR humano Quantikine (R&D Systems).

Análisis estadístico

Las características demográficas y clínicas de pacientes y sujetos de control se compararon usando la prueba χ^2 para variables categóricas y las pruebas t de Student para variables continuas. El análisis de regresión múltiple para suPAR circulante con otras variables se realizó con SPSS. Los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM). Todas las pruebas estadísticas fueron de dos colas, y $P < 0.05$ se consideró significativo.

EJEMPLO 3

La glomeruloesclerosis focal y segmentaria (FSGS) reaparece después del trasplante de riñón en aproximadamente un tercio de los individuos afectados y puede conducir a la pérdida de aloinjerto. Se investigó el efecto de suPAR sobre los cambios ultraestructurales en los podocitos durante la FSGS recurrente o de novo. Se determinó el impacto de la terapia sobre la estructura podocitaria.

Se realizó un estudio retrospectivo en un solo centro de 25 adultos que se sometieron a un trasplante renal y desarrollaron FSGS recurrente o de novo. Se revisaron los cambios histopatológicos, y los niveles de suPAR se correlacionaron con los cambios podocitarios ultraestructurales. Se evaluó su curso clínico y el efecto de la terapia sobre el borramiento de podocitos.

Las biopsias de aloinjerto iniciales mostraron solo cinco sujetos con cambios consistentes con FSGS en microscopía óptica, y el grado de borramiento de podocitos varió del 15 % al 100 %. Los niveles medios (\pm DE) de suPAR previos al tratamiento fueron mayores entre aquellos con borramiento grave del proceso podocitario (≥ 75 %) en comparación con aquellos con borramiento leve del proceso podocitario (< 25 %) (11.773 pg/ml \pm 5.595 pg/ml frente a 5.070 pg/ml \pm 1.277 pg/ml respectivamente; $P = 0,02$). Se administró una media de 21 (IQR: 10-23) sesiones de plasmaféresis. Doce pacientes recibieron rituximab. Entre los respondedores, la creatinina sérica media mejoró de $3,1$ mg/dl \pm $2,5$ mg/dl a $1,9$ mg/dl \pm $0,6$ mg/dl ($P = 0,048$). La proteinuria media disminuyó de $5,3$ g/g \pm $5,9$ g/g a $1,6$ g/g \pm $1,6$ g/g ($P = 0,01$) y el borramiento medio del proceso podocitario disminuyó del $54\% \pm 35\%$ a $23\% \pm 23\%$ ($P = 0,007$).

La manifestación patológica inicial de FSGS después del trasplante es el borramiento del proceso podocitario de podocitos. El grado de borramiento está estrechamente relacionado con el nivel de suPAR previo al tratamiento. La respuesta a la terapia mejora el borramiento del proceso podocitario.

Las características demográficas y clínicas de los participantes se muestran en la Tabla 3. El tiempo medio hasta el diagnóstico de FSGS fue de 48 días (rango intercuartil (IQR) de 4 días a 350 días) después del trasplante de riñón. Antes del tratamiento, veinte (80 %) de los receptores tenían eGFR por debajo de 60 ml/mín por 1,73 m², mientras que trece (52 %) tenían 3 g/g o más de proteinuria. La duración media del seguimiento fue de 16,0 meses \pm 20,1 meses. Media \pm desviación estándar (DE).

Hombres, n (%)	13 (52)
Raza negra, n (%)	13 (54)
Edad media en el trasplante, años \pm DE	43 \pm 12
Edad media en el diagnóstico de FSGS, años \pm DE	33 \pm 11
Duración media de la diálisis, años (IQR)	2 (0,5 - 3)
Micción previa al trasplante, n (%)	15 (60)
Diagnóstico primario previo al trasplante, n (%)	
FSGS	21 (84)
Otros	3 (12)
Desconocido	1 (4)
N.º de trasplantes en el momento de la recidiva de FSGS, n (%)	
1	18 (72)
2	4 (16)
3	3 (12)
Donante vivo, n (%)	15 (60)
Relacionado	4 (16)
No relacionado	11 (44)
Trasplante incompatible con ABO, n (%)	5 (20)
Tiempo medio con respecto al tratamiento posterior al trasplante, días (IQR)	48 (4 - 350)
Proteinuria media, g/g (IQR)	
Previo al trasplante	2,3 (1,1 - 7,7)
Pretratamiento	3,9 (1,8 - 7,3)
Creatinina sérica media previa al tratamiento, mg/dl (IQR)	2,2 (1,8 - 4)
eGFR medio previo al tratamiento, ml/mín 1,73 m ² (IQR)	35,1 (22,7 - 43,4)
suPAR medio previo al tratamiento, pg/ml (IQR)	6714 (5821-8557)

Veinticuatro sujetos tenían biopsias renales disponibles (en el momento del diagnóstico de FSGS después del trasplante); en diecisiete sujetos, la biopsia se realizó antes del inicio de la plasmaféresis y en seis poco después del inicio de la terapia (media de 5 días después del inicio del tratamiento, intervalo: 3-9 días) para evaluar el grado inicial de borramiento del proceso podocitario; un individuo no tuvo biopsia renal y otro no recibió terapia de plasmaféresis. En la biopsia renal inicial, cinco de los sujetos tuvieron cambios histopatológicos consistentes con FSGS en microscopía óptica (esclerosis segmentaria y depósito de hilanina), 19 no tuvieron ningún cambio de FSGS en microscopía óptica en la biopsia inicial; el borramiento del proceso podocitario varió del 15 % al 100 %. Veintidós individuos tuvieron seguimiento después de la terapia; cuatro de los sujetos que tuvieron cambios microscópicos ópticos continuaron teniendo los mismos cambios, y uno no tuvo ningún cambio de FSGS en la microscopía óptica. Pero cuatro sujetos adicionales desarrollaron cambios microscópicos ópticos en la biopsia de seguimiento después de la terapia, tres de ellos no respondieron a la terapia y perdieron su aloinjerto poco después de la recidiva, y uno tuvo solamente una respuesta parcial a la terapia y perdió un aloinjerto un año después.

Los niveles de suPAR previos al tratamiento se correlacionaron significativamente con la gravedad del borramiento del proceso podocitario de forma gradual (Tabla 4). Los niveles medios de suPAR fueron más de dos veces superiores entre aquellos con borramiento grave del proceso podocitario (11.773 pg/ml \pm 5.595 pg/ml frente a 5.070 pg/ml \pm 1.277 pg/ml respectivamente; P = 0,02).

Borramiento medio de podocitos	suPAR medio, pg/ml (DE)
\leq 25 % (n = 5)	5.070 (1.277)
del 26 % al 74 % (n = 4)	8.109 (4.335)
\geq 75 % (n = 5)	11.773 (5.595)

*Valor de P para las diferencias en las medias = 0,02

El tratamiento con plasmaféresis (PXP) comenzó en el momento de la FSGS recurrente o de novo que se manifiesta por el inicio o empeoramiento de la proteinuria. Los sujetos completaron una media de 21 sesiones de plasmaféresis (IQR: 10-23). Doce sujetos fueron refractarios a la plasmaféresis y recibieron infusión adyuvante de rituximab. Ocho (32 %) sujetos tuvieron una remisión completa, y otros 12 (48 %) individuos lograron una remisión parcial. Con el

tratamiento (Tabla 5), la creatinina sérica media general mejoró de 3,1 mg/dl \pm 2,3 mg/dl a 2,1 mg/dl \pm 1,2 mg/dl (P = 0,07), y el eGFR medio mejoró de 35,6 ml/mín \pm 19,4 ml/mín a 46,0 ml/mín \pm 24,3 ml/mín por 1,73 m² (P = 0,01). Adicionalmente, entre los respondedores, la creatinina sérica disminuyó aún más de 3,1 mg/dl \pm 2,5 mg/dl a 1,9 mg/dl \pm 0,6 mg/dl (P = 0,48).

5

	Pre promedio \pm DE	Post promedio \pm DE	Valor p
Borramiento medio del proceso podocitario, %			
Primera biopsia (n = 24)	59 \pm 33		
General (n = 22)	60 \pm 33	29 \pm 30	0,002
PXP en solitario (n = 12)	70 \pm 31	35 \pm 30	0,01
PXP + rituximab (n = 10)	49 \pm 32	21 \pm 27	0,07
Creatinina sérica, mg/dl			
General (n = 25)	3,1 \pm 2,3	2,1 \pm 1,2	0,07
PXP en solitario (n = 12)	3,1 \pm 1,9	2,1 \pm 1,4	0,16
PXP + rituximab (n = 12)	3 \pm 2,7	2,1 \pm 0,88	0,28
Proteinuria, g/g			
General (n = 24)	5,4 \pm 5,4	4,4 \pm 9,4	0,6
PXP en solitario (n = 12)	6,4 \pm 6,9	2,1 \pm 3,1	0,07
PXP + rituximab (n = 12)	4,4 \pm 3,1	6,6 \pm 12,5	0,57
Proteinuria, g/g			
	Pico	Más reciente	
General (n = 24)	10,9 \pm 11,4	4,6 \pm 10	0,05
PXP en solitario (n = 12)	9,3 \pm 9,6	2,3 \pm 5,4	0,045
PXP + rituximab (n = 12)	12,5 \pm 12,7	7 \pm 12,7	0,3

Entre los que alcanzaron la remisión completa o parcial (Tabla 6), la proteinuria media disminuyó significativamente después del tratamiento de 5,3 g/g \pm 5,9 g/g a 1,6 g/g \pm 1,6 g/g (P = 0,01). En contraste, los individuos que no respondieron al tratamiento tenían proteinuria persistente, que variaba de 4,2 g/g a 17,0 g/g. Las mejoras en estos parámetros clínicos se correlacionaron con los cambios observados en el borramiento del proceso podocitario, que disminuyó del 54 % \pm 35 % al 23 % \pm 23 % (P = 0,007) en sujetos que lograron una remisión completa o parcial, solo uno desarrolló FSGS en microscopía óptica.

10

	Pre promedio \pm DE	Post promedio \pm DE	Valor p
(continuación)			
Tabla 6. Cambio en los parámetros renales antes y después del tratamiento en respondedores			
Borramiento medio del proceso podocitario, %			
General (n = 17)	54 \pm 35	23 \pm 23	0,007
PXP en solitario (n = 10)	67 \pm 34	30 \pm 26	0,017
PXP + rituximab (n = 7)	34 \pm 27	14 \pm 14	0,1
Creatinina sérica, mg/dl			
General (n = 20)	3,1 \pm 2,5	1,9 \pm 0,6	0,048
PXP en solitario (n = 11)	3,1 \pm 2	1,7 \pm 0,5	0,047
PXP + rituximab (n = 12)	3 \pm 2,96	2,1 \pm 0,7	0,38
Proteinuria, g/g			
General (n = 20)	5,3 \pm 5,9	1,6 \pm 1,6	0,01
PXP en solitario (n = 11)	6,3 \pm 7,2	1,3 \pm 1,7	0,04
PXP + rituximab (n = 9)	4,1 \pm 3,4	1,9 \pm 1,4	0,1
Proteinuria, g/g			
	Pico	Último	
General (n = 20)	8,3 \pm 8	1,2 \pm 1	0,0005
PXP en solitario (n = 11)	8,8 \pm 9,8	0,7 \pm 0,7	0,017
PXP + rituximab (n = 9)	7,6 \pm 4,9	1,7 \pm 1,2	0,005

15

ANÁLISIS

Este estudio demuestra que el nivel de suPAR circulante antes del tratamiento de FSGS recurrente o de novo después del trasplante renal se correlaciona significativamente con la gravedad del borramiento del proceso podocitario de podocitos en el aloinjerto renal en el momento del diagnóstico de FSGS. En segundo lugar, el estudio estableció que el hallazgo patológico inicial de FSGS recurrente y de novo en el aloinjerto renal es el borramiento del proceso

20

podocitario de podocitos, detectado por microscopía electrónica, que puede extenderse de leve ($\leq 25\%$) a grave ($\geq 75\%$), y en algunos casos un borramiento completo en ausencia de cambios microscópicos ópticos. En tercer lugar, se demostró que la respuesta completa o parcial a la plasmaféresis con o sin rituximab dio como resultado una mejora significativa en el borramiento del proceso podocitario de podocitos.

5 Los datos amplían el papel recientemente descubierto de suPAR en FSGS. En el estudio de Wei y colegas, aproximadamente dos tercios de los sujetos con FSGS primaria tenían concentraciones significativamente elevadas de suPAR en comparación con sujetos sanos y aquellos con otros síndromes nefróticos primarios. Además, los niveles más altos de suPAR antes del trasplante se observaron entre los sujetos con FSGS que desarrollaron recidiva de FSGS después del trasplante renal. El estudio se basa en estos hallazgos al demostrar que entre los receptores con FSGS recurrente o de novo después del trasplante renal, los niveles de suPAR se correlacionan con cambios ultraestructurales en la estructura de los podocitos en seres humanos.

15 Además, los hallazgos demuestran la importancia potencial de medir los niveles de suPAR para predecir el riesgo de recidiva de FSGS y estimar la cantidad de daño posible en los podocitos del aloinjerto renal. Basándose en modelos experimentales de ratones, los efectos de suPAR en los procesos del pie son a través de la unión y activación de la integrina $\beta 3$ que se expresa en los podocitos. Tomados en el contexto de la respuesta variable a la plasmaféresis con o sin rituximab, sin embargo, se necesitan estudios prospectivos para determinar si el gen que codifica la integrina $\beta 3$ (*ITGB3*) en el receptor o el aloinjerto renal también influye en el pronóstico sobre el FSGS recurrente y la respuesta al tratamiento. También queda por determinar si la plasmaféresis y la mejora inducida por rituximab en el borramiento del proceso podocitario son paralelas a una disminución en los niveles de suPAR circulante, y determinar qué estrategia de tratamiento es superior para lograr una reducción en los niveles de suPAR circulante.

25 Algunos han sugerido que el hallazgo más inmediato en la FSGS recurrente es el borramiento del proceso podocitario; sin embargo, hay datos clínicos limitados para confirmar esto. Si bien varios informes de casos han mostrado el borramiento del proceso podocitario en receptores de trasplante renal con FSGS recurrente, solo uno informó cambios en la microscopía electrónica antes del inicio de la terapia en un solo paciente con recidiva inmediata de FSGS después de un trasplante de riñón de donante fallecido. En este informe, la biopsia del injerto una hora después del trasplante mostró anomalías glomerulares menores con borramiento parcial del proceso podocitario en microscopía electrónica. 30 La biopsia de protocolo a los tres meses para proteinuria persistente mostró una FSGS obvia bajo microscopía óptica. La biopsia de aloinjerto renal después de un año mostró la recuperación del borramiento del proceso podocitario pero aumentó la esclerosis global. Aunque recientemente se ha informado que el grado de borramiento del proceso podocitario en las biopsias posteriores a la reperfusión en pacientes con FSGS con alto riesgo de enfermedad recurrente puede predecir proteinuria recurrente después del trasplante, estos datos deberán validarse en una población diferente que incluya pacientes adultos con FSGS.

El estudio representa la serie de casos más grande hasta la fecha que confirma que el cambio detectable más temprano en la FSGS recurrente después del trasplante renal es el borramiento del proceso podocitario, y demuestra que el diagnóstico temprano y el tratamiento de FSGS recurrente pueden dar como resultado una mejora o resolución del borramiento del proceso podocitario y los parámetros renales clínicos, tales como función renal del aloinjerto y proteinuria.

En resumen, se demuestra que los niveles de suPAR previos al tratamiento se asociaron con la gravedad del borramiento del proceso podocitario de podocitos en el momento del diagnóstico de FSGS después del trasplante. 45 Adicionalmente, se establece que el borramiento del proceso podocitario de podocitos detectado por microscopía electrónica es el primer cambio ultraestructural durante la FSGS recurrente humana y de novo después del trasplante de riñón. Además, una respuesta completa o incluso parcial a la plasmaféresis con o sin rituximab dio como resultado una recuperación completa o parcial del borramiento del proceso podocitario. Estos hallazgos resaltan la necesidad de ensayos prospectivos para determinar si la disminución de los niveles de suPAR antes o después del trasplante renal previene la recidiva de FSGS y la necesidad de estudios adicionales para determinar si otros factores de receptores y donantes afectan al riesgo de recidiva de FSGS. Además, el estudio también respalda la necesidad de evaluar el papel de los cambios de microscopía electrónica para monitorizar la respuesta y determinar la duración adecuada de la terapia.

55 MÉTODOS

Diseño y población del estudio

60 Se realizó un estudio observacional retrospectivo de todos los receptores adultos de trasplante renal que se sometieron a un trasplante renal entre el 1 de enero de 2003 y el 31 de diciembre de 2011, y desarrollaron FSGS recurrente o de novo después del trasplante de riñón en un solo hospital terciario. Se identificaron 105 receptores de trasplante renal de 18 años de edad y mayores. Noventa y tres tenían FSGS nativa comprobada por biopsia renal; 12 tenían un probable diagnóstico de FSGS. Veinticinco individuos desarrollaron FSGS de novo ($n = 4$) y FSGS recurrente ($n = 21$) después del trasplante renal. La FSGS recurrente se definió por la presencia de proteinuria (más de 1 g/24 horas) en individuos que estaban anúricos antes del trasplante renal (ocho anúricos y dos desconocidos) o empeoramiento de la proteinuria entre aquellos que no estaban anúricos antes del trasplante renal ($n = 15$). La FSGS de novo se definió

como el nuevo inicio de proteinuria después del trasplante renal en un receptor cuya causa principal de ESRD no se atribuyó al FSGS. El diagnóstico se confirmó por la presencia de borramiento del proceso podocitario de podocitos en la biopsia de aloinjerto obtenida antes o en los 14 días posteriores al inicio del tratamiento. La Johns Hopkins University School of Medicine Institutional Review Board aprobó este estudio.

5

Recopilación de datos

Los datos sociodemográficos y clínicos se extrajeron de los historiales médicos de pacientes mediante la doble entrada de datos desde el momento del trasplante renal hasta tres años después del trasplante renal, o el último seguimiento clínico disponible. Las características clínicas del donante recopiladas incluyeron el estado vital del donante, la relación con el receptor, y la compatibilidad ABO con el receptor. Las características clínicas del receptor incluyeron la edad en el momento del diagnóstico de FSGS, la causa principal de ESRD, el número de trasplantes renales previos, la duración entre los que recibieron diálisis, la creatinina sérica y la proteinuria definidas por la relación proteína-creatinina en orina. La tasa de filtración glomerular (eGFR) se estimó utilizando la ecuación CKD-Epi que se ajusta por edad, sexo y raza (Levey et al., *Ann. Intern. Med.* 150:604-612, 2009). Los receptores se trataron con plasmaféresis. Aquellos con proteinuria persistentemente significativa también recibieron una o dos infusiones de rituximab. La respuesta completa se definió por una disminución de la proteinuria por debajo de 1 g/g al finalizar el ciclo de tratamiento y/o en la última cuantificación disponible de proteinuria. La respuesta parcial a la terapia se definió como una disminución de la proteinuria al final del tratamiento en un 50 % desde el nivel máximo de proteinuria, pero con proteinuria restante de 1 g/g o más al final del tratamiento. La histopatología renal se evaluó por un patólogo renal utilizando microscopía óptica, inmunofluorescencia y microscopía electrónica. El grado de borramiento del proceso podocitario de podocitos se basó en informes de biopsia, así como en evaluaciones secundarias de la microscopía electrónica por un segundo patólogo renal ciego con respecto al informe de biopsia original y al resultado del receptor. Estas dos evaluaciones se promediaron a continuación para obtener el borramiento medio del proceso podocitario de los podocitos, que se clasificó como <25 % (leve), 25 % -74 % (moderado), y del 75 % o más (grave). Los resultados iniciales de la microscopía electrónica se obtuvieron de biopsias renales realizadas antes o poco después del inicio de la terapia. El borramiento del proceso podocitario después del tratamiento se evaluó a partir de biopsias renales realizadas después de la finalización de las sesiones de plasmaféresis o después de la infusión de rituximab en casos refractarios. Entre los receptores con suero almacenado disponible antes del inicio del tratamiento, se midieron los niveles de suPAR utilizando el inmunoensayo uPAR humano Quantikine (R&D Systems) siguiendo el protocolo del fabricante en la University of Miami School of Medicine.

10

15

20

25

30

Análisis estadístico

Se realizaron análisis descriptivos para evaluar las distribuciones de las características sociodemográficas y clínicas iniciales de los receptores. Los niveles medios de suPAR de pretratamiento se compararon en las tres categorías de borramiento del proceso podocitario inicial mediante la prueba de Kruskal-Wallis. El cambio en el borramiento medio de podocitos, la función renal, la proteinuria y los niveles de suPAR desde el inicio hasta el post-tratamiento se evaluaron entonces mediante la prueba t de Student pareada. Estas comparaciones se realizaron utilizando la población general del estudio y después se restringieron solo a los receptores que obtuvieron una respuesta parcial o completa al tratamiento. Todos los análisis estadísticos se realizaron con Stata/MP versión 11.2 (StataCorp).

35

40

REIVINDICACIONES

1. Un cartucho inmunosorbente específico para el receptor soluble de urocinasa (suPAR), en donde el cartucho comprende:

- 5 (i) una entrada;
- (ii) un soporte;
- (iii) uno o más anticuerpos específicos de suPAR o porciones funcionales de los mismos que están unidos al soporte;
- 10 (iv) una salida;
- (v) un alojamiento que contiene el soporte en el mismo; y
- (vi) una ruta de fluido a través del alojamiento que conecta la entrada y la salida;

15 en donde el suPAR en una fase fluida de sangre, plasma o suero ingresa en la entrada, sigue la ruta de fluido a través del alojamiento y sale por la salida, se inmoviliza a través de la formación de un complejo inmune entre el suPAR y los anticuerpos, o porciones funcionales de los mismos, y su unión al soporte; y en donde el cartucho está configurado para su inserción en un aparato de aféresis.

20 2. El cartucho de la reivindicación 1, en donde el cartucho puede unirse a 2 µg a 10 µg de suPAR.

3. El cartucho de la reivindicación 1, en el que el soporte se selecciona del grupo que consiste en al menos una membrana permeable a fluidos, una o más fibras porosas, y una pluralidad de partículas.

25 4. El cartucho de la reivindicación 1, en el que el alojamiento está configurado para al menos filtración por membrana o cromatografía en columna.

5. El cartucho de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o la porción funcional del mismo:

- 30 (i) están unidos reversiblemente al menos al soporte; o
- (ii) están unidos irreversiblemente al soporte.

6. El cartucho de la reivindicación 1, que comprende además un envase aséptico que rodea el alojamiento para mantenerlo, la entrada, y la salida en condiciones estériles y apirógenas.

35 7. Uno o más anticuerpos específicos de suPAR, o porciones funcionales de los mismos, para su uso en un método de tratamiento de enfermedad renal proteinúrica en un sujeto, en donde los anticuerpos forman parte de un cartucho inmunosorbente que comprende:

- 40 (i) una entrada;
- (ii) un soporte;
- (iii) uno o más anticuerpos específicos de suPAR o porciones funcionales de los mismos que están unidos al soporte;
- (iv) una salida;
- (v) un alojamiento que contiene el soporte en el mismo; y
- 45 (vi) una ruta de fluido a través del alojamiento que conecta la entrada y la salida;

50 y en donde el suPAR en una fase fluida de sangre, plasma o suero del sujeto entra en la entrada, sigue la ruta de fluido a través del alojamiento y sale por la salida, se inmoviliza a través de la formación de un complejo inmune entre el suPAR y los anticuerpos, o porciones funcionales de los mismos, y su unión al soporte.

8. Uno o más anticuerpos específicos de suPAR para el uso de la reivindicación 7, en donde en el método de tratamiento del receptor soluble de urocinasa (suPAR) se elimina de la circulación de un sujeto, y el método comprende:

- 55 (a) poner en contacto extracorpóreo dicho cartucho inmunosorbente en condiciones de unión con sangre, plasma o suero como una fase fluida obtenida del sujeto, en donde la fase fluida comprende suPAR y otras proteínas plasmáticas;
- (b) separar un complejo inmune, que está compuesto por suPAR unido a los anticuerpos específicos de suPAR, o porciones funcionales de los mismos, de al menos algunas de las otras proteínas plasmáticas no complejadas en la fase fluida fuera del cuerpo del sujeto; y
- 60 (c) devolver al menos algunas de las otras proteínas plasmáticas a la circulación del sujeto.

9. Uno o más anticuerpos específicos de suPAR para el uso de la reivindicación 8, comprendiendo además el método:

- 65 (i) antes de (b), inmovilizar el complejo inmune en al menos el soporte;
- (ii) después de (a), separar las proteínas plasmáticas de al menos células seleccionadas del grupo que consiste

- en eritrocitos, leucocitos, trombocitos y combinaciones de los mismos;
- (iii) antes de (a), separar las proteínas plasmáticas de al menos células seleccionadas del grupo que consiste en eritrocitos, leucocitos, trombocitos y combinaciones de los mismos; o
- 5 (iv) antes de (b), separar las proteínas plasmáticas de al menos células seleccionadas del grupo que consiste en eritrocitos, leucocitos, trombocitos y combinaciones de los mismos.
10. Uno o más anticuerpos específicos de suPAR para el uso de la reivindicación 8, en donde el método de tratamiento comprende además añadir uno o más anticoagulantes a la fase fluida.
- 10 11. Uno o más anticuerpos específicos de suPAR para el uso de la reivindicación 8, en donde:
- (i) el complejo inmune se separa de al menos algunas de las otras proteínas plasmáticas mediante filtración por membrana o cromatografía en columna; y/o
- 15 (ii) el suPAR se elimina de la circulación en 10 a 20 rondas de unión entre una fase fluida y uno o más anticuerpos específicos de suPAR, o porciones funcionales de los mismos.
12. Uno o más anticuerpos específicos de suPAR para el uso de la reivindicación 8, en donde de al menos el 20 % hasta al menos el 30 % de suPAR que circula en un paciente antes de la etapa (a) se elimina en una sola ronda.
- 20 13. Uso de un cartucho inmunosorbente como se define en la reivindicación 1 para la eliminación extracorpórea de suPAR de la sangre de un paciente, en el que la sangre tratada debe devolverse a la circulación del paciente.
14. Un método para eliminar suPAR de una fase fluida de un sujeto, comprendiendo el método:
- 25 (a) poner en contacto extracorpóreo la fase fluida, que está compuesta por suPAR y otras proteínas plasmáticas obtenidas del sujeto, con uno o más anticuerpos específicos de suPAR, o porciones funcionales de los mismos, en donde los anticuerpos forman parte de un cartucho inmunosorbente de acuerdo con la reivindicación 1, en condiciones de unión; y
- 30 (b) separar un complejo inmune, que está compuesto por suPAR unido a los anticuerpos, o porciones funcionales de los mismos, de al menos algunas de las otras proteínas plasmáticas no complejadas en la fase fluida fuera del cuerpo del sujeto, en donde al menos algunas de las otras proteínas plasmáticas son para el retorno a la circulación del sujeto.

Figura 1

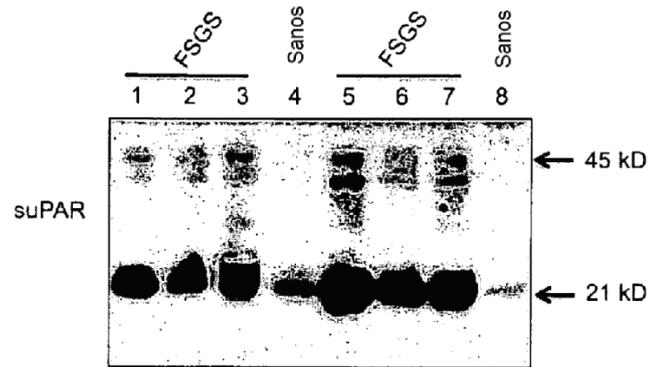


Figura 2

Integrina $\beta 3$ activa (tinción de AP5) en biopsias renales

Enfermedad	Número de glomérulos	% de esclerosis focal	% de glomérulos AP5 positivos
Control (n=3)	32,7 \pm 4,2	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
FSGS primaria (n=9)	10,1 \pm 2,3	31 \pm 7,3	60,2 \pm 39,3 *
FFSGS recurrente (n=6)	9,3 \pm 1,0	31,8 \pm 5,4	77,8 \pm 18,5 **
MCD (n=5)	10 \pm 1,4	0,0 \pm 0,0	17 \pm 21,1
MN (n=5)	10 \pm 1,6	0,0 \pm 0,0	10,8 \pm 19,1

Figura 3

Punción patológica

	Glomérulo (Intensidad 0-4; Focal 0-4)			Túbulo (Intensidad 0-4; Focal 0-4)			Intersticio (Intensidad 0-4; Focal 0-4)		
	Hiper celularidad focal	Reactividad podocitaria	Adhesión	Hiperlobulación	Subtotal	Deposición de proteínas	Inflamación crónica		
suPAR	4,3 ± 0,6	3,0 ± 1,0	1,3 ± 0,6	2,0 ± 0,0	10,7 ± 1,5	1,7 ± 0,6	0,7 ± 0,6		
E134A	1,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,6	1,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0		

Figura 4

Puntuación patológica renal

	Glomérulo (Intensidad 0-4; Focal 0-4)			Túbulo (Intensidad 0-4; Focal 0-4)			Intersticio (Intensidad 0-4; Focal 0-4)		
	Hiper celularidad focal	Reactividad podocitaria	Adhesión	Hiperlobulación	Subtotal	Deposición de proteínas	Inflamación crónica		
suPAR/ IgG Con	4,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,7 ± 1,1	0,7 ± 0,0	9,3 ± 1,5	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,6		
suPAR/ uPAR Mab	1,7 ± 0,6	1,0 ± 0,0	0,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	3,0 ± 1,0	0,0 ± 0,6	0,0 ± 0,0		

Figura 5

Distribución de edad (años) y sexo de la población de estudio

	Control	FSGS-CT	PodonNet
Edad en el muestreo			
0-2	12		8
3-12	62	17	55
13-18	36	27	31
>18		26	
Edad al inicio de la enfermedad			
0-2		1	29
3-12		20	53
13-18		24	12
>18		25	
Sexo			
Mujer	50	31	56
Hombre	50	39	38

Figura 6

Análisis de regresión múltiple de suPAR en GSGS-CT

	Valor de P	
	suPAR W01	suPAR W26
Edad al inicio	0,06	0,98
Edad en el muestreo	0,15	0,58
Sexo	0,06	0,33
Raza	0,73	0,07
Up/c W01	0,52	0,05
Albúmina sérica W01	0,81	0,02
Creatinina sérica W01	0,12	0,86
eGFR W01	0,24	0,83
Up/c W26		0,02
Albúmina sérica W26		0,02
Creatinina sérica W26		0,95
eGFR W26		0,06

Figura 7

Características FSGS CT iniciales por tratamiento, análisis univariado

	CSA (N=35)	MMF (N=35)	Valor de <i>p</i>
Edad al inicio	18,43 ± 1,76	17,29 ± 1,65	0,60
Edad en el muestreo	19,89 ± 1,79	18,26 ± 1,64	0,47
Mujeres (%)	13 (37,14%)	18 (51,42%)	0,28
Raza negra	11 (31%)	12 (34%)	0,50
Up/c (g/g)	5,41 ± 0,77	4,59 ± 0,53	0,40
Albúmina sérica (mg/dl)	3,07 ± 0,15	3,13 ± 0,13	0,90
Creatinina sérica (mg/dl)	1,18 ± 0,12	1,00 ± 0,09	0,25
eGFR	118,20 ± 10,34	122,60 ± 9,24	0,53
suPAR (pg/ml)	4721 ± 319,9	4311 ± 224,4	0,36

Figura 8

Características de PodoNet por etiología

	Gen/Fam (N=28)	No genético (N=66)	Valor de P
Edad al inicio	5,24 ± 0,78	6,41 ± 0,56	0,22
Edad en el muestreo	8,36 ± 1,06	10,53 ± 0,63	0,06
Mujeres (%)	20 (71,42%)	36 (54,54%)	0,13
Proteinuria (g/m ² /d)	3,27 ± 0,76	1,68 ± 0,35	0,03
Albúmina sérica (mg/dl)	2,96 ± 0,21	3,43 ± 0,13	0,07
Creatinina sérica (mg/dl)	0,91 ± 0,13	0,69 ± 0,07	0,19
eGFR	104,9 ± 20,86	110,2 ± 9,29	0,06

Figura 9

Características de PodoNet por tratamiento

	MMF (N=17)	Otros (N=77)	Valor de P
Edad al inicio	4,83 ± 0,99	6,41 ± 0,51	0,17
Edad en el muestreo	11,07 ± 1,29	9,62 ± 0,60	0,22
Mujeres (%)	8 (47,05%)	48 (62,33%)	0,13
Proteinuria (g/m ² /d)	1,59 ± 0,68	2,25 ± 0,39	0,18
Albúmina sérica (mg/dl)	3,21 ± 0,31	3,31 ± 0,12	0,86
Creatinina sérica (mg/dl)	0,82 ± 0,13	0,74 ± 0,07	0,66
eGFR	91,60 ± 10,82	112,2 ± 10,90	0,89