



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departamento de Medicina



**Aplicación de la Proteómica en la
Búsqueda de Biomarcadores de
Glomeruloesclerosis Segmentaria y Focal y
Nefropatía por Cambios Mínimos**

TESIS DOCTORAL UAB/2016

Vanessa Pérez Jiménez

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departamento de Medicina



**Aplicación de la Proteómica en la
Búsqueda de Biomarcadores de
Glomeruloesclerosis Segmentaria y Focal y
Nefropatía por Cambios Mínimos**

**Tesis presentada por Vanessa Pérez Jiménez para optar al título de
Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona.**

**Tesis realizada bajo la dirección del Profesor Ramón Romero González en
el programa de Doctorado en Medicina de la Universitat Autònoma de
Barcelona.**

Vanessa Pérez Jiménez

Dr. Ramón Romero González

Barcelona, septiembre 2016

Índice

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
1. SÍNDROME NEFRÓTICO EN EL ADULTO	9
1.1. Nefrona. Formación y composición de la orina	9
1.2. Manifestaciones clínicas	17
1.3. Clasificación	22
1.4. Epidemiología y etiología	23
1.5. Diagnóstico. Biopsia renal	25
1.6. Nefropatía por cambios mínimos	27
1.7. Glomeruloesclerosis segmentaria y focal	31
2. PROTEÓMICA	35
2.1. Tecnología proteómica	38
2.1.1. Preparación y procesamiento de la muestra	38
2.1.2. Análisis por espectrometría de masas	45
2.1.3. Identificación de las proteínas	52
2.2. Proteoma urinario	54
3. BIOMARCADORES DE NEFROPATÍA POR CAMBIOS MÍNIMOS Y GLOMERULOESCLEROSIS SEGMENTARIA Y FOCAL	57
3.1. Biomarcadores de nefropatía por cambios mínimos	57
3.2. Biomarcadores de glomeruloesclerosis segmentaria y focal	62

3.3. Proteómica en la búsqueda de biomarcadores de nefropatía por cambios mínimos y glomerulosclerosis segmentaria y focal	65
HIPÓTESIS	69
OBJETIVOS	71
MATERIALES Y MÉTODOS	74
ANÁLISIS DEL PEPTIDOMA URINARIO	76
ANÁLISIS DEL PROTEOMA URINARIO	91
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	114
ANÁLISIS DEL PEPTIDOMA URINARIO	118
ANÁLISIS DEL PROTEOMA URINARIO	135
DISCUSIÓN GENERAL	170
CONCLUSIONES	174
BIBLIOGRAFÍA	181
ANEXO I: <i>“Urinary peptide profiling to differentiate between minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis.”</i> PloS One. 2014;9(1):e87731	199

Abreviaturas

2DE	Electroforesis bidimensional
2D-DIGE	Electroforesis bidimensional diferencial en gel
AAT	Alfa-1-antitripsina
ACN	Acetonitrilo
ASB-14	Amidosulfobetaina-14
AUC	Área bajo la curva
BCAT2	Aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa, mitocondrial
BSA	Albúmina sérica bovina
CALB2	Calretinina
CCNY	Ciclina- γ
CHAPS	3-(cloroamidopropil)-dimetilamonio-1-propanosulfato
CLC-1	Factor 1 de citocinas similar a la cardiotrofina
c10orf11	<i>Leucine-rich repeat-containing protein c10orf11</i>
DTT	Ditiotreitol
ELOF1	Homólogo del factor de transcripción elongación 1
ESI	Ionización por electrospray
FT-ICR	Resonancia ciclotrónica de iones mediante transformada de Fourier
GSF	Glomerulosclerosis segmentaria y focal
HCCA	Ácido α -4-hidroxicinámico
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HN6	Humanina-like 6
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HTA	Hipertensión arterial

HTN3	Histatina-3
IC	Intervalo de de confianza
iCAT	Marcaje de afinidad codificado por isótopos
IEF	Isoelectroenfoque
iTRAQ	Marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta
IL-2	Interleuquina-2
IL-2R	Receptor de membrana de la IL-2
IL-13	Interleuquina-13
IPG	Gradientes inmovilizados de pH
LC	Cromatografía líquida
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MALDI	Desorción/ionización por láser asistida por matriz
MDRD	Fórmula modificación de la dieta en la enfermedad renal
miRNAs	MicroRNAs
MRPL17	Proteína ribosomal 39s L17, mitocondrial
MS	Espectrometría de masas
MudPIT	Cromatografía multidimensional de identificación de proteínas
<i>m/z</i>	Relación masa / carga
NCM	Nefropatía por cambios mínimos
PAS	Ácido periódico de Schiff
PCNP	Proteína nuclear contenedora de señal proteolítica PEST
PI	Punto isoeléctrico
PMF	Huella peptídica

PPP1R8	Inhibidor nuclear de la fosfatasa 1
PTAFR	Receptor del factor activador de plaquetas
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SELDI	Desorción/ionización por láser de superficie
suPAR	Receptor soluble de la uroquinasa
TA	Temperatura ambiente
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TF	Transferrina
TFA	Ácido trifluoroacético
TMC1	Proteína canal transmembrana-like 1
TOF	Tiempo de vuelo
uPAR	Receptor de la uroquinasa
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
ZAG	Zinc-alfa-2-glicoproteína

Introducción

1. SÍNDROME NEFRÓTICO EN EL ADULTO

El síndrome nefrótico es la consecuencia clínica de la pérdida de proteínas en la orina debida a un aumento de la permeabilidad de la pared capilar glomerular [1]. En la mayoría de casos, se debe a una lesión funcional o estructural en los podocitos, aunque puede afectar también a células del endotelio capilar y de la membrana basal [2].

A continuación se describe brevemente la estructura histológica de la nefrona para poder entender mejor la fisiopatología del síndrome nefrótico.

1.1. Nefrona. Formación y composición de la orina

La nefrona es la unidad estructural y funcional del riñón. En un individuo adulto hay más de un millón de estas unidades repartidas por toda la corteza renal. Las nefronas están formadas por un corpúsculo renal, donde tiene lugar la filtración del plasma sanguíneo, y un sistema tubular, donde ocurren los mecanismos de reabsorción y secreción que terminan de formar la orina (Figura 1) [3].

El corpúsculo renal está formado por el glomérulo y por la cápsula de Bowman que lo rodea. La cápsula de Bowman posee dos polos opuestos: el polo vascular, por donde entra la arteriola aferente y sale la arteriola eferente, y el polo urinario que se continúa con la porción tubular de la nefrona. La porción tubular se subdivide en: túbulo proximal, asa de Henle, túbulo distal y túbulo colector [3].

El glomérulo es un ovillo de capilares contorneados que derivan de la arteriola aferente, cuya pared está revestida interiormente por un endotelio muy fino de células planas con poros de 40 - 100 nm. Estas células endoteliales se apoyan sobre una membrana basal glomerular, la cual se encuentra recubierta por unas células epiteliales altamente especializadas denominadas podocitos. Los podocitos forman la capa epitelial visceral; estas células emiten unas largas prolongaciones citoplasmáticas, denominadas pedicelos, que envuelven a los capilares glomerulares y se entrelazan con las prolongaciones de los podocitos vecinos, dejando entre ellos unos estrechos espacios de unos 25 - 35 nm de anchura. Estos espacios se denominan hendiduras de filtración y permiten la salida del filtrado plasmático de los capilares glomerulares hacia el espacio capsular. Los pedicelos de los podocitos están íntimamente unidos a la membrana basal glomerular del capilar subyacente pero el cuerpo celular se separa del capilar entre 1 y 3 μm , lo que hace que casi toda la superficie del capilar se encuentre tapizada de pedicelos densamente interdigitados. Esta disposición aumenta al máximo la superficie total de las hendiduras de filtración, facilitando el paso del filtrado glomerular [3,4].

El ovillo de capilares se sostiene por el mesangio glomerular, el cual está compuesto por células mesangiales y por matriz mesangial, un material fibrilar amorfo compuesto principalmente por colágenos de tipo IV y V y por glicoproteínas como laminina, fibronectina y proteoglicanos [3].

La formación de la orina tiene lugar en las nefronas mediante tres procesos fisiológicos: filtración glomerular, reabsorción tubular y secreción tubular [3].

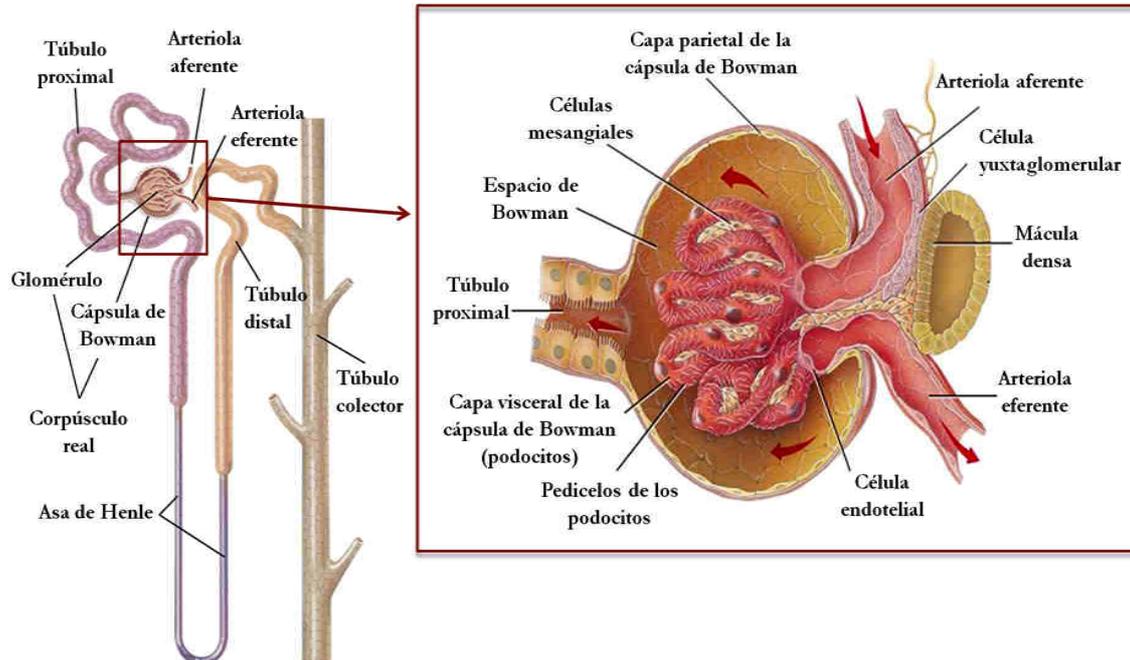


Fig. 1. Esquema de una nefrona (Imagen modificada de John Wiley & Sons).

El filtrado glomerular es la parte del plasma que atraviesa la barrera de filtración glomerular hacia el espacio de Bowman. Esta barrera la conforman las células endoteliales fenestradas de los capilares glomerulares, la membrana basal glomerular y las hendiduras de filtración [5,6] (Figura 2). Se trata de una barrera selectiva, permeable al agua y a solutos de bajo peso molecular (<10 kDa), pero que limita el paso a los elementos formes de la sangre, a proteínas y a otros componentes de elevado peso molecular, los cuales quedan retenidos en los capilares. Además, la pared de los capilares glomerulares está cubierta de cargas eléctricas negativas por su contenido en polianiones (glicoproteínas y proteoglicanos), lo que hace que el glómulo regule también el paso de moléculas según su carga eléctrica, facilitando el paso a moléculas neutras y catiónicas y restringiéndolo a moléculas aniónicas, como por ejemplo la albúmina [5].

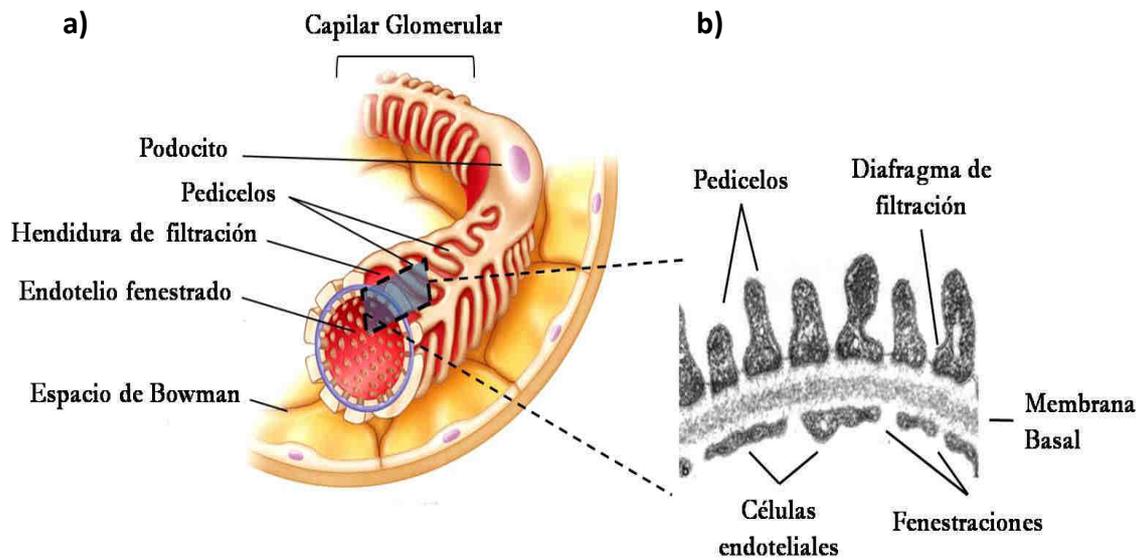


Fig. 2. Barrera de filtración glomerular. a) Capilar glomerular cubierto por podocitos. b) Ampliación de un corte del capilar (MET 78.000x). (Imagen modificada de Pearson Education y www.niddk.nih.gov)

De esta manera, el filtrado glomerular posee una composición muy similar a la del plasma sanguíneo, excepto que no contiene proteínas plasmáticas ni elementos formes de la sangre, debido a su gran tamaño y elevado peso molecular.

La filtración del plasma en el glomérulo es un proceso pasivo que depende de la interacción de tres tipos de fuerzas, denominadas Fuerzas de Starling, que son [7]:

- i. Presión hidrostática glomerular. Es la presión sanguínea de los capilares glomerulares y favorece la filtración (55 – 60 mmHg).
- ii. Presión oncótica capilar. Es la presión osmótica del plasma y tiende a impedir la filtración y a favorecer la reabsorción. Esta presión varía a lo largo de los capilares glomerulares, oscilando entre 22 y 35 mmHg.

- iii. Presión hidrostática capsular. Es la presión del ultrafiltrado que pasa a la cápsula de Bowman y, al igual que la anterior, tiende a impedir la filtración (20 mmHg).

La presión de los capilares (i) es superior a la suma de las otras dos fuerzas (ii, iii), por lo que el resultado neto es una presión de filtración positiva.

El volumen de líquido que pasa hacia la cápsula de Bowman en un determinado periodo de tiempo se conoce como tasa de filtración glomerular. En condiciones normales, se forman en el riñón 125 ml de filtrado glomerular cada minuto, de los cuales 124 ml vuelven a la circulación general mediante la reabsorción tubular. Por esta razón, menos del 1% del filtrado glomerular es excretado como orina. Se conservan los componentes imprescindibles para el organismo como el agua, la glucosa, los aminoácidos y las sales inorgánicas. Muchas de las proteínas filtradas en el glomérulo son también reabsorbidas en los túbulos proximales, por lo que la excreción diaria de proteínas en condiciones normales es inferior a 150 mg [4].

Finalmente, mediante la secreción tubular, se produce el paso de moléculas desde los capilares peritubulares hacia el lumen tubular con el fin de regular la concentración de algunas sustancias en el plasma sanguíneo y de eliminar desechos del organismo. Se trata de un proceso activo que requiere proteínas transportadoras de membrana para el paso de sustancias en contra de su gradiente de concentración [4].

Una vez el filtrado llega a los túbulos colectores no sufre más modificaciones en su composición y constituye la orina definitiva, la cual se acumula en la vejiga urinaria hasta ser excretada del organismo durante la micción.

En cuanto a la composición de la orina, ésta es muy variada ya que depende de numerosos factores, como son la dieta, la actividad física y el estado de salud del individuo, por lo que es muy difícil establecer unos valores normales para sus diferentes componentes.

En condiciones normales, la orina contiene una pequeña cantidad de solutos diluidos en la cantidad de agua que el organismo no necesita. Estos solutos incluyen sustancias inorgánicas como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} y H^+ , sustancias de desecho del metabolismo nitrogenado (urea, ácido úrico y creatinina) y sustancias tóxicas o extrañas al organismo [4].

También se pueden encontrar en la orina algunos elementos formes, como células (bacterias, hematíes, leucocitos o células descamativas), cilindros hialinos y algunos cristales de origen endógeno (ácido úrico, oxalato cálcico y fosfatos), pero siempre en mínimas cantidades. Un estudio microscópico del sedimento urinario permite detectar alteraciones cuantitativas y cualitativas de estos elementos formes, que son de gran interés tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de los pacientes. Estas alteraciones incluyen:

- **Hematuria.** En condiciones normales pueden aparecer 1 ó 2 hematíes por campo en el sedimento urinario. Si aparecen más de 2 hematíes por campo, más de 8.000 hematíes por ml de orina fresca centrifugada o más de 13.000 hematíes por ml de orina no centrifugada se considera patológico y se denomina hematuria. Ésta puede ser microscópica, si sólo se detectan los hematíes con la ayuda de un

microscopio, o macroscópica, si es visible a simple vista y tiñe la orina de un color que puede variar de rojo brillante a marrón.

Si mediante el microscopio se observa que los hematíes son dismórficos, se debe sospechar que la hematuria es de origen glomerular y si son isomórficos, se debe sospechar que la hematuria procede de las vías urinarias [4,8].

- **Proteinuria.** Como ya se ha descrito, en condiciones normales, sólo atraviesan libremente la barrera de filtración glomerular las proteínas plasmáticas de bajo peso molecular y la albúmina, la mayoría de las cuales son posteriormente reabsorbidas en el túbulo proximal, y sólo una mínima cantidad es excretada en la orina [6]. También se eliminan en la orina proteínas excretadas por células tubulares del tracto urinario inferior, principalmente proteína de Tamm-Horsfall [5].

La excreción normal de proteínas es de 150 mg/24h y se consideran patológicos valores superiores a 300 mg/24h [6,9].

Un aumento de proteínas en la orina puede conferirle a ésta un aspecto espumoso en el momento de la micción. Existen diferentes tipos de proteinuria:

- Proteinuria transitoria: tienen lugar en situaciones no patológicas y es reversible. Es debida a situaciones como ejercicio intenso, embarazo, fiebre, convulsiones, infecciones, insuficiencia cardíaca y por el empleo de fármacos vasoactivos, como la noradrenalina o la angiotensina.

- Proteinuria ortostática: aparece generalmente en la adolescencia, puede alcanzar los 2 g/24 h, y se normaliza con la posición en decúbito. Puede ser transitoria o persistente, y no supone ningún riesgo de progresión a insuficiencia renal.
- Proteinuria glomerular: debida a un aumento en la permeabilidad de la barrera de filtración glomerular que resulta en una filtración anormalmente elevada de proteínas plasmáticas. Puede ser:
 - Selectiva: cuando la proteína mayoritaria es la albúmina, Suele deberse a una lesión glomerular en la que sólo está afectada la electronegatividad de la barrera de filtración glomerular.
 - No selectiva: cuando contiene una mayor proporción de proteínas de elevado peso molecular, sobre todo inmunoglobulinas. Suele deberse a una alteración en la estructura de la barrera de filtración glomerular.
- Proteinuria tubular: aparece por un déficit en la reabsorción de las proteínas filtradas. Es debida a alteraciones hereditarias o adquiridas del túbulo proximal. Puede aparecer albúmina, α -globulinas, β -globulinas o β_2 -microglobulina, y la cantidad excretada no suele superar los 2 g/24 h.
- Proteinuria por sobrecarga filtrada: se eliminan en la orina proteínas de bajo peso molecular que por su elevada concentración en plasma son filtradas en gran cantidad y exceden la capacidad de reabsorción tubular. Suele ocurrir

por una síntesis anómala o excesiva de una proteína concreta o bien por una liberación masiva durante una lesión tisular.

- **Lipiduria.** Es la pérdida de lípidos en la orina. La filtración de éstos es mínima en sujetos sanos pero está considerablemente incrementada cuando aumenta la permeabilidad glomerular a macromoléculas.

1.2. Manifestaciones clínicas

El síndrome nefrótico se define por las siguientes características [1]:

- **Proteinuria** igual o superior a $3,5 \text{ g} / 1,73\text{m}^2 / 24\text{h}$.
- **Hipoalbuminemia.** La pérdida urinaria de albúmina y el aumento de su catabolismo, unido a la baja respuesta hepática para la síntesis de albúmina producen una hipoalbuminemia severa, con niveles inferiores a $2,5 \text{ g/dl}$.
- **Edemas.** Constituyen la manifestación clínica más frecuente y evidente en estos pacientes. Se trata de edemas típicamente simétricos, blandos, fríos y de intensidad variable. El líquido extracelular se acumula inicialmente en zonas declives como las extremidades inferiores y en los párpados, y se extiende en fases más avanzadas hasta llegar a ocasionar ascitis, derrame pleural y anasarca.

Los edemas son debidos a la hipoalbuminemia, que conduce a un descenso de la presión oncótica del plasma y, en consecuencia, a una salida de líquido al intersticio y una disminución del volumen circulante. El bajo volumen circulante

conduce a la retención de sodio y agua mediados por la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona y por la hormona antidiurética. La baja presión oncótica del plasma sanguíneo hace que el agua retenida vuelva a fugarse al intersticio manteniendo así un estado constante de depleción de volumen [10,11].

- **Dislipidemia.** El perfil lipídico del síndrome nefrótico se caracteriza por un incremento de colesterol total, principalmente a expensas de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), hipertrigliceridemia con aumento de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), y niveles reducidos de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Esto es debido a una eliminación excesiva de las HDL y de la lecitin colesterol aciltransferasa, una proteína involucrada en la síntesis de las HDL. Además, el descenso en la presión oncótica del plasma provoca un aumento en la síntesis hepática de las LDL y de la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa, enzima limitante en la síntesis de colesterol [12]. Por el contrario, la actividad de la lipoprotein lipasa endotelial disminuye, por lo que la tasa de degradación de las VLDL es mucho menor y se favorece la acumulación de triglicéridos en sangre [13].

La dislipidemia favorece el desarrollo de enfermedad cardiovascular y la progresión de la enfermedad renal crónica.

- **Lipiduria.** Debida a un aumento de filtración de las lipoproteínas.

El análisis microscópico del sedimento urinario de un paciente con síndrome nefrótico puro se caracteriza por la presencia de gotas de grasa [8].

Las alteraciones metabólicas asociadas a este síndrome condicionan una morbilidad significativa. Estas alteraciones incluyen:

- **Estado de hipercoagulabilidad.** Aunque existe una variación considerable en la incidencia de complicaciones tromboembólicas en el síndrome nefrótico, se reconoce que este problema afecta a aproximadamente el 35% de los pacientes [14]. En el síndrome nefrótico se da un estado de hipercoagulabilidad que predispone a padecer trombosis arteriales y venosas. La trombosis de la vena renal es la más frecuente, pero la afectación puede darse en cualquier otro lecho vascular [15–17].

La condición protrombótica en el síndrome nefrótico se debe a la pérdida urinaria de factores anticoagulantes, principalmente antitrombina III, una glucoproteína con un peso molecular de 58 kDa, similar al de la albúmina, que inhibe la coagulación a través de la neutralización de la trombina. La pérdida en la orina de proteínas de bajo peso molecular provoca la elevación en plasma de las de mayor peso molecular, como es el caso de algunas proteínas pro-coagulantes, como los factores V y VIII, así como del fibrinógeno, que pasa a fibrina [16]. En el síndrome nefrótico también se observa un aumento de la agregación plaquetaria.

Además, la administración de corticoides a estos pacientes altera los niveles de ciertos factores de la coagulación y puede constituir un estímulo adicional para una actividad procoagulante.

- **Susceptibilidad a infecciones.** Las infecciones son una de las principales y más frecuentes complicaciones en el síndrome nefrótico. La principal causa es la pérdida urinaria de inmunoglobulinas, principalmente IgG, así como de algunos factores del complemento, en especial de los factores B y D, lo que limita la opsonización y la capacidad fagocítica, haciendo más frecuentes las infecciones por microorganismos encapsulados, como es el caso de la peritonitis por neumococo.

Además, el tratamiento con corticoides y el líquido de edema, que actúa como medio de cultivo de los microorganismos, incrementan el riesgo de infección.

La infección más frecuentemente asociada al síndrome nefrótico es la peritonitis primaria, siendo sus principales síntomas dolor abdominal, fiebre, irritabilidad peritoneal, náuseas y vómitos. Con menos frecuencia se dan infecciones pulmonares, cutáneas y urinarias, meningocelalitis y, en casos más graves, septicemia. El *Streptococcus pneumoniae* es el organismo causal más frecuente, pero también pueden encontrarse bacterias gramnegativas como *Haemophilus influenzae* [1,18].

- **Insuficiencia renal.** La función renal en estos pacientes suele ser normal pero, sobre todo en pacientes de edad avanzada, con proteinuria masiva e hipoalbuminemia marcada, puede aparecer insuficiencia renal aguda o incluso un fracaso renal establecido, a veces favorecido por el uso de antiinflamatorios no esteroideos, por inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina II, y por diuréticos a altas dosis [19].

- **Anemia.** Ocurre en un elevado porcentaje de pacientes con síndrome nefrótico, en consecuencia a las pérdidas urinarias de eritropoyetina, transferrina y a la insuficiencia renal asociada [20].
- **Hipertensión arterial (HTA).** Es una complicación muy frecuente en el síndrome nefrótico [21].

No se conoce con claridad qué factores predisponen a padecer HTA, pero se sospecha que están relacionados con la retención de sodio y agua, o bien con la pérdida en orina de sustancias antihipertensivas.

- **Disminución de sustancias endógenas.** Muchas proteínas se pierden por la orina y al reducirse sus niveles plasmáticos, disminuyen las sustancias que transportan como iones (hierro, cobre, cinc), vitaminas (metabolitos de la vitamina D) y ciertas hormonas (esteroideas y tiroideas).

Clínicamente, la mayoría de los pacientes permanecen eutiroideos, aunque se dan casos de hipotiroidismo, el cual se resuelve con la remisión del síndrome nefrótico.

En cuanto al calcio y la vitamina D, ambos se encuentran alterados en estos pacientes. Las proteínas fijadoras de vitamina D, con un peso molecular de 59 kDa, son filtradas junto a la albúmina en pacientes con síndrome nefrótico y la hipoalbuminemia conduce a bajas concentraciones plasmáticas de calcio [22].

1.3. Clasificación

El síndrome nefrótico puede clasificarse según su etiología, manifestaciones clínicas e incluso, en función de su respuesta al tratamiento con corticoides (en corticosensible y corticoresistente).

Según su etiología el síndrome nefrótico se clasifica en:

- **Idiopático o primario:** se define como aquellas formas de síndrome nefrótico en las que no se conoce la causa determinante y no es posible identificar una enfermedad o condición sistémica responsable.
- **Secundario:** incluye todas aquellas lesiones renales que aparecen como consecuencia de una afección sistémica, de enfermedades hereditarias, de fármacos, de infecciones o de neoplasias, y habitualmente se acompañan de signos y síntomas extrarrenales, inherentes a la condición subyacente.

En función de las manifestaciones clínicas, el síndrome nefrótico se clasifica en:

- **Completo / Incompleto.** Aquellos casos de síndrome nefrótico que se presentan con la totalidad de sus componentes clínicos es decir, proteinuria en rango nefrótico, edema, hipoalbuminemia, hiperlipidemia (con hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia ó hipertrigliceridemia aislada), se consideran formas completas, mientras que aquellos casos donde no hay dislipidemia y/o el edema, se consideran formas incompletas.

- Puro / Impuro. Se consideran impuros aquellos casos en los que existe hematuria (macro o microscópica) y/o HTA. Si no se dan estas manifestaciones el síndrome nefrótico se considera puro. La mayoría de enfermedades glomerulares primarias que cursan con síndrome nefrótico, como son la nefropatía por cambios mínimos (NCM), la glomeruloesclerosis segmentaria y focal (GSF) y la nefropatía membranosa, lo hacen con formas puras.

1.4. Epidemiología y etiología

El síndrome nefrótico en adultos es debido a causas muy heterogéneas, las más frecuentes, junto con otras menos frecuentes, se muestran en la Tabla 1.

Cualquier glomerulonefritis, primaria o secundaria, puede producir síndrome nefrótico en algún momento de su evolución. Las glomerulonefritis son aquellas enfermedades en las que se encuentra afectada la estructura y función del glomérulo y representan entre un 15 a 26% de las causas de enfermedad renal crónica. Según el Registro de Glomerulonefritis de la Sociedad Española de Nefrología (www.senefro.org), con datos de casi 22.000 biopsias renales recogidas durante 20 años (1994 - 2013), la mitad de la patología renal biopsiada en nuestro país, excluyendo los casos de trasplante renal, la constituyen las glomerulonefritis. Entre las glomerulonefritis primarias, las que más frecuentemente producen síndrome nefrótico son la NCM, la GSF, la nefropatía membranosa, y la glomerulonefritis membranoproliferativa. Entre las glomerulonefritis secundarias destacan la nefropatía diabética seguida de la amiloidosis renal y la glomerulonefritis fibrilar.

Causas frecuentes	
Glomerulonefritis primarias	Nefropatía por cambios mínimos Glomerulosclerosis segmentaria y focal Glomerulonefritis membranosa Glomerulonefritis membranoproliferativa
Glomerulonefritis secundarias	Diabetes mellitus, amiloidosis , crioglobulinemia
Otras causas	
Fármacos	Antiinflamatorios no esteroideos, sales de oro, mercurio, litio, plata, penicilamina, probenecid, contraste yodado, captopril, rifampicina, interferón α , heroína , warfarina
Enfermedades autoinmunes	Lupus eritematoso sistémico, enfermedad mixta del tejido conectivo, dermatitis herpetiforme, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, púrpura de Schönlein-Henoch, vasculitis, crioglobulinemia, colitis ulcerosa, lipodistrofia facial, sarcoidosis, dermatomiositis
Patología obstétrica	Preeclampsia
Infecciones	VIH, glomerulonefritis postinfecciosa
Síndromes hereditarios	Síndrome de Alport, enfermedad de Fabry, enfermedad de Graves-Basedow, glomerulosclerosis segmentaria y focal familiar, anemia drepanocítica, síndrome nefrótico congénito
Otras patologías	Colitis ulcerativa crónica inespecífica, sarcoidosis, amiloidosis, reflujo vesicoureteral, hipertensión arterial vascularrenal, necrosis papilar, obesidad mórbida, nefropatía crónica del injerto, hipotiroidismo, infecciones (bacterianas, virales, parasitarias y fúngicas), neoplasias

Tabla 1. Etiología del síndrome nefrótico en adultos [8].

1.5. Diagnóstico. Biopsia renal

La aproximación diagnóstica inicial de un paciente con síndrome nefrótico se basa en una evaluación de los datos clínicos y analíticos. Cuando se identifica una enfermedad sistémica como causa del síndrome nefrótico no suele ser necesario el estudio histológico. Por el contrario, si los datos clínicos no revelan una causa clara, la biopsia renal es la única opción para obtener el diagnóstico definitivo, así como para establecer el pronóstico y decidir el tratamiento más adecuado.

La biopsia renal mediante punción percutánea dirigida con ecografía en tiempo real es la técnica de elección para el estudio y diagnóstico de las enfermedades renales [23]. Se trata de una técnica invasiva, y aunque en la mayoría de los casos no hay complicaciones, siempre existe un cierto riesgo, por lo que debe indicarse de forma individualizada a cada paciente. Las complicaciones más frecuentes son hemorragias e infecciones [24,25]. Además, la biopsia renal está contraindicada en pacientes con algún trastorno de la coagulación, con un sólo riñón, riñones de tamaño reducido o con alguna anomalía anatómica, así como en pacientes con obesidad mórbida, infección urinaria, poliquistosis o HTA mal controlada [26].

En el caso de las glomerulonefritis las lesiones histológicas suelen localizarse en los glomérulos, aunque también pueden observarse lesiones tubulointersticiales. La gravedad de las lesiones se establece según el número de glomérulos lesionados y del grado de destrucción.

La evaluación histopatológica del tejido obtenido requiere el empleo de microscopía óptica y electrónica y de un examen con técnicas de inmunofluorescencia.

Microscopía óptica

Las tinciones clásicas que se utilizan en la microscopía óptica son hematoxilina-eosina y la reacción del ácido periódico de Schiff (PAS), que es particularmente útil para evaluar la celularidad y la expansión de la matriz. Otras tinciones más específicas incluyen la tinción de plata y la tinción tricrómica. La tinción de plata tiñe de negro la membrana basal glomerular y puede revelar un doble contorno de esta membrana debido a un cúmulo de material celular o un aumento de la matriz mesangial que no sería detectable con otras técnicas. La tinción tricrómica permite detectar áreas con formación de cicatrices, que se tiñen de azul, así como depósitos inmunes, que se tiñen de rojo.

Microscopía electrónica

Permite visualizar alteraciones en la estructura de la membrana basal, en los pedicelos de los podocitos, así como depósitos densos de inmunocomplejos o la presencia de cadenas de proteínas anormales.

Inmunofluorescencia

Se utilizan anticuerpos frente inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM, diferentes componentes del sistema del complemento, generalmente C1q, C3 y C4, y otras proteínas, como fibrinógeno y albúmina, que permiten saber si en la patogenia de la enfermedad interviene la respuesta inmune. La inmunofluorescencia permite

identificar la naturaleza de los depósitos inmunológicos así como su distribución, intensidad, localización, y características morfológicas.

La precisión en la evaluación de la biopsia aumenta a mayor tamaño de tejido extraído. No existe un criterio absoluto sobre cuáles son los requisitos mínimos para considerar una biopsia renal como adecuada para el diagnóstico, pero suelen ser necesarios varios cilindros de tejido, de aproximadamente 1,2 - 1,4 mm de grosor y 9 - 12 mm de longitud, para poder estudiar entre 10 y 15 glomérulos. Si la muestra obtenida es pequeña y contiene pocos glomérulos las lesiones focales pueden pasar desapercibidas, y en los cortes transversales se pueden pasar por alto las lesiones segmentarias, lo que resultaría en un diagnóstico final equívoco.

En esta tesis nos centramos en dos glomerulonefritis primarias, la NCM y la GSF, por lo que a continuación se describe brevemente en qué consisten, siempre en referencia a la población adulta.

1.6. Nefropatía por cambios mínimos

La NCM supone un 15 – 20% de los casos de síndrome nefrótico en la población adulta, sin predilección de género [27,28]. Cabe decir que esta patología es la principal causa de síndrome nefrótico en niños, representando casi el 90% de los casos [29].

La etiología de la NCM es todavía desconocida, pero se le atribuye un posible origen inmunológico. En 1974, Shalhoub sugirió que la lesión de la barrera de filtración glomerular era debida a la producción de una linfocina producida por los linfocitos T

[30]. Desde entonces, otros estudios han demostrado la existencia de alteraciones de la respuesta inmunitaria, especialmente en las células T, y se ha sugerido que la NCM podría ser la consecuencia de una alteración primaria en la función de estas células [31,32]. Sin embargo, a pesar de las evidencias de la implicación del sistema inmunológico en la patogenia de la NCM, hasta la fecha no se han identificado ni los mediadores ni los mecanismos de lesión podocitaria. Estudios más recientes han propuesto algunas moléculas como posibles biomarcadores relacionados con el diagnóstico, la monitorización de la actividad o la respuesta al tratamiento. Estas moléculas se describirán más adelante (pág. 56).

En raras ocasiones, la NCM es secundaria a enfermedades como el linfoma de Hodgkin y a otros linfomas o a tumores sólidos, e incluso puede estar asociada al consumo de drogas o a alergias.

El cuadro clínico de la NCM es un síndrome nefrótico puro, de inicio abrupto. Estos pacientes presentan las características descritas anteriormente para el síndrome nefrótico, es decir, proteinuria de rango nefrótico, hipoalbuminemia y edema. La proteinuria es selectiva, es decir, pierden principalmente albúmina y otras proteínas de bajo peso molecular.

En una cuarta parte de los pacientes con NCM se da una remisión espontánea, pero es complicado conocer el curso natural de la enfermedad ya que los pacientes son tratados inmediatamente tras ser diagnosticados. El tratamiento incluye medidas para el tratamiento inespecífico del síndrome nefrótico, así como un tratamiento específico de la enfermedad. Los corticoides son el tratamiento de elección; la mayoría de

pacientes muestra una respuesta excelente y sólo un mínimo porcentaje muestra algún tipo de resistencia y rara vez no responden al tratamiento. Las guías KDOQI recomiendan tratar el primer episodio con altas dosis de prednisona (1 mg/kg/24h) vía oral. Si esta dosis es tolerada se mantiene hasta conseguir la remisión completa [33]. A las 10 semanas se observa remisión en un 40 - 75% de los pacientes adultos. Una vez conseguida la remisión, se sugiere ir disminuyendo la dosis de prednisona de manera progresiva [33].

Se dan casos de recaídas, dependiendo de la edad (a menor edad, mayor riesgo) y del tiempo de terapia desde la remisión hasta su suspensión (a mayor tiempo, menor riesgo). Estas recaídas, que pueden ser espontáneas o bien desencadenadas por algún proceso infeccioso o alérgico, suelen tratarse como un primer episodio, aunque esto supone someter al paciente a elevadas dosis de corticoides. Una alternativa es el uso de inmunosupresores como la ciclofosfamida, con remisiones en el 66 - 75% de los casos, pero estos fármacos aumentan la predisposición a infecciones y reducen la fertilidad. En casos de pacientes que no responden a la ciclofosfamida o que quieren preservar su fertilidad, se recomienda el tratamiento con inhibidores de la calcineurina (ciclosporina y tacrolimus) alcanzándose remisiones en el 50 - 75% de los casos [33]. En pacientes intolerantes a los corticoides, a la ciclofosfamida y a los inhibidores de la calcineurina se recomienda el uso de micofenolato mofetil.

Aunque el pronóstico de la NCM es excelente, puede asociarse a una importante morbilidad debido a la intensidad del síndrome nefrótico, que puede conducir a

insuficiencia renal aguda, a aterosclerosis o a episodios infecciosos. La mortalidad en estos pacientes oscila entre el 6 y el 10% [34].

Para el diagnóstico histológico, el hallazgo característico de la NCM es la ausencia de lesiones significativas en el glomérulo. La microscopía óptica revela glomérulos normales, sin alteraciones en su estructura. Es frecuente la hipertrofia de podocitos, pero es una lesión muy sutil y no siempre es reconocible (Figura 3). Las células epiteliales y los túbulos proximales pueden tener vacuolas claras como resultado de la reabsorción de lipoproteínas, de ahí la antigua denominación de la NCM como nefrosis lipoidea. A parte de estas lesiones, los túbulos, intersticio y vasos son estrictamente normales. La presencia de fibrosis intersticial y atrofia tubular, sobre todo en casos de síndrome nefrótico corticorresistente, debe hacer sospechar de otras entidades como la GSF.

Los estudios por inmunofluorescencia son generalmente negativos, pero en ocasiones pueden observarse débiles depósitos mesangiales de factores del complemento e inmunoglobulinas (IgA, IgM o C₃). Las alteraciones más patentes y características de esta entidad se observan mediante el microscopio electrónico, que revela un borramiento o fusión difusa de los pedicelos de los podocitos, debida a un cambio estructural en su citoplasma. Se observa una aposición directa de los podocitos sobre la membrana basal glomerular. En la superficie del citoplasma de los podocitos se aprecian signos de transformación vellositaria. En el citoplasma pueden observarse vacuolas o inclusiones proteicas. La membrana basal es de grosor normal con ausencia de alteraciones. No se detectan depósitos electrodensos.

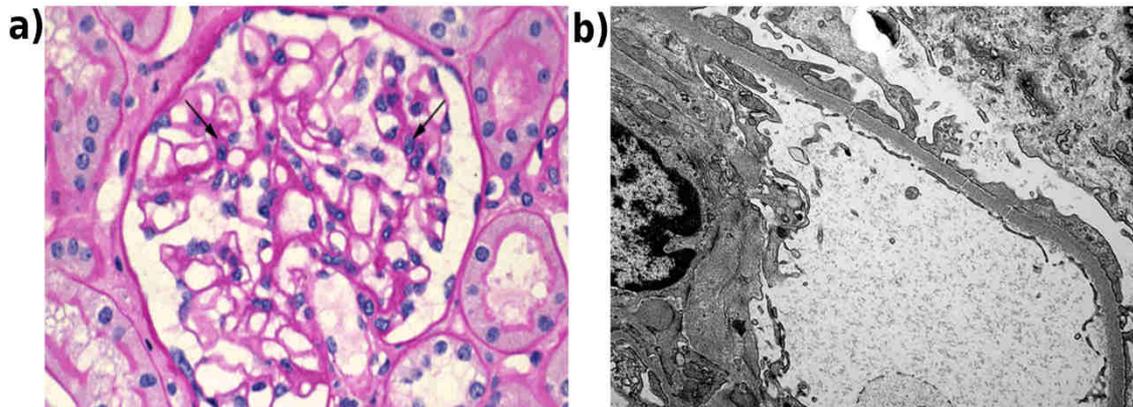


Fig. 3. Estudio histológico de la biopsia renal de un paciente con NCM. a) Microscopio óptico. No se observan lesiones en los glomérulos y no hay un aumento de la celularidad ni del grosor de la membrana basal (Hematoxilina-Eosina, 400x). La inmunofluorescencia es negativa; b) Microscopio electrónico. Se observa un borramiento de los pedicelos de los podocitos. (Imagen adaptada de <http://library.med.utah.edu/>)

1.7. Glomeruloesclerosis segmentaria y focal

La GSF representa el 40% de los casos de síndrome nefrótico en adultos [35]. Se clasifica en primaria (idiopática) o secundaria, en función de si se conoce o no la etiología. Las GSF secundarias incluyen las formas familiares, en las que hay mutaciones en genes que codifican para proteínas estructurales del podocito, como la podocina y la α -actinina-4, y las formas debidas a infecciones víricas o a toxicidad por fármacos [36].

La etiología de la GSF primaria es desconocida. Se ha propuesto un origen inmunológico debido a que algunos enfermos responden al tratamiento con corticoides e inmunosupresores, pero no se ha podido demostrar.

Existen otros argumentos clínicos que hacen sospechar de la existencia de un factor circulante permeabilizador capaz de lesionar el podocito [37]. Uno de estos

argumentos son las recidivas a las pocas horas o incluso minutos de realizar un trasplante renal en enfermos con GSF primaria y la desaparición de la proteinuria cuando los mismos riñones son retrasplantados a un paciente sin la enfermedad [38,39]. También apoya esta teoría la eficacia de la plasmaféresis en los casos de recurrencia de la proteinuria tras el trasplante y la evidencia de transmisión del síndrome nefrótico de madre con GSF al recién nacido [40–42]. Refuerza la teoría de este factor el hecho de que la inyección de suero de pacientes con GSF primaria podía inducir proteinuria en ratas y que este suero podía causar alteraciones en la permeabilidad de glomérulos *in vitro*. Sin embargo, y a pesar de múltiples investigaciones en las últimas décadas, no se ha conseguido identificar este misterioso factor permeabilizador.

Las formas primarias de la GSF suelen iniciarse entre los 30 – 40 años y predominan en el género masculino. El cuadro clínico típico es un síndrome nefrótico de inicio más bien agudo y habitualmente impuro, es decir, con cualquier rango de proteinuria, asociada en más de la mitad de los casos a hematuria microscópica e HTA. Un 30% de estos pacientes muestran algún grado de insuficiencia renal.

La GSF primaria muestra remisión espontánea en menos del 5% de los pacientes, siendo habitual que evolucione a insuficiencia renal, a una velocidad que depende del grado de proteinuria, de la función renal y de la respuesta al tratamiento. La supervivencia renal después de 9 años es mayor del 95% cuando la proteinuria es de rango no nefrótico y de un 50% cuando es de rango nefrótico.

El tratamiento de la GSF incluye medidas para el tratamiento inespecífico del síndrome nefrótico, así como un tratamiento específico. Las guías KDOQI recomiendan el tratamiento con prednisona a dosis altas (1 mg/kg/24h) durante 2 ó 3 meses, con pautas decrecientes hasta completar los 6 meses si hay una buena respuesta [33]. Los inconvenientes de este tratamiento son los frecuentes y severos efectos adversos que conllevan y la dificultad para saber qué pacientes responderán al tratamiento ya que, a largo plazo, la mayor parte de estos enfermos sufre recidivas y desarrolla corticodependencia o corticorresistencia. En estos casos se aconseja el uso de inhibidores de la calcineurina, pero con un riesgo de potencial nefrotoxicidad a largo plazo [33].

Para el diagnóstico histológico, el hallazgo característico de la GSF es la presencia de lesiones hialinas en algunos capilares (lesión segmentaria) de algunos glomérulos (lesión focal) (Figura 4). El número de glomérulos afectados y el tamaño de las lesiones son proporcionales al grado de proteinuria. En los segmentos afectados, los capilares están obstruidos por un cúmulo de células de la matriz mesangial y por depósitos hialinos, y se pueden observar adherencias del ovillo glomerular a la cápsula de Bowman.

Dado que la afectación es focal, los glomérulos no afectados se ven aparentemente normales y esto puede inducir a errores en las fases iniciales y confundirse con una NCM. A medida que progresa la enfermedad, el porcentaje de glomérulos esclerosados aumenta y comienzan a aparecer lesiones de atrofia tubular y fibrosis intersticial.

El estudio de inmunofluorescencia no da un patrón en concreto. Pueden observarse depósitos granulares grandes e irregulares de IgM y/o C3 en las zonas de hialinosis, pero no suelen encontrarse otras inmunoglobulinas ni fracciones del complemento.

La microscopía electrónica muestra lesiones similares a la NCM, siendo también el signo más típico el borramiento o fusión difusa de los pedicelos de los podocitos. Se observa además expansión mesangial y depósitos densos (hialinosis) en los capilares que se encuentran obstruidos. Los podocitos se observan vacuolados y la membrana basal es de grosor y aspecto irregular.

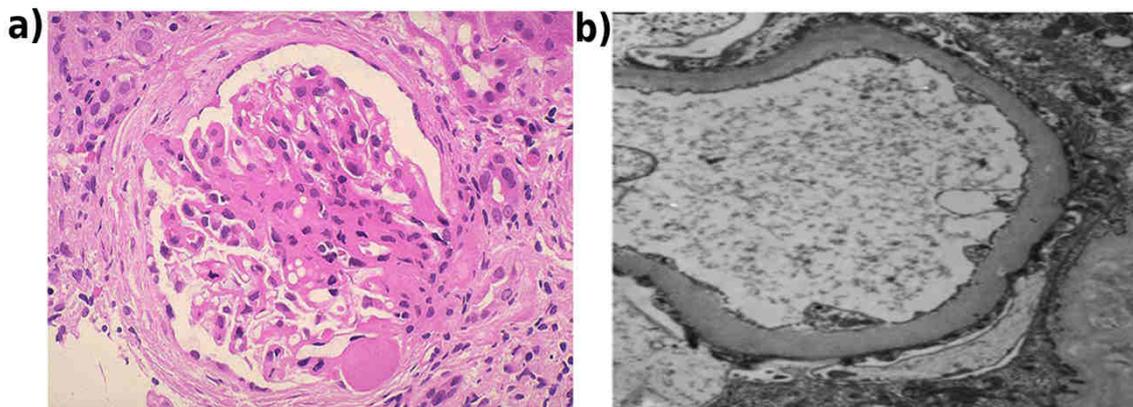


Fig.4. Estudio histológico de la biopsia renal de un paciente con GSF. a) Microscopio óptico. Se evidencia esclerosis avanzada en un segmento de la zona central del glomérulo (Hematoxilina-Eosina, 400x); b) Microscopio electrónico. Se observa un borramiento de los pedicelos de los podocitos. (Imagen adaptada de <http://library.med.utah.edu/>)

2. PROTEÓMICA

El Proyecto Genoma Humano reveló que el genoma humano estaba constituido por aproximadamente 3×10^9 pares de bases o nucleótidos, almacenados en 23 pares de cromosomas. Se secuenciaron aproximadamente 25.000 genes que codifican para proteínas, lo que representa un 1,5% del genoma, mientras que el resto son secuencias repetidas de ADN que no codifican para nada y otras secuencias de ADN que codifican para ARN no codificante, secuencias reguladoras e intrones [43,44].

La finalización de este Proyecto abrió paso a la actual era post-genómica, donde empezaron a evolucionar a pasos agigantados nuevos campos de investigación como la genómica funcional, la genómica comparativa, la transcriptómica, la metabolómica y la proteómica.

La proteómica se define como la ciencia que estudia el proteoma, término introducido por primera vez por Wilkins en 1994 para referirse al conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma, en un momento determinado y bajo unas condiciones concretas de tiempo y ambiente [45]. A diferencia del genoma, que es siempre el mismo en cada célula durante toda la vida, el proteoma es un elemento extremadamente dinámico, sufre variaciones dentro de un mismo organismo, tejido, célula o compartimiento subcelular, y en respuesta a factores ambientales y fisiológicos como la edad, situaciones de estrés, agentes tóxicos, fármacos u hormonas.

El estudio del proteoma es una labor dificultosa debido al elevado número de proteínas existentes. Dado que un sólo gen puede codificar para múltiples proteínas, se estima que el proteoma tiene un orden de magnitud más complejo que el genoma. Esta complejidad es debida principalmente al proceso de *splicing* o corte y empalme alternativo de los ARNm que codifican para proteínas, que hace que de los 25.000 genes codificantes en un ser humano puedan generarse hasta un millón de proteínas distintas [46,47]. Además, una vez sintetizadas, las proteínas pueden sufrir modificaciones en su estructura o en su secuencia básica por procesos proteolíticos, así como modificaciones post-traduccionales, las cuales sirven para modificar o modular la actividad, función o localización de una proteína en diferentes contextos fisiológicos o metabólicos (Figura 5). Se han documentado hasta 200 diferentes modificaciones post-traduccionales, que incluyen metilaciones, fosforilaciones y acetilaciones, lo cual explica la enorme complejidad del entorno proteico dentro de la célula.

El proteoma es mucho más informativo que el genoma sobre el estado fisiológico de un organismo, si tenemos en cuenta que son las proteínas, y no el ADN, las principales moléculas efectoras en la célula, las que poseen funciones estructurales, enzimáticas, metabólicas, reguladoras y señalizadoras.

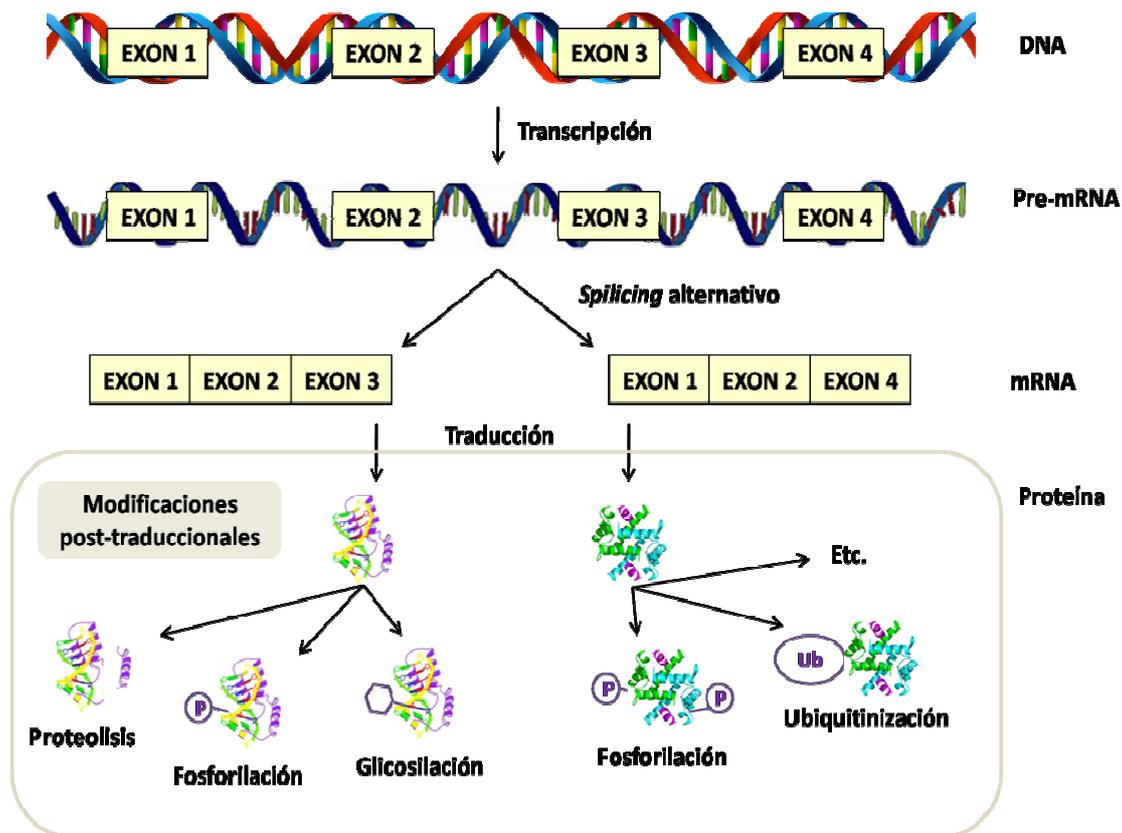


Fig. 5. Durante el proceso de *splicing* alternativo se producen diferentes recombinaciones de los exones de un gen, de forma que se pueden generar varios mRNA y consecuentemente, varias proteínas a partir de un mismo gen. Estas proteínas pueden sufrir posteriormente distintos tipos de modificaciones post-traduccionales. Estos mecanismos explican la falta de equivalencia entre el genoma y el proteoma de un organismo [46].

La aplicación de técnicas proteómicas en campo de la medicina se denomina proteómica clínica, cuyo principal objetivo es el descubrimiento de nuevos biomarcadores, es decir, características que se miden y evalúan objetivamente como indicadores de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica [48]. Estos biomarcadores podrían servir para establecer el diagnóstico y pronóstico de las enfermedades así como para determinar la eficacia de un tratamiento farmacológico. Un biomarcador ideal es aquel que se encuentra en una muestra biológica que puede obtenerse de forma no invasiva.

2.1. Tecnología proteómica

Existen gran variedad de estrategias para llevar a cabo un análisis proteómico. Generalmente, el diseño experimental de un análisis proteómico consta de las siguientes etapas: preparación y fraccionamiento de la muestra, análisis por espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*) y análisis informático de los datos.

2.1.1. Preparación y fraccionamiento de la muestra

La preparación de la muestra antes de su análisis es uno de los puntos críticos de los estudios proteómicos. Los factores preanalíticos son aquellos que tienen lugar antes del análisis de la muestra, e incluyen la recolección, el procesamiento y el almacenamiento de la misma. Estos factores pueden hacer variar significativamente el resultado final del análisis [49]. Por ello, las muestras utilizadas en un experimento proteómico deben ser manejadas con máximo cuidado para evitar cualquier tipo de contaminación. Además, muchos de los agentes químicos utilizados en el análisis deben ser cuidadosamente eliminados de la muestra antes de su análisis por MS, ya que su presencia puede influir en los resultados finales.

La mayoría de muestras biológicas son mezclas muy complejas de proteínas que no pueden ser analizadas directamente, por lo que el fraccionamiento es un paso crucial en todo experimento proteómico. El fraccionamiento permite incrementar el número de proteínas identificadas y favorece la detección de aquellas presentes en menor cantidad. Existen numerosas técnicas para este fin, entre las que destacan la tecnología de esferas magnéticas, la electroforesis bidimensional en gel y la cromatografía líquida de alta resolución o HPLC.

Esferas magnéticas

Son micropartículas magnéticas de tamaño uniforme y recubiertas con diferentes superficies que permiten la adsorción de péptidos y/o proteínas. La unión a las esferas se da mediante diferentes mecanismos, como son la fase reversa, el intercambio catiónico o la afinidad por iones de cobre [50].

Este tipo de fraccionamiento se utiliza fundamentalmente para realizar sofisticados estudios de perfiles de péptidos y proteínas (Figura 6).

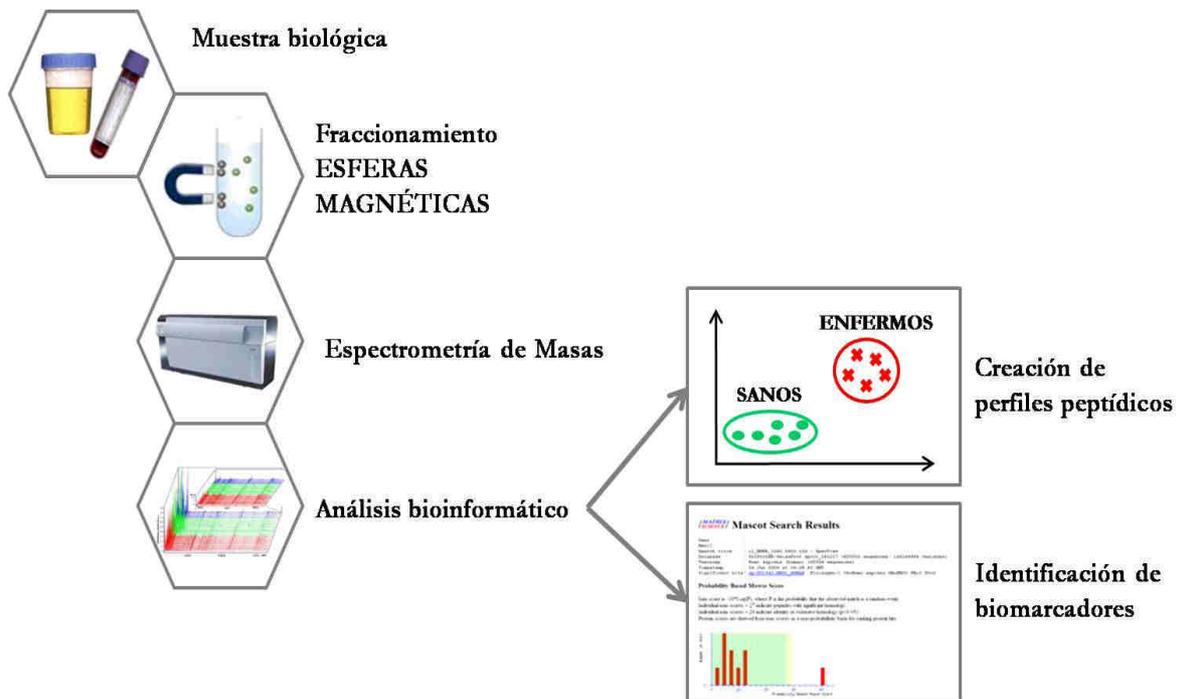


Fig. 6. Proceso para llevar a cabo estudios de perfiles peptídicos. Se utilizan esferas magnéticas para el fraccionamiento de las muestras previo al análisis por espectrometría de masas. El análisis bioinformático permite la creación de modelos de clasificación así como a la identificación de posibles biomarcadores.

Electroforesis bidimensional y tecnología 2D-DIGE

La electroforesis bidimensional (2DE, *two-dimensional gel electrophoresis*) permite la separación de mezclas complejas de proteínas con una gran capacidad resolutive. Esta técnica fue desarrollada en los años 70 de manera independiente por tres grupos distintos [51–53], pero su uso no generalizó hasta los años 80 con la introducción de una técnica para generar gradientes de pH inmovilizados (IPG, *Immobilized pH Gradients*) que permitió aumentar la reproducibilidad entre geles y la creación de bases de datos de geles bidimensionales, disponibles actualmente en Internet [54,55].

La electroforesis bidimensional consiste en la aplicación sucesiva de dos tipos de electroforesis sobre una misma muestra. En primer lugar, se aplica un isoelectroenfoco (IEF) que separa las proteínas en función de su punto isoeléctrico (PI) en un gradiente continuo de pH. Las proteínas son moléculas anfotéricas que pueden estar cargadas positiva o negativamente dependiendo del pH del medio en el que se encuentran. El PI corresponde al pH en el cual la proteína tiene una carga neta igual a cero (Figura 7).

En la electroforesis, las proteínas se cargan en un gradiente de pH al que se aplica un campo eléctrico. De esta manera migran hasta alcanzar el pH equivalente a su PI, donde pierden toda carga y dejan de moverse. Si una proteína migra más allá de su PI, inmediatamente gana carga y retrocede hasta su PI. Es lo que se denomina efecto “enfoco” de la técnica de IEF, y es lo que permite separar proteínas aunque la diferencia entre sus cargas sea mínima.

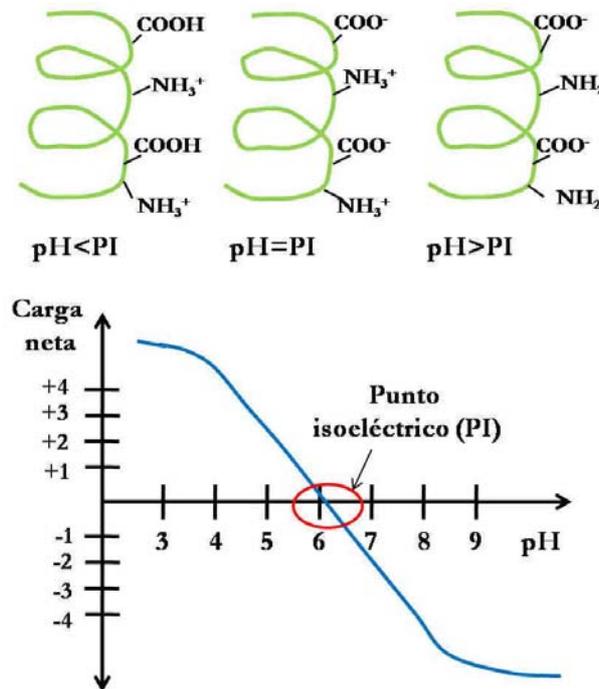


Fig. 7. Diagrama de la carga neta de una proteína con respecto al pH de su entorno. El punto de intersección de la curva en el eje de las x representa el punto isoeléctrico de la proteína. Una proteína en un medio con pH inferior a su punto isoeléctrico se encuentra cargada positivamente, y a la inversa.

La segunda electroforesis, que se lleva a cabo en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), separa las proteínas según su masa molecular (Figura 8).

Para visualizar las proteínas en el gel existen diferentes métodos de tinción, siendo el más sensible la tinción con plata [56]. El movimiento de las proteínas en la segunda electroforesis es perpendicular a la primera, por lo que el resultado es un mapa de manchas o *spots* distribuidos en dos dimensiones. Se puede así llevar a cabo un análisis cuantitativo basado en la intensidad de la señal de las manchas.

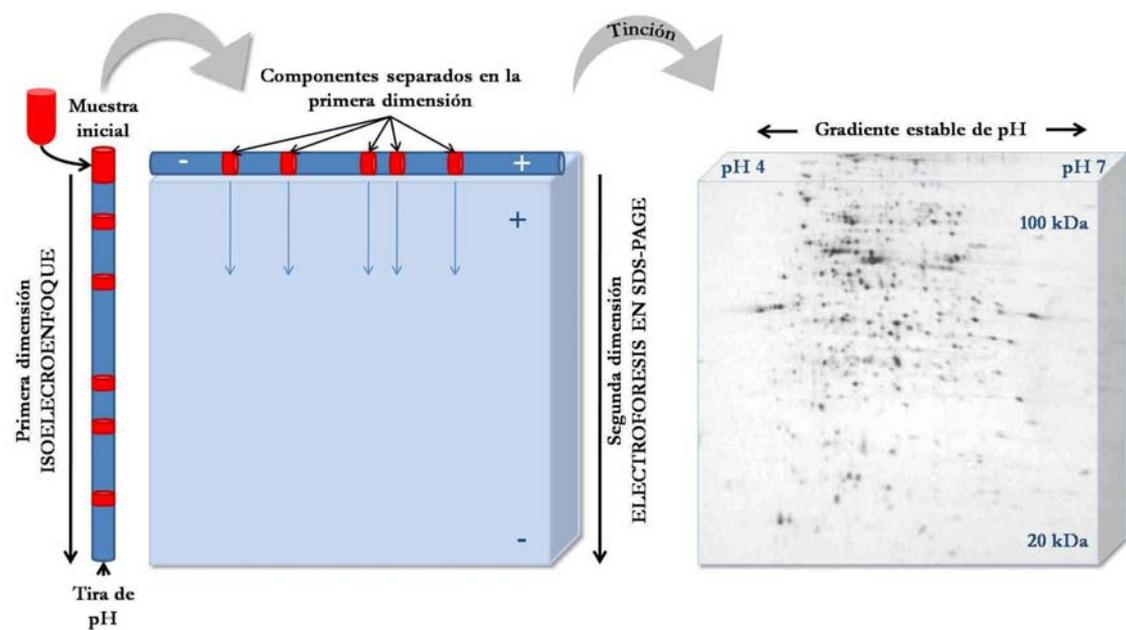


Fig. 8. Electroforesis bidimensional. Esta técnica se basa en la aplicación sucesiva de dos electroforesis para separar una mezcla de proteínas según su punto isoeléctrico (primera dimensión) y su masa molecular (segunda dimensión).

Las proteínas de interés pueden ser extraídas del gel y preparadas para su identificación. Para ello, se lleva a cabo la digestión directa de la mancha usando proteasas, se analizan los péptidos obtenidos mediante MS y se obtiene la huella peptídica de la proteína [57]. La identificación mediante huella peptídica se detalla más adelante.

La 2DE presenta diversas ventajas entre otras destaca el hecho de que permite visualizar directamente el mapa de manchas del proteoma estudiado, a diferencia de los métodos de fraccionamiento cromatográfico, que se explicarán a continuación. Sin embargo, una de las limitaciones de la 2DE es que la reproducibilidad se ve disminuida por factores como las desigualdades en la polimerización de la acrilamida, en la

temperatura y en la potencia. Esto hace que imágenes de geles diferentes no puedan ser fácilmente superpuestas y comparadas.

La electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE, *two-dimensional differential in gel electrophoresis*) permite llevar a cabo análisis comparativos y se basa en un marcaje fluorescente de las proteínas previo a la electroforesis [58,59]. Se utilizan colorantes derivados éster de las cianinas fluorescentes Cy3, Cy5 y Cy2, que tienen diferentes espectros de excitación y emisión. Estos colorantes se unen al extremo amino terminal de las lisinas de las proteínas a través de un enlace amida.

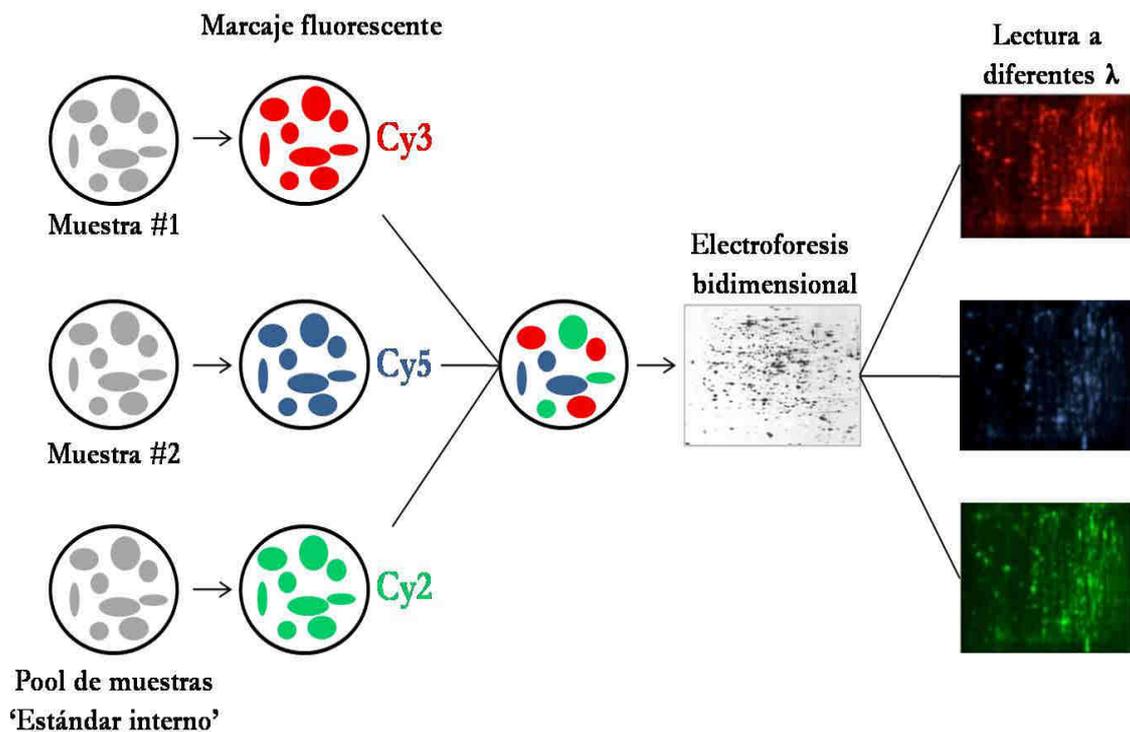


Fig. 9. Esquema de la técnica 2D-DIGE. Las proteínas de muestras distintas son marcadas con fluoróforos diferentes. Las muestras se mezclan y se separan en un mismo gel.

Lo más interesante de esta técnica es que varias muestras se tiñen con colorantes diferentes y posteriormente se mezclan y se someten a la electroforesis en un mismo gel, lo que incrementa al máximo la reproducibilidad y la fiabilidad del análisis de expresión diferencial entre muestras (Figura 9).

Cromatografía líquida

La cromatografía líquida (LC, *liquid chromatography*) es una técnica de fraccionamiento utilizada para separar los componentes de una mezcla según las propiedades físicas y/o químicas de éstos.

En la LC, los solutos se separan al ser arrastrados por una fase móvil líquida que fluye a través de una columna cromatográfica, que contiene una fase estacionaria. Al introducir la muestra en la corriente de la fase móvil, sus componentes avanzan a lo largo del sistema a una velocidad que depende de su afinidad por cada una de las fases. Una vez terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada componente eluye a un tiempo diferente, ya que los componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven más lentamente, mientras que los que son retenidos más débilmente avanzan con mayor rapidez.

Existen diferentes tipos de LC, dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria. Son las más utilizadas la cromatografía de adsorción, de intercambio iónico, de fase reversa, y de exclusión molecular.

Esta técnica puede utilizarse como un paso de purificación previo o posterior a la electroforesis bidimensional o como una alternativa a la misma.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) fue desarrollada para aumentar la eficacia de la separación e incrementar la resolución de la LC. En este tipo de cromatografía se impulsa la fase móvil con un sistema de bombeo de alta presión, pudiendo así utilizar una fase estacionaria muy compacta, con un tamaño de partícula mucho más reducido (2 y 5 μm) que en la LC clásica (150 - 200 μm).

En la cromatografía multidimensional de identificación de proteínas (MudPIT, *multidimensional protein identification technology*) se combinan distintas columnas de cromatografía, dispuestas de manera secuencial, con la MS en tándem. Esta técnica supera a las técnicas basadas en gel, en rapidez, sensibilidad, reproducibilidad y aplicabilidad a diferentes muestras y condiciones [60–62].

Se han desarrollado técnicas de marcaje isotópico de proteínas para compensar la falta de información cuantitativa, como ICAT (*Isotope-coded affinity tags*: marcaje de afinidad codificado por isótopos) e iTRAQ (*Isotope tags for relative and absolute quantitation*: marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta). En estas técnicas se marcan las proteínas de distintas muestras con diferentes moléculas que difieren en uno o varios daltons de masa, lo que permite detectarlos diferencialmente por MS con resultados más precisos y reproducibles [63].

2.1.2. Análisis por espectrometría de masas

La MS emergió durante la década de los 70 del siglo pasado con la aparición de diversas técnicas de ionización suave, como la desorción por campo eléctrico, la

desorción por plasma y la ionización por bombardeo con átomos rápidos [64,65], que constituyeron las herramientas básicas para el análisis y secuenciación de péptidos durante más de una década. Posteriormente, ya en los años 90, aparecieron dos métodos de ionización suave, el electrospray (ESI, *Electrospray Ionization*) y la ionización/desorción por láser asistida por matriz (MALDI, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*), que han sido los pilares básicos de la MS en la proteómica contemporánea.

La MS es una tecnología analítica de gran potencia y precisión, en la que tiene lugar la ionización en fase gaseosa de los compuestos analizados para ser separados en función de su relación masa/carga (m/z), lo que permite averiguar su masa molecular con gran precisión [66].

El espectrómetro de masas está compuesto por tres elementos básicos: fuente de ionización, analizador de masas y detector (Figura 10). Además de estos componentes, para que el análisis pueda llevarse a cabo con éxito, se requiere de un sistema o bomba de vacío, para crear en el interior del espectrómetro un ambiente de alto vacío, de forma que los iones hagan su recorrido hasta el detector sin sufrir colisiones.

La **fuente de ionización** es la parte del espectrómetro que convierte las moléculas en iones en fase gaseosa para que pasen al analizador de masas. Existen múltiples métodos de ionización, pero sólo los métodos de ionización suave permiten el análisis de biomoléculas, éstos son MALDI y el ESI.

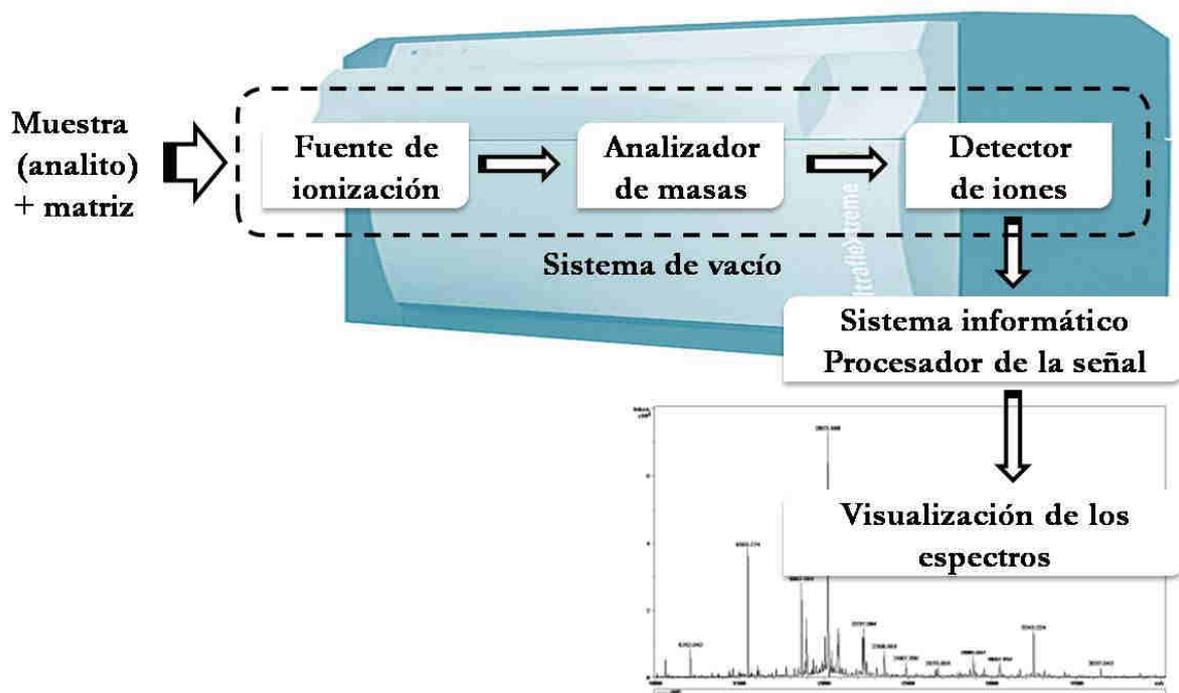


Fig. 10. Esquema de los elementos principales de un espectrómetro de masas: Fuente de ionización, analizador de masas y detector de iones. Las señales captadas por el detector se integran por un sistema informático que genera los espectros de masas.

- MALDI. Desarrollado a finales de los años ochenta [64]. El analito se mezcla con una matriz orgánica ionizable, como el ácido sinapínico o el ácido α -ciano-4-hidroxicinamínico, en presencia de un disolvente orgánico. Esta mezcla se deposita en una placa metálica, denominada placa MALDI, y se deja secar. Al evaporarse el disolvente, la matriz co-cristaliza junto con el analito y es entonces cuando la placa se introduce en la cámara de ionización del espectrómetro de masas. En esta cámara se hace el vacío y se incide la placa con pulsos de láser de una longitud de onda en la cual la matriz tiene máxima absorción. Se produce así la desorción de la mezcla, la matriz absorbe la energía del láser y la transfiere al analito vía transferencia de protón. Como resultado de este proceso se producen iones del

analito en fase gaseosa, la mayoría de ellos con una sola carga positiva. Una vez la muestra ha sido ionizada, el haz de iones es enfocado y dirigido hacia el analizador de masas, que separa los iones por su relación m/z .

La formación de iones en MALDI es pulsante por lo que se suele utilizar acoplado a analizadores tiempo de vuelo (TOF, *time of flight*), que se describen más adelante.

La desorción-ionización mediante láser de superficie (SELDI, *Surface-enhanced laser desorption/ionization*) es una variante tecnológica de MALDI en la que los péptidos y/o proteínas interaccionan con diferentes soportes cromatográficos antes de ser ionizados por el láser.

- ESI. Surgió en la década de los ochenta [67,68] y en el año 2002 se concedió el premio Nobel de Química a John Bennett Fenn y Koichi Tanaka, desarrolladores de este método suave de ionización para el análisis de macromoléculas biológicas por espectrometría de masas [69].

Se trata de una técnica de ionización a presión atmosférica en la que la muestra se encuentra en solución y se hace pasar a través de un fino capilar metálico, a cuya salida se produce una nebulización al aplicar un fuerte campo eléctrico. De esta manera, salen del capilar unas microgotas cargadas de analitos en forma de spray, las cuales se evaporan rápidamente bien por un proceso de desorción del campo eléctrico o de evaporación del solvente, liberando los péptidos y/o proteínas protonados a la fase gaseosa. Los iones generados son posteriormente acelerados en un campo eléctrico hacia el analizador de masas [67,68].

ESI es especialmente útil produciendo iones de macromoléculas ya que evita su propensión a fragmentarse al ser ionizadas

Tras la ionización, los iones entran en el **analizador de masas** donde son sometidos a campos magnéticos y/o eléctricos que los separan según su relación m/z . Los analizadores más utilizados son:

- TOF. Este analizador se basa en el hecho de que los iones acelerados por un campo eléctrico adquieren distintas velocidades según el valor de su relación m/z y por lo tanto tardan distinto tiempo en recorrer una determinada distancia. Considerando constantes la carga y la energía cinética de los iones formados en la fuente de ionización, la medida del tiempo de vuelo permite determinar de forma muy precisa la masa de cada uno de estos iones. El tiempo que tardan lo mide un reloj que se activa por el pulso de láser. Estos analizadores pueden incorporar un reflectrón, que es un espejo electrostático que permite aumentar la resolución y mejorar la separación de los iones.

El analizador TOF separa y detecta el paquete completo de iones procedente de la fuente de ionización, y está especialmente indicado para técnicas de ionización de carácter pulsante como el MALDI. Los espectrómetros de masas tipo MALDI-TOF son los más utilizados para el análisis de péptidos y proteínas ya que ofrecen importantes ventajas frente a otros espectrómetros (Figura 11). En primer lugar, su tiempo de análisis es muy corto, pueden analizar cientos de muestras en pocos minutos. Por otra parte, no existen limitaciones en la masa de los iones que puede

ser analizados, estos pueden ser desde péptidos de pocos aminoácidos a proteínas de muy elevado peso molecular [64].

- Cuadrupolo. Este analizador consiste en cuatro barras paralelas de sección hiperbólica en la cara interna, generalmente de unos 15-20 cm de largo y 0,5 cm de radio, separadas entre sí unos 2 cm, a las que se aplica un potencial de corriente continua y un potencial alterno de radiofrecuencia superpuesto que crean en su interior un campo denominado cuadrupolar. Los iones generados en la fuente atraviesan longitudinalmente el espacio limitado por estas barras para incidir en el detector. Estos iones, que entran en el analizador a una energía de unos pocos electronvoltios, son sometidos al efecto del campo cuadrupolar que los hace oscilar y los desvía en función de su valor m/z de forma que para una combinación de potenciales sólo los iones en un estrecho rango de valores m/z llegan hasta el detector.

Los analizadores de cuadrupolo actúan por tanto como filtros de iones y los espectros de masas en estos sistemas se obtienen mediante un barrido del potencial aplicado a las barras. En consecuencia, en cada instante sólo una pequeña fracción del total de iones es monitorizada mientras que el resto se desecha.

- Trampa iónica. Este tipo de analizador permite el aislamiento de iones dentro de una cámara de pequeño tamaño utilizando campos eléctricos (Orbitrap) o magnéticos (Resonancia ciclotrónica de iones mediante transformada de Fourier, FT-ICR). La trampa iónica consiste en un espacio tridimensional definido por las

superficies hiperbólicas de tres electrodos: un anillo circular central y dos tapas laterales, estas últimas provistas en su centro de pequeños agujeros para la entrada de los iones a la fuente y su salida hacia el detector. Los iones generados en la fuente entran en la trampa por el anillo superior y, al ajustar el voltaje de los electrodos, los iones de una determinada m/z quedan retenidos en el electrodo central. Mediante un cambio en el voltaje se permite una expulsión selectiva de los iones hacia el detector.

El **detector de iones** genera unas señales que son proporcionales a la abundancia relativa de cada ion. Estas señales son integradas por un sistema informático que genera gráficos de abundancia relativa de los iones frente a m/z , denominados espectros de masas. Existen varios tipos de detectores, como la caja de Faraday, el multiplicador de electrones y la placa fotográfica.

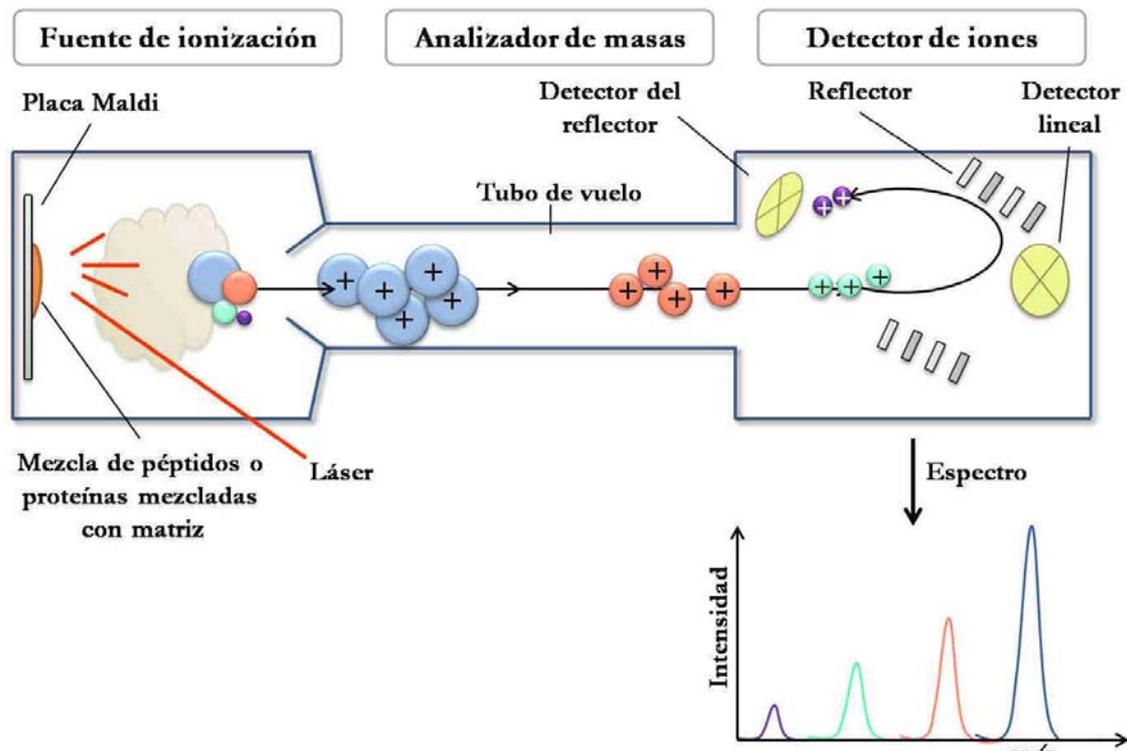


Fig. 11. Principales componentes de un espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF. Un haz de láser irradia la muestra mezclada con matriz sobre la placa MALDI, ionizando y vaporizando los péptidos. Éstos son acelerados por un campo eléctrico que los dirige al analizador de masas a través del tubo de vuelo. Las diferencias iniciales de energía son corregidas mediante el reflector y los iones llegan finalmente al detector.

2.1.3. Identificación de las proteínas

Los métodos más utilizados en la identificación de proteínas son:

Huella peptídica (PMF, *Peptide Mass Fingerprinting*)

Es el conjunto de fragmentos peptídicos que se obtienen tras la digestión de las proteínas con una enzima determinada, típicamente la tripsina, que corta específicamente después de los residuos básicos de lisina y arginina [57,70,71]. De esta manera, la huella peptídica es característica de cada proteína, depende de la proteasa utilizada y puede utilizarse para su identificación [72]. Esta identificación se realiza al

comparar las masas de los fragmentos peptídicos obtenidos mediante MS con los valores calculados de la digestión virtual de multitud de proteínas conocidas que se recogen en diferentes bases de datos como NCBIInr, MSDB o Swissprot.

Las bases de datos pueden ser rastreadas mediante motores de búsqueda, como por ejemplo Mascot, que evalúan y ordenan los resultados de acuerdo con un sistema de puntuación, como el denominado *Molecular Weight Search* o MOWSE.

Al comparar la huella experimental con la virtual se genera un listado de posibles proteínas candidatas, ordenadas según el nivel de identidad (puntuación).

PMF suele utilizarse únicamente para identificar proteínas puras o de mezclas poco complejas, de dos o tres proteínas. Es por esto, que suele ser el tipo de análisis más indicado en la identificación de los *spots* de los geles bidimensionales.

La técnica de MS más utilizada para realizar análisis por PMF es MALDI-TOF.

Secuenciación de péptidos mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

Mediante el uso de dos analizadores de masas dispuestos en tándem, se aísla en uno de ellos un ión de una determinada m/z , denominado ión precursor, el cual se fragmenta por procesos de colisión con un gas inerte y sus fragmentos pasan al siguiente analizador [73]. El patrón de fragmentación es característico de cada péptido y permite determinar su secuencia de aminoácidos, la cual se enfrenta a bases de datos de secuencias (Figura 12).

El patrón de fragmentación de un péptido obtenido mediante MS/MS depende de la carga del péptido, de la energía de colisión, del tipo de gas de colisión y de la presión en el espectrómetro de masas.

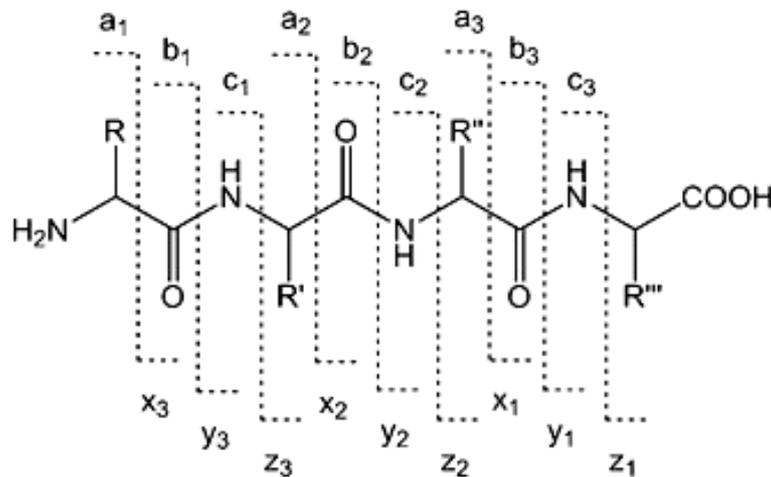


Fig. 12. Fragmentación teórica de un péptido con cuatro aminoácidos en un experimento de espectrometría de masas en tándem. Se muestran los 18 fragmentos más comunes que resultarían de un péptido con cuatro aminoácidos. (Imagen de Vasil'ev et al. [74])

2.2. Proteoma urinario

La orina humana ha jugado un papel importante como herramienta diagnóstica durante siglos. Ya en el siglo V a.C., el famoso filósofo griego Hermógenes describió el color y otras características de la orina como indicadores de ciertas enfermedades [75].

Actualmente existen pruebas para medir el nivel total de proteínas en orina o la presencia de una sola proteína, sin embargo, los avances en las tecnologías proteómicas permiten la visualización simultánea de las múltiples proteínas y péptidos

presentes en la orina, lo que supone una interesante manera de investigar la fisiología renal.

La orina posee algunas ventajas frente a otros fluidos biológicos que la hacen ser la más utilizada en la búsqueda de biomarcadores mediante técnicas proteómicas [76].

En primer lugar, la orina se puede obtener en grandes cantidades, de manera no invasiva y con un mínimo coste económico. Esto permite, por ejemplo, obtener muestras repetidas de un mismo individuo para llevar a cabo el seguimiento de una enfermedad.

En segundo lugar, los péptidos y proteínas de bajo peso molecular que hay en la orina son generalmente solubles, por lo que su solubilización no supone ningún problema, mientras que sí lo supone al analizar el proteoma de células y tejidos. Además, estos péptidos y proteínas de bajo peso molecular (<30 kDa) pueden analizarse en un espectrómetro de masas sin ninguna manipulación adicional, como puede ser una digestión con proteasas.

En tercer lugar, el contenido de proteínas en la orina suele ser bastante estable, en parte debido a que la orina se almacena durante horas en la vejiga y, por lo tanto, el efecto proteolítico de las proteasas endógenas se completa antes de la micción [76]. Se ha visto que la orina puede almacenarse durante varios años a -20°C sin sufrir cambios significantes en su proteoma.

Por último, el estudio de la orina proporciona información no sólo del riñón y del tracto urinario, sino también del resto de órganos. En individuos sanos, el 70% del

proteoma urinario se origina en el riñón y el tracto urinario inferior, mientras que el 30% restante lo forman proteínas plasmáticas filtradas por los glomérulos [77].

Por consiguiente, el análisis del proteoma urinario puede ser útil en la identificación de biomarcadores tanto de enfermedades del tracto urogenital como de otras enfermedades sistémicas no relacionadas con el riñón (98,97,99).

Numerosos grupos han estudiado el proteoma urinario en individuos sanos, utilizando diferentes tecnologías proteómicas [79–82]. En estos estudios se han ido identificando un número de proteínas y péptidos cada vez mayor, se habla de hasta 1.500 proteínas diferentes, y este número continúa aumentando.

3. BIOMARCADORES DE NEFROPATÍA POR CAMBIOS MÍNIMOS Y GLOMERULOESCLEROSIS SEGMENTARIA Y FOCAL

En los últimos años, y a raíz de numerosos estudios, se han propuesto diferentes moléculas como posibles biomarcadores relacionados con el diagnóstico, la monitorización de la actividad o la respuesta al tratamiento de la NCM y de la GSF [83].

Un biomarcador se define una característica que es objetivamente medida y evaluada como un indicador de un proceso biológico normal, un proceso patológico o como respuesta a un tratamiento farmacológico.

Todos los biomarcadores que se describen a continuación, aunque de gran interés, son todavía posibles candidatos y se debe demostrar que poseen una sensibilidad y especificidad suficientes para ser evaluados en estudios clínicos. Serán necesarios estudios adicionales con un mayor número de pacientes para poder confirmar las diferentes hipótesis.

3.1. Biomarcadores de nefropatía por cambios mínimos

Entre los biomarcadores propuestos, destacan:

- **CD80** (o B7-1). Es una proteína transmembrana expresada en células presentadoras de antígeno que, tras unirse a su ligando (CD28), presente en

linfocitos T, proporciona una señal de coestimulación a éstos, imprescindible para la activación linfocitaria [84].

En condiciones normales, los podocitos no expresan CD80, pero estudios recientes han demostrado que, en la NCM, pueden adquirir fenotipo y funciones de células dendríticas y pueden ser inducidas a expresar CD80, lo cual se ha asociado a la aparición de proteinuria nefrótica [84,85]. Se desconoce la funcionalidad de esta expresión de CD80 en los podocitos y no se ha podido demostrar, hasta la fecha, si existe relación con las alteraciones de la membrana de filtración glomerular que dan lugar a proteinuria.

También se ha observado que los niveles de CD80 se encuentran elevados en la orina de pacientes con NCM durante el brote y se normalizan tras la remisión. Sin embargo, este aumento no se ha observado en otras glomerulonefritis causantes de síndrome nefrótico, como son la GNM o la GSF [86–88].

Otro estudio reveló que el suero de pacientes con NCM, durante el brote pero no durante la remisión, estimulaba la expresión de CD80 en podocitos en cultivo [89]. No se ha identificado todavía qué factor, presente en el suero de los enfermos, es responsable de esta estimulación.

Nuestro equipo de investigación, en un trabajo previo, descubrió que la expresión del RNAm de CD80 en el sedimento urinario, en relación con el RNAm del gen que codifica para la proteína podocitaria nefrina (NPHS1) estaba aumentada en los

pacientes con NCM. Además, este ratio CD80/NPHS1 permitía diferenciar entre NCM y GSF [90] (Figura 13).

- **Interleuquina 13** (IL-13), producida por linfocitos T, induce proliferación y diferenciación de linfocitos B, así como cambio de clase a IgE.

Debido a la asociación entre NCM y enfermedad de Hodgkin, y a la evidencia de que la expresión de IL-13 es una característica común de las células de este linfoma [91], se han llevado a cabo numerosos estudios experimentales que relacionan IL-13 con la inducción de alteraciones estructurales en el podocito, capaces de alterar la selectividad de filtración y de causar síndrome nefrótico [92–94]. Recientemente, se ha demostrado un aumento en la expresión de IL-13 en linfocitos CD4 y CD8 de niños con síndrome nefrótico durante las recidivas [92]. También se han observado niveles plasmáticos elevados de IL-13 en niños con síndrome nefrótico idiopático [95].

También en estudios experimentales, se creó un modelo de ratones transgénicos para IL-13, los cuales hiperexpresaban esta proteína, tenían niveles en sangre permanentemente elevados y desarrollaron un síndrome nefrótico con lesiones histológicas renales idénticas a la NCM [106].

Las evidencias de que IL-13 puede inducir la expresión de CD80 en podocitos, y que esto se asocia a la aparición de proteinuria, abre la hipótesis sobre la utilidad del estudio de la vía IL-13-CD80 en enfermos con NCM.

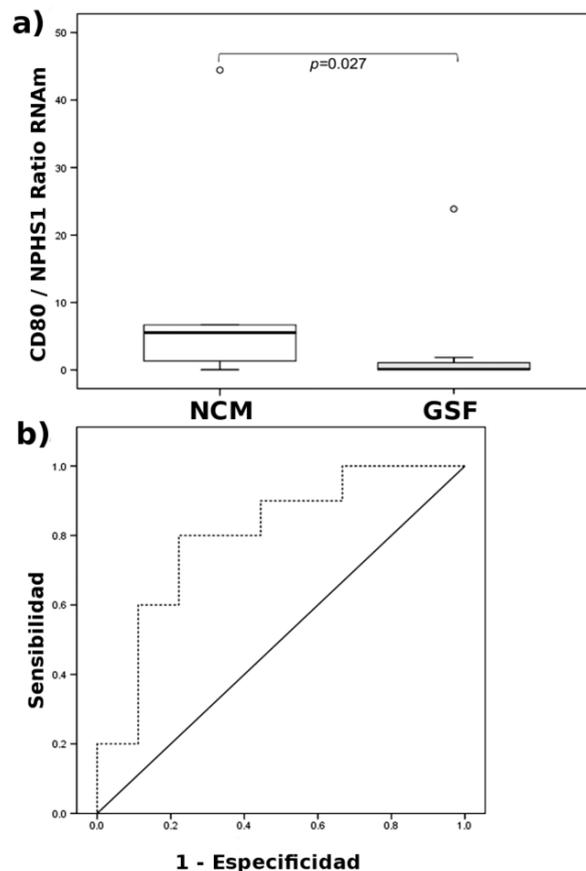


Fig. 13. a) Diagramas de cajas que muestran el ratio de los niveles de RNAm de CD80 y NPHS1 en el sedimento urinario de pacientes con NCM y GSF ; b) Curvas ROC para el ratio RNAm de CD80:NPHS1 para positivo en NCM. El AUC fue de 0,800 (IC 95% 0,592 – 1,008), con una sensibilidad del 80% y una especificidad del 78% [90].

- **Hemopexina.** Es una β -1 glicoproteína, sintetizada en el hígado, cuya principal función es el transporte y la eliminación del grupo hemo libre del plasma.

En sujetos sanos, la hemopexina circula en plasma en una forma inactiva, pero se ha identificado una isoforma con actividad proteasa que es capaz de inducir lesiones glomerulares similares a las observadas en la NCM tanto en tejido renal *in vitro* como tras infusión intrarrenal en ratas *in vivo* [96,97].

Se ha observado que los enfermos con NCM en fase de actividad presentan unos niveles reducidos de hemopexina circulante y un incremento en la isoforma con actividad proteasa [98]. No se conoce cuál es el significado clínico de estos datos, por lo que son necesarios más estudios que aclaren si estos resultados son específicos de la NCM y si podrían ser útiles en su diagnóstico.

- **Receptor soluble de la interleuquina 2.** El receptor de membrana de la interleuquina 2 (IL-2) es una proteína formada por tres cadenas: alfa, beta y gamma. Las subunidades beta y gamma del receptor se expresan por el linfocito T no estimulado, y tras la activación de éste al reconocer un antígeno a través del receptor de células T, se expresa la cadena alfa. Las tres cadenas forman el receptor de membrana funcionalmente activo de la IL-2 (IL-2R) [99].

En respuesta a la estimulación, el linfocito T sintetiza IL-2 que, mediante su unión al receptor de membrana, provoca la activación y expansión clonal de los linfocitos T. De forma paralela y proporcional a la expresión del receptor de membrana de IL-2, se libera a la circulación una forma soluble del receptor que se genera a partir de la ruptura proteolítica de la subunidad alfa y cuya función es actualmente desconocida.

Numerosas evidencias muestran que los enfermos con NCM presentan niveles muy elevados del receptor soluble de IL-2 durante la fase aguda y que se normalizan tras la remisión [100–103]. No obstante, también se han descrito niveles elevados de este receptor en otras enfermedades inflamatorias e

inmunológicas y en otras glomerulonefritis, por lo que son necesarios más estudios para confirmar su utilidad en el diagnóstico de la NCM.

- **ABCB1 y glicoproteína-P.** La glicoproteína-P es una proteína transmembrana miembro de la familia de los *ATP-binding cassette transporters*, cuya síntesis está codificada por el gen ABCB1. Se trata de una proteína transportadora de membrana responsable del eflujo celular de fármacos y tóxicos, por lo que constituye un sistema de detoxificación natural que se expresa en varios tejidos.

Existen varios estudios en los que se ha encontrado una sobreexpresión de ABCB1 y glicoproteína P en pacientes con NCM durante la remisión y tras el tratamiento con corticoides [103,104].

3.2. Biomarcadores de glomeruloesclerosis segmentaria y focal

Se han propuesto diferentes moléculas como posibles biomarcadores relacionados con el diagnóstico, la monitorización de la actividad o la respuesta al tratamiento de la GSF [83]:

- **Receptor soluble de la uroquinasa (suPAR).** El receptor de la uroquinasa (uPAR) es un importante regulador de la activación del plasminógeno y uno de los principales componentes de la homeostasis, expresado en la superficie de una amplia variedad de células [105]. uPAR puede transmitir señales intracelulares a través de su unión con integrinas de membrana [106]. Su función es todavía desconocida, pero se ha demostrado en modelos experimentales que la inducción

de la señalización a través de uPAR en podocitos causa fusión podocitaria y proteinuria a través de un mecanismo que depende de la activación de integrinas [107]. uPAR puede ser liberado de la membrana plasmática como forma soluble (suPAR). En condiciones normales su concentración en plasma es baja, pero se produce un aumento en condiciones inflamatorias e infecciosas, tales como VIH, tuberculosis, malaria, sepsis y artritis reumatoide [108,109], así como en algunas neoplasias malignas [110].

Se ha descrito también un aumento de los niveles séricos de suPAR en pacientes con GSF primaria pero no en pacientes con otro tipo de glomerulonefritis [107]. Los datos disponibles indican que más de la mitad de los enfermos con GSF primaria presentan niveles séricos elevados de este receptor. Existen evidencias de que niveles elevados de suPAR incrementan el riesgo de recidiva de la GSF tras un trasplante renal y de que el tratamiento con plasmaféresis puede reducir significativamente estos niveles e inducir la remisión de la enfermedad [107].

En estudios experimentales, se ha observado cómo en un modelo de ratones transgénicos que sobreexpresaban suPAR se inducían lesiones de GSF [111].

Para llegar a confirmar como biomarcador de GSF a suPAR serán necesarios más estudios.

- **Factor 1 de citocinas similar a la cardiotrofina (CLC-1).** Es una citocina perteneciente a la familia de la interleuquina-6. Está implicada en el desarrollo del sistema nervioso central y de neuronas motoras in vitro [112]. En estudios

recientes se han encontrado niveles circulantes de CLC-1 hasta 100 veces mayores en pacientes con GSF recurrente que en sujetos sanos [113]. En el riñón, CLC-1 parece aumentar la permeabilidad glomerular mediante una disminución en la expresión de nefrina [113]. Sin embargo, serán necesarios más estudios para dilucidar el papel de CLC-1 en la patogénesis de la GSF.

- **CD44.** Es una glicoproteína relacionada con la adhesión, interacción de la matriz y migración celular. Se ha observado una expresión *de novo* de CD44 en las células del epitelio parietal glomerular en modelos experimentales de glomerulonefritis [114].

Además, un estudio reciente demostró que en pacientes con GSF recurrente, donde aún no se había desarrollado esclerosis segmentaria, se detectaba una tinción de CD44 en el epitelio glomerular significativamente mayor que en pacientes con NCM [115]. Esto sugiere que la positividad para CD44 a nivel glomerular podría ayudar a diferenciar las fases iniciales de la GSF idiopática de la NCM.

- **MiR-193a.** Los micro-RNAs (miRNAs) son un tipo de RNA no codificante que actúan como reguladores de un gran número de genes a nivel post-transcripcional. Se ha demostrado que la expresión transgénica del miR-193a en ratones les induce rápidamente una GSF, con un amplio borramiento de los pies de los podocitos [116]. Se sugiere el uso de este tipo de miRNA como un biomarcador con utilidad diagnóstica en la GSF, pero no se ha demostrado si los niveles elevados de esta

molécula son característicos de las formas idiopáticas, o bien es común en la fisiopatología de las formas primarias y secundarias de la enfermedad.

Hasta la fecha sólo algunos posibles candidatos han sido propuestos como biomarcadores que permitan la diferenciación entre NCM y GSF. Mediante estudios de expresión génica y de inmunofluorescencia se ha conseguido diferenciar la NCM de la GSF a nivel histológico, por un incremento en la expresión podocitaria de CD80 [86,87] y una reducción en la expresión de α -dístroglicanos [117,118].

Los niveles urinarios de CD80 y de TGF- β también se han propuesto como candidatos biomarcadores para el diagnóstico diferencial y no invasivo de NCM y GSF [86,119].

3.3. Proteómica en la búsqueda de biomarcadores de nefropatía por cambios mínimos y glomeruloesclerosis segmentaria y focal

A continuación se citan los estudios más relevantes, los cuales emplean diferentes técnicas proteómicas [120], y la mayoría de ellos se centran en el análisis del proteoma urinario.

Candiano *et al.*, mediante el uso de 2DE seguida por MALDI-TOF MS, hallaron unos fragmentos de albúmina y alfa-1-antitripsina en la orina de pacientes con NCM que no se encontraban en individuos sanos [121]. Algunos de estos fragmentos se

encontraron también en el plasma de los pacientes, lo que sugería que la fragmentación no era debida únicamente a proteasas urinarias.

Andersen *et al.*, mediante un marcaje iTRAQ seguido de nano-LC-MS/MS, describieron niveles disminuidos de E y P-caderina en la orina de pacientes pediátricos con NCM [122].

En otro estudio, Sedic *et al.*, observaron un aumento de afamina, hidroxifenilacetato y uridina, junto con una disminución en los niveles de glutamina y fenilalanina en 12 pacientes pediátricos con síndrome nefrótico idiopático al comparar con 12 individuos sanos [123]. La mayoría de estas moléculas se había visto que estaban implicadas en el estrés oxidativo, por lo que sugieren realizar más estudios con mayor número de pacientes para investigar el papel del estrés oxidativo en el daño renal en el síndrome nefrótico idiopático.

Suresh *et al.* analizaron el proteoma urinario de 55 pacientes pediátricos con síndrome nefrótico mediante la combinación de iTRAQ y LC-MS/MS multidimensional [124]. Observaron que los niveles más bajos de apolipoproteína-A1 en la orina eran indicativos de síndrome nefrótico cortico-resistente, mientras que alfa-2-macroglobulina, proteína de unión al retinol 4, y orosomucoide-2 eran marcadores asociados con la GSF.

Hellín *et al.*, mediante el uso de 2DE, MALDI-TOF y LC/ESI-Q-TOF, hallaron tres fragmentos de albúmina que estaban presentes en el suero de pacientes pediátricos con GSF genética (n= 11) pero que estaban ausentes en pacientes con GSF idiopática (n= 15) [125]. Sugieren estudios adicionales para determinar si estos fragmentos

podrían ser potenciales biomarcadores para distinguir entre las formas idiopáticas y genéticas de la GSF.

En otro estudio, Kalantari *et al.* analizaron el proteoma urinario de 10 pacientes con GSF (6 cortico-sensibles y 4 cortico-resistentes) mediante nano-LC-MS/MS [126]. Hallaron diferencias en la excreción de 21 proteínas, siendo las que experimentaban un mayor cambio la apolipoproteína A-1 y la proteína remodeladora de matriz 8, con un aumento y una disminución, respectivamente, al comparar los pacientes cortico-sensibles con los cortico-resistentes.

Todos estos estudios han conducido al descubrimiento de diferencias en el proteoma urinario de pacientes con NCM y GSF, pero los biomarcadores propuestos son todavía posibles candidatos que deberán ser validados en estudios adicionales, con mayor número de pacientes, para poder algún día ser utilizados en la práctica clínica.

Hipótesis

El diagnóstico de las glomerulonefritis NCM y GSF requiere la realización de una biopsia renal, una técnica segura pero no exenta de complicaciones. Sin embargo, aún disponiendo del estudio histológico, el diagnóstico de estas dos enfermedades puede ser confuso. La inmunofluorescencia y la microscopía electrónica proporcionan resultados similares en ambas entidades, sin embargo la microscopía óptica revela glomérulos aparentemente normales en la NCM, y esclerosis en algunos, pero no en todos, los glomérulos en la GSF. Esta naturaleza focal de la GSF, hace que biopsias renales de pacientes con esta patología que contengan únicamente glomérulos normales puedan ser clasificadas erróneamente como NCM.

La importancia de llegar al diagnóstico correcto radica principalmente en el tratamiento al que se someterá al paciente; los pacientes con NCM muestran una respuesta excelente al tratamiento con corticoides, mientras que un elevado porcentaje de pacientes con GSF muestran dependencia o resistencia a este tratamiento.

Estos motivos determinan la necesidad de encontrar biomarcadores no invasivos que permitan a los nefrólogos diferenciar entre NCM y GSF.

En la última década, se ha utilizado la proteómica en la búsqueda de biomarcadores de diferentes patologías. La orina humana es un fluido biológico, asequible de forma no invasiva, en el que podemos encontrar biomarcadores que reflejan los fenómenos fisiopatológicos del aparato urinario y el metabolismo renal de mediadores sistémicos.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Determinar la utilidad de la proteómica urinaria en el diagnóstico diferencial de las glomerulonefritis primarias NCM y GSF.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Analizar el **peptidoma urinario** de pacientes diagnosticados mediante biopsia renal de NCM y GSF primaria.
 - Generar un modelo de predicción que permita clasificar a los pacientes en NCM o GSF.
 - Validar el modelo de predicción con un grupo independiente de pacientes diagnosticados mediante biopsia renal de NCM y GSF.
 - Determinar las diferencias en el peptidoma urinario entre sujetos sanos y pacientes con NCM y GSF.
 - Determinar las diferencias en el peptidoma urinario entre pacientes con NCM y pacientes con GSF.
 - Identificar biomarcadores urinarios para el diagnóstico diferencial de pacientes con NCM y GSF.

- II. Analizar el proteoma urinario de pacientes diagnosticados mediante biopsia renal de NCM y GSF primaria.

- Determinar las diferencias en el proteoma urinario entre pacientes con NCM y pacientes con GSF.
- Identificar biomarcadores urinarios para el diagnóstico diferencial de pacientes con NCM y GSF.
- Validar los resultados en un grupo independiente de pacientes diagnosticados mediante biopsia renal de NCM y GSF.
- Crear un árbol de decisión que permita clasificar a los pacientes en NCM y GSF.

Materiales y Métodos

ANÁLISIS DEL PEPTIDOMA URINARIO

POBLACIÓN DE ESTUDIO Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se trata de un estudio prospectivo en el que incluimos 44 individuos adultos con síndrome nefrótico puro y diagnóstico confirmado histopatológicamente de NCM o GSF, en fase activa de la enfermedad y sin hallarse bajo ningún tratamiento farmacológico en el momento del estudio. En todos los pacientes se descartaron condiciones o etiologías secundarias, como enfermedades autoinmunes, infecciones, cáncer o exposiciones a fármacos nefrotóxicos.

Los grupos de estudio quedaron formados por 22 pacientes con NCM (50%) y 22 pacientes con GSF (50%). Se incluyó además un grupo control con 16 individuos adultos sanos (10 mujeres, 37 ± 13 años), con función renal normal.

Todos los pacientes incluidos fueron diagnosticados conjuntamente por el Servicio de Anatomía Patológica y por el Servicio de Nefrología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol. Se obtuvo un consentimiento informado de todos los individuos y el protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético del mismo Hospital.

BIOPSIA RENAL

El diagnóstico histológico se consiguió mediante la realización de una biopsia renal percutánea guiada por ecografía, siempre llevada a cabo antes de empezar cualquier tratamiento farmacológico inmunosupresor o con corticoides.

Para la punción se utilizó un instrumento para biopsia de núcleo desechable Bard® Monopty® (Bard Biopsy Systems, Tempe, AZ, EE.UU.). Una vez extraído el tejido necesario se transportó inmediatamente al servicio de Anatomía Patológica en suero salino isotónico para su procesamiento. El tejido obtenido fue procesado y analizado de forma rutinaria por microscopía óptica, electrónica, e inmunofluorescencia de acuerdo con protocolos estandarizados.

Microscopía óptica. Los cortes histológicos de microscopía óptica deben ser múltiples y observados con tinción corriente de hematoxilina-eosina y otras tinciones histoquímicas especiales como PAS, tricrómica de Masson, metenamina de plata de Jones y rojo Congo [4].

- Hematoxilina-eosina. Permite detectar la mayoría de las lesiones elementales que caracterizan a las glomerulonefritis primarias y secundarias así como a las nefropatías intersticiales.
- PAS. Tiñe de forma específica las membranas basales glomerulares, tubulares y de la cápsula de Bowman, y permite analizar los engrosamientos y reduplicaciones que definen a las lesiones tubulares y las semilunas epiteliales y fibrosas. Además tiñe la sustancia mesangial, los depósitos inmunes ricos en IgA, IgM y fracciones del complemento y la sustancia hialina depositada en paredes vasculares y glomérulos.
- Tricrómico de Masson. Para el tejido conjuntivo y la fibrina, permite detectar la fibrosis intersticial e identificar necrosis fibrinoide.

- Metenamina de plata de Jones. Tiñe de forma equivalente al PAS, aunque con mayor nitidez, las membranas basales del riñón.
- Rojo Congo. Detecta la sustancia amiloidea. La tinción de rojo Congo observada con luz polarizada se considera positiva cuando el material tiene color verde.

Inmunofluorescencia. Los fragmentos de tejido destinados para inmunofluorescencia se congelaron en fresco para hacer cortes en el criostato. Se fijaron en acetona o etanol antes de teñirse, y se procesaron con anticuerpos fluoresceinados frente IgG, IgA, IgM, complemento (C3, C4 y C1q) y fibrinógeno, así como con anticuerpos anti-kappa y anti-lambda (Dako Corporation, Copenhagen, Dinamarca).

Microscopia electrónica. Se lleva a cabo para confirmar los hallazgos obtenidos por inmunofluorescencia, como son la localización de depósitos electro-densos del tipo complejos inmunes, estructuras virales o del tipo interferón y alteraciones de la membrana basal, entre otros. Las muestras de tejido se procesaron de acuerdo con técnicas establecidas. Brevemente, las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2% en tampón fosfato, posteriormente se fijaron en tetróxido de osmio 1% y se incluyeron en una mezcla de resinas epoxi (EPON). Se realizaron secciones ultrafinas (90 nm) que fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo para ser observadas y fotografiadas a diferentes aumentos en un microscopio electrónico de transmisión.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Como se muestra en la Figura 14, los pacientes fueron divididos, mediante aleatorización en bloques, en:

- Grupo de entrenamiento (11 pacientes con NCM y 11 pacientes con GSF), utilizado para la generación de un modelo de predicción de clase.
- Grupo de validación (11 pacientes con NCM y 11 pacientes con GSF), para validar el modelo de predicción de clase.

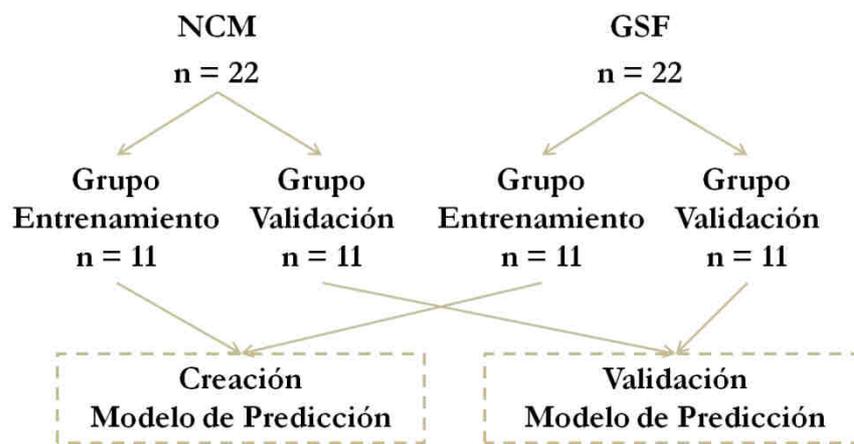


Fig. 14. Diseño del estudio para el análisis del peptidoma urinario

Los datos obtenidos del análisis del peptidoma urinario de todos los pacientes se utilizaron también en la identificación de los péptidos o señales m/z que mostraban diferencias entre sujetos sanos, pacientes con NCM y pacientes con GSF, sin tener en cuenta la división en grupos de entrenamiento o validación.

ANÁLISIS DE LAS VARIABLES BIOQUÍMICAS

Las variables bioquímicas se determinaron inmediatamente tras la extracción de las muestras por el Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Germans Trias i Pujol, con un analizador de rutina.

Se determinaron los niveles de colesterol y triglicéridos mediante métodos enzimáticos convencionales.

Los niveles de creatinina se determinaron mediante la reacción cinética de Jaffé (Roche Diagnostics, Basel, Suiza). La Creatinina, en presencia de picrato alcalino produce un color anaranjado que se mide a 510 nm. La velocidad con que el cromógeno se forma es directamente proporcional a la cantidad de creatinina presente en la muestra.

La proteinuria de 24 horas se cuantificó espectrofotométricamente en un analizador Cobas u 711 (Roche Diagnostics).

La Tasa de filtración glomerular fue estimada utilizando la formula MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*). Esta fórmula utiliza los niveles de creatinina en plasma y la edad, así como multiplicadores para ajustar la mejor estimación de acuerdo a raza y género [127].

Fórmula MDRD

$$\text{Tasa de filtración glomerular estimada} = 186 \times \text{Creatinina en plasma}^{-1,154} \times \text{Edad}^{-0,203} \times 1,21 \text{ (si es de raza negra)} \times 0,742 \text{ (si es mujer)}$$

ANÁLISIS DEL PEPTIDOMA URINARIO

Obtención de las muestras y procesamiento

Se recogió una muestra de orina a todos los individuos incluidos en el estudio. En el caso de los pacientes con síndrome nefrótico, la muestra se recogió siempre el mismo día de la biopsia renal, antes de la realización de la misma y de empezar ningún tratamiento farmacológico.

En todos los casos se recogió la parte media de la segunda micción del día en un recipiente estéril (50 ml aproximadamente) y se centrifugó inmediatamente a 2.100g durante 30 minutos a 4°C, para eliminar los restos celulares. Se recogió el sobrenadante y se ajustó a pH neutro con NH_4HCO_3 1M para minimizar la precipitación durante la congelación. Posteriormente, se realizaron alícuotas de 1,5 ml y se congelaron a -80°C hasta ser procesadas.

Aislamiento del peptidoma urinario

El aislamiento de la fracción peptídica de las muestras de orina se llevó a cabo, por duplicado, mediante el uso de esferas magnéticas (Figura 16).

Las esferas magnéticas utilizadas fueron Dynabeads[®] RPC18 (Invitrogen, Breda, Holanda) que capturan péptidos y proteínas al unirse a sus aminoácidos hidrofóbicos. Se siguieron las instrucciones del fabricante, pero se realizaron algunos cambios para optimizar el proceso.

A continuación se detalla el protocolo seguido:

Protocolo esferas magnéticas Dynabeads[®] RPC18 y punteado en placa MALDI

1. Pipetear las esferas magnéticas hasta conseguir una suspensión homogénea.
2. Pasar 10 μ l de esferas a una placa NUNC de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca).
3. Dejar la placa sobre un imán durante 1 minuto y eliminar el sobrenadante. Las esferas quedan retenidas por el imán en el fondo de los pocillos.
4. Sacar la placa del imán y realizar un lavado de las esferas con 100 μ l de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%. Homogeneizar la mezcla mediante pipeteo. Tras el lavado, la placa se coloca sobre el imán y se elimina de nuevo el sobrenadante.
5. Repetir el lavado (pasos 3 y 4) dos veces para realizar un total de 3 lavados.
6. Añadir 100 μ l de la muestra de orina y 2,5 μ l de TFA 2% (por duplicado).
7. Homogeneizar mediante pipeteo y dejar 5 minutos incubando a temperatura ambiente (TA) para permitir la unión de los péptidos a las esferas.
8. Colocar la placa sobre el imán y eliminar el sobrenadante.
9. Realizar 3 lavados con 100 μ l de TFA 0,1%.
10. Tras eliminar el sobrenadante del último lavado, añadir 15 μ l de acetonitrilo (ACN) 50% y dejar 5 minutos a TA. En este paso se separan los péptidos de las esferas y quedan en el ACN.
11. Colocar la placa sobre el imán y recoger 10 μ l del eluido de péptidos.
12. Diluir los eluidos 1:5 con agua de grado LC (Lab-Scan, Gliwice, Polonia)
13. Preparar la matriz: 1,84 mg/ml 2,6-dihidroxiacetofenona, 20% ACN y 40 mmol/l amonio citrato dibásico.
14. Mezclar eluido y matriz (1:2).

15. Aplicar, por duplicado, 1 μ l de la mezcla eluido/matriz sobre una placa MALDI AnchorChip 600/384 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) (Figura 14).
16. Dejar secar al aire la placa unos minutos para permitir que la matriz cristalice.

NOTA: en un análisis proteómico se recomienda utilizar únicamente material fungible que no se disuelva en presencia de disolventes orgánicos, para evitar que aparezcan polímeros de plástico en el espectro MALDI. En este estudio utilizamos tanto tubos como puntas de pipeta Eppendorf, especiales para este fin.

Para poder ser analizados por MALDI-TOF MS, los 10 μ l de eluido obtenidos de cada muestra se mezclaron con un compuesto, denominado matriz, que es capaz de absorber la luz UV. La mezcla matriz-eluido se aplicó en una placa MALDI AnchorChip™. Estas placas se caracterizan por que en cada posición hay una superficie hidrofílica rodeada de una zona hidrofóbica, lo que permite que la muestra se concentre en una superficie muy pequeña (Figura 15).



Fig. 15. Imagen de una placa MALDI AnchorChip 600/364

Para la calibración externa del espectrómetro de masas se utilizó *Peptide Calibration Standard I* (Bruker Daltonics), una mezcla de 9 péptidos estándar de masa molecular conocida (Tabla 2). El calibrador se mezcló 1:1 con la solución de matriz y 0,4 μ l se aplicaron en los lugares de la placa MALDI específicos para la calibración.

Péptido	Masa molecular (Da)
Bradikinina 1-7	757.3992
Angiotensina II	1046.5418
Angiotensina I	1296.6848
Sustancia P	1347.7354
Bombesina	1619.8223
ACTH clip 1-17	2093.0862
ACTH clip 18-39	2465.1983
Somatostatina 28	3147.4710

Tabla 2. Péptidos del calibrador *Peptide Calibration Standard I* junto con su masa molecular.

Todo el proceso de fraccionamiento fue automatizado utilizando un robot pipeteador de líquidos (Tecan, Mannedorf, Suiza), para mejorar el rendimiento y asegurar la reproducibilidad del análisis.

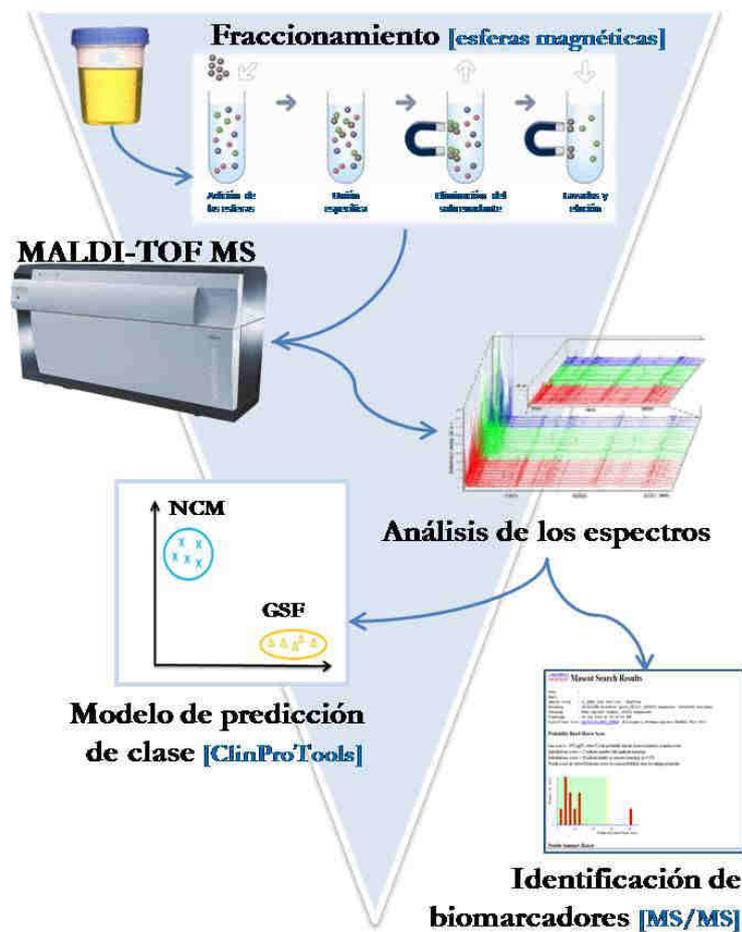


Fig. 16. Esquema de la metodología utilizada para el estudio del peptidoma urinario.

MALDI-TOF MS

Una vez están las muestras en la placa MALDI, ésta se introduce en la cámara de ionización de un espectrómetro de masas UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics), el cual dispone de una bomba de vacío para poder extraer todo el aire de la cámara.

Las muestras son irradiadas dentro de la cámara con un haz de luz láser, con pulsaciones de nanosegundos. Esta energía es absorbida por la matriz y transferida a

los analitos. De esta manera, la matriz ioniza la muestra y los péptidos ionizados quedan dispersos en el vacío de la cámara (desorción/ionización) (Figura 17).

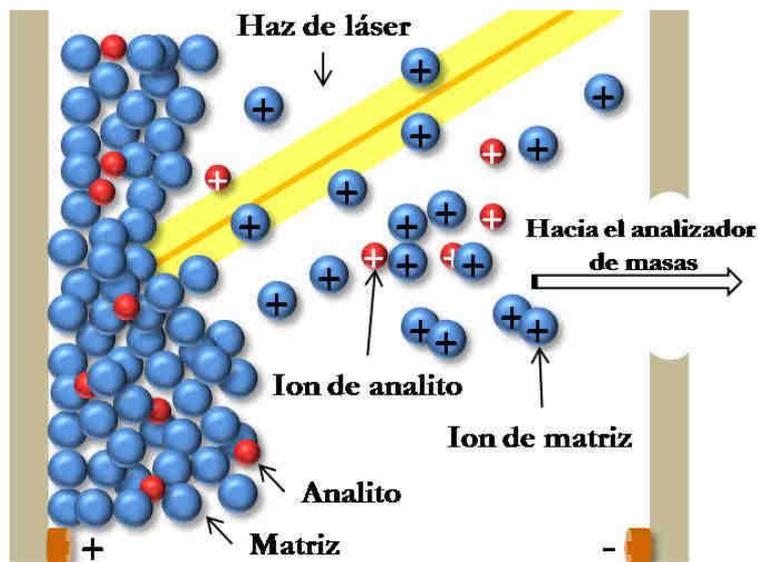


Fig. 17. Esquema de la ionización de las partículas en el MALDI (Adaptada de University of Bristol).

La cámara donde se coloca la placa con las muestras se encuentra entre dos electrodos, un cátodo y un ánodo. Al estar la muestra ionizada con cationes, migra hacia el ánodo, detrás del cual se encuentra el detector. La resolución del equipo depende en gran medida de la longitud del tubo de vuelo. Una forma de alargar el recorrido de los iones sin tener que incrementar la longitud del tubo es colocando un detector reflector a mitad de recorrido del tubo de vuelo. Este detector reflector detecta los iones una vez son rebotados por el detector lineal (Figura 11).

Por lo general, sólo hay una carga positiva en cada péptido, por lo que en un campo eléctrico determinado se aplica la misma fuerza a cada ion. Según la tercera ley de Newton, donde: Fuerza = masa x aceleración, los iones más ligeros experimentan una

mayor aceleración, viajan más rápido a través del tubo de vuelo y alcanzan antes el detector (Figura 11). Todos los iones que tienen la misma masa colisionan en el detector a la vez, generando un pico de magnitud proporcional al número de iones que colisionan a la vez.

En este estudio, se ionizaron las muestras mediante un láser de nitrógeno a 337 nm, operando en modo reflectivo de iones positivos y con una frecuencia de repetición de 1.000 Hz.

Mediante el programa informático *FlexControl v3.4* (Bruker Daltonics) controlamos el espectrómetro de masas. La adquisición de los espectros fue manual, con 300 disparos de láser dirigidos al azar sobre la superficie de la muestra, con una potencia del 70%. Las condiciones de la operación fueron las siguientes: voltajes de la fuente de iones: 25 y 22.40 kV; reflector: 26,45 kV; reflector 2: 13,40 kV; tiempo de extracción de los pulsos de iones: 300 ns. Los espectros fueron externamente calibrados, obteniendo una precisión de masa menor a 10 ppm. Los picos con una señal-ruído >3 dentro del rango m/z de 1 a 10 kDa fueron grabados.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Debido a los duplicados hechos durante el fraccionamiento de las muestras y durante el punteado en la placa MALDI, se obtuvieron 4 espectros de cada muestra. Estos espectros fueron analizados con el programa *DataAnalysis v3.4* (Bruker Daltonics) con el fin de seleccionar el espectro más representativo de cada muestra. Para ello, se seleccionaron los espectros con mayor número de señales y de intensidades más elevadas.

Para evaluar la reproducibilidad del fraccionamiento llevado a cabo con la tecnología de esferas magnéticas, se analizaron los espectros de las 4 réplicas obtenidas a partir de 5 muestras aleatorias. Para ello, 6 señales m/z fueron seleccionadas al azar para calcular el coeficiente de variación de su área del pico.

Se utilizó el programa *ClinProTools* v2.2 (Bruker Daltonics) para procesar los espectros obtenidos por MALDI-TOF MS y para la generación de un modelo de predicción de clase capaz de diferenciar entre NCM y GSF. El programa analiza los espectros obtenidos del grupo de entrenamiento mediante un algoritmo *Support Vector Machine*. Este algoritmo selecciona una combinación de picos que permite separar grupos de espectros a través del uso de un vector. Se basa en el principio de "minimización del riesgo estructural", que tiene como finalidad identificar la mejor combinación de picos con el menor riesgo de fracaso. Este algoritmo también selecciona el número máximo de picos utilizados para la generación del modelo. El programa ofrece unos valores de validación cruzada y de capacidad de reconocimiento. La validación cruzada mide la exactitud del modelo y puede utilizarse para predecir cómo se comportará en el futuro. La capacidad de reconocimiento describe el rendimiento de un algoritmo, es decir, la correcta clasificación de un determinado grupo de datos.

Una vez generado el modelo de predicción de clase, éste fue validado con los espectros del grupo de validación.

Además, se utilizaron los perfiles peptídicos de todos los pacientes, sin ser divididos en grupos de entrenamiento o validación, con el fin de identificar qué señales m/z

mostraban diferencias significativas al comparar entre NCM y GSF. Para realizar esta comparación, los datos de área del pico obtenidos por el programa *ClinProTools*, fueron convertidos a ficheros ASCII y exportados a hojas de cálculo EXCEL, para poder finalmente trabajar con el programa estadístico SPSS v15.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill., EE.UU.).

IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

La identificación de los péptidos de interés se llevó a cabo mediante HPLC-MS/MS, en un instrumento Agilent 1200, funcionando a 300 nl/min, combinado con un espectrómetro de masas.

Los péptidos eluidos de la columna cromatográfica fueron escaneados y fragmentados con un espectrómetro LTQ Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca).

Los iones precursores, en el rango de 400 a 2000 m/z , se detectaron en un analizador Orbitrap a alta resolución. Las secuencias de los péptidos se identificaron mediante búsquedas en bases de datos en el *International Protein Index v3.87*, restringidas a *Homo sapiens* y usando *Sequest* integrado en *Proteome Discoverer v1.3*.

El criterio para dar como positiva una identificación fue que el ratio de falsos positivos fuera $\leq 5\%$ y $Xcorr \geq 1,5, 2,0, 2,25, \text{ y } 3,0$, correspondientes a las cargas +1, +2, +3, and +4, respectivamente. El análisis de los péptidos proteotípicos se basó en la base de datos *Global Proteome Machine*.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Las variables continuas se expresaron como mediana (rango intercuartil). Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante la prueba no paramétrica de *Mann-Whitney*. Las variables categóricas se analizaron con el Test de chi-cuadrado o el test exacto de Fisher.

Las asociaciones entre las variables bioquímicas y el área del pico de las señales m/z se evaluaron con el coeficiente de correlación de *Spearman*.

Los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS v15.0, considerándose estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

ANÁLISIS DEL PROTEOMA URINARIO

POBLACIÓN DE ESTUDIO Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Para este estudio se incluyeron 49 pacientes adultos con síndrome nefrótico puro y diagnóstico confirmado histopatológicamente de NCM o GSF, en fase activa de la enfermedad y sin hallarse bajo ningún tratamiento farmacológico en el momento del estudio. En todos los pacientes se descartaron condiciones o etiologías secundarias, como enfermedades autoinmunes, infecciones, cáncer o exposiciones a fármacos nefrotóxicos. Los grupos de estudio quedaron formados por 24 pacientes con NCM y 25 pacientes con GSF.

Cuarenta y tres de estos pacientes se incluyeron en el estudio del peptidoma urinario (objetivo I de esta tesis).

Todos los individuos incluidos fueron diagnosticados conjuntamente por el Servicio de Anatomía Patológica y por el Servicio de Nefrología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol. Se obtuvo un consentimiento informado de todos los individuos y el protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético del mismo Hospital.

El diagnóstico histológico se consiguió mediante la realización de una biopsia renal, como se ha descrito anteriormente (pág. 77).

DISEÑO DEL ESTUDIO

Como se muestra en la Figura 18, los pacientes fueron divididos aleatoriamente en:

- Grupo de entrenamiento (10 pacientes con NCM y 11 pacientes con GSF), utilizado para llevar a cabo el análisis por 2D-DIGE.
- Grupo de validación (14 pacientes con NCM y 14 pacientes con GSF), para validar los resultados del 2D-DIGE.

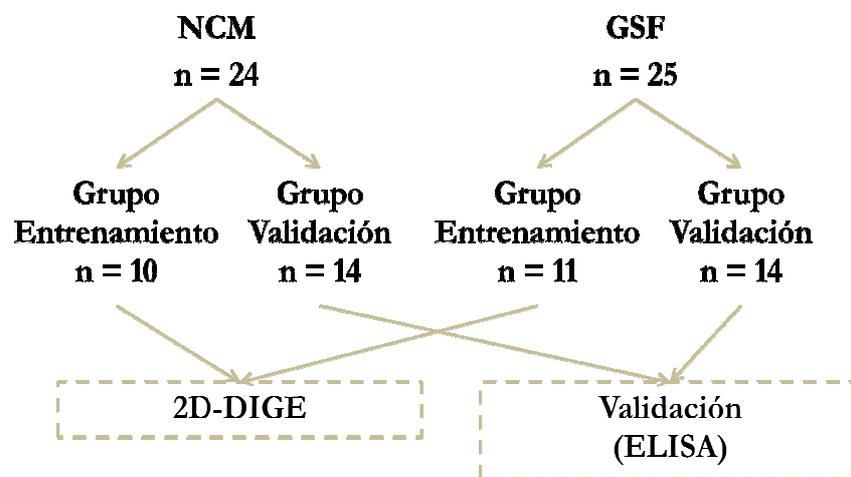


Fig. 18. Diseño del estudio para el análisis del proteoma urinario

Se llevó a cabo una aleatorización por bloques para disminuir la probabilidad de desequilibrios entre los grupos de estudio.

ANÁLISIS DE LAS VARIABLES BIOQUÍMICAS

Las variables bioquímicas se determinaron inmediatamente tras la extracción de las muestras por el Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Germans Trias i Pujol, con un analizador de rutina.

Los niveles de creatinina se determinaron mediante la reacción cinética de Jaffé (Roche Diagnostics, Basel, Suiza). La Creatinina, en presencia de picrato alcalino produce un color anaranjado que se mide a 510 nm. La velocidad con que el cromógeno se forma es directamente proporcional a la cantidad de creatinina presente en la muestra.

Todos los pacientes fueron sometidos a un estudio hematológico completo que incluyó: glucosa en suero (método de hexoquinasa) y proteína de suero (método de Biuret). La proteinuria de 24 horas se cuantificó espectrofotométricamente en un analizador Cobas u 711 (Roche Diagnostics) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

ANÁLISIS DEL PROTEOMA URINARIO

Los geles bidimensionales y la identificación de los *spots* se llevaron a cabo en el Servicio de Proteómica de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

Obtención de las muestras y procesamiento

Se recogió una muestra de orina a todos los pacientes incluidos en el estudio, siempre el mismo día de la biopsia renal, antes de la realización de la misma y de empezar ningún tratamiento farmacológico.

En todos los casos se recogió la parte media de la segunda micción del día en un recipiente estéril (50 ml aproximadamente) y se centrifugó inmediatamente a 2.100g durante 30 minutos a 4°C, para eliminar los restos celulares. Se recogió el sobrenadante y se ajustó a pH neutro con NH_4HCO_3 1M para minimizar la precipitación

durante la congelación. Posteriormente, se realizaron alícuotas de 1,5 ml y se congelaron a -80°C hasta ser procesadas.

Se hicieron dos *pools* con las muestras de los grupos de entrenamiento (10 muestras de pacientes con NCM en *pool* #1 y 11 muestras de pacientes con GSF en el *pool* #2). Para ello se incluyó la misma cantidad de proteína de cada muestra de orina (500 mg). La concentración total de proteínas de las muestras se cuantificó mediante el método de Bradford (Laboratorios Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante y como se detalla a continuación.

Cuantificación de proteína (Método Bradford)

Reconstitución del estándar (Albúmina sérica bovina, BSA)

- Añadir 20 ml de agua desionizada y mezclar hasta que se disuelva. La concentración final de BSA es de 1,46 mg/ml.

Protocolo

- Diluir 1/5 el colorante concentrado con agua desionizada. Filtrar a través de un filtro Whatman #1 (o equivalente) para eliminar posibles partículas.
- Preparar diluciones del estándar (BSA). El rango lineal de este ensayo en placa es de 0,5 mg/ml a 0,05 mg/ml, por lo que en este estudio se realizaron las siguientes diluciones: 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 y 0,05 mg/ml.
- Aplicar 10 µl de cada dilución del estándar y de cada muestra en los pocillos de una placa de 96 pocillos (todos por duplicado).
- Añadir 200 µl del colorante diluido a cada pocillo y mezclar cuidadosamente con una micropipeta evitando la formación de burbujas.

- Incubar a TA durante al menos 5 minutos (no incubar más de una hora ya que la absorbancia aumenta con el tiempo).
- Medir la absorbancia a 595 nm. En este estudio utilizamos un espectrofotómetro Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlandia).
- Se realiza una recta patrón con los datos de las absorbancias observadas en el espectrofotómetro para las diferentes concentraciones de BSA. En este estudio se evaluaron con el software SkanIt para Varioskan Flash (versión 2.4.1). En la Figura 19 se muestra un ejemplo de curva patrón.

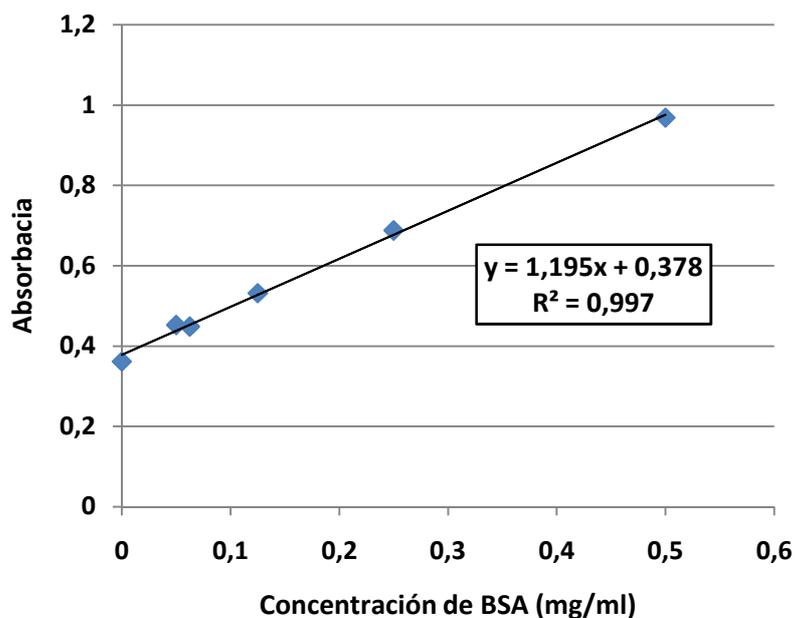


Fig. 19. Ejemplo de recta patrón con los datos de concentración y absorbancia observada de las diferentes diluciones de BSA

- Aplicando la ecuación de la recta patrón a la absorbancia de las muestras, se extrapola su concentración. La concentración final será la media de las concentraciones en cada muestra, teniendo en cuenta el factor de dilución en caso de haberlas diluido.

El método Bradford se basa en el cambio de color del colorante Azul Brillante de Coomassie G250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas [128]. El colorante se une a aminoácidos principalmente básicos (especialmente arginina) y aromáticos. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Por lo tanto, este método se basa en la propiedad del Azul Brillante de Coomassie de presentarse en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando el colorante se une a la proteína. Este método es sensible (1-15 μg), simple, rápido, económico y pocas sustancias interfieren en su determinación.

Marcaje de las muestras para DIGE

Para comparar los proteomas urinarios de ambas entidades glomerulares, 75 μg del *pool* #1 y 75 μg del *pool* #2 fueron marcados con diferentes fluorocromos (CyDye™ DIGE Dyes, GE Healthcare). Los fluorocromos CyDye contienen un grupo NHS éster reactivo que se une covalentemente al grupo ϵ -amino de los residuos lisina de la proteína vía unión amida. El fluorocromo se une a la proteína sin alterar su PI pero aumentando su masa molecular 450 Da. Esta propiedad no afecta al patrón visible en la segunda dimensión. La existencia de diferentes fluorocromos permite marcar diferentes muestras y separarlas en un mismo gel. De esta manera se puede confirmar que las diferencias observadas entre ambas muestras no se deben a diferencias en la movilidad electroforética ya que han sido separadas bajo las mismas condiciones en el mismo gel. En el mismo gel se puede incorporar un estándar interno constituido por la mezcla equimolecular de todas las dos muestras a analizar, el cual es marcado

con un tercer fluorocromo. De esta manera, se obtiene en un mismo gel, la comparativa de las dos muestras y de un estándar interno.

En este estudio, utilizamos Cy3 para el *pool* #1, Cy5 para el *pool* #2 y Cy2 para el control interno, según las instrucciones del fabricante. Cada muestra se marcó con 8 pmol de CyDye por cada μg de proteína y se incubó en hielo durante 30 minutos en oscuridad. La reacción de marcaje se interrumpió añadiendo 1 μl de lisina 10 mM e incubando en hielo durante 10 minutos en oscuridad.

En este estudio se realizaron tres replicas, con 150 μg de proteína total en cada gel.

	Cy2	Cy3	Cy5
NCM (<i>pool</i> #1)	75 μg	150 μg	--
GSF (<i>pool</i> #2)	75 μg	--	150 μg

Preparación de las muestras para la primera dimensión

Los *pools* de muestras se centrifugaron a 10.000g durante 10 minutos y se procedió posteriormente a una limpieza de los sobrenadantes, necesaria para eliminar posibles contaminantes como lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos. En este estudio se utilizó el kit 2DE-Clean-Up (GE Helthcare Life Science, Piscataway, NJ, EE.UU.) según el protocolo facilitado por el fabricante:

- Añadir 300 μl de precipitante (suministrado en el kit) a 100 μl de muestra. Vórtex e incubar en hielo 15 minutos.
- Añadir 300 μl de co-precipitante (suministrado en el kit). Vórtex.

- Centrifugar a 12.000 g durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante.
- Añadir 30 μ l de co-precipitante al pellet e incubar en hielo 5 minutos.
- Centrifugar a 12.000 g durante 5 minutos y añadir 25 μ l de agua destilada. Vórtex.
- Añadir 1 ml de tampón de lavado frío y 5 μ l de aditivo de lavado.
- Incubar 30 minutos a -20°C y vórtex de 10 segundos cada 10 minutos.
- Centrifugar a 12.000 g durante 5 minutos, eliminar el sobrenadante y secar el pellet.
- Resuspender con el tampón adecuado.

A continuación se procedió a la solubilización de las proteínas de las muestras para romper todas las interacciones moleculares y asegurarse de que cada punto del gel representará a un polipéptido individual [129]. La solubilización de la muestra se realiza normalmente con un tampón de lisis que contiene:

- Un agente caotrópico neutro para solubilizar las proteínas, normalmente se utiliza urea o tiourea, que desnaturalizan las proteínas mediante la ruptura de los puentes de hidrógeno, dejando expuestos los residuos hidrofóbicos que serán solubilizados por el detergente no-iónico.
- Un detergente no-iónico o *zwitteriónico* para prevenir agregaciones, como CHAPS [3-(cloroamidopropil)-dimetilamonio-1-propanosulfato] o NP-40.
- Un agente reductor, como β -mercaptoetanol, ditioneitol (DTT), que completa la desnaturalización de las proteínas mediante la ruptura de los puentes disulfuro.
- Anfólitos, que potencian la solubilidad de las proteínas, minimizando la agregación por interacciones de carga.

En este estudio, el tampón de lisis en el que se resuspendieron las muestras estaba formado por: urea 8 M, CHAPS 2,5%, ASB-14 (amidossulfobetaina-14) 2%, DTT 10 mM, IPG buffer 0,5% (v/v), Tris-HCl 40 mM pH 8,5. Se utilizaron únicamente 100 μ l de tampón de lisis para que las muestras quedaran muy concentradas. Se dejaron en agitación durante 30 minutos para una conseguir una mayor resuspensión.

Separación en la primera dimensión. Isoelectroenfoque

La electroforesis 2D-PAGE con gradiente de pH inmovilizado se llevó a cabo de acuerdo con Görg et al. [130]. El IEF de las proteínas se realizó en tiras individuales de poliacrilamida de gradiente de pH inmovilizado (IPG, *Immobiline DryStrips*, GE Healthcare) de 24 cm de longitud y rango de pH 3-10, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Estas tiras, que permiten la separación de las proteínas según su PI, se suministran deshidratadas para facilitar su conservación. Se preparó un tampón de rehidratación que permitió rehidratar las tiras así como mantener las proteínas en disolución durante todo el proceso del IEF. El tampón de rehidratación se preparó añadiendo al tampón de lisis: IPG 0,5%, solución DeStreak 1,4% (GE Healthcare) y trazas de azul de bromofenol. Este paso se llevó a cabo en unos *IPG Strip Holders* (GE Healthcare), como se detalla a continuación:

- Aplicar 450 μ l de tampón de rehidratación a lo largo del *IPG strip holder* evitando la formación de burbujas.
- Retirar el plástico de protección de la tira IPG y manipular siempre con guantes y pinzas.
- Colocar la tira en el *IPG Strip Holder* de manera que la acrilamida deshidratada quede en contacto con la disolución de rehidratación.

- Cubrir la tira con 2 ml de aceite mineral, para evitar la evaporación de agua durante el proceso.
- Dejar un mínimo de 12 horas a una temperatura inferior a 30°C en una superficie plana para una rehidratación homogénea.

En todo momento, se utilizaron guantes de nitrilo al manipular los geles de poliacrilamida, las tiras de IEF y cualquier equipamiento en contacto con los geles.

La primera dimensión se llevó a cabo en un *Ettan™ IPGphor™ Cup Loading Manifold* (GE Healthcare) en una unidad electroforética *Ettan IPGphor 3*. El *manifold* es una bandeja de cerámica con óxido de aluminio que permite una eficiente transferencia de calor y que contiene unos carriles donde colocar las tiras IPG. En este sistema, el IEF se realiza con el gel hacia arriba, y la muestra se aplica en una pequeña copa. Se aplicaron 75 µg de cada muestra + DTT 10 mM (final).

Las condiciones del IEF fueron:

- 300 V durante 1 hora
- 1.000 V durante 30 minutos en gradiente
- 5.000 V durante 80 minutos en gradiente
- 8.000 V durante 30 minutos en gradiente
- 8.000 V durante 2 horas
- Se enfocan las muestras hasta llegar a 65.000 Vhr

Al finalizar el IEF y antes de proceder a la separación de las proteínas en la segunda dimensión, las tiras fueron equilibradas con el fin de resolubilizar las proteínas y de reducir y alquilar cualquier puente disulfuro que pudiera quedar oxidado. El tampón de equilibrado utilizado fue: urea 6 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,8, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002% (w/v). El SDS es necesario para desnaturalizar las proteínas y formar con ellas complejos cargados negativamente que migran hacia el polo positivo durante la electroforesis.

El equilibrado se realizó en dos pasos, añadiendo en el primero DTT 0,1 g/10 ml, un agente reductor para mantener el estado reducido de las proteínas desnaturalizadas. Se dejaron las tiras durante 15 minutos en agitación continua a TA. Seguidamente, se dejaron otros 15 minutos en agitación continua, pero esta vez en tampón de equilibrado al que se habían añadido 0,25 g/10 ml de iodoacetamida, un agente alquilante para evitar la reoxidación de los grupos tiol de las proteínas. Finalmente, las tiras quedaron listas para usar en la segunda dimensión.

Separación en la segunda dimensión (SDS-PAGE)

Una vez que las proteínas habían sido separadas en función de su PI, se procedió a su separación en función de su tamaño o peso molecular mediante SDS-PAGE. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 12,5%, de gran tamaño (26 x 20 cm) para poder aplicar las tiras de IEF de 24 cm.

La poliacrilamida se forma por copolimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N'-metilen-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la tetrametiletilendiamina (TEMED) y el persulfato de amonio. El radical persulfato activa

al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice. Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formándose una red de porosidad bastante uniforme, que puede ser regulada variando las condiciones de la reacción y las concentraciones de los monómeros.

En este estudio, para la preparación del gel se mezclaron: 188 ml acrilamida - bisacrilamida, 113 ml Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 140 ml H₂O desionizada, 4,5 ml SDS 10% (p/v), 4,5 ml persulfato de amonio 10% (p/v), 0,62 µl TEMED 10% (p/v).

Para poder llevar a cabo la electroforesis se utilizó tampón de electroforesis 10x: 250 mM Tris, 1,92 M Glicina y 1% SDS. Los tampones utilizados para cátodo y ánodo fueron diluciones 3x y 1x de este tampón de electroforesis, respectivamente.

Se utilizaron marcadores de masa molecular Benchmark (Invitrogen). La electroforesis se realizó a 14°C hasta que el frente de migración de los iones rápidos alcanzó el fondo del gel.

1- 45 minutos a 6 W (2 W/gel)

2- 4 horas a 51 W (17 W/gel)

Los geles analíticos se realizaron por triplicado.

Escaneado de los geles

Para visualizar las muestras marcadas con fluorocromos Cy2, Cy3 y Cy5 fue necesario el uso de un escáner Typhoon 9400 (GE Healthcare) (Figura 20), que está especialmente equipado para la poder excitar y colectar la luz emitida por los fluorocromos, ya que estos no son visibles en el rango de longitudes de onda visibles. Para los tres canales

de fluorescencia el voltaje del fotomultiplicador fue ajustado a 475 V y la resolución empleada fue de 100 μm .

Las imágenes digitalizadas se analizaron con el programa SameSpots v4.0 (TotalLab Ltd, Newcastle, Reino Unido), el cual llevó a cabo el procesamiento y análisis estadístico de las imágenes.



Fig. 20. Escáner Typhoon (GE Healthcare)

Tinción de los geles

Para realizar el picado de los *spots* que se desean identificar fue necesaria una tinción visible, en este caso se llevó a cabo una tinción con azul Coomassie coloidal. Esta tinción consiste en la saturación del gel con el tinte, las proteínas tienen mucha más afinidad por las moléculas del tinte que por la poliacrilamida, por lo que, tras desteñir el gel, las proteínas resaltan sobre el fondo más claro del gel.

Para la tinción se dejaron los geles toda la noche con Instant Blue (Thermo Fisher). Los geles quedaron completamente azules y fueron desteñidos con H_2O destilada. Los

geles se digitalizaron con un escáner Typhoon y las imágenes resultantes se alinearon con las imágenes de los geles DIGE.

Aquellos puntos o *spots* cuya abundancia de proteínas estaba aumentada o disminuida 2 veces al comparar los dos *pools* fueron candidatos a ser identificados por huella peptídica.

Huella peptídica

Los *spots* de interés fueron procesados escindidos del gel para su digestión triptica:

- Destinción: Bicarbonato amónico 50mM / ACN 50%
- Reducción: DTT 20 mM, durante 20 minutos a 60°C
- Alquilación: Iodoacetamida 25 mM, durante 15 minutos a 37°C
- Digestión con tripsina: 30 ng/muestra (sequencing grade-Promega, Madison, WI, EE.UU.), durante 3h a 37°C
- Elución: H₂O : ACN (1:1) + 0,2% TFA

La tripsina es un enzima proteolítico que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas en las posiciones de lisina y arginina C-terminal, siempre y cuando no haya una prolina en el extremo N-terminal de dichos aminoácidos. La tripsina siempre genera un mismo patrón de péptidos para una proteína determinada, lo que se conoce, como se ha descrito anteriormente, como huella peptídica o PMF.

Para el análisis por MS, se mezclaron 0,5 µl de las muestras con el mismo volumen de matriz [10 mg/ml de ácido α-4-hidroxicinámico (HCCA) en 30% de ACN, 60% de H₂O y

0,1% TFA]. La mezcla (1 μ l) se aplicó en una placa MALDI *Ground Steel* (Bruker Daltonics) y se dejó secar al aire durante unos minutos.

El análisis por MS se llevó a cabo en un espectrómetro de masas MALDI-TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonics). La ionización de las muestras se consiguió con un laser de nitrógeno a 337 nm y los espectros fueron obtenidos usando un método en modo reflectrón y un voltaje de aceleración de 25 kv. Todos los espectros de masas se calibraron externamente utilizando una mezcla de calibradores externos (Bruker Daltonics).

La identificación de las proteínas se llevó a cabo mediante el motor de búsqueda MASCOT (*Matrix Science*, Londres, Reino Unido) utilizando la base de datos de proteínas NCBIInr, con los siguientes parámetros:

- Especie: Humano.
- Proteasa: Tripsina.
- Especificidad de la tripsina con un máximo de 3 lugares de corte omitidos.
- Modificaciones: oxidación de las metioninas y carbamidometilación de las cisteínas.
- Tolerancia en la masa: 50 ppm de error.

El programa proporciona una lista priorizada que incluye aquellas proteínas que presentan mayor probabilidad de corresponderse con la proteína analizada en función de su PMF. El criterio para dar como positiva una identificación fue si el score individual era superior al correspondiente score límite de homología.

VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS POR ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

La concentración de las proteínas identificadas por huella peptídica se evaluó en las muestras de orina de los grupos de validación utilizando kits de ELISA disponibles comercialmente.

Los kits utilizados fueron los siguientes:

- ALFA-1-ANTITRIPSINA (Gen AAT)
 - Fabricante: Abnova (Heidelberg, Germany)
 - Nº catálogo: KA0459
 - Tipo de ensayo: ELISA sandwich cuantitativo
 - Dilución: 1 : 5.000 – 1 : 40.000
 - LDL (ng/ml): (límite detectable más bajo, es la sensibilidad o concentración de proteína más baja que puede diferenciarse de 0): 0,3
 - Rango (ng/ml): 0,39 – 100
 - Coeficiente de variación intra-ensayo (%): 4,9
 - Coeficiente de variación inter-ensayo (%): 7,0

- TRANSFERRINA (Gen TF)
 - Fabricante: Abnova
 - Nº catálogo: KA0510
 - Tipo de ensayo: ELISA sandwich cuantitativo
 - Dilución: 1 : 10.000 - 1 : 30.000
 - LDL (ng/ml): 1,5
 - Rango (ng/ml): 1,56 - 100
 - Coeficiente de variación intra-ensayo (%): 4,5
 - Coeficiente de variación inter-ensayo (%): 7,1

- ZINC-ALFA-2-GLICOPROTEINA (Gen ZAG)
 - Fabricante: Abnova
 - Nº catálogo: KA1689
 - Tipo de ensayo: ELISA competitivo
 - Dilución: 1 : 1
 - LDL (ng/ml): 0,021
 - Rango (ng/ml): 0,1 – 1.000
 - Coeficiente de variación intra-ensayo (%): <10
 - Coeficiente de variación inter-ensayo (%): <15

- CALRETININA (Gen: CALB2)
 - Fabricante: Elabscience (Wuhan, China)
 - Nº catálogo: E-EL-H0628
 - Tipo de ensayo: ELISA sandwich cuantitativo
 - Dilución: 1 : 1
 - LDL (ng/ml): 0,188
 - Rango (ng/ml): 0,313 - 20
 - Coeficiente de variación intra-ensayo (%): <10
 - Coeficiente de variación inter-ensayo (%): <10

- PROTEÍNA CANAL TRANSMEMBRANA-LIKE 1 (Gen TMC1)
 - Fabricante: Cusabio (Wuhan, China)
 - Nº catálogo: CSB-EL023633HU
 - Tipo de ensayo: ELISA sandwich cuantitativo
 - Dilución: 1 : 1
 - LDL (ng/ml): 0,006
 - Rango (ng/ml): 0,025 – 1,6
 - Coeficiente de variación intra-ensayo (%): <8
 - Coeficiente de variación inter-ensayo (%): <10

- HISTATINA-3 (Gen HTN3)
 - Fabricante: Cusabio
 - Nº catálogo: CSB-EL010879HU
 - Tipo de ensayo: ELISA sandwich cuantitativo
 - Dilución: 1 : 1
 - LDL (ng/ml): 39
 - Rango (ng/ml): 156 – 10.000
 - Coeficiente de variación intra-ensayo (%): <8
 - Coeficiente de variación inter-ensayo (%): <10

- INHIBIDOR NUCLEAR DE LA FOSFATASA 1 (Gen PPP1R8)
 - Fabricante: Cusabio
 - Nº catálogo: CSB-EL018555HU
 - Tipo de ensayo: ELISA sandwich cuantitativo
 - Dilución: 1 : 1
 - LDL (ng/ml): 0,008
 - Rango (ng/ml): 0,003 - 2
 - Coeficiente de variación intra-ensayo (%): <8
 - Coeficiente de variación inter-ensayo (%): <10

- LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN C10ORF11 (Gen c10orf11)
 - Fabricante: Cusabio
 - Nº catálogo: CSB-EL002909HU
 - Tipo de ensayo: ELISA sandwich cuantitativo
 - Dilución: 1 : 1
 - LDL (ng/ml): 0,005
 - Rango (ng/ml): 0,019 – 1,2
 - Coeficiente de variación intra-ensayo (%): <8
 - Coeficiente de variación inter-ensayo (%): <10

- HOMÓLOGO DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ELONGACIÓN 1 (Gen ELOF1)
 - Fabricante: Cusabio
 - Nº catálogo: CSB-EL007618HU
 - Tipo de ensayo: ELISA sandwich cuantitativo
 - Dilución: 1 : 1
 - LDL (ng/ml): 0,004
 - Rango (ng/ml): 0,016 - 1
 - Coeficiente de variación intra-ensayo (%): <8
 - Coeficiente de variación inter-ensayo (%): <10

- PROTEÍNA NUCLEAR CONTENEDORA DE SEÑAL PROTEOLÍTICA PEST (Gen PCNP)
 - Fabricante: Cusabio
 - Nº catálogo: CSB-EL017625HU
 - Tipo de ensayo: ELISA sandwich cuantitativo
 - Dilución: 1 : 1
 - LDL (ng/ml): 0,006
 - Rango (ng/ml): 0,0024 – 1,5
 - Coeficiente de variación intra-ensayo (%): <8
 - Coeficiente de variación inter-ensayo (%): <10

- AMINOÁCIDO DE CADENA RAMIFICADA AMINOTRANSFERASA, MITOCONDRIAL (Gen BCAT2)
 - Fabricante: Cusabio
 - Nº catálogo: CSB-EL002601HU
 - Tipo de ensayo: ELISA sandwich cuantitativo
 - Dilución: 1 : 1
 - LDL (ng/ml): 0,006
 - Rango (ng/ml): 0,023 – 1,5
 - Coeficiente de variación intra-ensayo (%): <8
 - Coeficiente de variación inter-ensayo (%): <10

- **PROTEÍNA RIBOSOMAL 39S L17, MITOCONDRIAL (Gen MRPL17)**
 - Fabricante: Cusabio
 - Nº catálogo: CSB-EL014824HU
 - Tipo de ensayo: ELISA sandwich cuantitativo
 - Dilución: 1 : 1
 - LDL (ng/ml): 0,006
 - Rango (ng/ml): 0,025 – 1,6
 - Coeficiente de variación intra-ensayo (%): <8
 - Coeficiente de variación inter-ensayo (%): <10

- **RECEPTOR DEL FACTOR ACTIVADOR DE PLAQUETAS (Gen PTAFR)**
 - Fabricante: Cloud-Clone Corp. (Houston, TX, EE.UU.)
 - Nº catálogo: SEC753Hu
 - Tipo de ensayo: ELISA sandwich cuantitativo
 - Dilución: 1 : 1
 - LDL (ng/ml): 0,059
 - Rango (ng/ml): 0,156 - 10
 - Coeficiente de variación intra-ensayo (%): <10
 - Coeficiente de variación inter-ensayo (%): <12

- **CICLINA-Y (Gen CCNY)**
 - Fabricante: Cloud-Clone Corp.
 - Nº catálogo: SED270Hu
 - Tipo de ensayo: ELISA sandwich cuantitativo
 - Dilución: 1 : 1
 - LDL (ng/ml): 0,032
 - Rango (ng/ml): 0,078 - 5
 - Coeficiente de variación intra-ensayo (%): <10
 - Coeficiente de variación inter-ensayo (%): <12

- **PROTEÍNA HUMANINA-LIKE 6 (Gen HN6)**
 - Fabricante: Wuhan EIABB Science (Wuhan, China)
 - Nº catálogo: E12591h
 - Tipo de ensayo: ELISA sandwich cuantitativo
 - Dilución: 1 : 1
 - Rango (ng/ml): 0,312 - 20

Cada muestra se analizó por duplicado y de acuerdo, en todos los casos, con las instrucciones del fabricante.

Los valores de absorbancia fueron determinados mediante un espectrofotómetro Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific) a 450 nm. Las concentraciones medidas se evaluaron con el programa SkanIt para Varioskan Flash (versión 2.4.1) por extrapolación a partir de una curva estándar generada a partir de los estándares suministrados en los kits.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos de esta parte del estudio se llevaron a cabo en el Servicio de Estadística Aplicada de la Universitat Autònoma de Barcelona.

El primer paso se realizó mediante análisis univariados y bivariados. Para las variables continuas, expresadas como mediana (rango intercuartil), los grupos se compararon mediante la prueba no paramétrica de *Mann-Whitney*. Para las variables categóricas, las diferencias entre grupos se sometieron a un test chi-cuadrado.

Árbol de decisión

Con el objetivo de caracterizar las patologías de los pacientes se buscaron las proteínas que más discriminaban entre pacientes con NCM y pacientes con GSF. Para ello se creó un árbol de decisión a partir de la base de datos de los pacientes. Los árboles de decisión son diagramas de decisiones secuenciales creados para alcanzar un determinado objetivo y muestran los posibles resultados de cada una de las elecciones. En cada paso se intenta escoger la mejor partición de la población según alguno de los factores (variables explicativas) de manera que haya diferencias de la variable que define el objetivo entre los dos grupos resultantes. De esta manera, en cada paso la partición definirá dos subgrupos de la población.

En nuestro estudio, el número de pacientes de los grupos de entrenamiento de NCM y GSF era el mismo, es decir, la muestra estaba equilibrada. Así pues, para determinar las características de las proteínas en los pacientes NCM (o GSF) se determinó en qué particiones había un porcentaje menor o mayor al 50% de pacientes con MCD (o GSF). En el caso de que la probabilidad de tener NCM fuera prácticamente igual a la probabilidad de tener GSF entonces podríamos decir que ese perfil no estaba ni sobre-representado ni infra-representado en ninguna de las dos patologías.

Además, se analizó la sensibilidad y especificidad del árbol de decisión, calculando el área bajo la curva ROC (AUC) correspondiente. Se utilizó un intervalo de confianza (IC) del 95%, se consideró toda diferencia significativa a valores de $p < 0,05$.

Los análisis estadísticos se realizaron con el software SAS v9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE.UU.). El nivel de significación se fijó en 0,05.

Resultados y Discusión

En esta tesis nos centramos en dos glomerulonefritis, NCM y GSF primaria, cuyo diagnóstico mediante biopsia renal puede ser confuso y no concluyente. En estas glomerulonefritis se produce un aumento de la permeabilidad de la barrera de filtración glomerular, lo que da lugar al denominado SN idiopático, caracterizado por proteinuria masiva, edema e hipoalbuminemia.

El diagnóstico definitivo de estas enfermedades requiere la realización de una biopsia renal, una técnica segura pero no exenta de complicaciones, como hemorragias, infecciones o hematuria, y está contraindicada en algunos casos. La evaluación de la biopsia renal requiere del examen del tejido renal bajo microscopía óptica, de inmunofluorescencia y electrónica. Además, es necesaria la obtención de una cantidad adecuada de tejido que contenga un número mínimo de glomérulos para evidenciar el daño renal.

Aún disponiendo del estudio histológico de la biopsia renal, a día de hoy se siguen cometiendo errores en el diagnóstico de la NCM y la GSF. Esto es debido a la naturaleza focal de la GSF, que hace que el tejido obtenido en la biopsia pueda contener únicamente glomérulos no esclerosados, y llegar a un diagnóstico erróneo de NCM. La importancia de llegar al diagnóstico correcto radica principalmente en la respuesta al tratamiento no es la misma en ambas entidades. Los pacientes con NCM muestran una respuesta excelente al tratamiento con corticoides, mientras que un elevado porcentaje de pacientes con GSF muestran dependencia o resistencia a este tratamiento, por lo que llegar al diagnóstico correcto evita exponer a estos últimos a los efectos adversos de los corticoides.

Los casos de diagnósticos erróneos fueron los que llevaron a nuestro grupo a la búsqueda de biomarcadores en orina que pudieran utilizarse como pruebas complementarias a la biopsia renal en el diagnóstico diferencial de estas dos enfermedades. Se trataría de una prueba sencilla y no invasiva que podría repetirse tantas veces como fueran necesarias para seguir la progresión de la enfermedad e incluso controlar la respuesta del paciente al tratamiento.

Con este fin recurrimos a la proteómica, la cual ha experimentado increíbles avances en las últimas décadas y está abriendo nuevas vías en el descubrimiento de biomarcadores con valor diagnóstico. En la denominada proteómica clínica, la orina ha sido ampliamente estudiada, principalmente en la búsqueda de biomarcadores de enfermedades renales. En cuanto a las glomerulonefritis, se han propuesto posibles biomarcadores, pero ninguno de ellos ha permitido, hasta la fecha, diferenciar entre las diferentes entidades.

En esta tesis llevamos a cabo la búsqueda de biomarcadores mediante dos enfoques proteómicos diferentes:

1. En un primer estudio nos centramos en el análisis del peptidoma urinario.
2. En un segundo estudio nos centramos en el análisis del proteoma urinario.

La población de estudio estaba constituida por un grupo de pacientes con diagnóstico histológico de NCM y GSF primaria.

A continuación se discuten los resultados de ambos estudios.

Estudio 1

**Análisis del peptidoma urinario de pacientes
diagnosticados mediante biopsia renal de NCM y GSF
primaria**

De este estudio resultó publicado un trabajo: *Urinary peptide profiling to differentiate between minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis. PloSOne. 2014;9(1):e87731* (ver Anexo I).

En este estudio analizamos el peptidoma urinario de pacientes glomerulares. El peptidoma se refiere al proteoma de bajo peso molecular, es decir, al conjunto de fragmentos de proteínas y/o péptidos endógenos que están presentes tanto en el espacio intracelular como extracelular de un organismo. Los péptidos se generan constantemente *in vivo* mediante síntesis activa, y mediante el procesamiento proteolítico de proteínas precursoras más grandes, a menudo produciendo fragmentos de proteínas que intervienen en una gran variedad de funciones fisiológicas [131]. Una desregulación de estos péptidos puede jugar un papel en muchas situaciones patológicas, por lo que el estudio del peptidoma de los diferentes fluidos biológicos se ha convertido en una herramienta emergente en el descubrimiento de biomarcadores de diferentes enfermedades [132–136]. Se han propuesto algunas proteínas como posibles biomarcadores de enfermedad renal [137] y de síndrome nefrótico [121,138], pero no han sido hasta la fecha confirmadas para su uso en la práctica clínica.

En cuanto a la población de estudio de este trabajo, en la Tabla 3 se muestran algunas de las características demográficas y clínicas de los pacientes, comparándose los grupos de entrenamiento y validación en que fueron divididos aleatoriamente.

	NCM			GSF				
	Entrenamiento	Validación	P_{E-V}	Entrenamiento	Validación	P_{E-V}	P_{E-E}	P_{V-V}
N	11	11		11	11			
Edad	38 (28-68)	68 (28-75)	0,37	57 (31-62)	55 (33-65)	0,72	0,36	0,49
♀ / ♂	4 / 7	3 / 8		3 / 8	4 / 7			
IMC (kg/m²)	24,2 (22,1-33,8)	26,4 (24,7-34,6)	0,50	25,9 (23,1-26,7)	25,3 (22,1-26,3)	0,29	0,78	0,22
TG (mg/dl)	230 (176-365)	163 (108-232)	0,07	239 (129-360)	114 (70-166)	0,06	0,92	0,27
CT (mg/dl)	362 (274-477)	278 (226-346)	0,15	217 (180-320)	197 (178-247)	0,60	0,08	0,07

Tabla 3. Características demográficas y clínicas de la población de estudio. Los datos se muestran como mediana (rango intercuartil). Las diferencias entre los grupos fueron evaluadas mediante el test no paramétrico de *Mann-Whitney*. P_{E-V} compara los grupos de entrenamiento y validación, P_{E-E} compara los grupos de entrenamiento, y P_{V-V} compara los grupos de validación. Una $p < 0,05$ fue considerada estadísticamente significativa; N significa número de pacientes; IMC, índice de masa corporal; TG, triglicéridos; CT, colesterol total.

Con respecto a la edad, no se encontraron diferencias significativas al comparar los grupos de entrenamiento y validación de ambas entidades. Tampoco se observaron diferencias al comparar los diferentes grupos.

En cuanto al perfil lipídico se observaron niveles de colesterol significativamente mayores en los pacientes con NCM al comparar los grupos de entrenamiento. En cuanto a los TG, no había diferencias entre los grupos de entrenamiento, pero sí que las había entre los grupos de entrenamiento y sus respectivos grupos de validación, con menores niveles en los últimos. Como ya se ha descrito, el perfil lipídico del síndrome nefrótico se caracteriza por un incremento de colesterol total, así como por un aumento de los TG.

Al comparar la función renal de los grupos de entrenamiento y validación, no se observaron diferencias significativas (Figura 21). Sin embargo, al comparar los dos grupos de entrenamiento, encontramos mayor concentración de creatinina sérica y peor función renal (fórmula MDRD) en el grupo con GSF ($p= 0,02$ y $0,045$, respectivamente). Únicamente se encontraron diferencias significativas en los niveles de proteinuria al comparar los dos grupos validación.

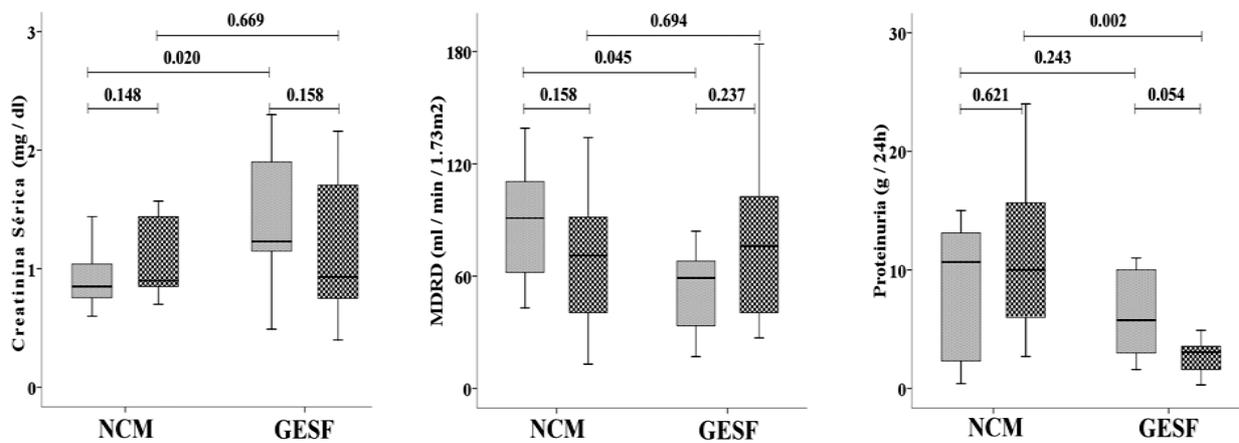


Fig. 21. Diagramas de cajas que comparan niveles de creatinina sérica, función MDRD y proteinuria. Las cajas indican la mediana y los percentiles 25 y 75. Los datos se compararon mediante la prueba U de *Mann-Whitney*. Una $p < 0,05$ fue considerada estadísticamente significativa.

Para el estudio del peptidoma utilizamos tecnología de esferas magnéticas, para el fraccionamiento de las muestras biológicas, combinada con un posterior análisis por MS. Esta metodología ha sido ampliamente utilizada durante la última década, demostrándose su utilidad en el estudio del peptidoma de diferentes fluidos biológicos [50,132,139]. La reproducibilidad de esta metodología ha sido evaluada en varios trabajos previos [50,140].

En esta tesis utilizamos un tipo de esferas magnéticas de cromatografía de fase reversa que capturan los péptidos y las pequeñas proteínas a través de fuertes interacciones entre los aminoácidos hidrofóbicos y la superficie de las esferas. Evaluamos la reproducibilidad de esta tecnología y obtuvimos como resultado un coeficiente medio de variación inferior al 11%, lo cual indica que los resultados obtenidos con esta metodología son altamente reproducibles (Tabla 4). Esta baja imprecisión se consiguió tras seguir estrictamente un protocolo estandarizado para la recogida de las muestras y para su procesamiento, incluyendo además el uso de una plataforma robótica en todo el proceso, desde la extracción del peptidoma hasta el punteado en la placa MALDI.

Para el análisis de las fracciones peptídicas obtenidas mediante el uso de estas esferas magnéticas, utilizamos MALDI-TOF MS, una de las técnicas de espectrometría de masas más utilizadas en proteómica clínica. Los espectros obtenidos se analizaron mediante programas informáticos con el fin de desarrollar un modelo de predicción de clase capaz de diferenciar entre NCM y GSF.

El modelo generado permitió diferenciar entre NCM y GSF con una capacidad de reconocimiento del 100% y una validación cruzada del 55%. Para validar este modelo, se utilizaron los datos de los perfiles peptídicos del grupo de validación. El modelo clasificó correctamente al 81,8% (9/11) de los pacientes con NCM del grupo de validación, y al 72,7% (8/11) de los pacientes con GSF (Tabla 5).

Resultados y Discusión

		<i>m/z</i>	1.798,56	1.913,60	2.392,54	2.408,26	2.642,26	2.939,95	3.004,65
Muestra #1	a	13,57	14,79	31,64	55,2	26,08	37,39	37,58	
	Área del pico (u.a.)	b	13,49	12,40	32,35	45,54	25,55	37,61	31,29
		c	12,09	11,79	26,90	41,87	26,80	43,06	38,00
		d	15,36	15,88	32,95	48,49	25,98	36,93	34,00
	CV (%)	9,82	14,12	8,91	11,81	1,99	7,46	9,01	
Muestra #2	a	21,07	294,10	20,88	24,04	14,01	19,71	46,64	
	Área del pico (u.a.)	b	26,71	235,66	22,32	26,24	12,68	20,46	49,63
		c	20,87	270,95	23,06	23,33	13,30	19,79	50,17
		d	27,25	368,98	24,53	26,52	12,91	17,49	46,88
	CV (%)	14,50	19,29	6,69	6,35	4,41	6,67	3,78	
Muestra #3	a	20,00	11,12	102,17	146,83	19,26	21,16	113,13	
	Área del pico (u.a.)	b	21,92	10,51	116,68	173,27	20,05	18,57	104,43
		c	18,05	10,79	108,95	147,57	22,97	19,74	108,97
		d	19,82	11,21	100,57	145,21	22,85	23,88	109,32
	CV (%)	7,95	2,94	6,86	8,75	8,96	10,97	3,27	
Muestra #4	a	13,29	126,69	20,90	49,75	17,56	17,26	101,82	
	Área del pico (u.a.)	b	12,17	131,38	21,87	50,44	17,10	15,02	113,95
		c	15,21	138,46	21,23	46,74	17,45	17,33	88,43
		d	14,16	149,39	25,55	64,31	17,22	17,15	106,11
	CV (%)	9,43	7,23	9,59	14,83	1,22	6,69	10,42	
Muestra #5	a	11,38	12,20	90,32	61,88	33,43	51,34	50,29	
	Área del pico (u.a.)	b	11,58	11,15	112,10	67,35	34,04	56,13	58,17
		c	11,59	12,91	114,72	71,03	37,43	57,25	48,92
		d	10,47	11,18	105,45	64,47	41,61	62,21	62,77
	CV (%)	4,74	7,21	10,35	5,94	10,26	7,86	11,94	
Media CV (%)		9,29	10,16	8,48	9,53	5,37	7,93	7,68	

Tabla 4. Evaluación de la reproducibilidad de la tecnología de esferas magnéticas. Se analizaron los espectros de 4 réplicas (a, b, c, d) obtenidos a partir de 5 muestras de orina aleatorias. Se seleccionaron al azar 7 señales para calcular el coeficiente de variación (CV) de su área del pico. Los valores de área del pico se muestran en unidades arbitrarias (u.a.).

	Grupos de validación	
	NCM (n = 11)	GSF (n = 11)
Clasificados como NCM (n)	9	3
Clasificados como GSF (n)	2	8
Clasificados correctamente (%)	81,8	72,7

Tabla 5. Evaluación del modelo de predicción de clase generado por el programa *ClinProTools* utilizando los datos espectrales de los grupos de validación.

Además del modelo de predicción, en este estudio analizamos el peptidoma urinario de todos los pacientes e individuos sanos en busca de péptidos diferenciales. De esta manera, se detectaron 24 péptidos que mostraban señal m/z en la orina de todos los individuos estudiados, tanto pacientes como individuos sanos. De estos 24 péptidos se llegó a la identificación de 4 (Tabla 6).

Al comparar sujetos sanos y pacientes con NCM se observaron diferencias significativas en el área del pico de 22 señales (Tabla 6): 7 señales (m/z 1.769,38, 1.898,37, 1.913,60, 2.713,96, 2.976,97, 3.004,65 y 3.389,12) mostraban mayor área del pico, y 15 señales (m/z 1.945,50, 1.961,71, 2.305,01, 2.378,07, 2.392,54, 2.408,26, 2.491,41, 2.505,64, 2.521,45, 2.543,26, 2.642,26, 2.939,95, 3.161,72, 3.226,48 y 4.013,38) mostraban menor área del pico en el grupo de sujetos sanos.

Al comparar sujetos sanos y pacientes con GSF, se observaron diferencias significativas en el área del pico de 20 señales: 6 señales (m/z 1.898,37, 1.913,60, 2.713,96, 2.976,97, 3.004,65 y 3.389,12) mostraban mayor área del pico, y 14 señales (m/z

1.831,61, 1.945,50, 1.961,71, 2.305,01, 2.378,07, 2.392,54, 2.408,26, 2.491,41, 2.505,64, 2.521,45, 2.543,26, 2.642,26, 2.678,13 y 3.226,48) mostraban menor área del pico en el grupo de sujetos sanos (Tabla 6).

Además, comparamos el peptidoma urinario de pacientes con NCM y pacientes con GSF con el fin de determinar la presencia de péptidos expresados diferencialmente entre ellos. La identificación de las proteínas a las que pertenecen estos péptidos podría aportar información sobre los mecanismos patológicos implicados en estas enfermedades. Se observaron diferencias en el área del pico de 5 péptidos (Tabla 6): uno de ellos, con m/z 1.913,60, mostraba mayor área del pico, y los 4 restantes, con m/z 2.392,54, 2.408,26, 2.976,97 y 3.161,72, mostraban menor área del pico en el grupo de pacientes con GSF.

Las señales m/z 1.898,37 y 1.913,60 fueron identificadas como fragmentos de uromodulina (UMOD; nº de acceso *Swiss-Prot*: P07911; *Homo sapiens*); las secuencias de aminoácidos coincidentes fueron 591–607 and 589–606, respectivamente. Estas señales mostraban un mayor área del pico en los sujetos sanos que en los pacientes, y entre estos, la señal con m/z 1.913,60 mostraba un mayor área en los que padecían GSF ($p= 0,039$) (Figura 22).

m/z	Sanos	NCM	Sanos vs. NCM		Sanos vs. GSF		Secuencia peptídica	Proteína	N° acceso Swiss-Prot
			P	Ratio ^a	P	Ratio ^b			
1.769,38	41,2 (27,6 - 81,0)	17,7 (9,0 - 41,2)	0,017	1,3	0,806	0,099			
1.831,61	9,2 (5,9 - 15,8)	12,4 (9,2 - 17,0)	0,071		0,030	0,512	LVRVTKKVPQVSTPTL	ALB	P02768
1.898,37	77,4 (59,8 - 139,6)	19,4 (12,0 - 29,6)	<0,001	4,1	<0,001	3,0	SVIDQSRVNLGPIIRK	UMOD	P07911
1.913,60	378,2 (346,1 - 644,6)	18,0 (10,1 - 45,8)	<0,001	15,4	<0,001	5,5	SGSVIDQSRVNLGPIIR	UMOD	P07911
1.945,50	7,9 (6,0 - 11,1)	56,6 (17,9 - 170,3)	<0,001	0,1	<0,001	0,1	EAIPIPSIPPEVKFNKPF	A1AT	P01009
1.961,71	11,0 (8,0 - 14,9)	21,1 (9,9 - 67,8)	0,021	0,2	0,037	0,4	EAIPI _g SIPPEVKFNKPF	A1AT	P01009
2.305,01	6,4 (5,3 - 8,7)	12,3 (8,7 - 20,3)	0,005	0,3	0,001	0,1			
2.378,07	16,8 (15,2 - 19,7)	39,5 (27,4 - 146,4)	<0,001	0,1	0,005	0,2			
2.392,54	13,4 (12,0 - 16,9)	217,4 (83,1 - 319 - 4)	<0,001	0,1	<0,001	0,1	MIEQNTKSPFLFMGKVVNPTQK	A1AT	P01009
2.408,26	12,5 (10,2 - 15,9)	58,1 (41,1 - 119,1)	<0,001	0,2	<0,001	0,3			1,8
2.491,41	12,4 (8,6 - 18,5)	53,8 (25,2 - 110,7)	<0,001	0,2	0,001	0,3			
2.505,64	5,6 (4,5 - 14,8)	99,3 (47,5 - 201,4)	<0,001	0,1	<0,001	0,1	LMIEQNTKSPFLFMGKVVNPTQK	A1AT	P01009
2.521,45	8,3 (6,7 - 10,5)	35,1 (16,9 - 62,8)	<0,001	0,2	<0,001	0,2	LMIEQNTKSPFLFM _g GKVVNPTQK	A1AT	P01009
2.543,26	8,9 (7,1 - 12,3)	20,8 (15,2 - 30,4)	0,000	0,5	<0,001	0,2			
2.642,26	5,8 (4,9 - 7,5)	16,3 (7,4 - 27,6)	0,001	0,3	<0,001	0,1			
2.678,13	12,6 (10,3 - 19,4)	22,0 (14,3 - 33,3)	0,076		0,037	0,4			
2.713,96	55,5 (38,9 - 77,5)	35,0 (23,8 - 53,1)	0,029	1,4	<0,001	2,0	LLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWS	B2M	P61769
2.939,95	16,9 (14,7 - 21,8)	23,2 (18,2 - 58,0)	0,007	0,2	0,232	0,593			
2.976,97	60,4 (44,1 - 70,5)	38,4 (15,7 - 55,0)	0,005	1,7	<0,001	3,4			2,0
3.004,65	118,8 (73,2 - 166,7)	49,6 (16,1 - 110,3)	0,011	1,7	0,001	2,4			2,8
3.161,72	19,9 (16,3 - 26,6)	52,9 (18,4 - 87,5)	0,009	0,3	0,806	0,011			
3.226,48	14,8 (11,0 - 17,3)	19,8 (16,1 - 28,2)	0,002	0,6	0,023	0,3			2,8
3.389,12	119,1 (93,2 - 165,0)	42,0 (17,7 - 58,0)	<0,001	2,0	<0,001	3,8			0,072
4.013,38	45,5 (30,8 - 54,3)	70,7 (48,1 - 130,3)	0,010	0,4	0,270	0,253			

Tabla 6. Área del pico de los péptidos urinarios de la población de estudio. Los datos se expresan en unidades arbitrarias como mediana (rangos intercuartiles). Para evaluar las diferencias se realizó la prueba no paramétrica *U de Mann Whitney*. ^aCoeficiente entre los valores de la mediana del área de pico de sujetos sanos y pacientes con NCM, ^bentre sujetos sanos y pacientes con GSF y entre ^cpacientes con NCM y pacientes con GSF. ALB: albúmina; UMOD: uromodulina; AAT: alfa-1-antitripsina; B2M: beta-2-microglobulina.

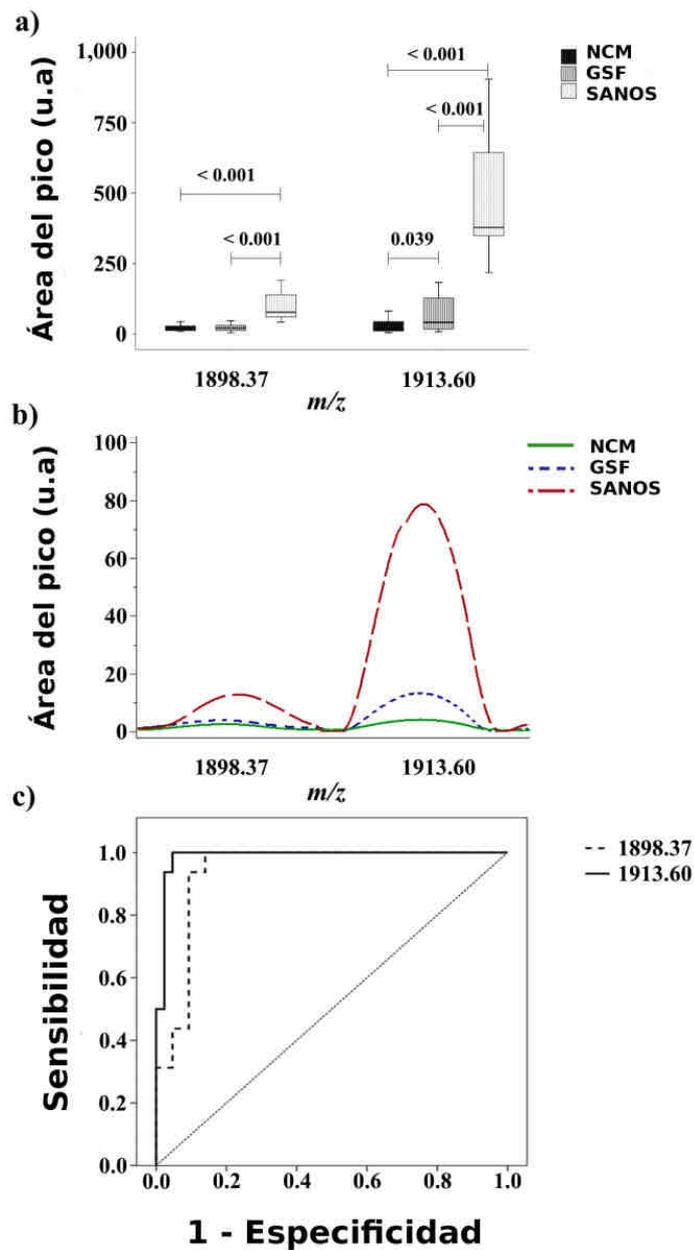


Fig. 22. Péptidos de UMOD (m/z 1.898,37 y 1.913,60) en orina de pacientes con NCM, GSF y sujetos sanos. a) Diagrama de cajas que muestra el área del pico de las señales. b) Imagen ofrecida por el programa *ClinProTools* que muestra el área del pico media, en unidades arbitrarias (u.a.), de los péptidos.

La UMOD, también conocida como proteína de Tamm-Horsfall, es la proteína más abundante de la vía urinaria de individuos sanos. En condiciones fisiológicas se excreta

en una proporción relativamente constante, de unos 50-150 mg/24h. Esta proteína es sintetizada exclusivamente en el riñón, concretamente en las células epiteliales de la rama ascendente del asa de Henle [141].

UMOD es una glicoproteína del tipo fosfatidilinositol, cuya estructura primaria es de 616 aminoácidos, su peso molecular es de unos 95 kDa y se encuentra altamente glicosilada, con un 30% de su masa formada por carbohidratos. Tiene 48 residuos de cisteína que le dan una conformación única y expone 8 sitios para glicosilación y enlace. Esta proteína está codificada por el gen UMOD, que se encuentra en el cromosoma 16p [142]. Dentro de sus funciones se han descrito: formar agregados linfocitarios e interferir con la función linfocitaria - puede modular la función de citoquinas a nivel tubular; proteger contra infecciones del tracto urinario - tiene capacidad inmunomoduladora y antimicrobiana, puede formar un moco fijador de bacterias como mecanismo antiinfeccioso, actuando como receptor soluble para fimbrias de *Escherichia coli* tipo I y ayudando a eliminar esta bacteria del tracto urinario mediante la formación de una pseudocápsula que la rodea; proteger contra la formación de cálculos - inhibe la agregación de cristales de oxalato de calcio en el lumen tubular [143]. Una baja excreción de UMOD se asocia a infecciones del tracto urinario, enfermedades cardiovasculares e insuficiencia renal.

Aunque esta proteína fue caracterizada ya en 1950, hasta día de hoy sus funciones no se conocen completamente. Existen evidencias de que los niveles de UMOD en orina podrían representar un biomarcador útil para el diagnóstico de enfermedades renales [137,144]. Nuestros resultados concuerdan con estas evidencias, en concreto,

observamos que los pacientes con glomerulonefritis tenían niveles más bajos de dos péptidos, correspondientes a fragmentos de UMOD, que los individuos sanos. Lo más interesante de este hallazgo es que uno de estos péptidos también nos permitía diferenciar entre NCM y GSF, con niveles más elevados en estos últimos.

Ya se había descrito una menor expresión de este mismo péptido de UMOD, de m/z 1.913, en pacientes con enfermedad renal avanzada y en pacientes diabéticos, lo que puede ser debido a una alteración de la membrana apical de las células de la rama ascendente del asa de Henle [145,146].

Las señales con m/z 1.945,50, 1.961,71, 2.392,54, 2.505,64 y 2.521,45 se identificaron como alfa-1-antitripsina (AAT; nº de acceso *Swiss-Prot*: P01009; *Homo sapiens*); las secuencias de aminoácidos coincidentes fueron 378-394, 378-394, 398-418, 397-418, y 397-418, respectivamente. Todas estas señales mostraban menor área del pico en los sujetos sanos en comparación con los pacientes glomerulares. Una de las señales, la de m/z 2.392,54, también permitía diferenciar entre NCM y GSF, con menor área en la GSF (Figura 23).

AAT es una glicoproteína de 52 kDa, formada por una cadena de 394 aminoácidos y 3 cadenas laterales de carbohidratos. La AAT está codificada por el gen SERPINA1, localizado en el extremo distal del brazo largo del cromosoma 14 y se expresa fundamentalmente en hepatocitos. Esta proteína es el inhibidor de proteasas más abundante en el suero humano, donde se encuentra a concentraciones de 120-220 mg/dl [147]. En condiciones fisiológicas, la secreción hepática es de unos 34 mg/kg/24h, pero esta cantidad puede incrementar hasta 5 veces en respuesta a

procesos inflamatorios, tumorales o infecciosos. La AAT existente en el suero representa únicamente el 40% del total de la proteína y el 60% restante se encuentra en el espacio extravascular, impregnando diferentes tejidos corporales [147].

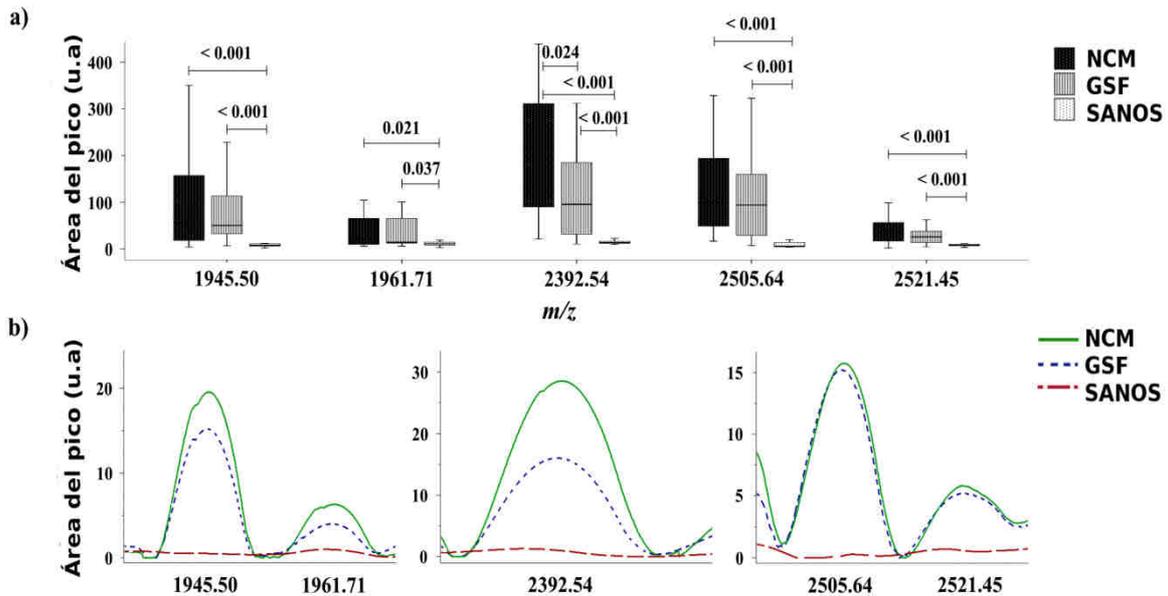


Fig. 23. Péptidos de AAT en orina de pacientes con NCM, GSF y sujetos sanos. a) Diagrama de cajas que muestra el área del pico de las señales. **b)** Imagen ofrecida por el programa *ClinProTools* que muestra el área del pico media, en unidades arbitrarias, de los péptidos.

La principal diana de la AAT es la elastasa de neutrófilos. Durante las infecciones respiratorias, los neutrófilos se dirigen a los alvéolos pulmonares y liberan la elastasa de neutrófilos que, al digerir la elastina, destruye la estructura elástica pulmonar y provoca la aparición de enfisema. La AAT se une a la elastasa de neutrófilos, protegiendo así el tejido conectivo pulmonar. La unión inactiva al enzima, por lo que se evitan sus efectos destructivos [148].

Aparte de su capacidad antiproteasa, la AAT neutraliza también las defensinas alfa del neutrófilo, el leucotrieno B4 y la interleucina-8, que son potentes quimioatrayentes de neutrófilos al foco inflamatorio [149]. En conjunto, todos estos datos indican que la AAT es una molécula antiinflamatoria natural de amplio espectro, cuya función es modular las reacciones inflamatorias que se producen continuamente en el organismo [148].

La deficiencia de AAT es una enfermedad congénita de herencia autosómica codominante no ligada al sexo, en la cual se produce degradación tisular durante la inflamación, que aumenta la predisposición a desarrollar enfermedades del pulmón, del hígado y de la piel [150,151]. La AAT se ha asociado también a enfermedad vascular, enfermedad intestinal inflamatoria, vasculitis y glomerulonefritis, aunque no se han establecido definitivamente estas relaciones. En un estudio previo, Candiano *et al.*, analizando el proteoma urinario de pacientes con síndrome nefrótico primario mediante electroforesis bidimensional combinada con MS, hallaron fragmentos de albúmina y AAT como las proteínas más abundantes. Aunque la mayoría de estos fragmentos se forman en el plasma, algunos de ellos fueron producidos en la orina, lo que sugiere la presencia en la orina de proteasas específicas [121]. En concordancia con estos datos, en el presente trabajo se encontraron 5 péptidos correspondientes a AAT con señales más intensas en los pacientes glomerulares; lo que es más interesante es que uno de estos péptidos nos permitió la diferenciación entre pacientes con NCM y pacientes con GSF.

Otra identificación fue la de la señal con m/z 2.713,96, que correspondía a un fragmento de la proteína beta-2-microglobulina (B2M; nº de acceso Swiss-Prot: P61769; *Homo sapiens*). Dentro de la proteína, la secuencia de aminoácidos hallada fue 59–81. Esta señal mostraba mayor área del pico en los sujetos sanos en comparación con el grupo de pacientes. Se trata de una proteína de bajo peso molecular, sintetizada por todas las células, principalmente linfocitos T citotóxicos. Su presencia en la superficie celular está relacionada con el sistema mayor de histocompatibilidad. En condiciones normales, menos del 0,1% de la B2M filtrada en los glomérulos pasa a la orina [152]. Su elevación en plasma se debe a cualquier condición que disminuya la tasa de filtración glomerular así como en casos de inflamación crónica, enfermedad hepática y algunas infecciones virales [152]. En personas con signos de daño renal, concentraciones de B2M elevadas en plasma y bajas en orina indican que el daño es de tipo glomerular. Por el contrario, si las concentraciones de B2M son bajas en plasma y elevadas en orina, es más probable que el daño sea de tipo tubular. De los individuos incluidos en nuestro estudio no disponemos de la concentración de B2M en plasma, pero observamos una menor señal en la orina de los pacientes glomerulares. Esta proteína, sin embargo, no permitió diferenciar entre NCM y GSF.

Por último, la señal con m/z 1.831,61, fue identificada como un fragmento de albúmina sérica (ALB; nº de acceso Swiss-Prot: P02768; *Homo sapiens*); dentro de esta proteína, la secuencia de aminoácidos coincidente fue 432–447. Este péptido estaba disminuido en los sujetos sanos al comparar con los pacientes con GSF, pero no se

encontraron diferencias al comparar con los pacientes con NCM. El péptido identificado como ALB no mostraba diferencias entre NCM y GSF

Mediante el coeficiente de correlación de *Spearman* se analizaron las asociaciones entre el área del pico de estas señales y las variables demográficas y bioquímicas de la población de estudio, sin hallarse ninguna asociación.

En resumen, del análisis comparativo del peptidoma urinario se observaron diferencias significativas en 5 péptidos al comparar pacientes con GSF y pacientes con NCM; los pacientes con GSF mostraron un área del pico mayor en una señal (m/z 1.913,60) correspondiente a un fragmento de UMOD y un área del pico menor en una señal (m/z 2.392,54) correspondiente a un fragmento de AAT. Estas dos señales mostraban diferencias también al comparar con los sujetos sanos; en el grupo de sujetos sanos los fragmentos de UMOD y AAT mostraban mayor y menor señal, respectivamente, en comparación con los pacientes con enfermedad glomerular. Observamos que el área del pico de estas dos señales no dependía del grado de proteinuria de los pacientes, por lo que ofrecían una información adicional en el diagnóstico de estas enfermedades, ya que la proteinuria por sí sola no es suficiente para diferenciar entre estas dos glomerulonefritis.

El patrón de fragmentación de las proteínas descritas anteriormente podría ser un reflejo de la actividad proteolítica que tiene lugar durante la enfermedad renal. En consecuencia, la aparición de algunos péptidos específicos en la orina podrían servir como marcadores biológicos de las enfermedades aquí tratadas, NCM y GSF.

En relación a las proteínas UMOD y AAT, nuestro grupo, en un estudio previo, también mediante el análisis del peptidoma urinario, consiguió identificar varios péptidos de estas proteínas que permitían diferenciar a los pacientes con glomerulonefritis de los sujetos sanos [153]. Al igual que en el presente trabajo, los péptidos de UMOD se encontraban disminuidos en los pacientes con glomerulonefritis en comparación con los sujetos sanos, mientras que los péptidos de AAT se encontraban aumentados. Sin embargo, ninguno de ellos permitió diferenciar entre NCM y GSF. Cabe decir, que el número de pacientes de este estudio previo era inferior al del estudio actual (23 pacientes frente a 44).

Los resultados de este estudio sugieren que el análisis de unos péptidos determinados de UMOD y AAT en orina podría ser un método sencillo y no invasivo para distinguir entre NCM y GSF primaria en aquellos casos en los que el resultado del estudio histológico de la biopsia fuera confuso y no del todo concluyente. Sin embargo, se trata todavía de posibles candidatos que deberían ser analizados en estudios con un mayor número de pacientes para determinar su utilidad en la práctica clínica. Además, encontramos otros péptidos en este estudio que también eran diferenciales entre NCM y GSF y que sería interesante llegar a identificar, ya que esto podría arrojar luz sobre los procesos patológicos que se producen en estas dos enfermedades.

ESTUDIO 2

**Análisis del proteoma urinario de pacientes
diagnosticados mediante biopsia renal de NCM y GSF
primaria**

En este estudio analizamos el proteoma urinario de pacientes glomerulares mediante electroforesis bidimensional DIGE.

En cuanto a la población de estudio, se incluyeron los mismos pacientes del estudio anterior, y se incluyeron 5 pacientes más.

En la Tabla 7 se muestran los datos demográficos y clínicos de los pacientes según fueron divididos aleatoriamente en un grupo de entrenamiento o de validación.

	Entrenamiento			Validación			P_{E-V}	
	NCM	GSF	P_{E-E}	NCM	GSF	P_{V-V}	MCD	GSF
N	10	11		14	14			
Edad	39,5 (28-68)	57 (31-71)	0,57	55,5 (30-72)	54,5 (36-59)	0,45	0,32	0,85
♀ / ♂	3/7	5/6	0,47	6/8	2/12	0,09	0,52	0,08
IMC (kg/m²)	27,3 (21,9-33,8)	25,5 (24-26,6)	0,68	29,4 (24,2-30,6)	26,3 (25,1-28,4)	0,63	0,76	0,41
ASC	1,7 (1,7-1,9)	1,8 (1,6-1,8)	0,83	1,8 (1,6-1,9)	1,9 (1,8-2)	0,35	0,52	0,11
Glucosa suero (mg/dl)	91 (81-101)	88 (83-97)	0,89	84 (81-94)	94 (87-97)	0,19	0,44	0,67
Creatinina suero (mg/dl)	0,9 (0,8-1)	1,2 (0,9-1,2)	0,12	0,9 (0,8-1,3)	1,3 (0,9-1,8)	0,24	0,64	0,62
Proteinuria (g/24h)	10,6 (2,3-12,2)	3,5 (2,5-7,4)	0,29	9,7 (5,9 - 15,0)	3,4 (1,7 - 4,5)	0,004	0,52	0,64

Tabla 7. Características demográficas y clínicas de la población de estudio. Los datos se muestran como mediana (rango intercuartil). Las diferencias entre los grupos fueron evaluadas mediante el test no paramétrico de *Mann-Whitney*. P_{E-V} compara los grupos de entrenamiento y validación, P_{E-E} los grupos de entrenamiento, y P_{V-V} los grupos de validación. Una $p < 0,05$ fue considerada estadísticamente significativa; N significa número de pacientes; IMC, índice de masa corporal y ASC, área de superficie corporal.

Los grupos de entrenamiento, que son los que se compararon mediante DIGE, no mostraban diferencias en edad ni en sexo, y además tenían niveles similares de proteinuria. Estos los grupos de validación existían diferencias en los niveles de proteinuria, con niveles mayores en el grupo de NCM.

Una vez escaneados los geles bidimensionales se contabilizaron un total de 392 *spots* (Figuras 24 y 25), de los cuales 242 mostraban diferencias significativas al comparar NCM y GSF (ANOVA, $p < 0,05$); el 57,4% de ellos mostraba mayor abundancia en los pacientes con NCM y el 42,6% en los pacientes con GSF (Tabla 8).

Dada la elevada cantidad de *spots* de interés, se comenzaron a identificar aquellos que mostraban un ratio superior a 2 al comparar los dos grupos de pacientes, con una $p < 0,01$. Se consiguieron identificar 25 *spots*, que resultaron en 16 proteínas diferentes. Once de estas proteínas estaban aumentadas en los pacientes con NCM y 5 lo estaban en los pacientes con GSF. En la Tabla 9 se muestra la lista de proteínas identificadas; se puede observar cómo en algunos casos, un mismo *spot* dio como resultado varias proteínas.

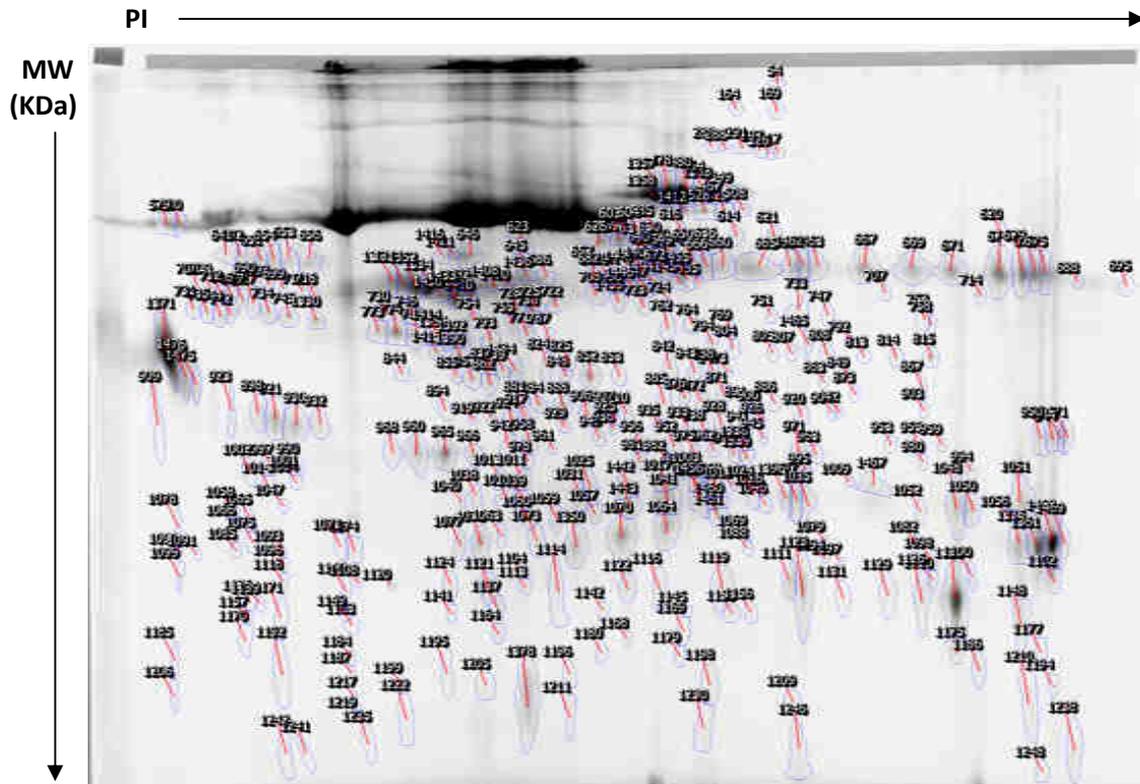


Fig. 24. Análisis diferencial (DIGE). Tinción Coomassie coloidal. Numeración de los spots ofrecida por el programa SameSpot (TotalLab).

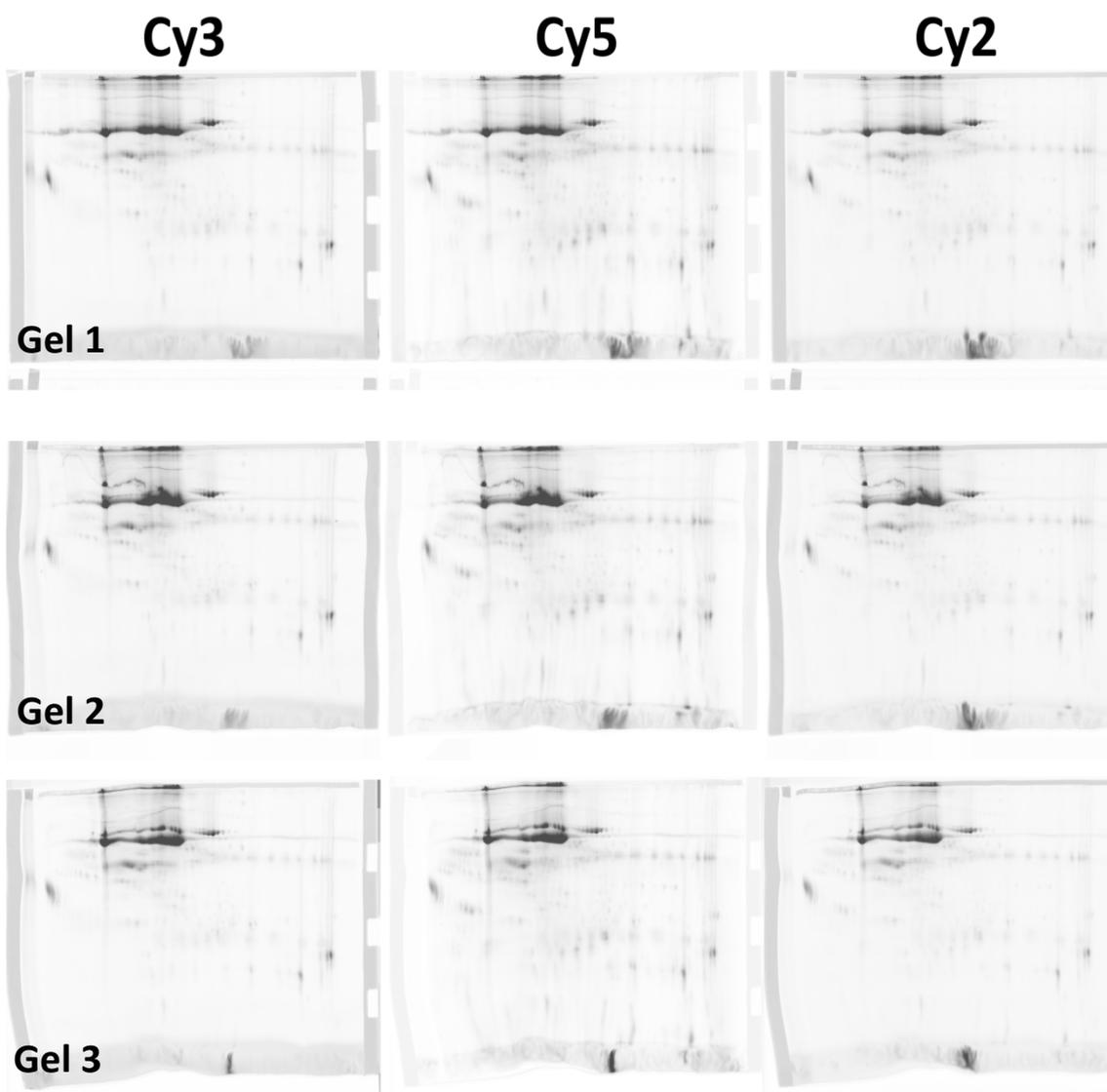


Fig. 25. Análisis diferencial (DIGE). Tinción Coomassie coloidal. Se muestran las imágenes marcadas con los fluorocromos Cy3 (NCM), Cy5 (GSF) y Cy2 (estándar interno) de las tres réplicas de los geles analíticos realizadas.

Resultados y Discusión

# spot	p (Anova)	Ratio	Media normalizada ^a		# spot	p (Anova)	Ratio	Media normalizada ^a	
			NCM	GSF				NCM	GSF
1.350	1,64E-02	17,4	0,122	2,128	1.340	0,002	2,0	1,407	0,717
169	3,33E-02	5,3	2,726	0,515	1.439	0,002	1,4	0,900	1,242
963	4,99E-02	2,6	1,771	0,683	1.451	0,002	1,5	1,220	0,828
745	6,39E-02	3,1	1,840	0,588	1.371	0,002	2,7	1,224	0,454
580	8,18E-02	2,3	1,723	0,760	960	0,002	2,0	1,182	0,599
1.468	8,34E-02	3,1	2,218	0,706	480	0,002	2,2	1,367	0,608
781	9,27E-02	2,6	1,271	0,490	734	0,002	2,7	1,704	0,629
930	1,03E-01	11,0	0,168	1,842	1.076	0,002	1,2	0,829	1,008
814	1,17E-01	9,9	0,184	1,819	1.382	0,002	2,6	1,368	0,533
621	1,31E-01	5,4	2,215	0,409	1.398	0,002	2,3	1,629	0,724
921	1,44E-01	11,8	0,155	1,822	1.473	0,002	3,4	1,473	0,430
638	1,48E-01	2,2	1,420	0,657	1.404	0,002	2,0	0,666	1,319
1.356	1,78E-01	4,8	1,847	0,382	1.458	0,002	6,1	0,279	1,689
1.164	2,14E-01	1,6	1,166	0,709	1.065	0,002	9,0	0,185	1,668
1.358	2,22E-01	2,2	1,362	0,628	1.012	0,002	2,2	1,383	0,623
1.412	2,25E-01	2,2	1,555	0,697	508	0,003	2,4	1,674	0,703
1.334	2,75E-01	4,1	1,792	0,437	528	0,003	2,3	1,556	0,679
774	3,55E-01	2,6	1,268	0,490	1.475	0,003	2,3	1,210	0,519
928	3,63E-01	3,3	0,403	1,323	631	0,003	1,9	1,500	0,777
1.469	3,80E-01	4,4	2,980	0,682	630	0,003	2,3	1,543	0,682
529	3,82E-01	2,2	1,551	0,697	478	0,003	2,2	1,371	0,632
1.470	4,18E-01	3,8	0,434	1,647	958	0,003	2,3	1,940	0,855
728	4,34E-01	3,0	1,863	0,626	283	0,003	1,4	1,051	0,755
1.330	4,42E-01	2,5	1,692	0,688	1.064	0,004	4,3	0,392	1,668
1.336	5,04E-01	1,6	1,614	1,001	891	0,004	4,8	2,369	0,498
1.349	5,43E-01	2,3	1,531	0,653	1.003	0,004	3,4	1,703	0,495
614	5,62E-01	2,4	1,738	0,733	1.434	0,004	7,9	2,183	0,277
1.354	5,81E-01	4,5	1,770	0,395	771	0,004	1,9	1,375	0,741
999	6,49E-01	2,2	1,476	0,680	746	0,004	2,9	0,571	1,680
1.148	6,69E-01	1,7	1,773	1,040	1.070	0,004	11,5	0,177	2,037
1.361	6,72E-01	2,2	1,917	0,877	1.111	0,004	4,8	0,344	1,648
815	7,19E-01	18,6	0,087	1,613	929	0,004	2,1	1,515	0,705
965	7,26E-01	2,0	1,156	0,574	955	0,004	2,1	1,760	0,843
1.352	7,28E-01	4,2	1,789	0,430	932	0,004	3,7	0,415	1,529
1.460	7,39E-01	7,0	0,245	1,721	962	0,004	1,8	1,568	0,885
971	7,53E-01	2,0	1,645	0,828	902	0,004	6,8	0,221	1,509
808	7,64E-01	10,1	0,166	1,673	838	0,005	5,0	0,330	1,641
981	7,72E-01	1,8	1,437	0,820	1.400	0,005	5,7	2,176	0,383
1.363	7,87E-01	2,6	1,514	0,586	888	0,005	2,0	1,358	0,665
1.129	8,52E-01	1,6	1,578	0,976	904	0,005	7,8	0,202	1,564
54	8,90E-01	4,2	2,395	0,570	943	0,005	3,3	2,132	0,646
970	8,96E-01	2,4	1,920	0,815	648	0,005	2,3	1,614	0,709
898	0,001	5,2	0,327	1,685	1.410	0,005	1,8	1,361	0,748
464	0,001	2,6	1,556	0,606	1.110	0,005	3,9	0,437	1,686
651	0,001	1,7	0,729	1,267	824	0,005	1,9	1,389	0,740

Resultados y Discusión

# spot	p (Anova)	Ratio	Media normalizada ^a		# spot	p (Anova)	Ratio	Media normalizada ^a	
			NCM	GSF				NCM	GSF
609	0,006	2,2	0,624	1,371	1.046	0,012	2,5	0,567	1,432
1.408	0,006	4,4	2,166	0,490	742	0,012	2,0	0,660	1,297
773	0,006	2,1	1,186	0,561	1.390	0,013	1,4	0,998	1,352
805	0,006	3,8	0,404	1,534	650	0,013	1,8	1,423	0,785
975	0,006	1,7	1,531	0,876	695	0,013	4,4	1,725	0,388
1.058	0,006	5,5	0,288	1,573	657	0,013	1,9	1,480	0,765
807	0,006	4,4	0,381	1,678	738	0,013	1,9	1,539	0,801
990	0,006	1,9	1,642	0,858	857	0,013	1,9	0,739	1,376
1.102	0,007	3,0	1,950	0,645	1.414	0,013	1,4	1,125	0,791
585	0,007	1,4	0,765	1,070	844	0,014	2,9	1,527	0,520
959	0,007	2,7	1,508	0,552	966	0,014	1,8	1,128	0,636
1.048	0,007	1,3	1,259	1,006	794	0,014	1,3	1,162	0,925
1.472	0,007	2,5	1,693	0,679	727	0,014	1,3	1,215	0,939
994	0,007	2,3	0,577	1,306	705	0,014	2,4	0,499	1,208
753	0,007	2,2	0,677	1,479	1.471	0,014	2,0	0,761	1,544
852	0,008	1,9	1,461	0,754	1.421	0,014	1,4	0,798	1,138
688	0,008	5,4	1,697	0,315	686	0,015	1,5	1,563	1,023
1.467	0,008	1,5	1,202	0,794	764	0,015	1,9	0,685	1,314
1.438	0,008	1,3	1,246	0,962	744	0,015	2,3	0,585	1,337
1.135	0,008	1,4	1,541	1,083	711	0,015	3,2	1,944	0,605
1.079	0,008	4,4	0,340	1,499	995	0,015	1,7	1,471	0,876
1.476	0,008	2,4	1,281	0,525	640	0,016	1,5	1,308	0,850
1.463	0,008	1,2	0,835	1,001	1.017	0,016	1,4	1,267	0,884
714	0,008	1,9	0,635	1,221	1.098	0,016	5,7	0,311	1,774
723	0,009	1,6	0,811	1,270	662	0,016	1,6	1,441	0,890
1.066	0,009	6,0	0,272	1,631	1.014	0,017	1,6	0,827	1,319
1.384	0,009	2,3	0,583	1,361	884	0,017	1,9	1,452	0,784
848	0,009	1,8	1,420	0,810	968	0,017	2,3	1,229	0,528
467	0,009	1,9	1,409	0,743	839	0,018	5,5	2,054	0,376
288	0,009	1,4	1,031	0,741	623	0,018	2,4	1,678	0,708
626	0,009	2,1	1,550	0,729	1.210	0,018	2,7	0,526	1,408
900	0,009	1,6	0,760	1,218	1.461	0,019	4,3	0,418	1,781
1.339	0,01	2,1	1,702	0,827	941	0,019	2,6	1,720	0,654
1.392	0,01	5,1	0,307	1,571	1.015	0,019	1,3	1,217	0,968
1.073	0,01	4,2	0,458	1,913	953	0,019	1,9	1,581	0,846
1.131	0,01	3,0	0,501	1,503	842	0,02	2,0	0,672	1,337
1.175	0,01	1,4	1,458	1,011	1.082	0,02	1,7	1,378	0,820
1.126	0,01	1,9	0,877	1,653	718	0,02	3,2	2,696	0,841
1.443	0,011	1,4	0,878	1,206	1.357	0,02	2,1	1,366	0,662
1.415	0,011	2,1	1,392	0,678	1.441	0,02	1,6	1,393	0,856
885	0,011	1,4	1,409	1,035	956	0,02	1,6	0,771	1,272
1.397	0,011	1,1	0,918	1,017	1.075	0,021	8,4	0,180	1,514
1.074	0,011	3,6	0,567	2,019	1.025	0,021	1,6	1,150	0,723
674	0,012	1,3	0,809	1,059	1.436	0,021	1,8	1,569	0,876
649	0,012	1,6	1,280	0,784	936	0,021	2,1	1,749	0,841

# spot	p (Anova)	Ratio	Media normalizada ^a		# spot	p (Anova)	Ratio	Media normalizada ^a	
			NCM	GSF				NCM	GSF
1.238	0,021	1,2	1,029	1,226	1.013	0,038	1,3	1,058	0,799
924	0,022	5,5	0,317	1,732	907	0,038	1,3	1,347	1,002
678	0,022	1,5	0,766	1,125	1.378	0,039	1,3	0,850	1,104
1.447	0,023	1,3	0,954	1,244	679	0,041	1,4	0,800	1,090
1.097	0,023	3,7	0,406	1,509	1.026	0,041	3,7	0,497	1,815
724	0,023	2,6	0,559	1,443	876	0,042	1,6	0,729	1,163
1.009	0,024	1,5	1,249	0,858	693	0,042	2,6	0,556	1,438
1.137	0,024	1,7	1,269	0,738	620	0,045	1,3	0,867	1,120
669	0,024	1,2	0,814	0,995	758	0,045	1,9	0,705	1,310
1.440	0,024	1,5	1,305	0,893	813	0,045	2,1	0,657	1,347
793	0,025	1,4	0,840	1,211	961	0,046	1,3	0,950	1,251
616	0,025	1,6	1,258	0,771	663	0,046	1,1	0,850	0,921
1.119	0,026	1,5	0,921	1,362	938	0,047	1,4	1,348	0,946
843	0,026	2,3	0,612	1,398	642	0,047	1,1	0,910	1,009
978	0,026	1,3	1,345	1,065	730	0,047	1,7	1,889	1,137
1.060	0,027	1,7	1,469	0,887	1.004	0,049	1,1	1,172	1,036
1.448	0,027	1,4	1,309	0,917	1.136	0,049	2,5	0,445	1,133
855	0,027	1,2	1,070	1,281					
769	0,028	2,9	0,441	1,262					
906	0,028	2,1	1,514	0,729					
1.153	0,028	2,8	0,563	1,550					
1.071	0,029	5,2	0,414	2,137					
579	0,029	1,9	1,501	0,778					
1.116	0,03	1,6	0,810	1,297					
755	0,03	1,8	1,552	0,863					
881	0,03	1,7	1,543	0,930					
1.094	0,03	4,5	0,346	1,571					
1.085	0,03	4,1	0,381	1,565					
871	0,03	1,4	0,910	1,261					
862	0,031	1,6	0,798	1,237					
853	0,031	1,9	1,943	1,018					
1.100	0,032	9	0,190	1,708					
917	0,033	2,2	0,867	1,938					
922	0,033	2,3	0,630	1,449					
825	0,033	1,7	1,502	0,880					
762	0,034	1,7	0,710	1,184					
1.124	0,034	1,5	0,699	1,082					
685	0,035	1,4	1,161	0,855					
754	0,035	3,2	0,456	1,439					
1.222	0,035	2,6	0,635	1,622					
603	0,037	1,3	0,928	1,191					
910	0,037	1,6	1,443	0,885					
317	0,038	1,1	0,941	0,823					
604	0,038	2	0,654	1,320					
997	0,038	1,3	1,524	1,164					

Tabla 8. Listado de los spots resultantes del análisis diferencial DIGE que muestran diferencias significativas al comparar la abundancia en NCM y GSF ($p < 0,05$).

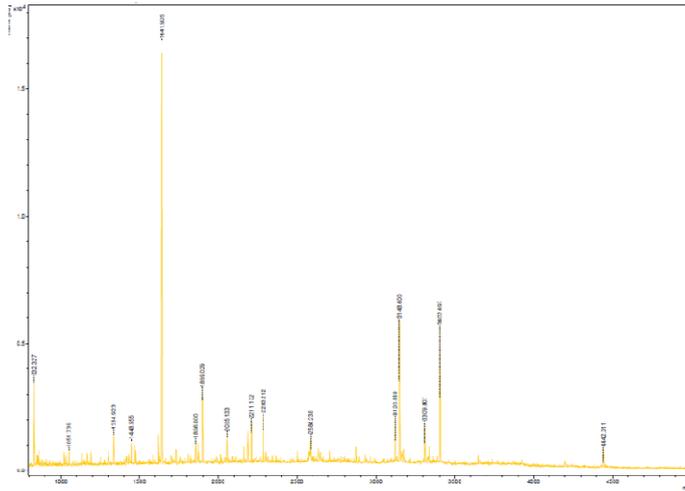
^aMedia normalizada del volumen de los spots de las 3 réplicas DIGE realizadas.

Resultados y Discusión

#Spot ^a	Proteína	Gen	Nº acceso UniProt ^b	Secuencia (%)	Péptidos coincidentes	Puntuación MASCOT
774	Zinc-alfa-2-glicoproteína	AZGP1	P25311			155
781	Zinc-alfa-2-glicoproteína	AZGP1	P25311	28,9	10	61,9
1.064	Aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa, mitocondrial	BCAT2	O15382	19,9	5	42,4
1.070	Inhibidor nuclear de la fosfatasa 1	PPP1R8	Q12972	28,2	7	48,4
1.334	Alfa-1-antitripsina	SERPINA1	P01009	21,3	6	44,6
	Receptor del factor activador de plaquetas	PTAFR	P25105	17,3	5	46,5
	Ciclina-Y	CCNY	Q8ND76	32,6	7	49,8
1.352	Alfa-1-antitripsina	SERPINA1	P01009	49,3	13	51,7
1.354	Alfa-1-antitripsina	SERPINA1	P01009	49,3	18	86,3
	Proteína canal transmembrana-like 1	TMC1	Q8TDI8	23,9	15	33,4
1.356	Homólogo del factor de transcripción elongación 1	ELOF1	P60002	51,8	7	36,2
1.363	Transferrina	TF	P02787	24,5	12	64,9
1.392	Albúmina sérica	ALB	P02768	28,1	16	58,6
	Leucine-rich repeat-containing protein C10orf11	c10orf11	Q9H2I8	36,9	6	41,6
1.400	Albúmina sérica	ALB	P02768	39,4	21	85,1
1.408	Albúmina sérica	ALB	P02768	53,2	31	92,1
1.458	Proteína nuclear contenedora de señal proteolítica PEST	PCNP	Q8WW12	51,7	5	38,6
	Aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa, mitocondrial	BCAT2	O15382	19,9	5	42,4
1.460	Leucine-rich repeat-containing protein C10orf11	c10orf11	Q9H2I8	36	9	32,7
	Calretinina	CALB2	P22676	32,1	7	27,9
1.468	Albúmina sérica	ALB	P02768	24,8	21	80,2
	Proteína ribosomal 39s L17, mitocondrial	MRPL17	Q9NRX2	62,9	9	40
	Proteína humanina-like 6	HN6	POCJ73	100	7	64,1
1.469	Albúmina sérica	ALB	P02768	28,2	25	56,6
	Histatina-3	HTN3	P15516	68,6	4	36,7

Tabla 9. Listado de proteínas identificadas en la orina del grupo de entrenamiento mediante huella peptídica. ^a Número de *spot* generado por el programa de análisis de imágenes SameSpots (TotalLab), haciendo referencia a las manchas que se muestran en la Figura 23. ^b Número de acceso a la base de datos NCBI nr.

Tres *spots* del DIGE (#1.334, #1.352 y #1.354) fueron identificados como AAT (nº de acceso *Swiss-Prot*: P01009; *Homo sapiens*) (Figuras 26, 27 y 28).



CCNY Base de datos: SwissProt Score= 49.8 Nº péptidos= 7 %Secuencia= 32.6

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
MCNTYSCCVS	SSPKLRNAH	SRLESYREDT	DLSREDTONC	LQHSIDFENI	DDLMMFPNES	DHPRASTIFL	SKSQDVRREK	RKSLFINHHP	POQIARYYS	CSTIFLDDET	VSQENLKYTI
130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
KCVALAIYVH	IKNEDFDGRM	LLDIFDENLH	PLSKSEVPPD	YDKINEEQKQ	IYRFVPTLES	AAQLTAECAL	VTLVYLERLL	TYAEIDICPA	NWKRIVLGAI	LLASKVDDQ	AVWNVDYCQI
250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	
LKIDITVEDMN	ELERQFLELL	QFMIVPESSV	YAKYFDLRS	LAENNLFFP	LEPLSRERAH	KLEAISRLCE	DKYKLRSSA	RKRSASADNS	ELPRNSEATI	S	

m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	P	Range	Sequence	Modification
442.3107	1.571	1	5	79-117	EKRKSLFINHHPPGQIARKYSSCSTIFLDDSTVSSQ-NLK	
1055.9990	-7.571	1	1	110-132	YTIKCVALAIYIHK	Carbamidomethyl: 5
3148.6005	-77.22	1	3	280-307	SLAEANNI.SPPL.EPLSRERAHKLEFAISR	
1448.9554	68.84	1	5	313-323	YKDLRFSARKR	
2293.2119	-27.73	1	5	315-334	DLRFSARKRSASADNLTLP	
2055.1328	-16.87	1	2	323-341	RSASADNI.TI.FRWISPAIS	
1899.0291	16.89	1	1	324-341	SASADNLTLP.RWISPAIS	

PTAFR Base de datos: SwissProt Score= 46,5 Nº péptidos= 5 %Secuencia= 17,3

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
MEFHDSSHM	SEFRITLFFPI	VYSIIFVGV	IANGYVLWVF	ARLYPCRKFN	EIRIFWVHT	NADMLFLITL	PLWIVTYUNO	GNWILFRFLC	NVAGCLFFIN	TYCSVAFVGV	IITYNRFQAVT
130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
RPKTAOANT	RKRGISLSLV	IWVALVGAAS	YFLILDSTWT	VPDFSAGSNV	TRCFEHYEKG	SVPVLIITIF	IVFSFFLVFL	IILSCNLVII	RILLMOPVQO	ORNAEVEKRA	IRMVCTVLAV
250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	
EIICFVPHV	VQLFWLAEEL	GFQDSKFBQA	INDABOVTLG	LLSTNCVLDP	VIYCLTKKF	RKHLTEKEYS	MRSSEKCSRA	TTDTVIEVVV	PFNQIPGNLS	KN	

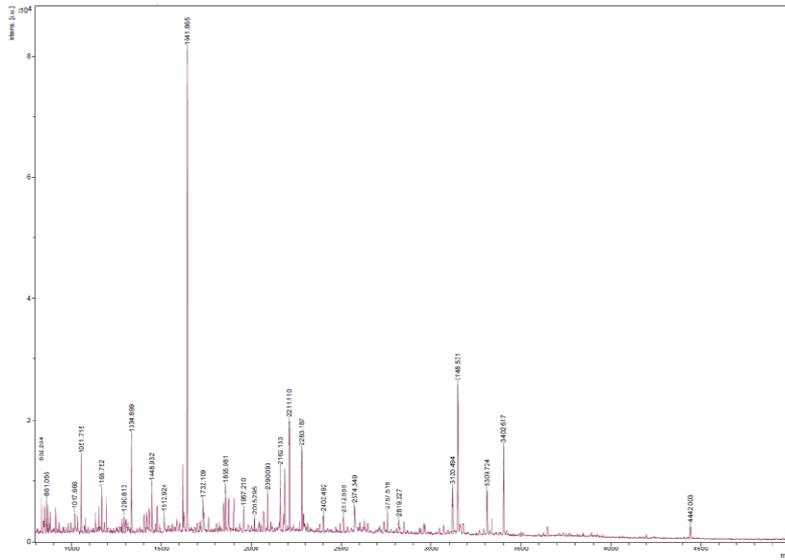
m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	P	Range	Sequence	Modification
3148.6005	17.39	1	0	88-115	FLONVAGCLFFINTYCSVAFVGVITYNR	
1899.0291	9.195	1	1	212-227	TLLMQPVQQQRNAEVK	Oxidation: 4
2055.1328	9.758	1	2	212-228	TLLMQPVQQQRNAEVKRR	Oxidation: 4
2211.1317	-37.18	1	3	212-229	TLLMQPVQQQRNAEVKRR	Oxidation: 4
1641.9052	53.95	1	2	303-315	HLTEKFYSMRSSR	

AAT Base de datos: SwissProt Score= 364.47 Nº péptidos= 9 %Secuencia= 15.8

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
MESSVSWGLL	LLAGLCCLVE	VSLAEDPQGD	NRKDTSSH	DQDHTFNKI	TENLAEPFAS	LYRQLARQSN	STNIFFSPVS	IATAFAMLSL	GTHADTHDEI	LEGLNFKLFE	IPEAQCHEGF
130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
QRILRTIQP	DSQLQITFN	GLFLSEGLKL	VDFKLDVKK	LYSRKAPFVN	EGDTERAKG	TNDYURKQKQ	GRIVDLVKRL	DRDVFALVN	YIFFKQKWR	PFEVKDTRKE	DFRVDQVTV
250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
KVPMRQLGM	ENIQHCKELS	SWVLLMEYLG	NATAPPLED	ESGLQHELE	LTHDITKREL	ENEDRRSASL	HLKELSTPT	YDLKSLVQLL	GITEKVFNSGA	DLSSVTEEAP	LKLSKAVHKA
370	380	390	400	410	420						
VLTDEIGGTE	ARGAMPLEAI	PMSIEEVKPF	NEDPVFLMIE	QNTKSELFMG	KVVNPTQK						

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
23	1	504.7730	38.70	2	29.2	20.0	0	180-187	KQINDYVEK.G	
24	1	740.4120	49.25	2	29.2	34.8	1	100-192	KQINDYVEKGTQCKI	
128	1	416.9060	881.14	3	35.9	28.7	0	248-257	RLGMFNQHCCK	Carbamidomethyl: 9
57	1	421.9030	70.76	3	31.0	39.4	0	248-257	RLGMFNQHCCK	Carbamidomethyl: 9, Oxidation: 3
33	1	426.8050	127.64	2	29.8	47.5	0	307-314	R.SASLHLPK.L	
161	1	555.8330	49.12	2	38.0	50.5	0	315-324	KLSITGTYDLK.S	
183	1	508.3390	55.18	2	40.3	19.0	0	325-334	KSVLQGLGITK.V	
70	1	444.7820	59.64	2	32.2	51.1	0	360-367	KAVITDFK.G	
116	1	390.7410	80.34	2	35.0	53.1	0	405-411	K.SPLFMGK.V	

Fig. 26. Identificación del spot #1.334. Se muestran las proteínas identificadas y sus secuencias, en las que se muestran en rojo los péptidos coincidentes.



AAT Base de datos: SwissProt Score= 59,2 Nº péptidos= 13 %Secuencia= 49,3

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
MPSSVSWGIL	LLAGLCLV	VSLAEDPQGD	AAQKDTDSHH	DQDHPTFNKI	TENLAEFAPS	LYRQLAQSN	STNIFSPVPS	IATAFAMLSL	GTKADTHDEI	LEGLNPLTE	IPEAQIHEGF
130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
GRILRPTINQP	DSQQLTFTGN	GIPLSEGLKI	VTKFIRIVK	LYHSEAFVNV	FSDTRAAKQ	INDYVKGQTQ	GKIVDIAVKEL	DRDTPVALVN	YTFPKGKWR	PFEVKDPRR	DFHVDQVTV
250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
FVPMKRLGM	FNIQHCKKLS	SWVLLMKYLG	NALAIFFLPD	EGKLQHLNE	LTHDITKEL	ENEDRRSASL	HLPKLSITGT	YDLKSVLQQL	GITKVFESNGA	DLSGVTERAP	LKLSKAVHKA
370	380	390	400	410	420						
VLTIDEKQTE	AAGAMFLEAI	PMSIIPPEVKF	NKPFVFLMIE	QNTKSPLFMG	KVVNPTQK						

m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	P	Range	Sequence	Modification
3337.7533	10.85	1	0	2-34	PSSVSWGILLAGLCLVPSVLAEDPQGDAAQK	
3402.6175	1.087	1	1	35-63	TCTSHHDQDHPTFNKITPNLAEFASLYR	
1641.8655	1.206	1	0	50-63	ITPNLAEFASLYR	
2574.3486	2.979	1	0	126-149	TLNQDSQLQLTTGNGLFSEGLK	
2196.0489	3.123	1	1	181-179	LVHSEFTVNFQDTEEAKK	
3175.6344	3.960	1	2	161-187	LVHSEFTVNFQDTEEAKKQINDYVEK	
2757.5180	-1.582	1	2	193-215	IVDLVKELDRDTPVALVNIYFFK	
2090.0932	-1.180	1	1	199-215	ELDRDTPVALVNIYFFK	
3148.6309	2.759	1	2	216-241	GKWERPFVKTDEEEDFHVDQVTVK	
1078.6251	-2.294	1	1	299-306	FLENEDRR	
2182.1327	-0.5833	1	1	335-355	VFSNGADLSGVTEEAPLKLK	
1855.9813	2.058	1	0	390-404	FNKPFVFLMIEQNTK	
1871.9778	2.853	1	0	390-404	FNKPFVFLMIEQNTK	Oxidation: 9

Fig. 27. Espectro de PMF del spot #1.352 obtenido por MALDI-TOF MS. Se muestra la proteína identificada y su secuencia, en la que se muestran en rojo los péptidos coincidentes.

En los 3 casos había un mayor volumen en la NCM en comparación con la GSF (Figura 29):

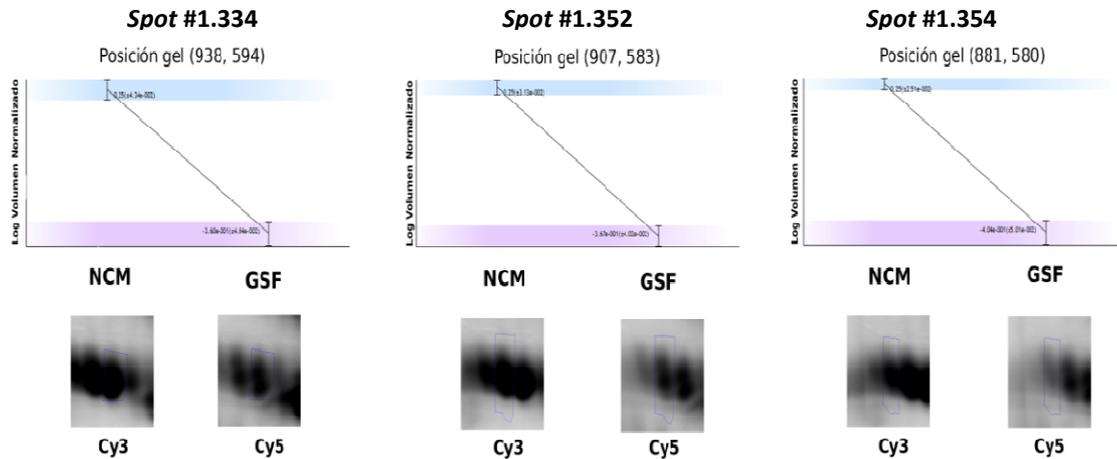


Fig. 29. Spots identificados como AAT. Se muestra el volumen normalizado de cada spot para cada patología, así como el detalle de estos spots en los geles.

En concordancia con los resultados del DIGE, la posterior validación mediante ELISA mostró una mayor concentración de AAT en la orina de los pacientes con NCM (Figura 30). Esta proteína se detectó en el 96% de los pacientes.

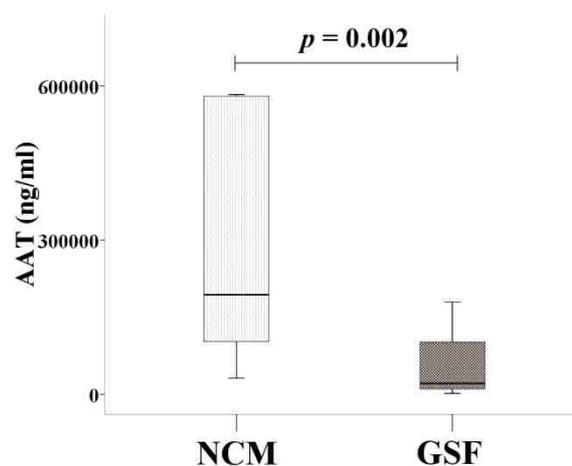


Fig. 30. Cuantificación de AAT en la orina de los pacientes incluidos en los grupos de validación. Se utilizó el kit de ELISA de Abnova (Nº cat. KA0459).

La descripción de la proteína AAT se encuentra en la página 129. Brevemente, se trata de una proteína que protege a los tejidos de diferentes proteasas, principalmente de la elastasa de los neutrófilos, las cuales son liberadas por las células cuando hay daño o inflamación. Ya estudios previos han descrito una mayor concentración de esta proteína en la orina de pacientes con SN, y una práctica ausencia en individuos sanos [121,138].

La identificación del *spot* #1.334 resultó en otras 2 proteínas, además de la AAT, el receptor del factor activador de (PTAFR) y la ciclina-Y (CCNY) (Figura 24). En la validación, mediante ELISA, encontramos PTAFR sólo en el 25% de los pacientes (5 NCM y 2 GSF) y no habían diferencias al comparar los dos grupos ($p= 0,25$). En cuanto a la ciclina-Y, ésta se detectó en la orina de la mayoría de los pacientes (86%) pero no se hallaron diferencias entre NCM y GSF ($p= 0,71$).

El *spot* #1.363 fue identificado como Transferrina (TF, nº de acceso *Swiss-Prot*: P02787; *Homo sapiens*) (Figura 31). Este *spot* mostraba un mayor volumen en la NCM que en la GSF (Figura 32).

TF Base de datos: SwissProt Score= 64,90 Nº péptidos= 12 %Secuencia= 24,5

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
MRLAVGALIV	CAVLGICLAV	PKTVRNCVAV	SEHEATKQCS	FRDEMKSVIP	SDGPSVACVK	KASYLDCIRA	IAANEADAVT	LDAGLVYDAY	LAPNLRKPVV	AEFYGSKEDF	QTFYYAVAVV
130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
KKDSGFQMNQ	LRGKKSCHTG	LGRSAGWNTP	IQLLYCDLPE	PRKPLEKAVA	NFFSGSCAPC	ADGTFPQLC	QLCPGCGCST	LNQYFGYSGA	FKCLKDGAGD	VAFVKHSTIF	ENLANKADRD
250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
QYELLCLDNT	RKPVDEYKDC	HLAQVPSHTV	VARSMSGKED	LIWELLNQAQ	EHFGKDRSKE	FQLFSSPBGK	DLLFKDSAHG	FLKVPFRMDA	KMYLGYEYVT	AIRNLRGTC	PEAPTDECKP
370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
VKWCALSHHE	RLKCDSESVN	SVGKIECVSA	ETTEDCIAKI	MGEADAMSL	DGGFYVIAGK	CGIVPVAEN	YKSDNCEDT	PEAGYFAIAY	VKKSASDLTW	DNLKGGKSKC	TAVGRTAGWN
490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
IPMGLLYNKI	NHCRFDEFFS	EGCAGSKFD	SSLCKLQMS	GLNLCEPNNK	EGYYGYTGA	RCLVEKQDVA	FVKHQVTPQN	TGGENDFWA	KNLNEKDYEL	LCLDGRKPV	EYANCHLAR
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700		
APNHAIVTRK	DREACVHKIL	ROQCHLFGSN	YTDGSGNFCL	FRSETKDLIF	RDDTYCIAKL	HDRNTYKYL	GEEYVEAVGN	LREKSTSSLL	EACTFRFP		

m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	P	Range	Sequence	Modification
3520.7855	-9.569	1	2	136-167	SCHTGLGRSAGWNIPIGLLYCDLPEPRKPLEK	
2171.1458	23.22	1	0	144-162	SAGWNIPIGLLYCDLPEPR	Carbamidomethyl: 13
2549.3537	23.85	1	1	252-273	KPVDEYKDCHLACVPSHTVVAR	Carbamidomethyl: 9
1940.1156	20.82	1	2	311-327	DLLFKDSAHGFLKVPFR	
1478.7713	24.67	1	0	332-343	MYLGYEYVTAIR	
1494.7706	27.38	1	0	332-343	MYLGYEYVTAIR	Oxidation: 1
2994.3978	22.93	1	1	347-371	EGTCPEAPTDECKPVKWCALSHHER	Carbamidomethyl: 4, 12, 18
2258.0315	24.85	1	1	490-508	INHCRFDEFFSEGCAPGSK	Carbamidomethyl: 4, 14
2386.1377	28.24	1	2	490-508	INHCRFDEFFSEGCAPGSKK	Carbamidomethyl: 4, 14
2971.3995	27.38	1	1	516-541	LCMGSGLNLCEPNNKEGYGYTGAFR	Carbamidomethyl: 2, 10
2987.4087	32.34	1	1	516-541	LCMGSGLNLCEPNNKEGYGYTGAFR	Carbamidomethyl: 2, 10; Oxidation: 5
2157.1106	22.93	1	2	660-676	LHCRNTYKYLGEYVVK	

Fig. 31. Identificación del spot #1.363 mediante huella peptídica. Se muestra la secuencia de la proteína identificada y su secuencia, en la que se muestran en rojo los péptidos coincidentes.

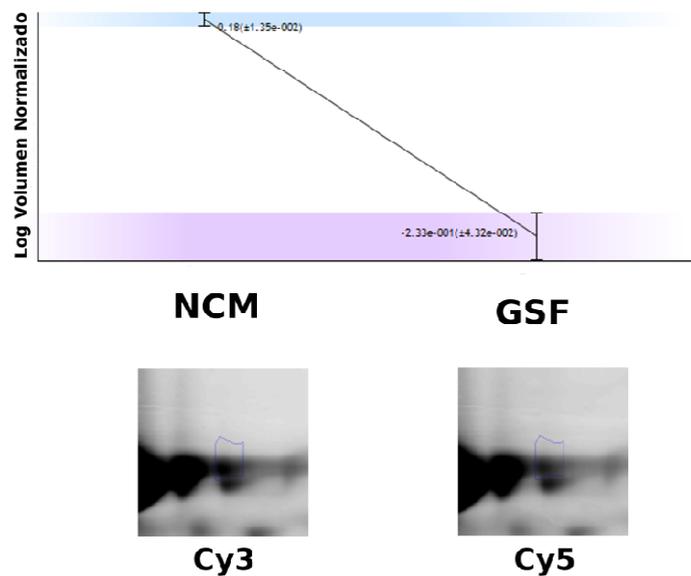


Fig. 32. Spot identificado como TF (posición en el gel 1.614, 355). Se muestra el volumen normalizado del spot para cada patología, así como el detalle de este spot en el gel.

En los grupos de validación, mediante ELISA se detectó TF en la orina del 93% de los pacientes. Al comparar NCM y GSF se observaron diferencias significativas, que también mostraban una mayor concentración en los pacientes con NCM (Figura 33).

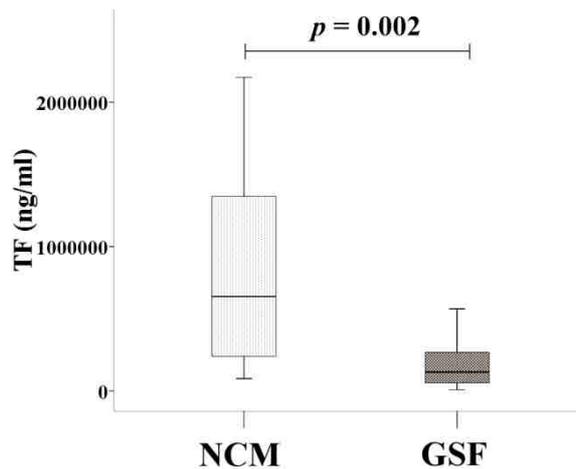


Fig. 33. Diagrama de cajas que representa la concentración de TF en la orina de los grupos de validación. Las cajas muestran la mediana y los percentiles 25 y 75. Los datos se compararon mediante el test no paramétrico de *Mann-Whitney*. Una $p < 0,05$ fue considerada significativa. Se utilizó el kit de ELISA de Abnova (nº cat. KA0510).

La TF es una glicoproteína sintetizada principalmente en el hígado y es la principal proteína plasmática transportadora de hierro. Posee una actividad antioxidante, evitando que el hierro se encuentre libre y de esta manera impidiendo una producción en exceso de radicales hidroxilo que podrían causar peroxidación de las membranas lipídicas y otros constituyentes celulares [154]. En la anemia por deficiencia de hierro, los niveles de TF aumentan debido al aumento en su síntesis. Durante estados inflamatorios y en enfermedad maligna los niveles de esta proteína son bajos, por lo que se dice que la TF es un reactante de fase aguda negativo [155]. También se

encuentran niveles disminuidos en casos de desnutrición, enfermedad hepática crónica y pérdida de proteínas. La TF en orina resulta de una alteración de la permeabilidad de la membrana basal glomerular. Ya es conocido que durante el síndrome nefrótico muchos pacientes sufren de anemia, y esto es debido a la pérdida en orina de proteínas como la transferrina [20]. También se había descrito un aumento en la excreción de TF en los momentos previos al desarrollo de microalbuminuria en las glomerulonefritis y en la *Diabetes Mellitus* tipo 2 [156,157]. Otros estudios sugieren que la TF en orina puede predecir la severidad de la celularidad mesangial y de la glomeruloesclerosis en los estadios tempranos de las glomerulonefritis [158]. Lo que no se había visto hasta ahora, era que los niveles de esta proteína permitieran diferenciar entre NCM y GSF.

El *spot* #1.469 fue identificado como Histatina-3 (HTN3) (Figura 34). La mancha correspondiente a esta proteína tenía un mayor volumen en el grupo de pacientes con NCM (Figura 35).

Al llevar a cabo la validación mediante ELISA, esta proteína sólo se detectó en la orina de 8 pacientes (5 NCM y 3 GSF), y de acuerdo con los resultados del DIGE, también se encontraba en mayor concentración en aquellos que padecían NCM (Figura 36).

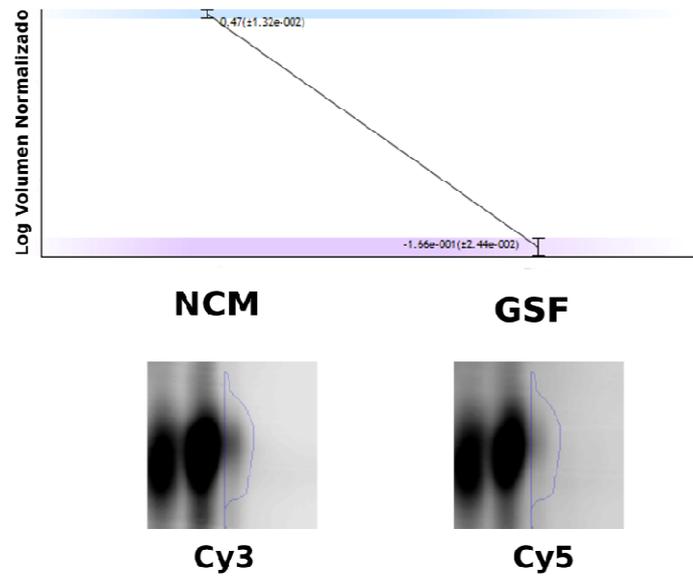


Fig. 35. *Spot* #1.469 identificado como HTN3 (posición en el gel 2.450, 1.196). Se muestra el volumen normalizado del *spot* para cada patología, así como el detalle de este *spot* en el gel.

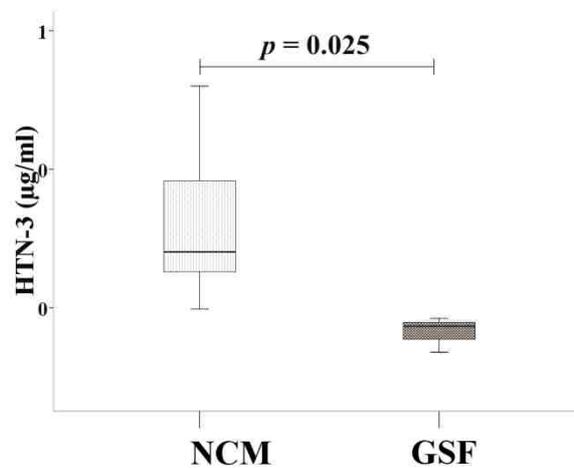
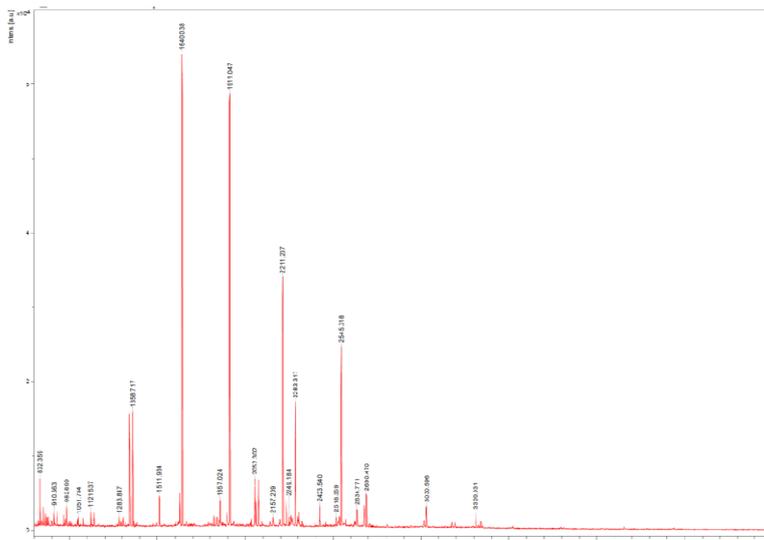


Fig. 36. Diagrama de cajas que representa la concentración de HTN3 en la orina de los grupos de validación. Las cajas muestran la mediana y los percentiles 25 y 75. Los datos se compararon mediante el test no paramétrico de *Mann-Whitney*. Una $p < 0,05$ fue considerada significativa. Se utilizó el kit de ELISA de Cusabio (Nº cat: CSB-EL010879HU).



HMN6 Base de datos: SwissProt Score= 64.1 Nº péptidos= 7 %Secuencia= 100

10 20 30
MTPRGFSCLL **LET**SETDLEV **K**RRT

m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	P	Range	Sequence	Modification
2305.2868	40.65	1	1	1-21	MT PRGFSCLL PTSETDLPVK	
2518.3384	17.30	1	2	1-22	MT PRGFSCLL PTSETDLPV K R	Carbamidomethyl: 8
2534.3405	11.62	1	2	1-22	MT PRGFSCLL PTSETDLPV K R	Carbamidomethyl: 8, Oxidation: 1
2674.4628	17.23	1	3	1-23	MT PRGFSCLL PTSETDLPV K RR	Carbamidomethyl: 8
2680.4667	21.56	1	3	1-23	MT PRGFSCLL PTSETDLPV K RR	Carbamidomethyl: 8, Oxidation: 1
1820.0322	44.61	1	0	5-21	GF SCLLPTSETDLPVK	

ALB Base de datos: SwissProt Score= 80.20 Nº péptidos= 21 %Secuencia= 24.8

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
 MGVVTFISLL FLFFSAYSRG VFRDRAHKE VAHREKDLGE ENFEALVLLA FAQLQCCPF EDHVKLVNEV TEFAKTCVAD ESAENCDESL HTLFGDKLCT VATLRETYGR MADCCAKQEP
 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
 ERMECLQHK DDNEMLERLV RFEVDMC7A FHDNEETFLK KVLVLAERRH PYPVAPPELLP FAKRYAAPT ECGQADKAA CLLPKLDELK DEGRASAKQ RLR**CASLQKP** GERAFRANAV
 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 ARLSQRFKA EFAEVSRLVT DLTRVTECC HGDLLCADL RADLRYICE **NQDSISSK**LK ECCKEPLLEK SHCIAEVEND EMPADLPSLA ADFVESKDVV KNYAZARDVF LGMFLYETAR
 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
 RHPDYSVLL LRLAKTYETT LKCCAAADP HECYAKVDE FKPLVEEFGN LIKQNCLEFE QLGKYKQNA LLVRYTKVP **QVSTPTLVEV** SRNLGKVGSK CCRHPEAKRM **PCAEDYLSV**
 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
LNQCLVLRK TPVSDRVTKC **CTESLVNRP** **CFSALVDET** **VYPERPRAET** **FTFHADICTL** **SEKERQIKKQ** TALVELVKEK **EKATKEQLKA** **VMDFAAFVE** **KCKCKADKRT** **CFAREGRKLV**
 610
 AASQAALGL

m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	P	Range	Sequence	Modification
1138.5844	-2.556	1	1	224-233	CASLQ K FGER	
1627.8295	18.30	1	1	287-300	YICENQDSISS K LK	
1640.0384	61.38	1	1	438-452	KVPQVSTPTLVEVSR	
2052.3025	50.11	1	2	438-456	KVPQVSTPTLVEVSRNLGK	
2423.5399	58.52	1	3	438-460	KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK	
1511.9330	60.26	1	0	438-452	VDPQVSTPTLVEVSR	
2674.4628	55.26	1	1	469-490	RMP CAEDYLSV LNQLCVLHEK	Carbamidomethyl: 4, 17
2690.4667	59.38	1	1	469-490	RMP CAEDYLSV LNQLCVLHEK	Carbamidomethyl: 17, Oxidation: 2
2518.3594	57.77	1	0	470-490	M PCAEDYLSV LNQLCVLHEK	Carbamidomethyl: 3, 16
2534.3405	51.97	1	0	470-490	M PCAEDYLSV LNQLCVLHEK	Carbamidomethyl: 3, 16, Oxidation: 1
3030.5858	60.74	1	1	503-524	C CTESLVNRRP CFSALVDETYVPK	Carbamidomethyl: 1, 2, 12
1911.0467	60.18	1	0	503-524	R PC FSALEVDETYVPK	Carbamidomethyl: 3

MRPL17 Base de datos: SwissProt Score= 40 Nº péptidos= 9 %Secuencia= 62.9

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
 MRLSVAAAIS HGRVFRMGL GPESRIHLK **NLLTGLVRE** **RIEAPWAKVD** **EMRGYAKLI** **DYKLGDTNE** **RAMR**MADFNL TEKOLIKLF CVLAFRYKDO TGGYTRMLQI **PNSLDRKM**
 130 140 150 160 170 180
AVIEYRGNCL **PPLPLPRDS** **HLTLLNQLLQ** **QLRQDLRQK** **EASNS**SBTA QTPT

m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	P	Range	Sequence	Modification
1640.0384	53.72	1	2	3-17	LSVAAAI S HGRVFR	
3309.9306	61.40	1	4	31-53	NLLTGLV R HERIEAPWAVDEMRGYAEK	
1911.0467	61.58	1	2	39-53	HERIEAPWAVDE M R	Oxidation: 14
3030.5958	39.16	1	4	49-74	VDEMRGYAEKLDYKLGDTNERAMR	
1342.7208	-3.829	1	1	107-117	MLQIPN R SLDR	
1368.7170	-2.901	1	1	107-117	MLQIPN R SLDR	Oxidation: 1
2283.3165	35.61	1	2	118-137	AKMAVIEYKGNCL P PLPR	Carbamidomethyl: 12, Oxidation: 3
2423.5399	61.90	1	3	118-138	AKMAVIEYKGNCL P PLPRR	Carbamidomethyl: 12
2233.2088	-14.48	1	1	139-157	DSHLTLLNQLLQ L RQDLR	

Fig. 37. Espectro de PMF del spot #1.468 obtenido por MALDI-TOF MS. Se muestran las proteínas identificadas y sus secuencias, en las que se muestran en rojo los péptidos coincidentes.

El *spot* numerado como #1.468 resultó en 3 identificaciones: albúmina (ALB), proteína ribosomal 39s L17 mitocondrial (MRPL17) y proteína humanina-like 6 (HN6) (Figura 37).

Este *spot* mostraba un volumen 3,1 veces mayor en pacientes con NCM ($V= 2,218$) que en pacientes con GSF ($V= 0,706$) (Figura 38).

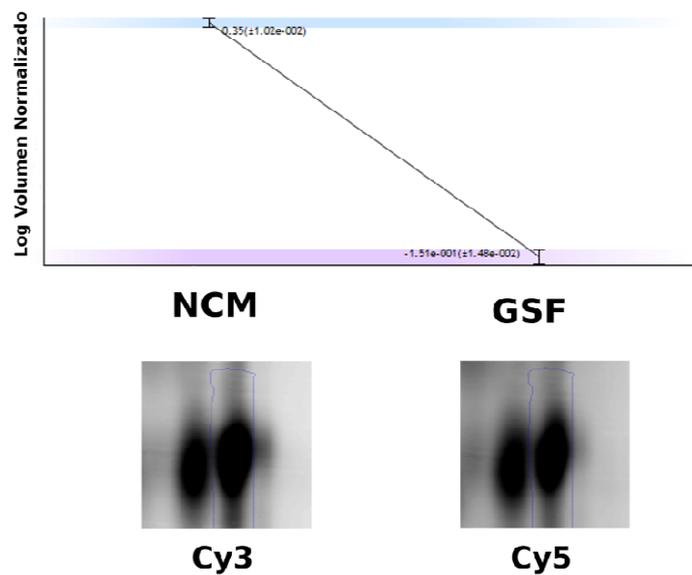


Fig. 38 Spot #1.468 (posición en el gel 2.434, 1.200). Se muestra el volumen normalizado del *spot* para cada patología, así como el detalle de este *spot* en el gel.

Mediante ELISA observamos que la concentración de la proteína MRPL17 era mayor en la orina de los pacientes con NCM del grupo de validación (Figura 39). Sin embargo, la proteína HN6 no se detectó en la orina de ningún paciente.

MRPL17 es una proteína codificada por genes nucleares y ayuda en la síntesis proteica dentro de la mitocondria. No existe hasta la fecha ningún estudio que relacione esta proteína con enfermedades renales.

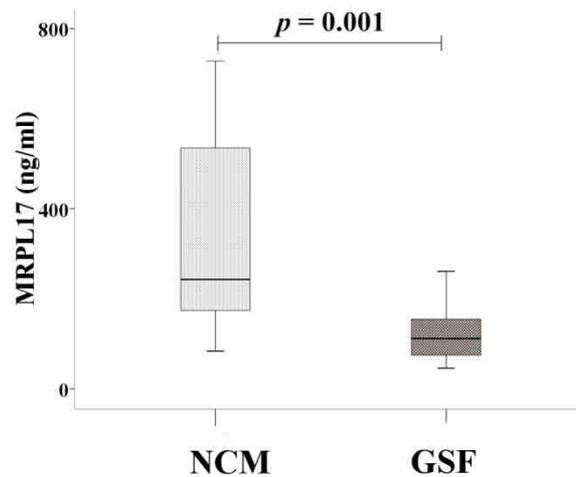


Fig. 39. Diagrama de cajas que representa la concentración de MRPL17 en la orina de los grupos de validación. Las cajas muestran la mediana y los percentiles 25 y 75. Los datos se compararon mediante el test no paramétrico de *Mann-Whitney*. Una $p < 0,05$ fue considerada significativa. Se utilizó el kit de ELISA de Cusabio (Nº cat: CSB- EL014824HU).

El *spot* #1.460 mostraba un volumen 7 veces mayor en la GSF en comparación con la NCM (Figura 40). Este *spot* fue identificado como calretinina (CALB2) y como leucine-rich repeat-containing protein C10orf11 (C10orf11) (Figura 41).

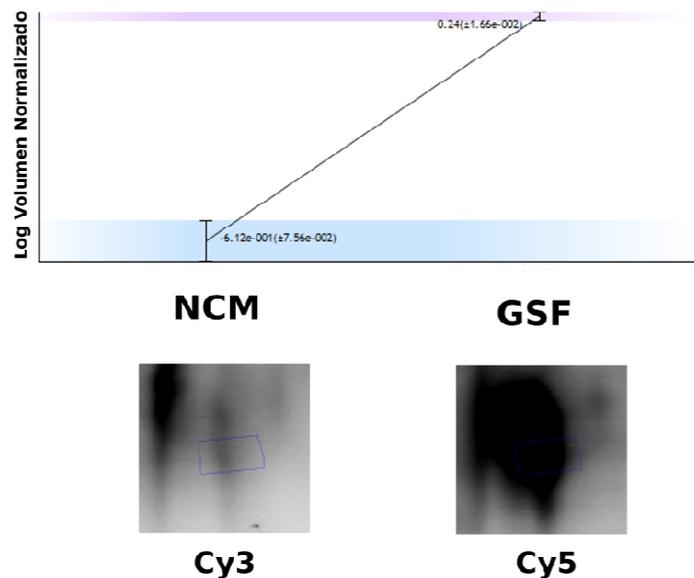


Fig. 40 *Spot* #1.460 (posición en el gel 1.625, 1.102). Se muestra el volumen normalizado del *spot* para cada patología, así como el detalle de este *spot* en el gel.

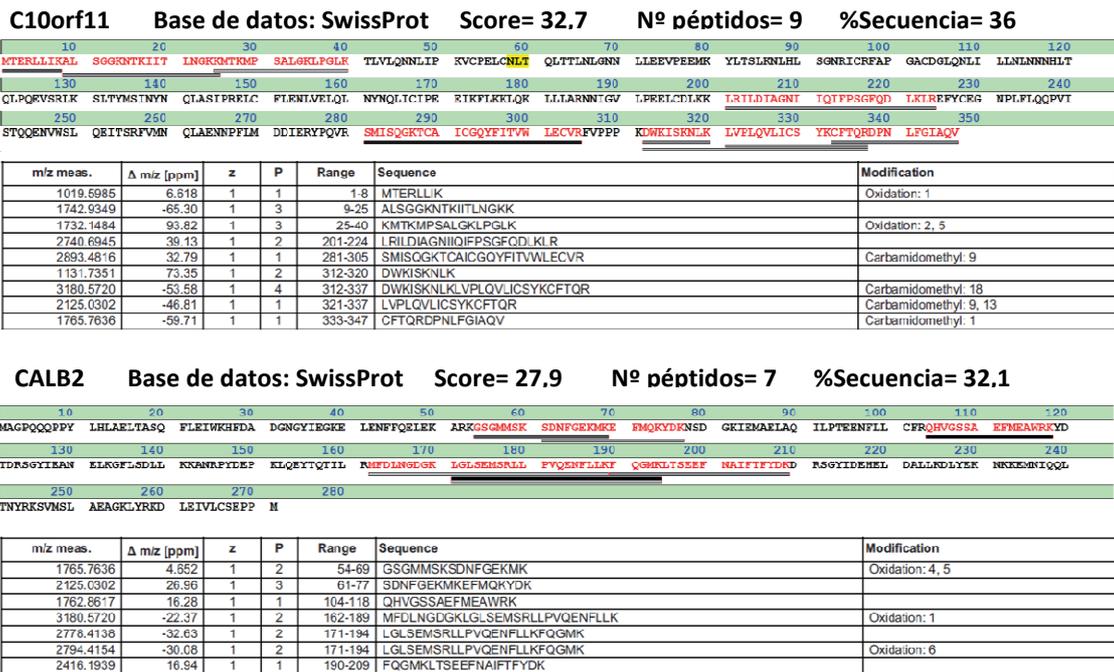


Fig. 41. Identificación del spot #1.363 mediante huella peptídica. Se muestra la secuencia de las proteínas identificadas y sus secuencias, en las que se muestran en rojo los péptidos coincidentes.

En la validación se detectó CALB2 en la orina de todos los pacientes, y también se encontraron diferencias entre NCM y GSF ($p = 0,002$), con mayor concentración en los pacientes con GSF (Figura 42).

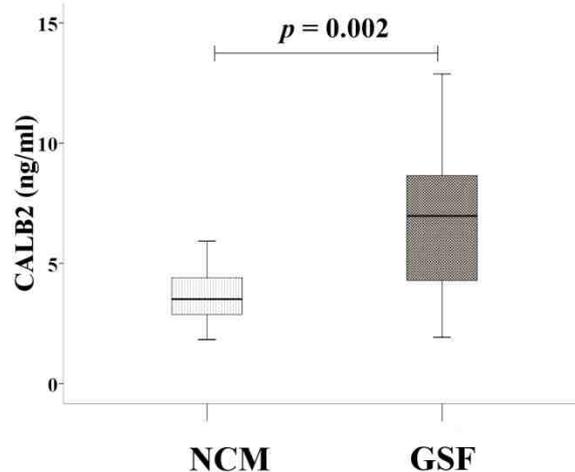


Fig. 42. Diagrama de cajas que representa la concentración de CALB2 en la orina de los grupos de validación. Las cajas muestran la mediana y los percentiles 25 y 75. Los datos se compararon mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Una $p < 0,05$ fue considerada significativa. Se utilizó el kit de ELISA de Elabscience (Nº cat: E-EL-H0628).

La CALB2 es una proteína de unión al calcio de 29 kDa, perteneciente a la superfamilia de las troponinas C y principalmente expresada en las neuronas del sistema nervioso central y periférico [159]. Fuera del sistema nervioso, la expresión de la CALB2 se ha observado en una serie de tipos celulares, incluidas las células mesoteliales, las células productoras de esteroides, algunas células neuroendocrinas, glándulas sudoríparas ecrinas y otros tipos celulares. La CALB2 tiene función tampón al prevenir un aumento excesivo de calcio intracelular [159].

La CALB2 se ha propuesto como marcador útil en el diagnóstico de algunas enfermedades, como la enfermedad de Hirschsprung y algunos tipos de cáncer, como cáncer de pulmón y mesotelioma [160–163]. Mediante el uso de anticuerpos se han detectado células positivas en CALB2 en los túbulos contorneados renales.

El *spot* #1.458, que mostraba mayor expresión en los pacientes con NCM, fue identificado como proteína nuclear contenedora de señal proteolítica PEST (PCNP) (Figura 43).

PCNP Base de datos: SwissProt Score= 38,6 Nº péptidos= 5 %Secuencia= 51,7

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
MADGKAGDEK	PEKSORAGAA	GGPEEEAEKP	VTKTKVSSSN	GGESSRSRAE	KSAEEEAAD	LPTKPTKISK	FGFALGSQTT	KNASALSIKL	GSSKPKSTVP	TLAPKPLSYA	AAFNEDESE
130	140	150	160	170	180						
PEEMPPEAKM	RMGNIGRDTF	TSAQPNSEFK	GKHGFSNQK	LWEPNIKSHL	GNVEDQDN						

m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	P	Range	Sequence	Modification
1762.8989	-34.09	1	2	1-16	MADGKAGDEKPEKSQR	
1899.0538	79.36	1	2	33-51	TKTVSSNNGESSRSRAEK	Oxidation: 1
2055.1522	71.07	1	3	33-52	TKTVSSNNGESSRSRAEKR	
3180.6604	-5.744	1	3	53-82	SAEEEAADLPTKPTKISKFGFALGSQTTKK	
2893.5404	87.70	1	1	106-131	TLVAAAFNEDESEPEEMPPEAKMR	

BCAT2 Base de datos: SwissProt Score= 42,4 Nº péptidos= 5 %Secuencia= 19,9

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
MAAALGQIN	ARKLLSVPWL	LOGPRRYASS	SFRADLQLE	MTQRPHKPG	PGBELVFGKT	FTDHIIMVEW	NDKGGWQFRI	QPFQNTLHP	ASSSLHYSLQ	IFEGMKAFKG	KDCCVRLFRP
130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
WLNMDRLRS	AMRLCLP8FD	KLELLECIIR	LIEVDKDWV	DARQTSLYVR	PVLIGNEPSL	GVSQPTTRALL	FVILCFVGRY	FPQGSVTPVS	LLADPAFIRA	WVGGVGNFKL	GGNYGPTVLV
250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
QQEALKRGE	QVNLVYGPDE	QLTEVGTMTI	FVYVTHEDGV	LEIVTPEPLNG	VILPGVVRQS	LIDMAQTWGE	FRVVERTITM	KQLLRALERG	RVEVFS8GT	ACQVCPVHRI	LYKDRNLHTP
370	380	390	400								
TMENGPPELLL	RFQRELEBIQ	YGRRAHEWMT	EV								

m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	P	Range	Sequence	Modification
2778.4833	-21.20	1	2	1-25	MAAALGQIWARLKL SVPWLLCGFR	Carbamidomethyl: 22
2893.5404	-26.40	1	3	1-26	MAAALGQIWARLKL SVPWLLCGPRR	Oxidation: 1
2794.4881	-10.12	1	3	127-149	MLRSAMRLCLPSFDKLELLECIIR	Carbamidomethyl: 9
1899.0538	-10.21	1	2	142-156	LELLECIIRRLIEVDK	Carbamidomethyl: 6
2836.3512	-27.18	1	2	356-377	NLHIPTMENGPELILRFQKELK	Oxidation: 7

Fig. 43. Identificación del spot #1.458 mediante huella peptídica. Se muestra la secuencia de las proteínas identificadas y sus secuencias, en las que se muestran en rojo los péptidos coincidentes.

Se detectó PCNP en la orina del 93% de los pacientes de los grupos de validación, pero no se encontraron diferencias al comparar NCM y GSF ($p= 0,720$).

En la Tabla 10 se muestran los resultados de las validaciones por ELISA. No se han incluido en esta tabla las proteínas que no se detectaron en la orina de los pacientes de los grupos de validación, que fueron AZGP1, BCAT2, PPP1R8, TMC1, ELOF1, c10orf11 y HN6.

Proteína	Patología	N	Concentración en orina	p
AAT	NCM	13 / 14	193,50 (102,49 - 580,00) µg/ml	0,002
	GSF	14 / 14	20,93 (10,45 - 101,65) µg/ml	
TF	NCM	12 / 14	653,63 (241,27 - 1,348,38) µg/ml	0,002
	GSF	14 / 14	129,96 (55,41 - 267,10) µg/ml	
HTN3	NCM	5 / 14	0,35 (0,32 - 0,48) µg/ml	0,030
	GSF	3 / 14	0,22 (0,17 - 0,23) µg/ml	
MRPL17	NCM	12 / 14	242,98 (174,25 - 534,75) pg/ml	0,001
	GSF	14 / 14	111,86 (74,90 - 154,78) pg/ml	
PCNP	NCM	14 / 14	441,67 (152,50 - 503,10) pg/ml	0,720
	GSF	12 / 14	348,55 (216,25 - 437,70) pg/ml	
CALB2	NCM	14 / 14	3,52 (2,88 - 4,40) pg/ml	0,002
	GSF	14 / 14	6,98 (4,29 - 8,65) pg/ml	
CCNY	NCM	12 / 14	87,60 (83,40 - 91,15) pg/ml	0,710
	GSF	12 / 14	87,70 (84,30 - 102,2) pg/ml	
PTAFR	NCM	5 / 14	0,84 (0,46 - 0,98) ng/ml	0,250
	GSF	2 / 14	0,51 (0,36 - 0,66) ng/ml	

Tabla 10. Resultados de las validaciones mediante ELISA. N significa el número de pacientes en los que se detectaron las proteínas en orina. La concentración se muestra como mediana (percentiles 25 y 75). Los datos se compararon mediante el test no paramétrico de *Mann-Whitney*. Una $p < 0,05$ fue considerada significativa.

Se creó un árbol de decisión, en el cual la variable de interés fue la patología, que permitiera predecir si un paciente era NCM o bien GSF. Las variables explicativas fueron las proteínas.

Para crear el árbol de decisión se consideraron las siguientes particiones de la muestra: para cada concentración de las proteínas se calcularon los deciles, que son los puntos en los que se divide la muestra en 10 partes iguales. Para cada uno de estos deciles, se consideró que constituían un grupo aquellos pacientes con una concentración mayor o igual al decil en cuestión. De esta manera, el otro grupo lo constituían los pacientes con una concentración menor al decil en cuestión.

Una vez definidos todos los posibles subconjuntos se realizaron contrastes de la patología de los pacientes según la partición de la muestra, mediante el test exacto de Fisher y el Likelihood Ratio Chi-Square test (estos contrastes no se ajustaron por multiplicidad de contrastes). Se escogió la decisión en que el p valor del test exacto de Fisher era menor, es decir, aquel contraste en que las diferencias se hicieron más evidentes (Tabla 11).

En la primera partición, la variable escogida fue la concentración de CALB2 (punto de corte 6,4 ng/ml), y se obtuvieron dos grupos:

01 - CALB2 < 6,4 ng/ml: 19 pacientes (NCM 73,68%, GSF 26,32%)

02 - CALB2 \geq 6,4 ng/ml: 9 pacientes (NCM 0%, GSF 100%)

En la segunda partición, se dividió el grupo 01 obtenido en el paso anterior según la concentración de MRPL17:

011 - MRPL17 < 139,29 pg/ml: 8 pacientes (NCM 50%, GSF 50%).

012 - MRPL17 \geq 139,29 pg/ml: 11 pacientes (NCM 90,91%, GSF 9,09%).

En la siguiente partición se dividió el grupo 011 según si se detectaba o no HTN3 en la orina de los pacientes:

0111 – HTN3 no detectada: 6 pacientes (NCM 66,67%, GSF 33,33%).

0112 - HTN3 detectada: 2 pacientes (NCM 0%, GSF 100%).

Grupo	Nº casos	% NCM	% GSF	Partición	Likelihood Ratio			
					Chi-Square	DF	p^1	p^2
01	19	73,68	26,32	CALB2 < 6,4 (p70)	16,92	1	<0,0001	0,0006
02	9	0	100	CALB2 >= 6,4 (p70)				
011	8	50	50	MRPL17 < 139,29 (p50)	4,11	1	0,0427	0,1108
012	11	90,91	9,09	MRPL17 >= 139,29 (p50)				
0111	6	66,67	33,33	HTN3 ND (p10)	3,45	1	0,0632	0,4286
0112	2	0	100	HTN3 D (p10)				

Tabla 11. Particiones escogidas en cada paso para crear el árbol de decisión. p^1 Likelihood Ratio Chi-Square; p^2 Fisher's Exact Test (2-Tail); ND significa no detectada y D detectada.

De estas particiones quedan los siguientes grupos (Figura 44):

- GRUPO 1. Pacientes con CALB2 >=6,4 ng/ml.
Total: 9 pacientes (0% NCM, 100% GSF).
- GRUPO 2. Pacientes con CALB2 <6,4 ng/ml y MRPL17 >= 139,29 pg/ml.
Total: 11 pacientes (90,91% NCM, 9,09% GSF).
- GRUPO 3. Pacientes con CALB2 <6,4 ng/ml, MRPL17 <139,29 pg/ml y HTN3 no detectada.
Total: 6 pacientes (66,67% NCM, 33,33% GSF).

- GRUPO 4. Pacientes con CALB2 <6,4 ng/ml, MRPL17 <139,29 pg/ml y HTN3 >0 (detectada).

Total: 2 pacientes (0% NCM, 100% GSF).

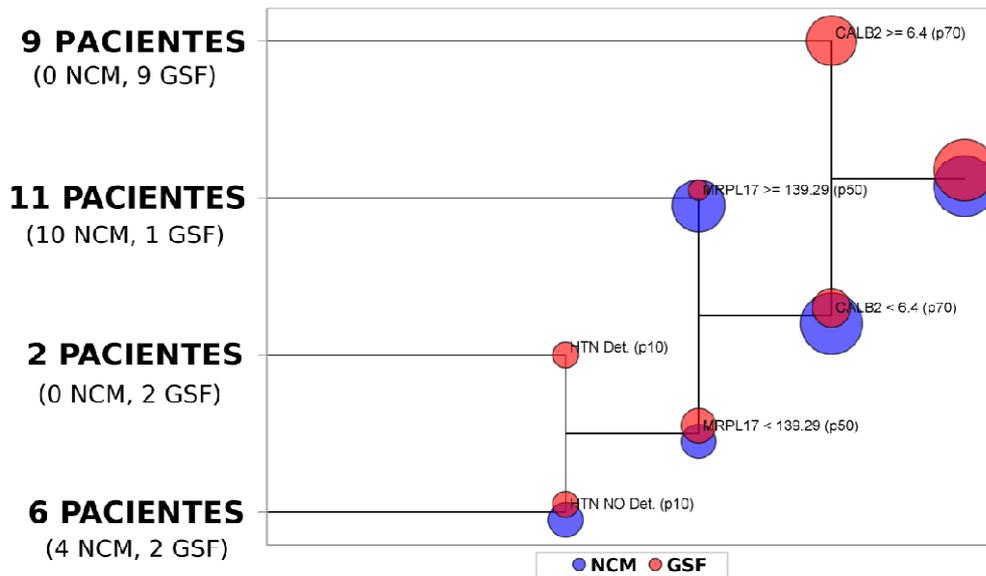


Fig. 44. Particiones de la muestra realizadas para crear el árbol de decisión.

Observamos que en los grupos 2 y 3 se encuentran principalmente pacientes con NCM y que en los grupos 1 y 4 únicamente se encuentran pacientes con GSF. Por lo tanto, el pronóstico de NCM fueron todos los pacientes incluidos en los grupos 2 y 3, mientras que el pronóstico de GSF fueron aquellos pacientes en los grupos 1 y 4.

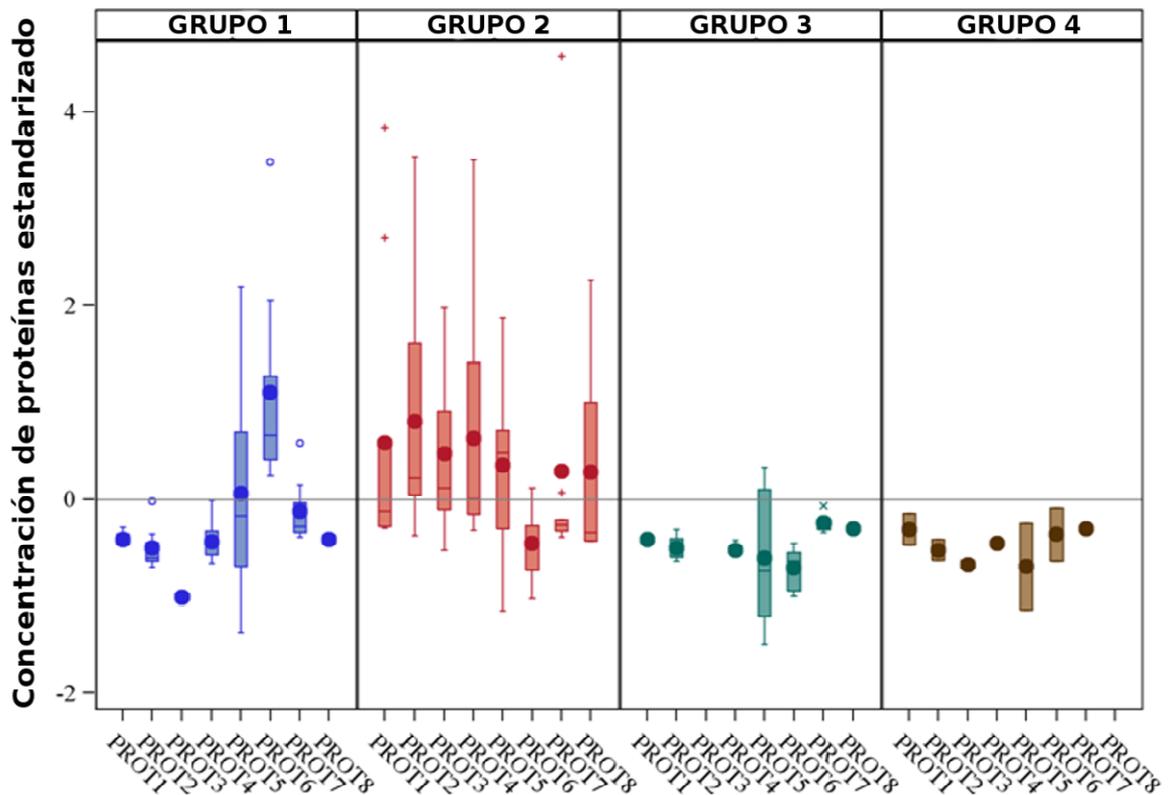


Fig. 45. Diagramas de caja que muestra la concentración estandarizada de las proteínas según grupo. PROT1 (AAT), PROT2 (TF), PROT3 (HTN3), PROT4 (MRPL17), PROT5 (PCNP), PROT6 (CALB2), PROT7 (CCNY), PROT 8 (PTFAR).

En la Figura 45 observamos que:

- El GRUPO 1 se caracteriza por tener niveles elevados de CALB2.
- El GRUPO 2 se caracteriza por tener niveles bajos de CALB2 y niveles altos de AAT, TF, HTN3 y MRPL17.
- El GRUPO 3 se caracteriza por tener niveles bajos de CALB2 y MRPL17 y por no detectarse la proteína HTN3.
- El GRUPO 4 se caracteriza por tener niveles bajos de CALB2 y MRPL17 y por la detección de la proteína HTN3.

Se llevó a cabo una validación del árbol de decisión mediante el método de cross-validación *k-folds*. Para ello se utilizó una parte de los datos para estimar los parámetros del modelo y el resto de datos se utilizaron para evaluar su capacidad predictiva.

Este método consiste en dividir la base de datos en k submuestras (en este caso se subdividió en 5). A continuación se utilizó cada una de estas submuestras para validar el modelo estimado con el resto de datos, ajustando en total k modelos.

Debido a la cantidad de pacientes de este estudio, se realizaron 10 iteraciones de la cross-validación, cada una de ellas escogiendo los 28 pacientes al azar para formar cada uno de los grupos excluidos (Tabla 12).

Por ejemplo, en la primera iteración se dividieron de manera aleatoria los 28 pacientes de los grupos de validación del estudio (14 NCM y 14 GSF) en 5 grupos: (i) 4 NCM y 2 GSF; (ii) 3 NCM y 3 GSF; (iii) 3 NCM y 3 GSF; (iv) 0 NCM y 5 GSF; (v) 4 NCM y 1 GSF (Tabla 12). Al realizar los 5 árboles de decisión para definir 4 grupos de pacientes (cada uno de ellos excluyendo a uno de los 5 grupos), un 92,85% de los pacientes fueron bien clasificados y el 7,15% de los pacientes fueron mal clasificados (estos porcentajes corresponden a la mediana de bien y mal clasificados de los 5 modelos) (Tabla 13).

Pacientes excluidos										
Iteración	1		2		3		4		5	
	NCM	GSF								
1	4	2	3	3	3	3	0	5	4	1
2	1	5	4	2	3	3	2	3	4	1
3	1	5	3	3	3	3	4	1	3	2
4	4	2	3	3	3	3	2	3	2	3
5	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2
6	5	1	2	4	2	4	2	3	3	2
7	3	3	4	2	2	4	2	3	3	2
8	5	1	2	4	2	4	3	2	2	3
9	3	3	4	2	3	3	3	2	1	4
10	2	4	4	2	4	2	2	3	2	3

Tabla 12. Iteraciones de la cross-validación. Se realizaron 10 iteraciones, cada una de ellas escogiendo los 28 pacientes al azar para formar cada uno de los grupos excluidos.

Una vez obtenidos cada uno de los modelos de clasificación, se utilizaron para clasificar a los pacientes excluidos, obteniendo un porcentaje de pacientes bien clasificados y mal clasificados. De esta manera, en la primera iteración un 64% de los pacientes excluidos del modelo fueron bien clasificados, y un 36% fueron mal clasificados (de nuevo, este porcentaje corresponde a la mediana de los 5 modelos creados en cada iteración).

En la Tabla 13 se muestra un resumen de los resultados de la cross-validación para cada una de las 10 iteraciones realizadas. Se puede observar que un 91,7% de los pacientes de los grupos utilizados para hacer el árbol fueron bien clasificados y, además, el 69% del grupo excluido también fue bien clasificado. El hecho de que el

porcentaje de pacientes incluidos en el modelo y bien clasificados fuera superior a los no incluidos podría deberse al reducido tamaño muestral y a la poca estabilidad del árbol.

Iteración validación	% Correcto	% Incorrecto	% Correcto	% Incorrecto
	Incluidos modelo	Incluidos modelo	Excluidos modelo	Excluidos modelo
1	92,85%	7,15%	64,00%	36,00%
2	91,07%	8,93%	79,33%	20,67%
3	91,98%	8,02%	74,67%	25,33%
4	91,07%	8,93%	71,33%	28,67%
5	91,11%	8,89%	72,00%	28,00%
6	88,38%	11,62%	64,00%	36,00%
7	90,95%	9,05%	63,33%	36,67%
8	93,75%	6,25%	68,00%	32,00%
9	92,92%	7,08%	64,67%	35,33%
10	92,89%	7,11%	68,67%	31,33%
Mediana	91,70%	8,30%	69,00%	31,00%

Tabla 13. Pacientes clasificados correcta o incorrectamente en las 10 iteraciones de la cross-validación.

Cabe destacar que en 33 de los 50 árboles que se crearon se realizó la primera partición con la proteína CALB2, lo que da relevancia a la primera decisión del árbol de decisión final. En el resto, la primera partición se llevó a cabo con las proteínas AAT (9 árboles), MRPL17 (5 árboles) y TF (3 árboles).

Se creó una curva ROC, que es un gráfico que ilustra el hecho de utilizar una partición binaria de los datos como un sistema de determinación de la patología. En la Tabla 14 se presentan los resultados del modelo partiendo la muestra en los 4 grupos definidos.

		NCM		GSF		Área	Lower	Upper
n NCM	n GSF	Sensibilidad	Especificidad	Sensibilidad	Especificidad	ROC	Area	Area
14	14	1,00	0,79	0,79	1,00	0,89	0,78	1,00

Tabla 14. Resultados de sensibilidad y especificidad del árbol de decisión según los 4 grupos definidos.
n significa número de pacientes.

Los 14 pacientes con NCM estaban divididos entre los grupos 2 y 3 y todos ellos, se predijo correctamente que eran NCM.

Los 14 pacientes con GSF estaban divididos entre:

- 9 pacientes en el GRUPO 1: predichos como GSF.
- 1 paciente en el GRUPO 2: predicho como NCM.
- 2 pacientes en el GRUPO 3: predichos como GSF.
- 2 pacientes en el GRUPO 4: predichos como GSF.

De esta manera, se obtuvo una $Sensibilidad_{NCM} = \left(\frac{Pacientes\ predichos\ NCM}{Pacientes\ NCM} \right)$, y una

$Especificidad_{NCM} = \left(\frac{Pacientes\ predichos\ GSF}{Pacientes\ GSF} \right)$. Son los mismos que en el caso de la GSF.

Observamos que en ambas patologías (NCM y GSF) se obtuvo un valor de $AUC = 0,89$, con un IC del 95% = [0,78, 1] (Figura 46). Por lo tanto, podemos decir que hacer

predicciones a partir de este modelo podría ser un buen test para saber qué patología padece cada paciente, aunque se debe tener en cuenta que incluir nuevos pacientes con características diferentes podría hacer variar este modelo.

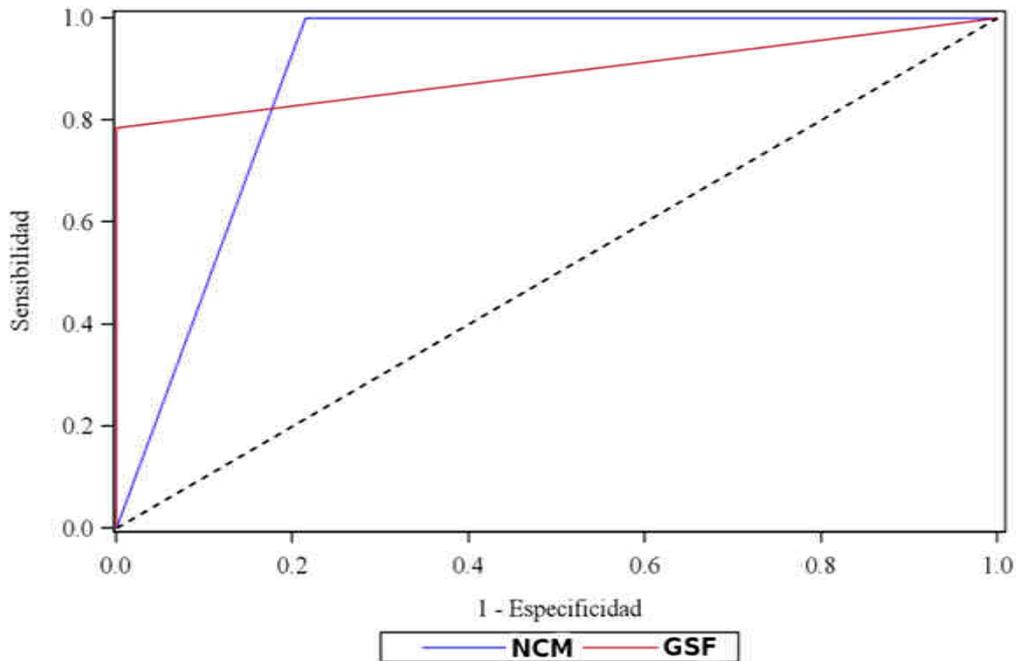


Fig. 46. Curva ROC. Representación gráfica de la sensibilidad frente a la especificidad para el árbol de decisión creado.

Para aumentar la estabilidad de este árbol de decisión se debería aumentar el número de pacientes. Podría de esta manera llegar a ser una herramienta que permitiera predecir la patología del paciente en aquellos casos en que el resultado de la biopsia no permitiera concluir si el paciente padece NCM o bien GSF.

DISCUSIÓN GENERAL

El diagnóstico de las enfermedades renales requiere, en la mayoría de casos, la realización de una biopsia renal, una técnica invasiva no exenta de riesgos y complicaciones. Por este motivo, uno de los desafíos a los que se enfrenta la nefrología moderna es el de identificar biomarcadores que se asocien a patrones anatomopatológicos definidos y que puedan ser utilizados en el diagnóstico de los diferentes tipos de enfermedades renales, así como para predecir el pronóstico, evaluar la progresión y monitorizar los efectos de los tratamientos

En cuanto a las glomerulonefritis, los avances en el conocimiento de su patogenia, sumados al progresivo desarrollo y estandarización de las técnicas de proteómica, han permitido ir identificando un número creciente de moléculas que podrían ser útiles para los fines anteriormente mencionados. En la actualidad, se han propuesto numerosos biomarcadores candidatos, principalmente mediante técnicas proteómicas, pero son todavía datos muy preliminares y se debe demostrar que poseen suficiente sensibilidad y especificidad para su uso en la práctica clínica.

En esta tesis, dentro de las diferentes glomerulonefritis, nos centramos en la NCM y en la GSF que, en ocasiones, no llegan a ser diferenciadas mediante el estudio histológico de la biopsia renal. El diagnóstico erróneo supone someter a pacientes a tratamientos que no les son efectivos y que además conllevan múltiples efectos adversos.

Puesto que un único método proteómico no es capaz de cubrir todas las proteínas y péptidos presentes en un proteoma, debido a la complejidad del mismo, en este

estudio utilizamos dos metodologías diferentes para analizar tanto el peptidoma como el proteoma urinario de los enfermos. Como resultado se lograron identificar algunas proteínas como posibles biomarcadores capaces de distinguir entre NCM y GSF.

Una de las proteínas candidatas fue la AAT. Esta proteína estaba aumentada en pacientes glomerulares al comparar con la población sana. Lo que fue más interesante es que también permitía diferenciar entre NCM y GSF. Mediante 2D-DIGE se observaron varios *spots* que fueron identificados como AAT y que tenían un mayor volumen en la NCM. Posteriormente, se cuantificó esta proteína en la orina de un grupo independiente de pacientes y se encontraron concentraciones más elevadas en aquellos que padecían NCM. Mediante el estudio del peptidoma también se determinó que un péptido de AAT mostraba diferencias entre NCM y GSF, con mayor intensidad en la orina de los pacientes con NCM.

Del estudio del peptidoma, se encontraron varios péptidos de UMOD que mostraban una mayor intensidad en la población sana en comparación con los enfermos glomerulares. Ya estudios previos habían descrito esta diferencia. Además, uno de estos péptidos mostraba diferencias entre NCM y GSF, con una mayor intensidad en la GSF.

Se hallaron otras proteínas mediante 2D-DIGE que también serían interesantes candidatos en el diagnóstico diferencial de la NCM y la GSF. Estas proteínas son: TF, HTN3, MRPL17 y CALB2. Las tres primeras estaban aumentadas en el grupo de pacientes con NCM, mientras que la CALB2 estaba aumentada en el grupo de pacientes con GSF. La validación mediante ELISA corroboró estas diferencias en un

grupo independiente de pacientes. El papel de estas proteínas en la patogenia de las enfermedades NCM y GSF no se conoce, no hay estudios hasta la fecha que las hayan propuesto como marcadores con valor diagnóstico. Sin embargo, los resultados de este estudio apuntan a la utilidad de estas proteínas en el diagnóstico diferencial y no invasivo de la NCM y la GSF.

Las diferencias halladas, tanto a nivel de peptidoma como de proteoma, eran independientes del grado de proteinuria de los pacientes, por lo que ofrecían una información adicional en el diagnóstico de estas enfermedades, ya que la proteinuria por sí sola no es suficiente para diferenciarlas.

En conclusión, dada la dificultad que tiene en algunos casos poder diferenciar entre NCM y GSF mediante la evaluación de las biopsias renales, la validación mediante técnicas sencillas y no invasivas, como las utilizadas en este estudio, podría ayudar a los nefrólogos a confirmar o no el diagnóstico y evitar con ello un tratamiento del paciente innecesario o inadecuado.

No obstante, los resultados de esta tesis son todavía muy preliminares, por lo que consideramos de gran interés que las proteínas y péptidos aquí descritos sean analizados en un mayor número de pacientes para poder quizás algún día ser analizados en la práctica clínica.

Conclusiones

Los estudios previamente resumidos proponen algunos péptidos y proteínas como posibles biomarcadores para el diagnóstico diferencial y no invasivo de pacientes afectados por las enfermedades glomerulares NCM y GSF.

De manera resumida, y en función de los objetivos específicos planteados, estas son las conclusiones finales de los estudios realizados:

OBJETIVO 1: Analizar el PEPTIDOMA urinario de pacientes diagnosticados mediante biopsia renal de NCM y GSF primaria.

- Para el estudio del peptidoma urinario se utilizó espectrometría de masas tipo MALDI-TOF, posterior a un fraccionamiento de las muestras mediante tecnología de esferas magnéticas. Se evaluó la reproducibilidad de esta tecnología, obteniendo como resultado un coeficiente medio de variación inferior al 11%, lo cual apuntaba a que los resultados obtenidos eran altamente reproducibles.
- Se creó un modelo de predicción de clase, mediante el programa informático *ClinProTools*, que permitió diferenciar entre NCM y GSF con una capacidad de reconocimiento del 100% y una validación cruzada del 55%.
- El modelo de predicción clasificó correctamente al 81,8% de pacientes con NCM y al 72,7% de los pacientes con GSF de los grupos de validación.

- Se observaron diferencias significativas en 5 señales m/z al comparar el peptidoma urinario de pacientes con NCM y GSF.
- Los pacientes con GSF mostraron un área del pico mayor en una señal (m/z 1.913,60) correspondiente a un fragmento de UMOD y un área del pico menor en una señal (m/z 2.392,54) correspondiente a un fragmento de AAT, al comparar con pacientes con NCM.
- Se hallaron péptidos de UMOD y AAT que mostraban mayor y menor señal, respectivamente, en el grupo de sujetos sanos en comparación con los pacientes con enfermedad glomerular.
- La señal con m/z 2.713,96, identificada como un fragmento de la proteína beta-2-microglobulina, mostraba mayor área en los sujetos sanos pero no permitía diferenciar entre NCM y GSF.
- El patrón de fragmentación de las proteínas UMOD y AAT podría ser un reflejo de la actividad proteolítica que tiene lugar durante las enfermedades NCM y GSF. La presencia de algunos péptidos específicos en la orina podrían servir como marcadores biológicos de interés en el diagnóstico no invasivo de estas enfermedades.
- Los péptidos encontrados en este estudio son posibles biomarcadores candidatos que deberían ser analizados en estudios con un mayor número de pacientes para determinar su utilidad en la práctica clínica, en el diagnóstico diferencial de la NCM y la GSF.

OBJETIVO 2: Analizar el PROTEOMA urinario de pacientes diagnosticados mediante biopsia renal de NCM y GSF primaria.

- Mediante electroforesis bidimensional DIGE se encontraron diferencias significativas en 242 *spots* al comparar NCM y GSF; el 57,4% de estos *spots* mostraba mayor abundancia en los pacientes con NCM y el 42,6% en los pacientes con GSF.
- Tres *spots* del DIGE, identificados como AAT, mostraban un mayor volumen en el grupo de pacientes con NCM en comparación con el grupo de pacientes con GSF. En concordancia, mediante ELISA, se detectó mayor concentración de esta proteína en la orina de los pacientes con NCM del grupo de validación.
- Un *spot*, identificado como TF, mostraba un mayor volumen en el grupo de pacientes con NCM en comparación con el grupo de pacientes con GSF. Mediante ELISA se observaron diferencias significativas que también mostraban una mayor concentración de TF en los pacientes con NCM del grupo de validación.
- Un *spot*, identificado como histatina-3, mostraba un mayor volumen en el grupo de pacientes con NCM en comparación con el grupo de pacientes con GSF. En la validación mediante ELISA, esta proteína, aunque únicamente se detectó en la orina de 8 pacientes, también se encontraba en mayor concentración en los pacientes que padecían NCM.

- Un *spot*, identificado como MRPL17, mostraba un mayor volumen en el grupo de pacientes con NCM en comparación con el grupo de pacientes con GSF. En la validación mediante ELISA, esta proteína también se encontraba en mayor concentración en los pacientes que padecían NCM.
- Un *spot*, identificado como CALB2, mostraba mayor volumen en el grupo de pacientes con GSF en comparación con el grupo de pacientes con NCM. En la validación mediante ELISA, esta proteína también se encontraba en mayor concentración en la orina de los pacientes que padecían GSF.
- Se creó un árbol de decisión con el objetivo de predecir si un paciente se clasificaba en NCM o GSF. Para ello se definieron 4 grupos de pacientes según umbrales en las concentraciones de las proteínas CALB2, MRPL17 e HTN3. Se obtuvo un valor de AUC = 0,89, con un IC 95% = [0,78, 1], lo cual indicaba que hacer las predicciones a partir de este árbol podría ser un buen test para predecir la patología de cada paciente.

Bibliografía

1. Orth SR, Ritz E. The nephrotic syndrome. *N Engl J Med.* 1998;338: 1202–1211. doi:10.1056/NEJM199804233381707
2. Cameron JS, Hicks J. The origins and development of the concept of a “nephrotic syndrome.” *Am J Nephrol.* 2002;22: 240–247. doi:63768
3. Preuss HG. Basics of renal anatomy and physiology. *Clin Lab Med.* 1993;13: 1–11.
4. L. Hernando Avendaño. *Nefrología Clínica.* 3ª Ed. Ed. Médica Panamericana; 2008.
5. Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev.* 2008;88: 451–487. doi:10.1152/physrev.00055.2006
6. Tryggvason K, Pettersson E. Causes and consequences of proteinuria: the kidney filtration barrier and progressive renal failure. *J Intern Med.* 2003;254: 216–224.
7. Starling EH. The glomerular functions of the kidney. *J Physiol.* 1899;24: 317–330.
8. Sara Anaya, Carmen Vozmediano, Francisco Rivera. Síndromes clínicos en nefrología. 2010; doi:10.3265/Nefrologia.2010.pub1.ed80.chapter2795
9. D’Amico G, Bazzi C. Pathophysiology of proteinuria. *Kidney Int.* 2003;63: 809–825. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00840.x
10. Siddall EC, Radhakrishnan J. The pathophysiology of edema formation in the nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 2012;82: 635–642. doi:10.1038/ki.2012.180
11. Palmer BF, Alpern RJ. Pathogenesis of edema formation in the nephrotic syndrome. *Kidney Int Suppl.* 1997;59: S21–27.
12. Radhakrishnan J, Appel AS, Valeri A, Appel GB. The nephrotic syndrome, lipids, and risk factors for cardiovascular disease. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 1993;22: 135–142.
13. Trevisan R, Dodesini AR, Lepore G. Lipids and renal disease. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2006;17: S145–147. doi:10.1681/ASN.2005121320
14. Rabelink TJ, Zwaginga JJ, Koomans HA, Sixma JJ. Thrombosis and hemostasis in renal disease. *Kidney Int.* 1994;46: 287–296.
15. Kayali F, Najjar R, Aswad F, Matta F, Stein PD. Venous thromboembolism in patients hospitalized with nephrotic syndrome. *Am J Med.* 2008;121: 226–230. doi:10.1016/j.amjmed.2007.08.042

16. Tarry WC, Moser AJ, Makhoul RG. Peripheral arterial thrombosis in the nephrotic syndrome. *Surgery*. 1993;114: 618–623.
17. Kendall AG, Lohmann RC, Dossetor JB. Nephrotic syndrome. A hypercoagulable state. *Arch Intern Med*. 1971;127: 1021–1027.
18. Rubin HM, Blau EB, Michaels RH. Hemophilus and pneumococcal peritonitis in children with the nephrotic syndrome. *Pediatrics*. 1975;56: 598–601.
19. Koomans HA. Pathophysiology of acute renal failure in idiopathic nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2001;16: 221–224.
20. Shibasaki T, Misawa T, Matsumoto H, Abe S, Nakano H, Matsuda H, et al. Characteristics of anemia in patients with nephrotic syndrome. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*. 1994;36: 896–901.
21. Küster S, Mehls O, Seidel C, Ritz E. Blood pressure in minimal change and other types of nephrotic syndrome. *Am J Nephrol*. 1990;10 Suppl 1: 76–80.
22. Koenig KG, Lindberg JS, Zerwekh JE, Padalino PK, Cushner HM, Copley JB. Free and total 1,25-dihydroxyvitamin D levels in subjects with renal disease. *Kidney Int*. 1992;41: 161–165.
23. Whittier WL, Korbet SM. Renal biopsy: update. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004;13: 661–665.
24. Corapi KM, Chen JLT, Balk EM, Gordon CE. Bleeding complications of native kidney biopsy: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2012;60: 62–73. doi:10.1053/j.ajkd.2012.02.330
25. Whittier WL, Korbet SM. Timing of complications in percutaneous renal biopsy. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2004;15: 142–147.
26. Bandari J, Fuller TW, Turner li RM, D’Agostino LA. Renal biopsy for medical renal disease: indications and contraindications. *Can J Urol*. 2016;23: 8121–8126.
27. Cameron JS. Nephrotic syndrome in the elderly. *Semin Nephrol*. 1996;16: 319–329.
28. Keskar V, Jamale TE, Kulkarni MJ, Kiggall Jagadish P, Fernandes G, Hase N. Minimal-change disease in adolescents and adults: epidemiology and therapeutic response. *Clin Kidney J*. 2013;6: 469–472. doi:10.1093/ckj/sft063

29. The primary nephrotic syndrome in children. Identification of patients with minimal change nephrotic syndrome from initial response to prednisone. A report of the International Study of Kidney Disease in Children. *J Pediatr.* 1981;98: 561–564.
30. Shalhoub RJ. Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet Lond Engl.* 1974;2: 556–560.
31. Mathieson PW. Immune dysregulation in minimal change nephropathy. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2003;18 Suppl 6: vi26–29.
32. Grimbert P, Audard V, Remy P, Lang P, Sahali D. Recent approaches to the pathogenesis of minimal-change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2003;18: 245–248.
33. KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis. *Kidney Int Suppl.* 2012;2.
34. Tarshish P, Tobin JN, Bernstein J, Edelmann CM. Prognostic significance of the early course of minimal change nephrotic syndrome: report of the International Study of Kidney Disease in Children. *J Am Soc Nephrol JASN.* 1997;8: 769–776.
35. D'Agati VD, Kaskel FJ, Falk RJ. Focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med.* 2011;365: 2398–2411. doi:10.1056/NEJMra1106556
36. D'Agati V. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Nephrol.* 2003;23: 117–134. doi:10.1053/snep.2003.50012
37. McCarthy ET, Sharma M, Savin VJ. Circulating permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2010;5: 2115–2121. doi:10.2215/CJN.03800609
38. Hickson LJ, Gera M, Amer H, Iqbal CW, Moore TB, Milliner DS, et al. Kidney transplantation for primary focal segmental glomerulosclerosis: outcomes and response to therapy for recurrence. *Transplantation.* 2009;87: 1232–1239. doi:10.1097/TP.0b013e31819f12be
39. Rudnicki M. FSGS Recurrence in Adults after Renal Transplantation. *BioMed Res Int.* 2016;2016: 3295618. doi:10.1155/2016/3295618
40. Artero ML, Sharma R, Savin VJ, Vincenti F. Plasmapheresis reduces proteinuria and serum capacity to injure glomeruli in patients with recurrent focal glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 1994;23: 574–581.

41. Kemper MJ, Wolf G, Müller-Wiefel DE. Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child. *N Engl J Med*. 2001;344: 386–387. doi:10.1056/NEJM200102013440517
42. Lagrue G, Branellec A, Niaudet P, Heslan JM, Guillot F, Lang P. [Transmission of nephrotic syndrome to two neonates. Spontaneous regression]. *Presse Médicale Paris Fr* 1983. 1991;20: 255–257.
43. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291: 1304–1351. doi:10.1126/science.1058040
44. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431: 931–945. doi:10.1038/nature03001
45. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnol Nat Publ Co*. 1996;14: 61–65.
46. Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom JMS*. 2001;36: 1083–1091. doi:10.1002/jms.229
47. Graveley BR. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet TIG*. 2001;17: 100–107.
48. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69: 89–95. doi:10.1067/mcp.2001.113989
49. Ferguson RE, Hochstrasser DF, Banks RE. Impact of preanalytical variables on the analysis of biological fluids in proteomic studies. *Proteomics Clin Appl*. 2007;1: 739–746. doi:10.1002/prca.200700380
50. Fiedler GM, Baumann S, Leichtle A, Oltmann A, Kase J, Thiery J, et al. Standardized peptidome profiling of human urine by magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chem*. 2007;53: 421–428. doi:10.1373/clinchem.2006.077834
51. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*. 1975;26: 231–243.

52. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975;250: 4007–4021.
53. Scheele GA. Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. *J Biol Chem.* 1975;250: 5375–5385.
54. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods.* 1982;6: 317–339.
55. Görg A, Postel W, Günther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 1988;9: 531–546. doi:10.1002/elps.1150090913
56. Rabilloud T. Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis. *Anal Chem.* 2000;72: 48A–55A.
57. Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90: 5011–5015.
58. Unlü M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis.* 1997;18: 2071–2077. doi:10.1002/elps.1150181133
59. Viswanathan S, Unlü M, Minden JS. Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Nat Protoc.* 2006;1: 1351–1358. doi:10.1038/nprot.2006.234
60. Griffin TJ, Goodlett DR, Aebersold R. Advances in proteome analysis by mass spectrometry. *Curr Opin Biotechnol.* 2001;12: 607–612.
61. Wu CC, MacCoss MJ. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr Opin Mol Ther.* 2002;4: 242–250.
62. Florens L, Washburn MP. Proteomic analysis by multidimensional protein identification technology. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2006;328: 159–175. doi:10.1385/1-59745-026-X:159
63. Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE, Warscheid B. Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics.* 2007;7: 340–350. doi:10.1002/pmic.200600422

64. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988;60: 2299–2301.
65. Barber M, Bordoli RS, Garner GV, Gordon DB, Sedgwick RD, Tetler LW, et al. Fast-atom-bombardment mass spectra of enkephalins. *Biochem J.* 1981;197: 401–404.
66. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem.* 2001;70: 437–473. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.437
67. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 1989;246: 64–71.
68. Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem.* 1985;57: 675–679.
69. Markides, K; Gräslund, A. Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry 2002. The Royal Swedish Academy of Sciences; 2002.
70. Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol CB.* 1993;3: 327–332.
71. Mann M, Højrup P, Roepstorff P. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol Mass Spectrom.* 1993;22: 338–345. doi:10.1002/bms.1200220605
72. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* 1999;20: 3551–3567. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2
73. Mørtz E, O'Connor PB, Roepstorff P, Kelleher NL, Wood TD, McLafferty FW, et al. Sequence tag identification of intact proteins by matching tandem mass spectral data against sequence data bases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93: 8264–8267.
74. Vasil'ev YV, Tzeng S-C, Huang L, Maier CS. Protein modifications by electrophilic lipoxidation products: adduct formation, chemical strategies and tandem mass spectrometry for their detection and identification. *Mass Spectrom Rev.* 2014;33: 157–182.
75. Iorio L, Avagliano F. Observations on the Liber medicine orinalibus by Hermogenes. *Am J Nephrol.* 1999;19: 185–188. doi:13449

76. Decramer S, Gonzalez de Peredo A, Breuil B, Mischak H, Monsarrat B, Bascands J-L, et al. Urine in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2008;7: 1850–1862. doi:10.1074/mcp.R800001-MCP200
77. Thongboonkerd V, Malasit P. Renal and urinary proteomics: current applications and challenges. *Proteomics*. 2005;5: 1033–1042. doi:10.1002/pmic.200401012
78. Thongboonkerd V. Urinary proteomics: towards biomarker discovery, diagnostics and prognostics. *Mol Biosyst*. 2008;4: 810–815. doi:10.1039/b802534g
79. Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen JV, Mann M. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol*. 2006;7: R80. doi:10.1186/gb-2006-7-9-R80
80. Spahr CS, Davis MT, McGinley MD, Robinson JH, Bures EJ, Beierle J, et al. Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. I. Profiling an unfractionated tryptic digest. *Proteomics*. 2001;1: 93–107. doi:10.1002/1615-9861(200101)1:1<93::AID-PROT93>3.0.CO;2-3
81. Pieper R, Gatlin CL, McGrath AM, Makusky AJ, Mondal M, Seonarain M, et al. Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. *Proteomics*. 2004;4: 1159–1174. doi:10.1002/pmic.200300661
82. Coon JJ, Zürbig P, Dakna M, Dominiczak AF, Decramer S, Fliser D, et al. CE-MS analysis of the human urinary proteome for biomarker discovery and disease diagnostics. *Proteomics Clin Appl*. 2008;2: 964. doi:10.1002/prca.200800024
83. Segarra-Medrano A, Carnicer-Cáceres C, Arbós-Via MA, Quiles-Pérez MT, Agraz-Pamplona I, Ostos-Roldán E. Biological markers of nephrotic syndrome: a few steps forward in the long way. *Nefrol Publ Of Soc Esp Nefrol*. 2012;32: 558–572. doi:10.3265/Nefrologia.pre2012.Jun.11396
84. Shimada M, Ishimoto T, Lee PY, Lanasa MA, Rivard CJ, Roncal-Jimenez CA, et al. Toll-like receptor 3 ligands induce CD80 expression in human podocytes via an NF- κ B-dependent pathway. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2012;27: 81–89. doi:10.1093/ndt/gfr271
85. Reiser J, Mundel P. Danger signaling by glomerular podocytes defines a novel function of inducible B7-1 in the pathogenesis of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2004;15: 2246–2248. doi:10.1097/01.ASN.0000136312.46464.33

86. Garin EH, Diaz LN, Mu W, Wasserfall C, Araya C, Segal M, et al. Urinary CD80 excretion increases in idiopathic minimal-change disease. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2009;20: 260–266. doi:10.1681/ASN.2007080836
87. Garin EH, Mu W, Arthur JM, Rivard CJ, Araya CE, Shimada M, et al. Urinary CD80 is elevated in minimal change disease but not in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2010;78: 296–302. doi:10.1038/ki.2010.143
88. Cara-Fuentes G, Wei C, Segarra A, Ishimoto T, Rivard C, Johnson RJ, et al. CD80 and suPAR in patients with minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis: diagnostic and pathogenic significance. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 2014;29: 1363–1371. doi:10.1007/s00467-013-2679-1
89. Ishimoto T, Cara-Fuentes G, Wang H, Shimada M, Wasserfall CH, Winter WE, et al. Serum from Minimal Change patients in relapse increases CD80 expression in cultured podocytes. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 2013;28: 1803–1812. doi:10.1007/s00467-013-2498-4
90. Navarro-Muñoz M, Ibernón M, Pérez V, Ara J, Espinal A, López D, et al. Messenger RNA expression of B7-1 and NPHS1 in urinary sediment could be useful to differentiate between minimal-change disease and focal segmental glomerulosclerosis in adult patients. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2011;26: 3914–3923. doi:10.1093/ndt/gfr128
91. Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, Trümper LH, Bonin F von, Kapp U, et al. Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2001;97: 250–255. doi:10.1182/blood.V97.1.250
92. Yap HK, Cheung W, Murugasu B, Sim SK, Seah CC, Jordan SC. Th1 and Th2 cytokine mRNA profiles in childhood nephrotic syndrome: evidence for increased IL-13 mRNA expression in relapse. *J Am Soc Nephrol JASN*. 1999;10: 529–537.
93. Van Den Berg JG, Aten J, Chand MA, Claessen N, Dijkink L, Wijdenes J, et al. Interleukin-4 and interleukin-13 act on glomerular visceral epithelial cells. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2000;11: 413–422.
94. Park SJ, Saleem MA, Nam J-A, Ha T-S, Shin JI. Effects of interleukin-13 and montelukast on the expression of zonula occludens-1 in human podocytes. *Yonsei Med J*. 2015;56: 426–432. doi:10.3349/ymj.2015.56.2.426

95. Mishra OP, Teli AS, Singh U, Abhinay A, Prasad R. Serum immunoglobulin E and interleukin-13 levels in children with idiopathic nephrotic syndrome. *J Trop Pediatr*. 2014;60: 467–471. doi:10.1093/tropej/fmu040
96. Cheung PK, Klok PA, Baller JF, Bakker WW. Induction of experimental proteinuria in vivo following infusion of human plasma hemopexin. *Kidney Int*. 2000;57: 1512–1520. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00996.x
97. Lennon R, Singh A, Welsh GI, Coward RJ, Satchell S, Ni L, et al. Hemopexin Induces Nephrin-Dependent Reorganization of the Actin Cytoskeleton in Podocytes. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2008;19: 2140–2149. doi:10.1681/ASN.2007080940
98. Bakker WW, van Dael CML, Pierik LJWM, van Wijk JAE, Nauta J, Borghuis T, et al. Altered activity of plasma hemopexin in patients with minimal change disease in relapse. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 2005;20: 1410–1415. doi:10.1007/s00467-005-1936-3
99. Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol*. 1993;11: 245–268. doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.001333
100. Mandreoli M, Beltrandi E, Casadei-Maldini M, Mancini R, Zucchelli A, Zucchelli P. Lymphocyte release of soluble IL-2 receptors in patients with minimal change nephropathy. *Clin Nephrol*. 1992;37: 177–182.
101. Bock GH, Ongkingco JR, Patterson LT, Ruley J, Schroepfer LR, Nelson DL. Serum and urine soluble interleukin-2 receptor in idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 1993;7: 523–528.
102. Ayli MD, Duman N, Duranay M, Ateş K, Ayli M, Karatan O, et al. Serum levels of soluble interleukin-2 receptor in patients with primary nephrotic syndrome. *Nephron*. 1998;80: 349–350.
103. Youssef DM, Elbehidy RM, Abdelhalim HS, Amr GE. Soluble interleukine-2 receptor and MDR1 gene expression levels as inflammatory biomarkers for prediction of steroid response in children with nephrotic syndrome. *Iran J Kidney Dis*. 2011;5: 154–161.
104. Wasilewska AM, Zoch-Zwierz WM, Pietruczuk M. Expression of P-glycoprotein in lymphocytes of children with nephrotic syndrome treated with glucocorticoids. *Eur J Pediatr*. 2006;165: 839–844. doi:10.1007/s00431-006-0177-1

105. Mondino A, Blasi F. uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. *Trends Immunol.* 2004;25: 450–455. doi:10.1016/j.it.2004.06.004
106. D’Alessio S, Blasi F. The urokinase receptor as an entertainer of signal transduction. *Front Biosci Landmark Ed.* 2009;14: 4575–4587.
107. Wei C, Möller CC, Altintas MM, Li J, Schwarz K, Zacchigna S, et al. Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nat Med.* 2008;14: 55–63. doi:10.1038/nm1696
108. Koch A, Voigt S, Kruschinski C, Sanson E, Dückers H, Horn A, et al. Circulating soluble urokinase plasminogen activator receptor is stably elevated during the first week of treatment in the intensive care unit and predicts mortality in critically ill patients. *Crit Care Lond Engl.* 2011;15: R63. doi:10.1186/cc10037
109. Sidenius N, Sier CF, Ullum H, Pedersen BK, Lepri AC, Blasi F, et al. Serum level of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor is a strong and independent predictor of survival in human immunodeficiency virus infection. *Blood.* 2000;96: 4091–4095.
110. Sier CF, Stephens R, Bizik J, Mariani A, Bassan M, Pedersen N, et al. The level of urokinase-type plasminogen activator receptor is increased in serum of ovarian cancer patients. *Cancer Res.* 1998;58: 1843–1849.
111. Wei C, El Hindi S, Li J, Fornoni A, Goes N, Sageshima J, et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med.* 2011;17: 952–960. doi:10.1038/nm.2411
112. Vlotides G, Zitzmann K, Stalla GK, Auernhammer CJ. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3)/cardiotrophin-like cytokine (CLC)--a novel gp130 cytokine with pleiotropic functions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15: 325–336. doi:10.1016/j.cytogfr.2004.04.002
113. Savin VJ, McCarthy ET, Sharma R, Charba D, Sharma M. Galactose binds to focal segmental glomerulosclerosis permeability factor and inhibits its activity. *Transl Res J Lab Clin Med.* 2008;151: 288–292. doi:10.1016/j.trsl.2008.04.001
114. Besse-Eschmann V, Le Hir M, Endlich N, Endlich K. Alteration of podocytes in a murine model of crescentic glomerulonephritis. *Histochem Cell Biol.* 2004;122: 139–149. doi:10.1007/s00418-004-0683-z

115. Fatima H, Moeller MJ, Smeets B, Yang H-C, D'Agati VD, Alpers CE, et al. Parietal epithelial cell activation marker in early recurrence of FSGS in the transplant. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2012;7: 1852–1858. doi:10.2215/CJN.10571011
116. Gebeshuber CA, Kornauth C, Dong L, Sierig R, Seibler J, Reiss M, et al. Focal segmental glomerulosclerosis is induced by microRNA-193a and its downregulation of WT1. *Nat Med*. 2013;19: 481–487. doi:10.1038/nm.3142
117. Regele HM, Fillipovic E, Langer B, Poczewki H, Kraxberger I, Bittner RE, et al. Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2000;11: 403–412.
118. Giannico G, Yang H, Neilson EG, Fogo AB. Dystroglycan in the diagnosis of FSGS. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2009;4: 1747–1753. doi:10.2215/CJN.01510209
119. Woroniecki RP, Shatat IF, Supe K, Du Z, Kaskel FJ. Urinary cytokines and steroid responsiveness in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Am J Nephrol*. 2008;28: 83–90. doi:10.1159/000109396
120. L'Imperio V, Smith A, Chinello C, Pagni F, Magni F. Proteomics and glomerulonephritis: A complementary approach in renal pathology for the identification of chronic kidney disease related markers. *Proteomics Clin Appl*. 2016;10: 371–383. doi:10.1002/prca.201500075
121. Candiano G, Musante L, Bruschi M, Petretto A, Santucci L, Del Boccio P, et al. Repetitive fragmentation products of albumin and alpha1-antitrypsin in glomerular diseases associated with nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2006;17: 3139–3148. doi:10.1681/ASN.2006050486
122. Andersen RF, Palmfeldt J, Jespersen B, Gregersen N, Rittig S. Plasma and urine proteomic profiles in childhood idiopathic nephrotic syndrome. *Proteomics Clin Appl*. 2012;6: 382–393. doi:10.1002/prca.201100081
123. Sedic M, Gethings LA, Vissers JPC, Shockcor JP, McDonald S, Vasieva O, et al. Label-free mass spectrometric profiling of urinary proteins and metabolites from paediatric idiopathic nephrotic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;452: 21–26. doi:10.1016/j.bbrc.2014.08.016
124. Suresh CP, Saha A, Kaur M, Kumar R, Dubey NK, Basak T, et al. Differentially expressed urinary biomarkers in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Exp Nephrol*. 2016;20: 273–283. doi:10.1007/s10157-015-1162-7

125. Hellin JL, Bech-Serra JJ, Moctezuma EL, Chocron S, Santin S, Madrid A, et al. Very low-molecular-mass fragments of albumin in the plasma of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2009;54: 871–880. doi:10.1053/j.ajkd.2009.07.011
126. Kalantari S, Nafar M, Rutishauser D, Samavat S, Rezaei-Tavirani M, Yang H, et al. Predictive urinary biomarkers for steroid-resistant and steroid-sensitive focal segmental glomerulosclerosis using high resolution mass spectrometry and multivariate statistical analysis. *BMC Nephrol.* 2014;15: 141. doi:10.1186/1471-2369-15-141
127. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2002;39: S1–266.
128. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72: 248–254.
129. Rabilloud T. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis.* 1996;17: 813–829. doi:10.1002/elps.1150170503
130. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics.* 2004;4: 3665–3685. doi:10.1002/pmic.200401031
131. Schrader M, Schulz-Knappe P. Peptidomics technologies for human body fluids. *Trends Biotechnol.* 2001;19: S55–60. doi:10.1016/S0167-7799(01)01800-5
132. Jia K, Li W, Wang F, Qu H, Qiao Y, Zhou L, et al. Novel circulating peptide biomarkers for esophageal squamous cell carcinoma revealed by a magnetic bead-based MALDI-TOFMS assay. *Oncotarget.* 2016; doi:10.18632/oncotarget.8123
133. Lai ZW, Petrera A, Schilling O. The emerging role of the peptidome in biomarker discovery and degradome profiling. *Biol Chem.* 2015;396: 185–192. doi:10.1515/hsz-2014-0207
134. Good DM, Zürbig P, Argilés A, Bauer HW, Behrens G, Coon JJ, et al. Naturally occurring human urinary peptides for use in diagnosis of chronic kidney disease. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2010;9: 2424–2437. doi:10.1074/mcp.M110.001917

135. He W-T, Liang B-C, Shi Z-Y, Li X-Y, Li C-W, Shi X-L. Weak cation exchange magnetic beads coupled with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry in screening serum protein markers in osteopenia. *SpringerPlus*. 2016;5: 679. doi:10.1186/s40064-016-2276-4
136. Yan Z, Chaojun H, Chuiwen D, Xiaomei L, Xin Z, Yongzhe L, et al. Establishing serological classification tree model in rheumatoid arthritis using combination of MALDI-TOF-MS and magnetic beads. *Clin Exp Med*. 2015;15: 19–23. doi:10.1007/s10238-013-0265-2
137. Lapolla A, Seraglia R, Molin L, Williams K, Cosma C, Reitano R, et al. Low molecular weight proteins in urines from healthy subjects as well as diabetic, nephropathic and diabetic-nephropathic patients: a MALDI study. *J Mass Spectrom JMS*. 2009;44: 419–425. doi:10.1002/jms.1520
138. Magistroni R, Ligabue G, Lupo V, Furci L, Leonelli M, Manganelli L, et al. Proteomic analysis of urine from proteinuric patients shows a proteolytic activity directed against albumin. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2009;24: 1672–1681. doi:10.1093/ndt/gfp020
139. Pérez V, Sánchez-Escuredo A, Lauzurica R, Bayés B, Navarro-Muñoz M, Pastor MC, et al. Magnetic bead-based proteomic technology to study paricalcitol effect in kidney transplant recipients. *Eur J Pharmacol*. 2013;709: 72–79. doi:10.1016/j.ejphar.2013.03.040
140. Zhang X, Leung S-M, Morris CR, Shigenaga MK. Evaluation of a novel, integrated approach using functionalized magnetic beads, bench-top MALDI-TOF-MS with prestructured sample supports, and pattern recognition software for profiling potential biomarkers in human plasma. *J Biomol Tech JBT*. 2004;15: 167–175.
141. Rindler MJ, Naik SS, Li N, Hoops TC, Peraldi MN. Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein/uromuroid) is a phosphatidylinositol-linked membrane protein. *J Biol Chem*. 1990;265: 20784–20789.
142. Devuyst O, Dahan K, Pirson Y. Tamm-Horsfall protein or uromodulin: new ideas about an old molecule. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2005;20: 1290–1294. doi:10.1093/ndt/gfh851
143. Wangsiripaisan A, Gengaro PE, Edelstein CL, Schrier RW. Role of polymeric Tamm-Horsfall protein in cast formation: oligosaccharide and tubular fluid ions. *Kidney Int*. 2001;59: 932–940. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.059003932.x

144. Prajczek S, Heidenreich U, Pfaller W, Kotanko P, Lhotta K, Jennings P. Evidence for a role of uromodulin in chronic kidney disease progression. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2010;25: 1896–1903. doi:10.1093/ndt/gfp748
145. Wu J, Wang N, Wang J, Xie Y, Li Y, Liang T, et al. Identification of a uromodulin fragment for diagnosis of IgA nephropathy. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM.* 2010;24: 1971–1978. doi:10.1002/rcm.4601
146. Lapolla A, Molin L, Sechi A, Cosma C, Ragazzi E, Seraglia R, et al. A further investigation on a MALDI-based method for evaluation of markers of renal damage. *J Mass Spectrom JMS.* 2009;44: 1754–1760. doi:10.1002/jms.1685
147. Abboud RT, Ford GT, Chapman KR, Stnadards Committee of the Canadian Thoracic Society. Alpha1-antitrypsin deficiency: a position statement of the Canadian Thoracic Society. *Can Respir J.* 2001;8: 81–88.
148. Brantly M. Alpha1-antitrypsin: not just an antiprotease: extending the half-life of a natural anti-inflammatory molecule by conjugation with polyethylene glycol. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;27: 652–654. doi:10.1165/rcmb.F250
149. Hill AT, Campbell EJ, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA. Evidence for excessive bronchial inflammation during an acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in patients with alpha(1)-antitrypsin deficiency (PiZ). *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160: 1968–1975. doi:10.1164/ajrccm.160.6.9904097
150. American Thoracic Society, European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168: 818–900. doi:10.1164/rccm.168.7.818
151. Eriksson S, Carlson J, Velez R. Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha 1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med.* 1986;314: 736–739. doi:10.1056/NEJM198603203141202
152. Heegaard NHH. beta(2)-microglobulin: from physiology to amyloidosis. *Amyloid Int J Exp Clin Investig Off J Int Soc Amyloidosis.* 2009;16: 151–173. doi:10.1080/13506120903151775
153. Navarro-Muñoz M, Ibernón M, Bonet J, Pérez V, Pastor MC, Bayés B, et al. Uromodulin and $\alpha(1)$ -antitrypsin urinary peptide analysis to differentiate

- glomerular kidney diseases. *Kidney Blood Press Res.* 2012;35: 314–325. doi:10.1159/000335383
154. Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochem.* 2002;91: 9–18.
155. Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, Navolotskaia O, Ledue TB, Craig WY. Reference distributions for the negative acute-phase serum proteins, albumin, transferrin and transthyretin: a practical, simple and clinically relevant approach in a large cohort. *J Clin Lab Anal.* 1999;13: 273–279.
156. Bernard AM, Amor AA, Goemaere-Vanneste J, Antoine JL, Lauwerys RR, Lambert A, et al. Microtransferrinuria is a more sensitive indicator of early glomerular damage in diabetes than microalbuminuria. *Clin Chem.* 1988;34: 1920–1921.
157. Narita T, Sasaki H, Hosoba M, Miura T, Yoshioka N, Morii T, et al. Parallel increase in urinary excretion rates of immunoglobulin G, ceruloplasmin, transferrin, and orosomucoid in normoalbuminuric type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2004;27: 1176–1181.
158. Li Y, Wang J, Zhu X, Feng Q, Li X, Feng X. Urinary protein markers predict the severity of renal histological lesions in children with mesangial proliferative glomerulonephritis. *BMC Nephrol.* 2012;13: 29. doi:10.1186/1471-2369-13-29
159. Rogers JH. Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J Cell Biol.* 1987;105: 1343–1353.
160. Marchevsky AM. Application of immunohistochemistry to the diagnosis of malignant mesothelioma. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132: 397–401. doi:10.1043/1543-2165(2008)132[397:AOITTD]2.0.CO;2
161. Saydan N, Salicio V, Cappelli-Goetzos B, Goetzos V. Expression of calretinin in human mesothelioma cell lines and cell cycle analysis by flow cytometry. *Anticancer Res.* 2001;21: 181–188.
162. Małydyk J, Rybczyńska J, Piotrowski D, Kozielski R. Evaluation of calretinin immunohistochemistry as an additional tool in confirming the diagnosis of Hirschsprung disease. *Pol J Pathol Off J Pol Soc Pathol.* 2014;65: 34–39.

163. Doglioni C, Dei Tos AP, Laurino L, Iuzzolino P, Chiarelli C, Celio MR, et al. Calretinin: a novel immunocytochemical marker for mesothelioma. *Am J Surg Pathol.* 1996;20: 1037–1046.

Anexo I

*Urinary peptide profiling to differentiate between minimal change disease
and focal segmental glomerulosclerosis.*

PloS One. 2014;9(1):e87731

Urinary Peptide Profiling to Differentiate between Minimal Change Disease and Focal Segmental Glomerulosclerosis

Vanessa Pérez^{1,2}, Meritxell Ibernón¹, Dolores López³, María Cruz Pastor⁴, Maruja Navarro¹, Maribel Navarro-Muñoz^{1,2}, Josep Bonet¹, Ramón Romero^{1,2,5*}

1 Department of Nephrology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Esfera UAB, Badalona, Spain, **2** Laboratory of Experimental Nephrology, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Esfera UAB, Badalona, Spain, **3** Department of Pathology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Esfera UAB, Badalona, Spain, **4** Department of Clinical Biochemistry, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Esfera UAB, Badalona, Spain, **5** Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Esfera UAB, Badalona, Spain

Abstract

Background: Minimal change disease (MCD) and primary focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) are the main causes of primary idiopathic nephrotic syndrome in children and adults, with diagnosis being essential for the appropriate choice of therapy and requiring renal biopsy. However, the presence of only normal glomeruli on renal biopsy of FSGS patients may lead to the misclassification of these patients as having MCD. The aim of this study was to (i) compare the peptide profile of MCD and FSGS patients with that of a group of healthy subjects, (ii) generate and validate a class prediction model to classify MCD and FSGS patients and (iii) identify candidate biomarkers of these glomerular entities by analysis of the urinary peptidome.

Methods: The urinary peptide profile was analyzed by magnetic bead-based technology combined with MALDI-TOF mass spectrometry in 44 patients diagnosed of MCD (n = 22) and FSGS (n = 22). The resulting spectra were compiled and analyzed using ClinProTools software.

Results: A class prediction model was developed to differentiate MCD and FSGS patients. The validation of this model correctly classified 81.8% (9/11) of MCD patients and 72.7% (8/11) of FSGS patients. Moreover, the signal with *m/z* 1913.60, identified as a fragment of uromodulin, and the signal with *m/z* 2392.54, identified as a fragment of alpha-1-antitrypsin, showed higher and lower peak areas, respectively, in FSGS patients compared with MCD patients.

Conclusions: The simple, non-invasive technique described in the present study may be a useful tool to help clinicians by confirming diagnoses achieved by renal biopsy, thereby reducing misdiagnoses and avoiding the implementation of inappropriate therapies.

Citation: Pérez V, Ibernón M, López D, Pastor MC, Navarro M, et al. (2014) Urinary Peptide Profiling to Differentiate between Minimal Change Disease and Focal Segmental Glomerulosclerosis. PLoS ONE 9(1): e87731. doi:10.1371/journal.pone.0087731

Editor: Ivan Cruz Moura, Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), France

Received: September 18, 2013; **Accepted:** December 29, 2013; **Published:** January 30, 2014

Copyright: © 2014 Pérez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (PI10/01424) and the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII-RETICS REDinREN RD06/0016) from Spain. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: Ramon.romero@uab.es

Introduction

Chronic kidney disease is a public health problem worldwide with an increasing incidence and prevalence, poor outcome and high associated costs [1]. The common causes of chronic kidney disease are glomerular diseases, such as minimal change disease (MCD) and focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), which are often associated with nephrotic syndrome in children and adults [2,3].

Renal biopsy is needed to obtain the definitive diagnosis of glomerular diseases, to establish the prognosis, and to choose the most appropriate therapy. However, the invasiveness of this technique may result in complications and may be contraindicated in some cases [4,5,6]. Renal biopsy evaluation requires examina-

tion of the tissue under light, immunofluorescence, and electron microscopy, and an adequate sample size must be obtained, with a minimum number of glomeruli to demonstrate renal injury in cases of focal lesions [7,8].

Light microscopy reveals apparently normal glomeruli in MCD and segmental sclerosis in some but not all glomeruli in FSGS. Accordingly, renal biopsies of FSGS patients showing only normal glomeruli may lead to the misclassification of these patients as MCD, especially in the earlier, pre-scarring stages of the disease.

Patients with MCD usually respond to corticosteroid therapy but a considerable number of patients with FSGS are dependent on or resistant to this treatment [9,10]. Thus, the different

treatment approaches and the toxicity of corticosteroids make it especially interesting to differentiate between these disorders.

Physiological and pathological processes may be reflected by peptides and proteins present in blood, urine and other body fluids. Proteins are differentially expressed as a consequence of the development of a disease and are, thus, very valuable as potential diagnostic biomarkers. In the case of kidney diseases, the urinary proteome has been extensively investigated [11,12,13,14]. Urine is an ideal source of biomarkers because it can be obtained noninvasively, in large amounts and at minimum cost. Moreover, the protein and peptide content of urine is relatively homogeneous, probably because urine remains in the bladder for several hours and proteolytic degradation by endogenous proteases is completed before voiding [15].

In the last decade, mass spectrometry (MS) has been the method of choice for the analysis of peptides and small proteins in biological fluids. To reduce the complexity of biological samples prior to MS analysis, functionalized magnetic beads have been designed, which allow the capture and purification of peptides and small proteins and also allow the removal of salts to increase the sensitivity of the analysis. The combination of magnetic beads with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) MS has become a promising approach in the field of biomarker discovery and proteomic pattern diagnostic since it enables the rapid study of thousands of peptides and small proteins simultaneously with only a small sample volume and with high sensitivity. Moreover, the reproducibility of this approach may be improved by automation in a liquid-handling platform. This proteomic approach has been successfully used to profile the peptidome of different biological fluids [16,17,18,19,20,21].

The objectives of our study were to (i) compare the peptide profile of MCD and FSGS patients with that of a group of healthy subjects, (ii) generate and validate a class prediction model able to classify MCD and FSGS patients, and (iii) identify potential biomarkers that discriminate between MCD and FSGS patients.

Subjects and Methods

Subjects and Sample Collection

This prospective study included Caucasian patients older than 18 years, with clinical signs of nephrotic syndrome, such as proteinuria, with stable renal function. Only patients with a clinical and histological diagnosis of MCD (n = 22) and primary FSGS (n = 22; 58% FSGS not otherwise specified, 14% perihilar variant, 9% cellular variant, 14% tip variant, and 5% collapsing variant) were included. Cases of clinical or pathological features indicating a secondary cause such as autoimmune diseases, infections, cancer or exposure to nephrotoxic drugs were excluded.

Twenty-three of the 44 patients had also been studied in a previous report [12]. However, the urinary peptide profile of these patients was generated again to minimize intra-assay variations.

Urine and blood samples were collected the day of renal biopsy, prior to performing it.

Urine samples from 16 healthy subjects (10 females, 37±13 years) with normal renal function were collected to establish a normal urinary peptide profile.

The Clinical Research Ethics Committee of Germans Trias i Pujol Hospital approved the study protocol, and all patients gave written informed consent to participate.

Renal Biopsy

Histological diagnosis was achieved by percutaneous renal biopsy performed before initiating corticosteroid or immunosuppressive therapy.

Biopsies were carried out using a Bard Monopty Disposable Core Biopsy Instrument (Bard Biopsy Systems, Tempe, AZ, USA) and processed for light, immunofluorescence, and electron microscopy following standard procedures. Light microscopy sections were stained with hematoxylin/eosin, Schiff's periodic acid, methenamine silver, Masson's trichrome and Congo red. Immunofluorescence assays were performed by incubating cryostat sections with polyclonal fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibodies against IgG, IgM, IgA, C3 fraction, C1q, C4, kappa and lambda chains and fibrinogen (Dako Corporation, Copenhagen, Denmark).

Study Design

MCD and FSGS patients were randomly subdivided into a preliminary training group for the generation of a class prediction model (11 MCD patients and 11 FSGS patients) and a validation group (11 MCD patients and 11 FSGS patients).

The spectral data obtained from the whole study population was also used for the identification of peptide signals differentially expressed among MCD patients, FSGS patients and healthy subjects.

Biochemical Estimations

Biochemical variables were determined with a routine clinical chemistry laboratory analyzer immediately after extraction. Serum levels of total cholesterol and triglycerides were determined by conventional enzymatic methods.

Serum creatinine levels were determined using a modified Jaffe kinetic reaction (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Twenty-four hour proteinuria was measured spectrophotometrically on a Cobas u 711 analyzer (Roche Diagnostics). The glomerular filtration rate was calculated using the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) formula.

Peptidome Isolation

Urine samples were centrifuged at 2,100 g for 30 minutes at 4°C to remove cellular debris. The supernatant was recovered, adjusted to neutral pH with 1 M NH₄HCO₃, aliquoted, and immediately frozen at -80°C until processing.

Samples were thawed and pre-fractionated using Dynabeads RPC18 (Invitrogen, Breda, The Netherlands). Samples were processed in duplicate following the manufacturer's protocol but modified for optimization purposes, as described previously [22]. Fifteen microliters of peptide eluate were obtained from each sample, diluted 1:5 with LC-grade water (Lab-Scan, Gliwice, Poland), and mixed 1:2 with matrix solution (1.84 mg/ml 2,6-dihydroxyacetophenone, 20% acetonitrile, 40 mmol/l ammonium citrate dibasic). Of the resulting mixture, 1 µl was spotted in duplicate onto the sample anchor spots of an AnchorChip 600/384 target plate (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and allowed to air-dry at room temperature to let the matrix crystallize. Four spots of each sample were analyzed by MALDI-TOF MS. ClinProt Peptide Calibration Standard I (Bruker Daltonics), a commercially available mixture of protein/peptide calibrators, was mixed 1:1 with matrix solution and 0.4 µl were deposited onto calibrant anchor spots of the AnchorChip target plate for instrument calibration.

Robotics

Automation of the complete magnetic bead pre-fractionation and AnchorChip target plate loading was performed on a liquid-handling robotic platform (Freedom Evo, Tecan, Männedorf,

Switzerland) to improve throughput and ensure assay reproducibility.

MALDI-TOF MS

Mass spectrometry analyses were performed in an UltrafleX-treme MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics). Ionization was achieved by irradiation with a 337-nm nitrogen laser operating in linear positive ion mode geometry, with a repetition rate of 1,000 Hz. Each spectrum was acquired manually with 300 laser shots delivered randomly over the surface of the spot at a fixed laser power of 70%. Operating conditions were as follows: ion source voltages, 25 and 22.40 kV; reflector 1, 26.45 kV; reflector 2, 13.40 kV; pulsed ion extraction time, 300 ns. Spectra were externally calibrated, achieving a mass accuracy lower than 10 ppm. Peaks with a signal-to-noise ratio >3 in the m/z range of 1–10 kDa were recorded with the FlexControl acquisition software v3.4 (Bruker Daltonics).

Bioinformatics

Due to the duplicates in pre-fractionation and in AnchorChip target plate loading, 4 spectra were obtained from each sample. A detailed analysis was performed with DataAnalysis software v3.4 (Bruker Daltonics) in order to choose the best spectrum for each sample. Spectra with the highest number of peaks and the highest intensity were selected. To assess the reproducibility of the magnetic bead-based technology used in this study, we analyzed the 4 replicated spectra obtained from 5 random samples. Six m/z signals were randomly selected to calculate the coefficient of variance of their peak area.

ClinProTools software v2.2 (Bruker Daltonics) was used to process MALDI-TOF MS spectra according to the following standard workflow: baseline subtraction to remove broad structures, normalization of spectra to their own total ion count, recalibration of spectra using the most prominent peaks, calculation of total average spectrum, peak area detection on the total average spectrum, and area calculation of each peak.

The generation of a class prediction model able to differentiate between MCD and FSGS patients was achieved with the Support Vector Machine (SVM) algorithm. Only spectra from the training groups were used, and the number of input peaks was automatically detected based on clustering of the peak rankings as determined by the SVM. The algorithm determines optimal separation planes between the different data classes. To determine the accuracy of the class prediction model the software offers values of cross validation and recognition capability. Cross validation is a measure for the reliability of a calculated model and can be used to predict how a model will behave in the future. This method is used for evaluating the performance of a classifier for a given data set and under a given parameterization. Recognition capability describes the performance of an algorithm, i.e., the proper classification of a given data set.

The model generated was further tested with spectral data from the validation groups.

For statistical analyses, peak area data provided by ClinProTools software was converted to ASCII files, exported to Excel spreadsheets and analyzed with SPSS software v15.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA).

Protein Identification

Protein identification was conducted by HPLC-MS/MS as described in a previous report [12].

Statistical Analysis

Continuous variables were expressed as medians (interquartile ranges). Differences between groups were tested by the non-parametric Mann-Whitney U test. Categorical variables were analyzed with the chi-square or Fisher's exact probability test. Associations between biochemical variables and the peak area of the m/z signals were estimated using the Spearman's correlation coefficient. Statistical analyses were performed with the SPSS software v15.0. A p-value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Demographic and Clinical Characteristics

Demographic and clinical characteristics of glomerular patients, randomly divided into training or validation group, are presented in Table 1.

Regarding age, no significant differences were found between patients in training and validation groups. There were no significant differences in patients' age of both training groups.

Differences in renal function were observed between patients of both training groups, with higher levels of serum creatinine in FSGS patients. No differences in proteinuria levels were found between these patients (Figure 1).

Reproducibility of Urinary Peptide Profiling

The reproducibility of the technology used in this study was assessed by analyzing the spectral data from 5 randomly selected samples. The peak area of 6 m/z signals showed a mean coefficient of variance below 11% (Table 2).

Class Prediction Model

The spectra obtained from the training groups were analyzed by ClinProTools software to generate a class prediction model. Seven regions of the spectra, with m/z 1798.56, 1913.60, 2392.54, 2408.26, 2642.26, 2939.95 and 3004.65, were used for classification. The model allowed distinguishing between MCD and FSGS patients with a recognition capability of 100% and a cross validation of 55%.

Validation of the Class Prediction Model

To verify the accuracy of the established classification model, the spectra from the validation groups were tested. The model correctly classified 81.8% (9/11) of samples from MCD patients and 72.7% (8/11) of samples from FSGS patients (Table 3).

Differentially Expressed Peptides between Glomerular Patients and Healthy Subjects

Urinary peptide profiles of glomerular patients differed significantly from those of healthy subjects (Table 4). Twenty-two signals discriminated MCD patients from healthy subjects; seven signals, with m/z 1769.38, 1898.37, 1913.60, 2713.96, 2976.97, 3004.65 and 3389.12, showed a higher peak area and 15 signals, with m/z 1945.50, 1961.71, 2305.01, 2378.07, 2392.54, 2408.26, 2491.41, 2505.64, 2521.45, 2543.26, 2642.26, 2939.95, 3161.72, 3226.48 and 4013.38, showed a lower peak area in healthy subjects.

Twenty signals showed statistically different area (Table 4) on comparing healthy subjects with FSGS patients; six signals, with m/z 1898.37, 1913.60, 2713.96, 2976.97, 3004.65 and 3389.12, showed a higher peak area and 14 signals, with m/z 1831.61, 1945.50, 1961.71, 2305.01, 2378.07, 2392.54, 2408.26, 2491.41,

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the study population.

	MCD			FSGS				
	Training	Validation	P_{T-V}	Training	Validation	P_{T-V}	P_{T-T}	P_{V-V}
No. of subjects	11	11		11	11			
Age (years)	38 (28–68)	68 (28–75)	0.374	57 (31–62)	55 (33–65)	0.718	0.358	0.490
Female/male ratio	4/7	3/8		3/8	4/7			
BMI (kg/m ²)	24.2 (22.1–33.8)	26.4 (24.7–34.6)	0.497	25.9 (23.1–26.7)	25.3 (22.1–26.3)	0.288	0.778	0.223
TG (mg/dl)	230 (176–365)	163 (108–232)	0.070	239 (129–360)	114 (70–166)	0.056	0.923	0.266
TC (mg/dl)	362 (274–477)	278 (226–346)	0.151	217 (180–320)	197 (178–247)	0.602	0.076	0.071

Data are shown as median (interquartile range). Differences between groups were tested using the non-parametric Mann-Whitney U test. P_{T-V} shows P value between training and validation groups, P_{T-T} between training groups, and P_{V-V} between validation groups of both glomerular entities. A P value less than 0.05 was considered significant.

BMI: body mass index; TG: triglycerides; TC: total cholesterol.

doi:10.1371/journal.pone.0087731.t001

2505.64, 2521.45, 2543.26, 2642.26, 2678.13 and 3226.48, showed a lower peak area in healthy subjects.

Differentially Expressed Peptides between MCD and FSGS Patients

Statistically significant differences in 5 signals were observed on comparing the peptide profile of MCD and FSGS patients (Table 4). One signal, with m/z 1913.60, showed a higher peak area and 4 signals, with m/z 2392.54, 2408.26, 2976.97 and 3161.72, showed a lower peak area in FSGS patients compared with MCD patients.

Peptide Identifications

Signals with m/z 1898.37 and 1913.60 have been identified in previous reports as fragments of uromodulin (UMOD; Swiss-Prot accession No.: P07911; *Homo sapiens*; the amino acid sequences matched were 591–607 and 589–606, respectively) [12]. These signals showed a higher peak area in healthy subjects compared with MCD and FSGS patients. FSGS patients showed a higher peak area in signal m/z 1913.60 than MCD patients (Figure 2).

Signals with m/z 1945.50, 1961.71, 2392.54, 2505.64 and 2521.45 have been identified in previous reports as fragments of alpha-1-antitrypsin (A1AT; Swiss-Prot accession No.: P; *Homo sapiens*; the amino acid sequences matched were 378–394, 378–

394, 398–418, 397–418, and 397–418, respectively) [12]. These signals showed a lower peak area in healthy subjects compared with MCD and FSGS patients. A lower peak area in signal with m/z 2392.54 was observed in FSGS patients on comparing with MCD patients (Figure 3).

Signal with m/z 2713.96, identified as a fragment of beta-2-microglobulin (B2M; Swiss-Prot accession No.: P61769; *Homo sapiens*; the amino acid sequence matched was 59–81) [12], showed a higher peak area in healthy subjects compared with MCD and FSGS patients.

Signal with m/z 1831.61, identified as a fragment of serum albumin protein (ALB; Swiss-Prot accession No.: P02768; *Homo sapiens*; the amino acid sequence matched was 432–447) [12], showed a lower peak area in healthy subjects compared with FSGS patients, but no differences were found on comparing healthy subjects with MCD patients.

We analyzed correlations of signals corresponding to fragments of UMOD, A1AT, B2M and ALB with patients' age, gender, serum creatinine, MDRD and proteinuria levels to determine whether any clinical parameter influenced these results, but no association was observed.

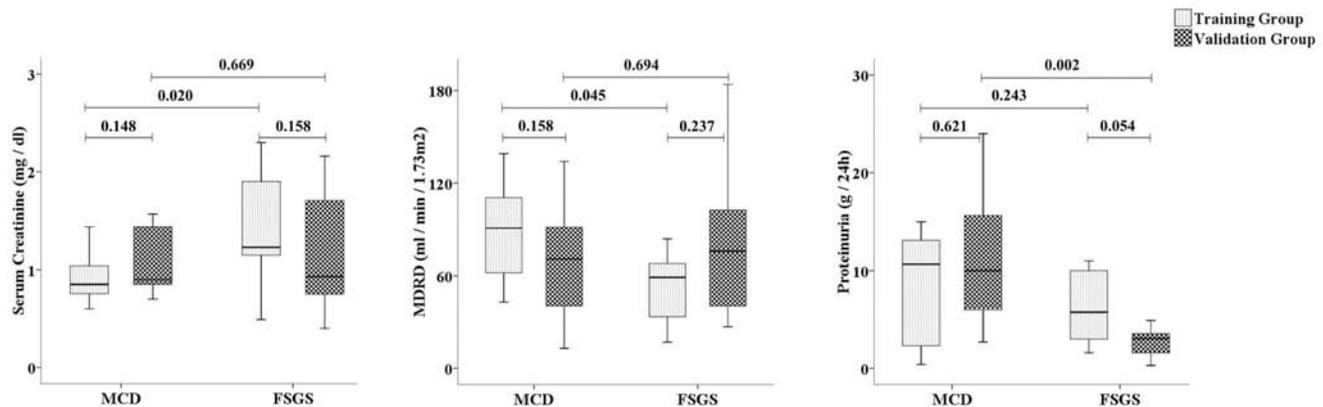


Figure 1. Box plots comparing the renal function of MCD and FSGS patients in the training and validation groups. a) Serum creatinine levels; b) MDRD formula and c) 24 h-proteinuria. The boxes indicate median and 25th and 75th percentiles. Data were compared using the Mann-Whitney U test. A $P < 0.05$ was considered significant.

doi:10.1371/journal.pone.0087731.g001

Table 2. Reproducibility of urinary peptide profiling by magnetic-bead technology in combination with MALDI-TOF MS analysis.

			<i>m/z</i>						
			1798.56	1913.60	2392.54	2408.26	2642.26	2939.95	3004.65
Urine sample #1	Peak Area (a.u.)	Rep 1	13.57	14.79	31.64	55.2	26.08	37.39	37.58
		Rep 2	13.49	12.40	32.35	45.54	25.55	37.61	31.29
		Rep 3	12.09	11.79	26.90	41.87	26.80	43.06	38.00
		Rep 4	15.36	15.88	32.95	48.49	25.98	36.93	34.00
		CV (%)	9.82	14.12	8.91	11.81	1.99	7.46	9.01
Urine sample #2	Peak Area (a.u.)	Rep 1	21.07	294.10	20.88	24.04	14.01	19.71	46.64
		Rep 2	26.71	235.66	22.32	26.24	12.68	20.46	49.63
		Rep 3	20.87	270.95	23.06	23.33	13.30	19.79	50.17
		Rep 4	27.25	368.98	24.53	26.52	12.91	17.49	46.88
		CV (%)	14.50	19.29	6.69	6.35	4.41	6.67	3.78
Urine sample #3	Peak Area (a.u.)	Rep 1	20.00	11.12	102.17	146.83	19.26	21.16	113.13
		Rep 2	21.92	10.51	116.68	173.27	20.05	18.57	104.43
		Rep 3	18.05	10.79	108.95	147.57	22.97	19.74	108.97
		Rep 4	19.82	11.21	100.57	145.21	22.85	23.88	109.32
		CV (%)	7.95	2.94	6.86	8.75	8.96	10.97	3.27
Urine sample #4	Peak Area (a.u.)	Rep 1	13.29	126.69	20.90	49.75	17.56	17.26	101.82
		Rep 2	12.17	131.38	21.87	50.44	17.10	15.02	113.95
		Rep 3	15.21	138.46	21.23	46.74	17.45	17.33	88.43
		Rep 4	14.16	149.39	25.55	64.31	17.22	17.15	106.11
		CV (%)	9.43	7.23	9.59	14.83	1.22	6.69	10.42
Urine sample #5	Peak Area (a.u.)	Rep 1	11.38	12.20	90.32	61.88	33.43	51.34	50.29
		Rep 2	11.58	11.15	112.10	67.35	34.04	56.13	58.17
		Rep 3	11.59	12.91	114.72	71.03	37.43	57.25	48.92
		Rep 4	10.47	11.18	105.45	64.47	41.61	62.21	62.77
		CV (%)	4.74	7.21	10.35	5.94	10.26	7.86	11.94
Mean CV (%)			9.29	10.16	8.48	9.53	5.37	7.93	7.68

Peak area, in arbitrary units (a.u.), of the 7 peaks used for the generation of the class prediction model from 5 randomly selected urine samples processed in quadruplicate.

Rep: replicate; CV: coefficient of variance.

doi:10.1371/journal.pone.0087731.t002

Discussion

Our results revealed differences in the urinary peptide profile on comparing glomerular patients with healthy subjects. Furthermore, a class prediction model able to classify MCD and FSGS patients was generated.

During the last decade, proteomic studies based on magnetic bead technology combined with MS readout have demonstrated

the utility of this approach in profiling the low-molecular-weight proteome of different biological fluids [16,17,23,24]. The reproducibility of this type of profiling within and between days has been evaluated [25,26]. In our study, a standardized protocol for sample collection and processing, including the use of a robotic platform, was strictly followed to minimize variations. Indeed, the intra-assay imprecision achieved was less than 11%, indicating that the results obtained with this methodology are highly reproducible for peptidome profiling of human urine.

Urinary proteomics has been widely performed to identify biomarkers of clinical diseases, mainly of those affecting the kidney [11,12,13,14,27,28]. Within the group of kidney diseases, those affecting the glomerulus have been studied and potential biomarkers have been proposed, but none has been confirmed to discriminate between the different entities [28,29]. In a previous study we identified differentially expressed urinary peptides which allowed distinguishing between glomerular kidney disease patients and healthy subjects [12]. We therefore endeavored to search for non-invasive biomarkers able to differentiate FSGS and MCD patients because of the need for specific treatment in each disease and diagnosis by renal biopsy may be confounded if the sample does not include the affected portion of the kidney. Consequently,

Table 3. Evaluation of the class prediction model generated with ClinProTools software using spectral data from the validation groups.

	Validation groups	
	MCD (n = 11)	FSGS (n = 11)
Classified as MCD (n)	9	3
Classified as FSGS (n)	2	8
Correctly classified (%)	81.8	72.7

doi:10.1371/journal.pone.0087731.t003

Table 4. Peak area of urinary peptides of the study population.

m/z	Healthy subjects		MCD patients		FSGS patients		Healthy vs. MCD		Healthy vs. FSGS		MCD vs. FSGS		Protein	Swiss-Prot accession number
	Peak area	P	Peak area	P	Peak area	P	Fold ^(a)	P	Fold ^(b)	P	Fold ^(c)	P		
1769.38	41.2 (27.6–81.0)	0.017	17.7 (9.0–41.2)	0.017	42.2 (15.8–96.2)	0.017	1.3	0.806	0.099					
1831.61	9.2 (5.9–15.8)	0.071	12.4 (9.2–17.0)	0.071	14.8 (8.3–112.0)	0.071	0.1	0.030	0.1	0.512			ALB	P02768
1898.37	77.4 (59.8–139.6)	<0.001	19.4 (12.0–29.6)	<0.001	21.4 (10.9–34.8)	<0.001	4.1	<0.001	3.0	0.808			UMOD	P07911
1913.60	378.2 (346.1–644.6)	<0.001	18.0 (10.1–45.8)	<0.001	41.0 (14.2–138.8)	<0.001	15.4	<0.001	5.5	0.039	0.4		UMOD	P07911
1945.50	7.9 (6.0–11.1)	<0.001	56.6 (17.9–170.3)	<0.001	50.4 (31.9–170.9)	<0.001	0.1	<0.001	0.1	0.942			A1AT	P01009
1961.71	11.0 (8.0–14.9)	0.021	21.1 (9.9–67.8)	0.021	14.2 (11.7–66.1)	0.021	0.2	0.037	0.4	0.610			A1AT	P01009
2305.01	6.4 (5.3–8.7)	0.005	12.3 (8.7–20.3)	0.005	10.7 (8.9–20.2)	0.005	0.3	0.001	0.1	0.884				
2378.07	16.8 (15.2–19.7)	<0.001	39.5 (27.4–146.4)	<0.001	29.7 (18.6–61.7)	<0.001	0.1	0.005	0.2	0.080				
2392.54	13.4 (12.0–16.9)	<0.001	217.4 (83.1–319–4)	<0.001	95.5 (28.1–194.8)	<0.001	0.1	<0.001	0.1	0.024	1.7		A1AT	P01009
2408.26	12.5 (10.2–15.9)	<0.001	58.1 (41.1–119.1)	<0.001	37.7 (17.8–55.4)	<0.001	0.2	<0.001	0.3	0.016	1.8			
2491.41	12.4 (8.6–18.5)	<0.001	53.8 (25.2–110.7)	<0.001	25.6 (18.5–65.5)	<0.001	0.2	0.001	0.3	0.109				
2505.64	5.6 (4.5–14.8)	<0.001	99.3 (47.5–201.4)	<0.001	94.0 (26.9–161.9)	<0.001	0.1	<0.001	0.1	0.451			A1AT	P01009
2521.45	8.3 (6.7–10.5)	<0.001	35.1 (16.9–62.8)	<0.001	25.7 (12.5–50.3)	<0.001	0.2	<0.001	0.2	0.343			A1AT	P01009
2543.26	8.9 (7.1–12.3)	0.000	20.8 (15.2–30.4)	0.000	23.1 (18.0–70.5)	0.000	0.5	<0.001	0.2	0.159				
2642.26	5.8 (4.9–7.5)	0.001	16.3 (7.4–27.6)	0.001	18.2 (11.7–143.5)	0.001	0.3	<0.001	0.1	0.132				
2678.13	12.6 (10.3–19.4)	0.076	22.0 (14.3–33.3)	0.076	21.6 (14.8–27.7)	0.076	0.4	0.037	0.4	0.923				
2713.96	55.5 (38.9–77.5)	0.029	35.0 (23.8–53.1)	0.029	28.3 (17.8–45.6)	0.029	1.4	<0.001	2.0	0.224			B2M	P61769
2939.95	16.9 (14.7–21.8)	0.007	23.2 (18.2–58.0)	0.007	20.0 (13.5–71.3)	0.007	0.2	0.232	0.593					
2976.97	60.4 (44.1–70.5)	0.005	38.4 (15.7–55.0)	0.005	14.4 (8.8–30.4)	0.005	1.7	<0.001	3.4	0.008	2.0			
3004.65	118.8 (73.2–166.7)	0.011	49.6 (16.1–110.3)	0.011	31.4 (12.4–96.0)	0.011	1.7	0.001	2.4	0.285				
3161.72	19.9 (16.3–26.6)	0.009	52.9 (18.4–87.5)	0.009	20.6 (9.2–39.6)	0.009	0.3	0.806	0.011	2.8				
3226.48	14.8 (11.0–17.3)	0.002	19.8 (16.1–28.2)	0.002	18.7 (15.2–46.1)	0.002	0.6	0.023	0.3	0.752				
3389.12	119.1 (93.2–165.0)	<0.001	42.0 (17.7–58.0)	<0.001	23.3 (9.0–50.9)	<0.001	2.0	<0.001	3.8	0.072				
4013.38	45.5 (30.8–54.3)	0.010	70.7 (48.1–130.3)	0.010	55.5 (23.9–98.7)	0.010	0.4	0.270	0.253					

Data are expressed in arbitrary units as median (interquartile ranges). The nonparametric Mann Whitney U test was performed to assess differences.

^(a)Ratio between the median values of the peak area in healthy subjects and MCD patients.

^(b)Ratio between the median values of the peak area in healthy subjects and FSGS patients.

^(c)Ratio between the median values of the peak area in MCD and FSGS patients.

ALB: albumin; UMOD: uromodulin; A1AT: alpha-1-antitrypsin; and B2M: beta-2-microglobulin.

doi:10.1371/journal.pone.0087731.t004

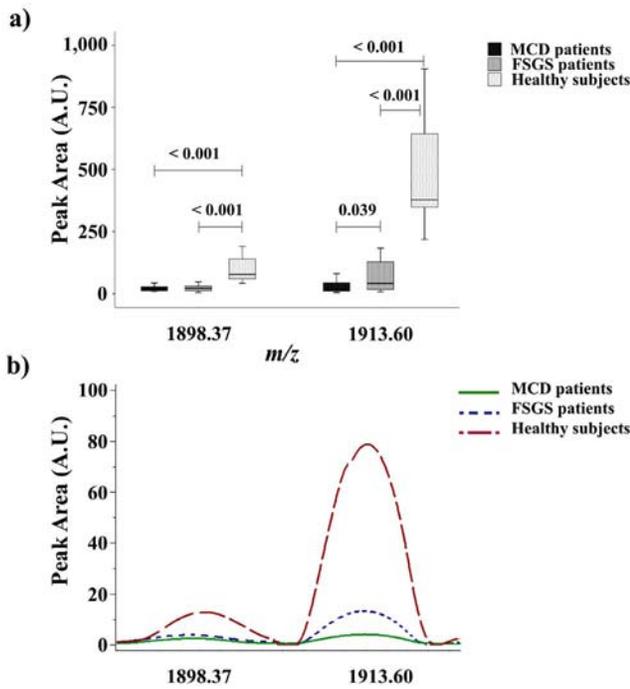


Figure 2. Uromodulin peptides (m/z 1898.37 and 1913.60) in urine from glomerular disease patients and healthy subjects. a) Box plot showing urinary expression of uromodulin peptides in MCD, FSGS patients and healthy subjects. b) ClinProTools image showing the average intensity, in arbitrary units, of uromodulin peptides in MCD, FSGS patients and healthy subjects. doi:10.1371/journal.pone.0087731.g002

in the present study we included patients diagnosed with MCD or FSGS in order to develop a class prediction model able to differentiate between these entities.

The model generated correctly classified 81.8% and 72.7% of MCD and FSGS patients from validation groups, respectively.

In addition to creating the classification model, we considered it to be of interest to compare the urinary peptidome of patients of both glomerular entities with the aim of determining the presence of differentially expressed peptides between them. Identification of the proteins to which these peptides belong could help to gain more insight into the pathological mechanisms involved in these diseases.

Interestingly, although 18 urinary peptides showed a similar peak area on comparing MCD and FSGS patients, some differences were observed in other peptides; FSGS patients showed a higher peak area in one signal corresponding to a fragment of UMOD and a lower peak area in one signal corresponding to a fragment of A1AT. Our results also showed that healthy subjects had higher areas in signals of UMOD peptides and lower areas in signals of A1AT peptides compared to patients with glomerular diseases. The area of these signals was independent of the degree of proteinuria, thus offering additional information in the diagnosis of these diseases, since proteinuria alone is not enough to differentiate between glomerular entities.

UMOD, also known as the Tamm-Horsfall protein, is the most abundant urinary protein in healthy individuals; it is synthesized exclusively in the kidney, on the epithelial cells of the thick ascending limb (TAL) of Henle's loop [30]. Although the physiological role of this protein remains unclear, recent studies have proposed low levels of UMOD as a biomarker of renal disease [14,31]. In this regard, our results are in agreement. The peak area of the signal m/z 1913.60, corresponding to a peptide of UMOD, showed a higher peak area in healthy subjects and also allowed differentiation between MCD and FSGS patients, with higher values in the latter; underexpression of this UMOD peptide has been previously described in patients with advanced renal disease and diabetic patients and may be due to an alteration of the apical membrane of the TAL epithelial cells [32,33].

A1AT is a major protease inhibitor in human serum that inhibits neutrophil elastase [34]. Its deficiency is associated with

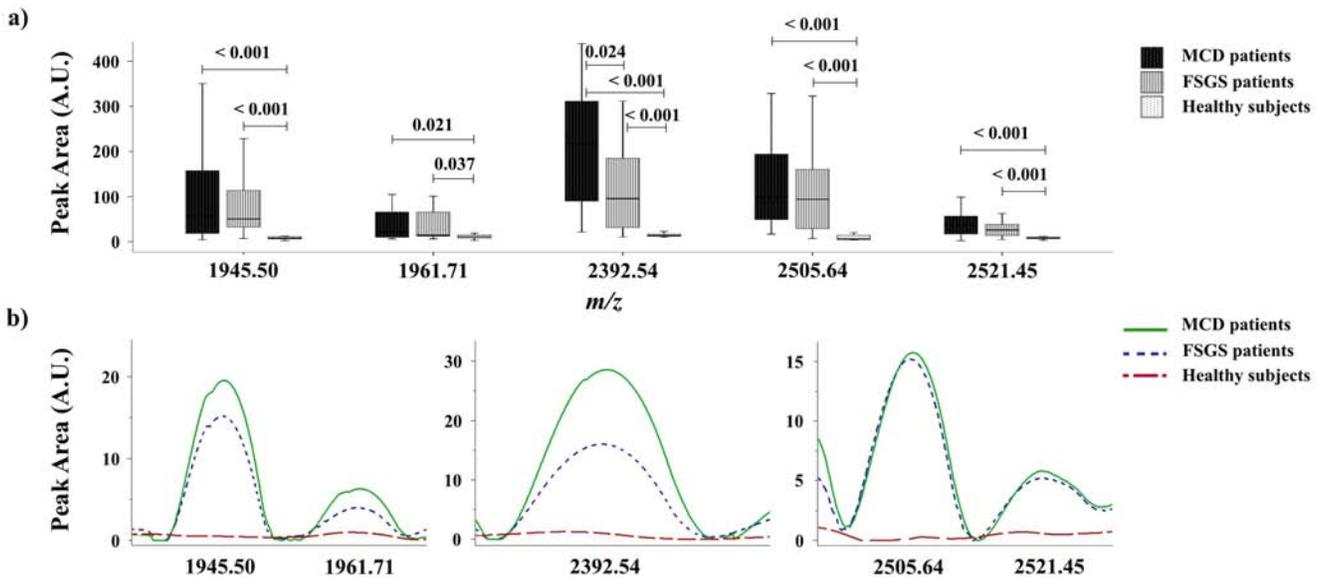


Figure 3. Alpha-1-antitrypsin peptides (m/z 1945.50, 1961.71, 2392.54, 2505.64 and 2521.45) in urine from glomerular disease patients and healthy subjects. a) Box plot showing urinary expression of alpha-1-antitrypsin peptides in MCD, FSGS patients and healthy subjects. b) ClinProTools image showing the average intensity, in arbitrary units, of alpha-1-antitrypsin peptides in MCD, FSGS patients and healthy subjects. doi:10.1371/journal.pone.0087731.g003

lung, liver and skin disease [35,36]. Associations between this glycoprotein and vascular disease, inflammatory bowel disease, vasculitis and glomerulonephritis have been proposed, albeit not definitively established. In a previous study, Candiano *et al.* analyzed the urinary proteome from patients with primary nephrotic syndrome by combining two-dimensional electrophoresis with MS, and found fragments of albumin and A1AT as the most abundant proteins. Although these fragments were mainly formed in plasma, a few were produced in urine, suggesting the presence in urine of specific proteases [29]. In agreement with this study, we found 5 peptides corresponding to A1AT with higher intensities in glomerular patients. Interestingly, one of these peptides allowed differentiation between MCD and FSGS patients. Moreover, with regard to albumin fragments, we found a peptide signal (m/z 1831.61) with a higher peak area in FSGS patients compared with healthy subjects.

The fragmentation pattern of the proteins described above may reflect the proteolytic activity that takes place during kidney disease, and the appearance of specific peptides in the urine could consequently serve as biomarkers of the diseases studied here, MCD and FSGS.

Histological diagnosis takes time and may not achieve a precise diagnosis if an adequate tissue sample is not obtained. Consequently, renal biopsy is limited, time-consuming and cannot be performed several times, thereby limiting its practice in the follow-up of the patients. The search for biomarkers in urine could replace renal biopsy as an accurate, non-invasive test and could be repeated to follow the progression of the disease and monitor the response to therapy.

References

- NationalKidneyFoundation (2012) KDOQI Clinical Practice Guideline for Diabetes and CKD: 2012 Update. *Am J Kidney Dis* 60: 850–886.
- McGrogan A, Franssen CF, de Vries CS (2010) The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature. *Nephrol Dial Transplant* 26: 414–430.
- Braden GL, Mulhern JG, O'Shea MH, Nash SV, Ucci AA Jr, et al. (2000) Changing incidence of glomerular diseases in adults. *Am J Kidney Dis* 35: 878–883.
- Madaio MP (1990) Renal biopsy. *Kidney Int* 38: 529–543.
- Eiro M, Katoh T, Watanabe T (2005) Risk factors for bleeding complications in percutaneous renal biopsy. *Clin Exp Nephrol* 9: 40–45.
- Corapi KM, Chen JL, Balk EM, Gordon CE (2012) Bleeding complications of native kidney biopsy: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 60: 62–73.
- Corwin HL, Schwartz MM, Lewis EJ (1988) The importance of sample size in the interpretation of the renal biopsy. *Am J Nephrol* 8: 85–89.
- Fogo AB (2003) Approach to renal biopsy. *Am J Kidney Dis* 42: 826–836.
- Mak SK, Short CD, Mallick NP (1996) Long-term outcome of adult-onset minimal-change nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 11: 2192–2201.
- Waldman M, Crew RJ, Valeri A, Busch J, Stokes B, et al. (2007) Adult minimal-change disease: clinical characteristics, treatment, and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol* 2: 445–453.
- Drube J, Schiffer E, Mischak H, Kemper MJ, Neuhaus T, et al. (2009) Urinary proteome pattern in children with renal Fanconi syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 24: 2161–2169.
- Navarro-Munoz M, Ibernón M, Bonet J, Perez V, Pastor MC, et al. (2012) Uromodulin and alpha(1)-antitrypsin urinary peptide analysis to differentiate glomerular kidney diseases. *Kidney Blood Press Res* 35: 314–325.
- Haubitz M, Witke S, Weissing EM, Walden M, Rupperecht HD, et al. (2005) Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int* 67: 2313–2320.
- Lapolla A, Seraglia R, Molin L, Williams K, Cosma C, et al. (2009) Low molecular weight proteins in urines from healthy subjects as well as diabetic, nephropathic and diabetic-nephropathic patients: a MALDI study. *J Mass Spectrom* 44: 419–425.
- Good DM, Thongboonkerd V, Novak J, Bascands JL, Schanstra JP, et al. (2007) Body fluid proteomics for biomarker discovery: lessons from the past hold the key to success in the future. *J Proteome Res* 6: 4549–4555.
- Villanueva J, Philip J, Entenberg D, Chaparro CA, Tanwar MK, et al. (2004) Serum peptide profiling by magnetic particle-assisted, automated sample processing and MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 76: 1560–1570.
- Baumann S, Ceglarek U, Fiedler GM, Lembcke J, Leichte A, et al. (2005) Standardized approach to proteome profiling of human serum based on magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chem* 51: 973–980.
- Zhang J, Zhou S, Li R, Cao T, Zheng H, et al. (2012) Magnetic bead-based salivary peptidome profiling for periodontal-orthodontic treatment. *Proteome Sci* 10: 63.
- Perez V, Navarro-Munoz M, Mas S, Bayes B, Pastor MC, et al. (2011) Proteomic approach to the study of statin pleiotropy in kidney transplant patients. *Pharmacology* 87: 161–168.
- Cheng AJ, Chen LC, Chien KY, Chen YJ, Chang JT, et al. (2005) Oral cancer plasma tumor marker identified with bead-based affinity-fractionated proteomic technology. *Clin Chem* 51: 2236–2244.
- Perez V, Sanchez-Escuredo A, Lauzurica R, Bayes B, Navarro-Munoz M, et al. (2013) Magnetic bead-based proteomic technology to study paricalcitol effect in kidney transplant recipients. *Eur J Pharmacol*.
- Perez V, Sanchez A, Bayes B, Navarro-Munoz M, Lauzurica R, et al. (2010) Effect of paricalcitol on the urinary peptidome of kidney transplant patients. *Transplant Proc* 42: 2924–2927.
- Jimenez CR, Koel-Simmeling M, Pham TV, van der Voort L, Teunissen CE (2007) Endogenous peptide profiling of cerebrospinal fluid by MALDI-TOF mass spectrometry: Optimization of magnetic bead-based peptide capture and analysis of preanalytical variables. *Proteomics Clin Appl* 1: 1385–1392.
- Taneja S, Ahmad I, Sen S, Kumar S, Arora R, et al. (2011) Plasma peptidome profiling of acute hepatitis E patients by MALDI-TOF/TOF. *Proteome Sci* 9: 5.
- Zhang X, Leung SM, Morris CR, Shigenaga MK (2004) Evaluation of a novel, integrated approach using functionalized magnetic beads, bench-top MALDI-TOF-MS with prestructured sample supports, and pattern recognition software for profiling potential biomarkers in human plasma. *J Biomol Tech* 15: 167–175.
- Fiedler GM, Baumann S, Leichte A, Oltmann A, Kase J, et al. (2007) Standardized peptidome profiling of human urine by magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chem* 53: 421–428.
- Surin B, Sachon E, Rougier JP, Steverlync C, Garreau C, et al. (2012) LG3 fragment of endorepellin is a possible biomarker of severity in IgA nephropathy. *Proteomics* 13: 142–152.
- Varghese SA, Powell TB, Budisavljevic MN, Oates JC, Raymond JR, et al. (2007) Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease. *J Am Soc Nephrol* 18: 913–922.
- Candiano G, Musante L, Bruschi M, Petretto A, Santucci L, et al. (2006) Repetitive fragmentation products of albumin and alpha1-antitrypsin in

- glomerular diseases associated with nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 17: 3139–3148.
30. Rindler MJ, Naik SS, Li N, Hoops TC, Peraldi MN (1990) Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein/uromucoid) is a phosphatidylinositol-linked membrane protein. *J Biol Chem* 265: 20784–20789.
 31. Prajczek S, Heidenreich U, Pfaller W, Kotanko P, Lhotta K, et al. (2010) Evidence for a role of uromodulin in chronic kidney disease progression. *Nephrol Dial Transplant* 25: 1896–1903.
 32. Wu J, Wang N, Wang J, Xie Y, Li Y, et al. (2010) Identification of a uromodulin fragment for diagnosis of IgA nephropathy. *Rapid Commun Mass Spectrom* 24: 1971–1978.
 33. Lapolla A, Molin L, Sechi A, Cosma C, Ragazzi E, et al. (2009) A further investigation on a MALDI-based method for evaluation of markers of renal damage. *J Mass Spectrom* 44: 1754–1760.
 34. Abboud RT, Ford GT, Chapman KR (2001) Alpha1-antitrypsin deficiency: a position statement of the Canadian Thoracic Society. *Can Respir J* 8: 81–88.
 35. Society ATSER (2003) American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 818–900.
 36. Eriksson S, Carlson J, Velez R (1986) Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha 1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 314: 736–739.
 37. Garin EH, Mu W, Arthur JM, Rivard CJ, Araya CE, et al. (2010) Urinary CD80 is elevated in minimal change disease but not in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 78: 296–302.