

Efecto de las Estatinas sobre el Peptidoma Plasmático y Urinario de Pacientes Trasplantados Renales



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Medicina

**Trabajo de Investigación
Convocatoria de Septiembre**

Autor:

Vanessa Pérez Jiménez

Director:

Dr. Ramón Romero González

Co-Director:

Dra. Beatriz Enriqueta Bayés Genís

Médico adjunto del Servicio de Nefrología del
Hospital Universitario Germans Trias i Pujol.
Universitat Autònoma de Barcelona.

Barcelona, 2010

Annex 1

CERTIFICAT DEL DIRECTOR O CO-DIRECTOR DEL TREBALL DE RECERCA

Dr. Ramón Romero González, Professor del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i Cap del Servei de Nefrologia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol,

Dra. Beatriz Enriqueta Bayés Genís, metge adjunt del Servei de Nefrologia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol,

FAN CONSTAR,

que el treball titulat '**EFFECTE DE LES ESTATINES SOBRE EL PEPTIDOMA PLASMÀTIC I URINARI DE PACIENTS TRASPLANTATS RENALS**' ha estat realitzat sota la nostra direcció per la llicenciada **Vanessa Pérez Jiménez**, trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball d'investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorat en Medicina Interna/Diagnòstic per la Imatge (curs 2009-2010), a la convocatòria de setembre.

Barcelona, 2 de Setembre del 2010.

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. GENERALIDADES DEL TRASPLANTE RENAL	5
1.2. DISLIPEMIA POST-TRASPLANTE	6
1.2.1. Tratamiento de las dislipemias. Estatinas	7
1.3. INTRODUCCIÓN A LA PROTEÓMICA	9
1.3.1. Análisis de una muestra proteica	9
1.3.2. El proteoma urinario	13
1.3.3. El proteoma plasmático	14
1.4. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	15
2. PACIENTES Y MÉTODOS	16
2.1. PACIENTES	17
2.2. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES BIOQUÍMICAS	18
2.3. ANÁLISIS PROTEÓMICO	18
2.3.1. Obtención de las muestras y procesamiento	18
2.3.2. Extracción de la fracción peptídica	19
2.3.3. Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF	21
2.3.4. Análisis de los espectros	22
2.3.5. Identificación de los péptidos	23
2.3.6. Validación	24
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
3. RESULTADOS	27
3.1. EFECTO DE LA ATORVASTATINA SOBRE LAS VARIABLES BIOQUÍMICAS	28
3.2. EFECTO DE LA ATORVASTATINA SOBRE EL PEPTIDOMA URINARIO	30
3.3. EFECTO DE LA ATORVASTATINA SOBRE EL PEPTIDOMA PLASMÁTICO	31
4. DISCUSIÓN	34
5. CONCLUSIONES	38
ABREVIATURAS	39
BIBLIOGRAFÍA	40

Las estatinas se prescriben en receptores de trasplante renal para tratar la dislipemia, una complicación frecuente en estos pacientes. La eficacia de las estatinas reduciendo los niveles de colesterol se ha visto acompañada de otros efectos pleiotrópicos beneficiosos para el paciente.

Los **objetivos** de este estudio fueron: estudiar el efecto del tratamiento con atorvastatina sobre perfil lipídico, función renal y marcadores de inflamación de un grupo de pacientes trasplantados renales y determinar, mediante proteómica, si este tratamiento modificaba su peptidoma plasmático y/o urinario.

Material y métodos: 54 pacientes trasplantados renales fueron tratados con atorvastatina durante 3 meses. Se recogieron muestras de sangre y orina al inicio del estudio y después del tratamiento. Las variables bioquímicas se determinaron en el laboratorio de bioquímica con un analizador de rutina y el estudio proteómico se basó en tecnología de esferas magnéticas combinada con espectrometría de masas y espectrometría de masas en tándem.

Resultados: La atorvastatina mejoró el perfil lipídico de los pacientes y provocó cambios significativos en su peptidoma plasmático. Los péptidos m/z 1063 y 1898 disminuyeron en plasma tras el tratamiento y fueron identificados como fragmentos derivados del quinínógeno y del componente C4 del complemento, respectivamente.

Conclusiones: Aunque nuestro estudio no mostró una reducción significativa en sangre de los marcadores de inflamación, mediante técnicas proteómicas encontramos una disminución del quinínógeno y de C4. Dado que bradiquinina y C4a, liberados respectivamente del quinínógeno y de C4, son potentes mediadores de la inflamación, nuestros hallazgos podrían arrojar luz a los efectos anti-inflamatorios atribuidos a las estatinas.

1. Introducción

1.1 GENERALIDADES DEL TRASPLANTE RENAL

El trasplante renal ha avanzado espectacularmente en los últimos años, siendo actualmente el tratamiento de elección en la mayoría de casos de insuficiencia renal crónica terminal.

Para el enfermo renal el trasplante supone un aumento en la supervivencia y en la calidad de vida, ya que deja de depender de la diálisis y de dietas estrictas. Además, el trasplante renal supone otra ventaja frente a la diálisis al ser económicamente menos costoso.

La introducción de nuevos fármacos inmunosupresores ha dado lugar a un importante descenso en la incidencia de rechazo agudo en el post-trasplante inmediato. Sin embargo, esta mejoría a corto plazo no se ha acompañado de una mejoría a largo plazo, con un aumento en la morbilidad y mortalidad debido principalmente a complicaciones cardiovasculares, seguidas por procesos infecciosos y neoplásicos (Figura 1). Existen registros de mortalidad por enfermedad cardiovascular en pacientes trasplantados renales que triplican la mortalidad observada en la población general¹. Este hecho es debido principalmente a 3 causas:

- Cambios demográficos, con un aumento de la edad tanto de receptor como de donante.
- Disminución de la mortalidad en el post-trasplante inmediato.
- Aumento en la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular a largo plazo como enfermedad cardiovascular previa, hipertensión arterial, dislipemia, obesidad, diabetes, etc.

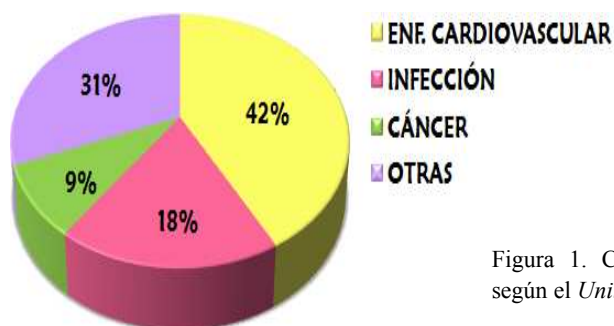


Figura 1. Causas de muerte en pacientes trasplantados renales según el *United States Renal Data System*.

1.2 DISLIPEMIA POST-TRASPLANTE

La dislipemia es una alteración metabólica frecuente en receptores de trasplante renal, de etiología multifactorial, aparición precoz y que, generalmente, persiste a lo largo de la evolución del trasplante². Existen estudios que describen una correlación positiva entre dislipemia y enfermedad cardiovascular tras el trasplante renal³⁻⁶.

El patrón de dislipemia en trasplante es variable y puede ir cambiando en función de la evolución del mismo, aunque lo más frecuente es un aumento del colesterol total (CT) y del colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL), con niveles de triglicéridos (TG) normales o ligeramente elevados y niveles de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) normales⁷.

El origen de la dislipemia post-trasplante incluye principalmente el tratamiento inmunosupresor, los fármacos anti-hipertensivos, la disfunción del injerto, la predisposición genética y trastornos metabólicos como dieta, obesidad y diabetes.

	mg/dL	mmol/L
Colesterol Total		
Ideal	< 200	< 5,17
Moderadamente elevado	200 - 239	5,17 - 6,18
Elevado	≥ 240	≥ 6,19
Colesterol - LDL		
Óptimo	< 100	< 2,59
Casi óptimo	100 - 129	2,59 - 3,33
Límite	130 - 159	3,34 - 4,11
Elevado	160 - 189	4,12 - 4,88
Muy elevado	≥ 190	≥ 4,89
Triglicéridos		
Normal	< 150	< 1,69
Límite elevado	150 - 199	1,69 - 2,25
Elevado	200 - 499	2,26 - 5,63
Muy elevado	≥ 500	≥ 5,64
Colesterol - HDL		
Bajo	< 40	< 1,03

Tabla 1. Definición de las dislipemias según las guías del *National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, the Adult Treatment Panel III*)⁷.

La principal consecuencia del exceso de colesterol en sangre es el desarrollo de enfermedades coronarias cuya causa principal es la aterosclerosis. La aterosclerosis consiste en una alteración degenerativa que afecta a las arterias en las que se forman unas lesiones focales denominadas placas de ateroma, formadas por la acumulación de células inflamatorias y partículas lipídicas.

1.2.1 Tratamiento de las dislipemias. Estatinas.

Existen guías cuyo propósito es proporcionar orientación sobre el manejo de las dislipemias en pacientes con trasplante renal⁸. Estas guías incluyen medidas generales como realizar dieta y ejercicio físico moderado, evitar el consumo de tabaco y alcohol, optimización de la inmunosupresión y tratamiento farmacológico. La figura 2 muestra la propuesta que adoptan las guías del *Adult Treatment Panel III* (ATP III)⁷.

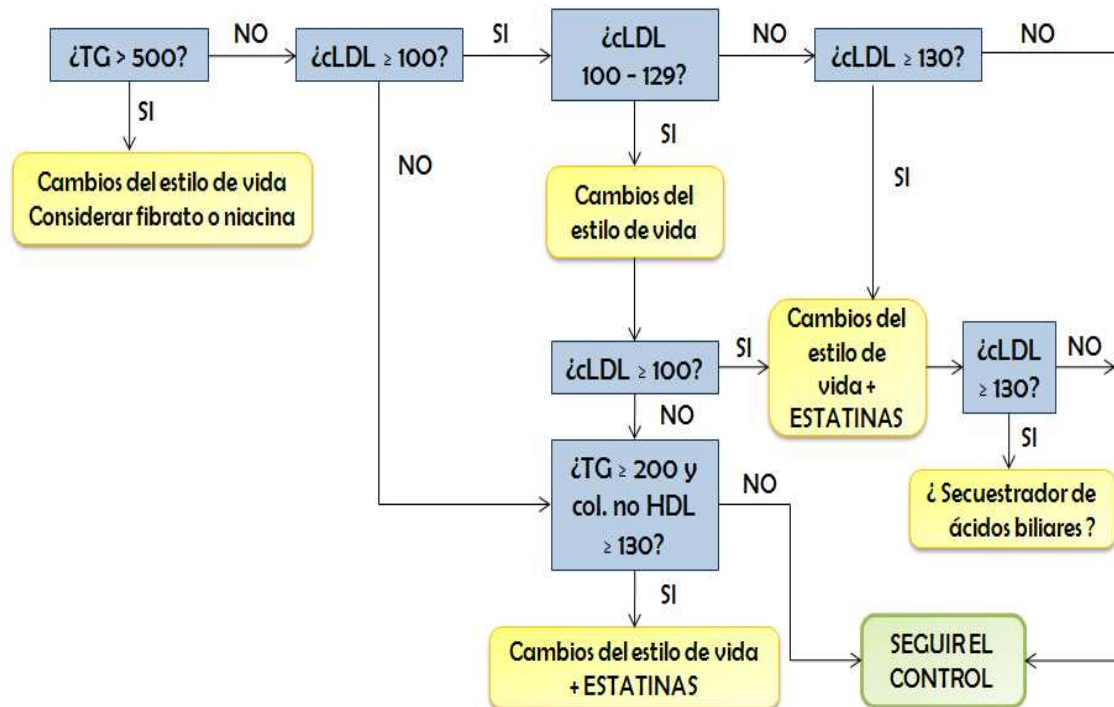


Figura 2. Pauta para tratar las dislipemias en pacientes con trasplante renal propuesta por las guías del ATP III. Valores expresados en mg/dL. TG significa triglicéridos; cLDL, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; cHDL, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad.

Los cambios en el estilo de vida dan lugar a una reducción del cLDL pero, por lo general, no suele ser suficiente para llegar a valores por debajo de los 100 mg/dL, siendo necesario tratamiento farmacológico, basado principalmente en la administración de estatinas. Se ha demostrado que éstas reducen significativamente la incidencia de muerte cardíaca e infarto de miocardio en pacientes trasplantados renales⁶.

Las estatinas son la familia de fármacos que más eficazmente reducen los niveles de colesterol total y de cLDL en sangre. Su mecanismo de acción consiste en inhibir selectiva y competitivamente la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, que

cataliza la reducción de la HMG-CoA a mevalonato, un paso limitante en la vía de biosíntesis del colesterol.

Esta disminución en los niveles de colesterol provoca, en compensación, una regulación positiva de los receptores hepáticos para LDL, dando lugar a un incremento en la captación y el catabolismo de estas lipoproteínas (Figura 3).

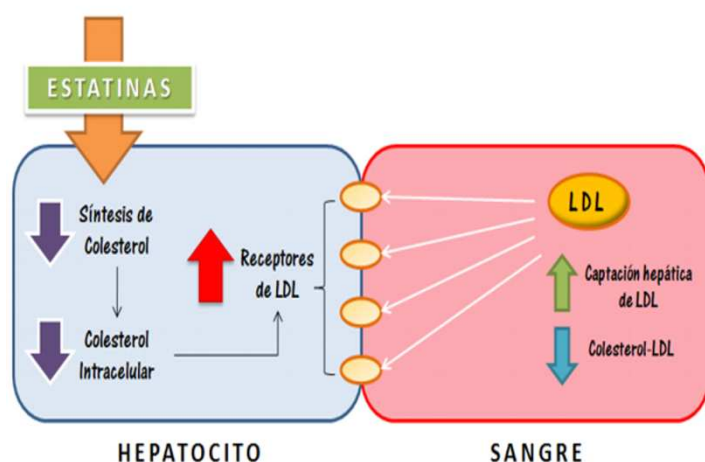


Figura 3. El efecto hipolipemiante de las estatinas es debido a un doble mecanismo: inhibición de la síntesis de colesterol y aumento del número de receptores para LDL.

Al margen del efecto hipolipemiante las estatinas poseen múltiples efectos beneficiosos que determinan su uso en la práctica clínica. Estos efectos se denominan en conjunto efectos pleiotrópicos e incluyen⁹⁻¹¹:

- Inhibición de la respuesta inflamatoria y de la trombosis
- Disminución del estrés oxidativo
- Mejora de la función endotelial
- Prevención del desarrollo de aterosclerosis

Estos efectos pueden debidos a que las estatinas inhiben la síntesis de colesterol pero además bloquean también la síntesis de otros compuestos como los isoprenoides no esteroideos farnesilpírofosfato y geranilpírofosfato (Figura 4). Estos compuestos actúan en la isoprenilación de diversas proteínas, como proteínas G, Rho, Rab y Ras, involucradas en mecanismos de regulación de transducción de señales, proliferación de células del músculo liso vascular, apoptosis y regulación de la actividad vascular de la NADPH oxidasa.

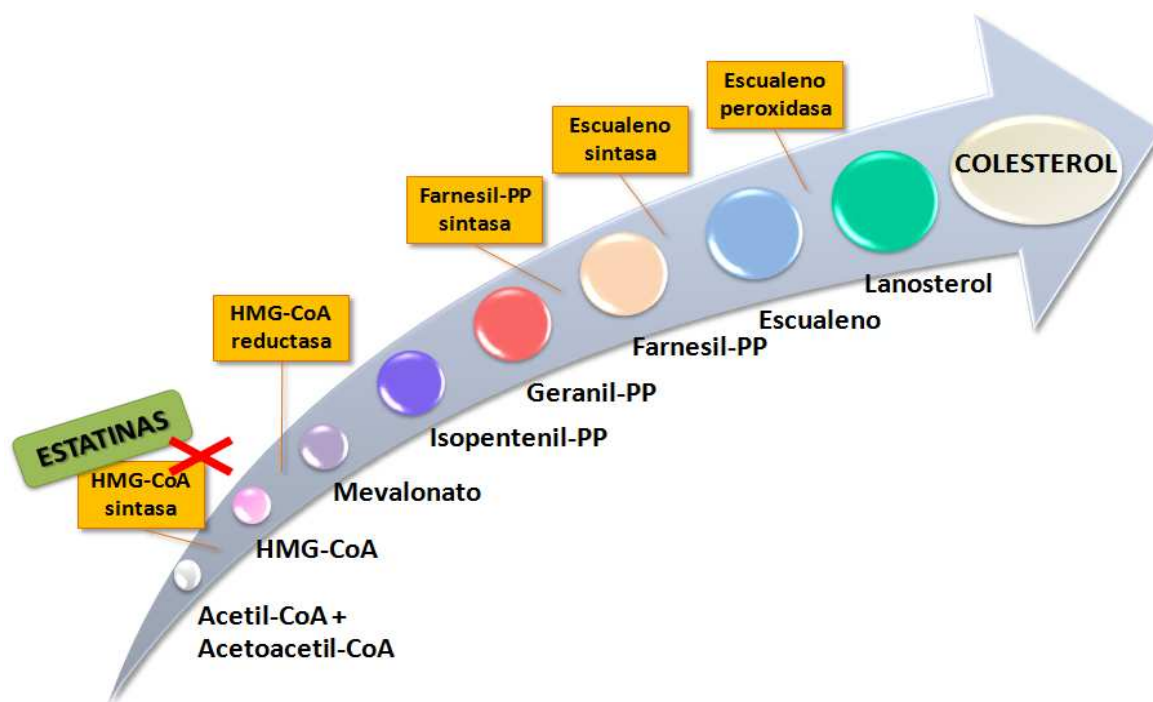


Figura 4. Vía del mevalonato y acción de las estatinas.

1.3 INTRODUCCIÓN A LA PROTEÓMICA

El término proteoma fue acuñado en 1994 para definir a todas las proteínas que son expresadas por un genoma en un momento determinado y bajo unas condiciones ambientales determinadas. A diferencia del genoma, el proteoma es extremadamente dinámico, varía dependiendo del tejido, célula o fluido biológico y éstos, a su vez, pueden cambiar debido a alteraciones en el ambiente, situaciones de estrés, estado fisiológico normal o patológico, tratamiento farmacológico, etc.

La proteómica consiste en la aplicación de un conjunto de técnicas que permiten el estudio del proteoma.

1.3.1 Análisis de una muestra proteica

Actualmente no existe un diagrama de flujo único para el análisis proteómico de una muestra biológica pero, por lo general, se realizan los siguientes pasos (Figura 7):

i) Fraccionamiento de la muestra o separación de las proteínas. Debido a la gran cantidad

de proteínas que hay en cualquier muestra biológica este paso es necesario para reducir su complejidad. Las técnicas más utilizadas son:

- Esferas magnéticas. Micropartículas de tamaño uniforme y superparamagnéticas, recubiertas con diferentes superficies para la adsorción o unión de péptidos y proteínas.
 - Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*). Separa los componentes de una mezcla mediante diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y una columna cromatográfica.
 - Electroforesis bidimensional. Consiste en la aplicación de 2 tipos de electroforesis sobre la misma muestra. Las proteínas se separan en la primera dimensión por isoelectroenfoque y en la segunda dimensión corren en un gel SDS-PAGE (del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) en función de su masa.
- ii) **Espectrometría de masas**. Se trata de una tecnología analítica de gran potencia y precisión, que requiere la ionización en fase gaseosa de los compuestos analizados, los cuales se separan en función de su relación masa/carga (m/z) permitiendo averiguar su masa molecular con gran precisión (Figura 5).

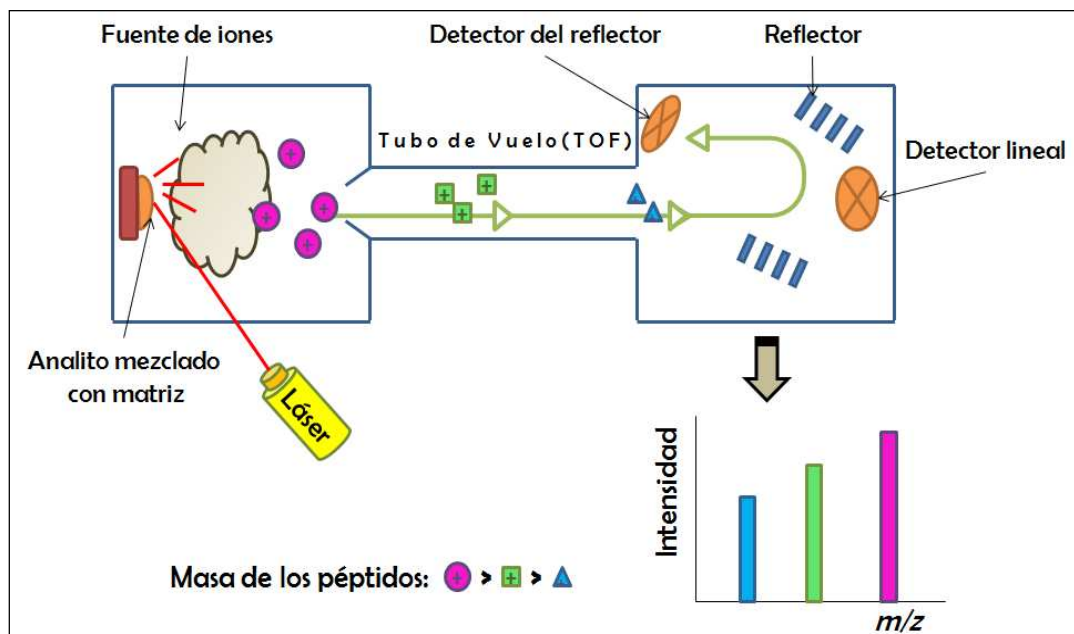


Figura 5. Esquema de un espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF. Un pulso de láser irradia la muestra embebida en matriz sobre la placa MALDI, ionizando y vaporizando los péptidos. Éstos son acelerados por un campo eléctrico que los dirige al analizador de masas a través del tubo de vuelo. Las diferencias de energía iniciales son corregidas mediante el reflector y los iones llegan finalmente al detector.

El espectrómetro de masas lo forman principalmente 3 componentes (Figura 6):

a. Fuente de ionización. Ioniza y vaporiza las muestras. Hay diferentes tipos:

- **MALDI** (del inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*). Los péptidos se aplican en una placa mezclados con una matriz ionizable que absorbe la luz de un láser con una determinada longitud de onda. El destello del láser sobre la preparación expulsa moléculas que, al salir de la matriz, capturan electrones y salen como iones cargados.
- **ESI** (del inglés, *Electrospray Ionization*). Las muestras se ionizan directamente en fase líquida al pasar a través de una fina aguja metálica a la que se aplica una alta diferencia de potencial eléctrico.
- **SELDI** (del inglés, *Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization*). Las muestras se aplican en chips que capturan proteínas con diferentes propiedades y son ionizadas por un láser.

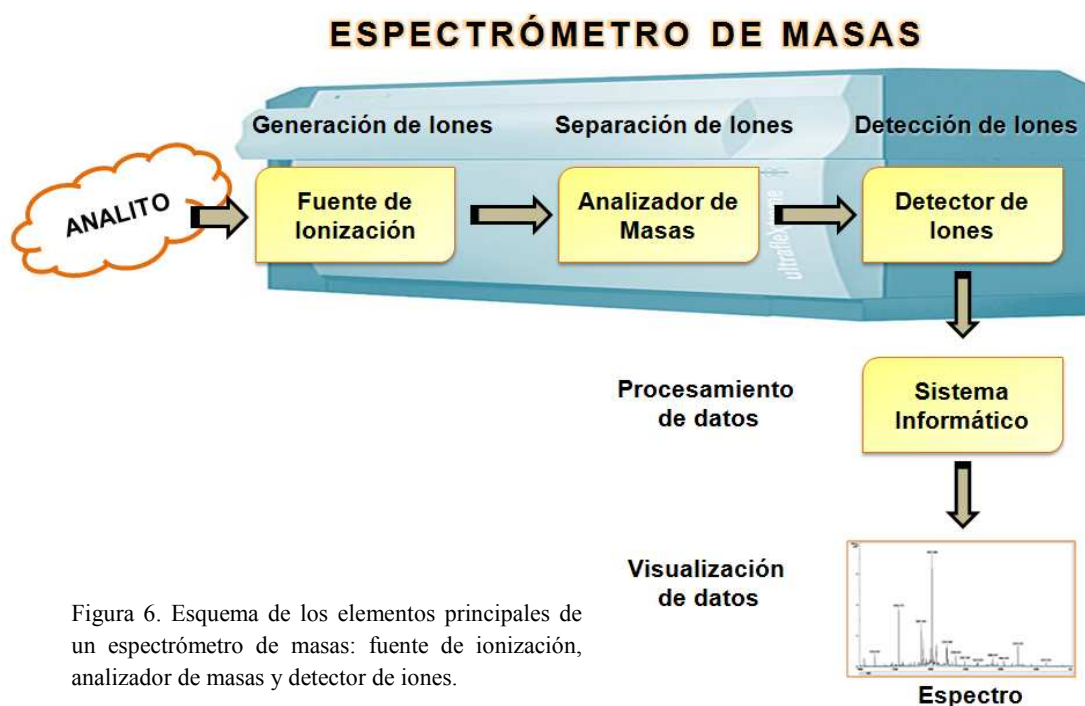


Figura 6. Esquema de los elementos principales de un espectrómetro de masas: fuente de ionización, analizador de masas y detector de iones.

b. Analizador de masas. Inmediatamente después del proceso de ionización, los iones en fase gaseosa entran en la región del analizador, donde son separados en base a su relación m/z . Los analizadores que se utilizan más frecuentemente son:

- Tiempo de vuelo (TOF, del inglés *Time of Flight*). Basado en la medida del tiempo que tardan los iones en alcanzar el detector. Como los iones poseen la misma energía pero diferentes masas alcanzarán el detector a diferentes tiempos dependiendo de su masa. El tiempo de vuelo lo mide un reloj que se activa por el pulso de láser.
- Cuadrapolo. Consiste en 4 rodillos paralelos a los que se aplica un campo electromagnético oscilatorio que actúa a modo de filtro y determina qué iones alcanzarán el detector.
- Trampa iónica. Consiste en un espacio tridimensional formado por 2 electrodos situados por encima y por debajo de un anillo central. Los iones generados 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.

c. Detector de iones. Genera señales proporcionales a la abundancia relativa de cada ion. Estas señales son integradas en un sistema informático que generará gráficos de abundancia relativa de los iones frente a m/z , denominados espectros de masas.

iii) Identificación de las proteínas. Hay dos estrategias principales:

- a. Huella peptídica.** Es el conjunto de péptidos que se obtienen tras la digestión enzimática de una proteína, generalmente con tripsina. Permite la identificación de la proteína mediante la comparación de los valores de masa medidos con los valores de bases de datos que recogen las huellas peptídicas de multitud de proteínas conocidas. La huella peptídica es característica de cada proteína y depende de la proteasa utilizada.
- b. Espectrometría de masas en tandem (MS/MS).** Se selecciona un ion de una determinada m/z en un primer espectrómetro, se fragmenta por colisión con un gas y los fragmentos pasan a un segundo espectrómetro. Permite determinar la secuencia de aminoácidos de un péptido la cual se enfrenta a bases de datos de secuencias.

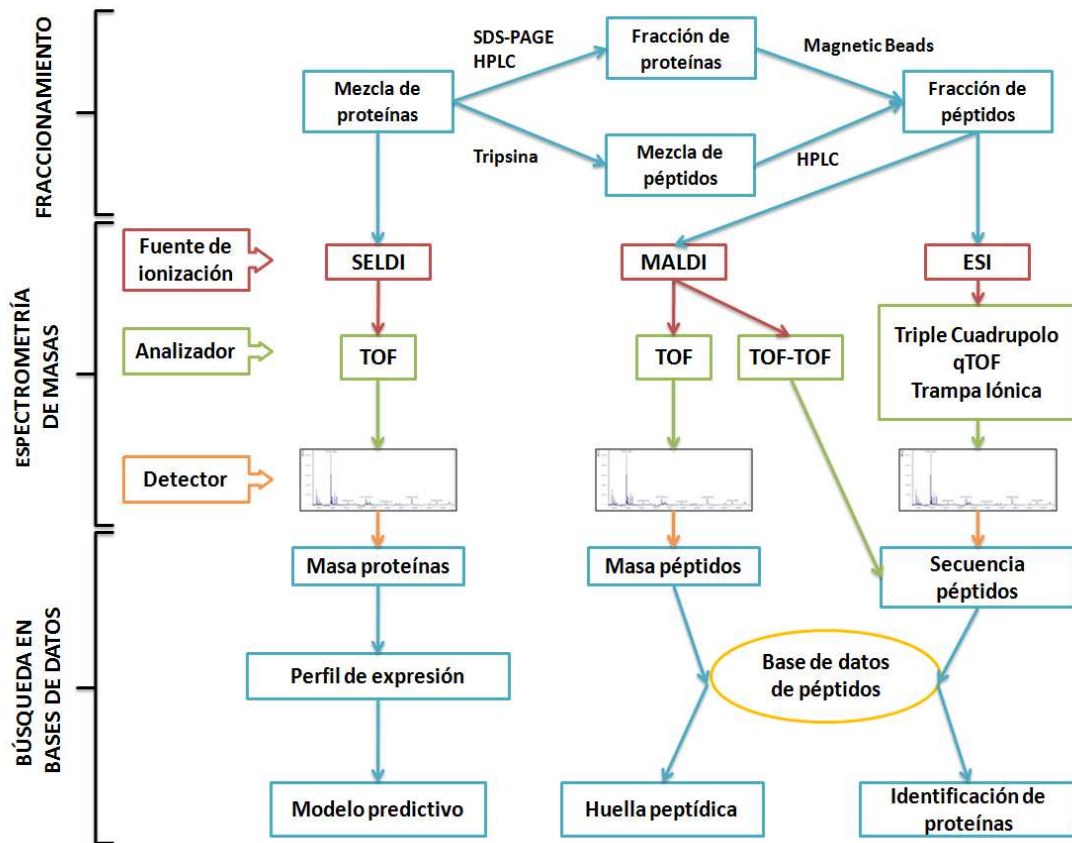


Figura 7. Esquema de los posibles procedimientos para llevar a cabo un análisis proteómico.

1.3.2 El proteoma urinario

La orina se forma en el riñón por ultrafiltración del plasma para eliminar productos de desecho. Un gran volumen de plasma fluye por el riñón, generando una gran cantidad de ultrafiltrado (150-180 L/día) en condiciones fisiológicas normales. Algunos componentes del ultrafiltrado como agua, glucosa, aminoácidos y sales inorgánicas son selectivamente reabsorbidos, y menos del 1% se excreta en la orina. Las proteínas séricas se filtran en el glomérulo según su tamaño y carga. Después de pasar a través del glomérulo, muchas proteínas son reabsorbidas en los túbulos proximales renales, por lo que la excreción de proteínas en condiciones normales es inferior a 150 mg/día. Si la excreción es mayor se define como proteinuria.

La orina es de interés para realizar análisis proteómicos debido a su disponibilidad, ya que se obtiene en grandes cantidades y de manera no invasiva. A pesar de la baja concentración de proteínas, una sola muestra puede ser suficiente para obtener la cantidad de proteína deseada.

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/péptidos presentes en la orina, constituyendo una interesante manera de investigar la fisiología renal.

1.3.3 El proteoma plasmático

El plasma contiene alrededor de 60-80 mg/mL de proteínas. Se calcula que hay alrededor de 10.000 proteínas, la mayoría de las cuales se encuentran a muy bajas concentraciones, siendo únicamente unas 22 proteínas las que constituyen más del 90% del contenido proteico, denominadas proteínas “mayoritarias” (albúmina, inmunoglobulinas, haptoglobina, transferrina, etc.). El resto lo forman proteínas que se encuentran a concentraciones muy bajas y se definen como proteínas “minoritarias”^{12,13} (Figura 8).

Los análisis proteómicos de muestras sanguíneas son complicados debido a su extrema complejidad, ya que contienen proteínas propias de la sangre pero además proteínas específicas de otros tejidos que son liberadas a la sangre por diferentes motivos (fisiológicos o patológicos). De esta manera, el plasma contiene información sobre el estado fisiológico de las diferentes partes del cuerpo y el estudio de su proteoma o peptidoma refleja lo que ocurre en cada momento en los diferentes tejidos del organismo.

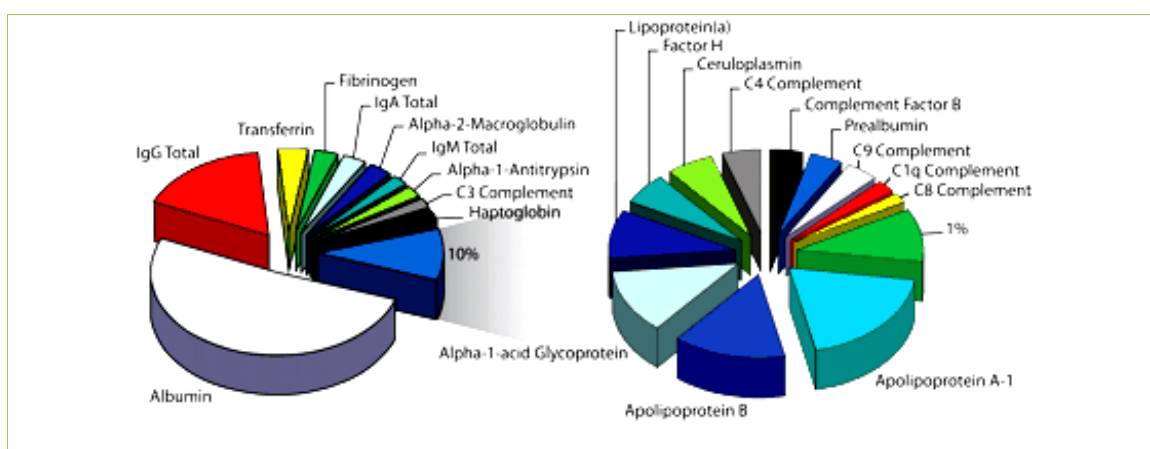


Figura 8. Cantidad relativa de proteínas en plasma. Un gran porcentaje del contenido proteico en plasma lo constituyen unas 22 proteínas denominadas ‘mayoritarias’. Imagen obtenida de la web <http://www.mcponline.org/content/2/10.cover-expansion>.

1.4 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los efectos pleiotrópicos de las estatinas han sido muy estudiados, incluso recientemente mediante técnicas proteómicas¹⁴⁻¹⁷. Estos estudios proteómicos llevaron a cabo análisis por espectrometría de masas, cuyos avances permiten la medición simultánea de miles de péptidos con tan solo una pequeña cantidad de muestra. La mayoría de estos estudios utilizaron la electroforesis bidimensional para el fraccionamiento de las muestras. Se trata de una técnica laboriosa que requiere un tiempo considerable por muestra, por lo que en este estudio el paso del fraccionamiento lo realizamos con una metodología que nos permitió el análisis de un número importante de muestras de manera automatizada y rápida, y lo que es más importante, con elevada sensibilidad y reproducibilidad. Este procedimiento se basa en el uso de esferas magnéticas, seguido por el análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y espectrometría de masas en tándem. Esta misma metodología ha sido estandarizada en otros trabajos con el fin de obtener el perfil peptídico de diferentes fluidos biológicos¹⁸⁻²³.

Con el fin de conocer más en profundidad los efectos pleiotrópicos de las estatinas, los objetivos de nuestro estudio fueron:

- 1) Determinar si el tratamiento durante 3 meses con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa (atorvastatina) modificaba perfil lipídico, marcadores de inflamación y función renal de un grupo de pacientes trasplantados renales.
- 2) Examinar los efectos de este tratamiento sobre el peptidoma urinario de los pacientes.
- 3) Examinar los efectos de este tratamiento sobre el peptidoma plasmático de los pacientes.

2. Pacientes y Métodos

2.1 PACIENTES

Estudio prospectivo que incluyó 54 pacientes trasplantados renales (30 varones; edad media: 46 ± 13 años) con dislipemia, función renal estable y más de un año con injerto funcionante.

El 85% de los pacientes tenía hipertensión, el 26% eran obesos ($\text{IMC} \geq 30$) y el 35% eran fumadores.

El tratamiento inmunosupresor que recibieron los pacientes durante el período de estudio consistió en: corticoides (65%), ciclosporina (74%), micofenolato mofetil (35%), tacrolimus (19%) y azatioprina (4%). Este tratamiento se mantuvo sin cambios durante el tiempo que duró el estudio.

Todos los pacientes tuvieron una respuesta pobre a la dieta y recibieron durante 3 meses un tratamiento hipolipemiante con 10 mg/día de atorvastatina.

Las determinaciones de las diferentes variables bioquímicas y los análisis proteómicos se realizaron en situación basal y a los 3 meses de tratamiento con atorvastatina.

Para el análisis proteómico de la orina se dispuso únicamente de muestras de 39 de los pacientes (18 varones; edad media: 49 ± 11 años).

El protocolo del estudio fue aprobado por el comité de ética local y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio.

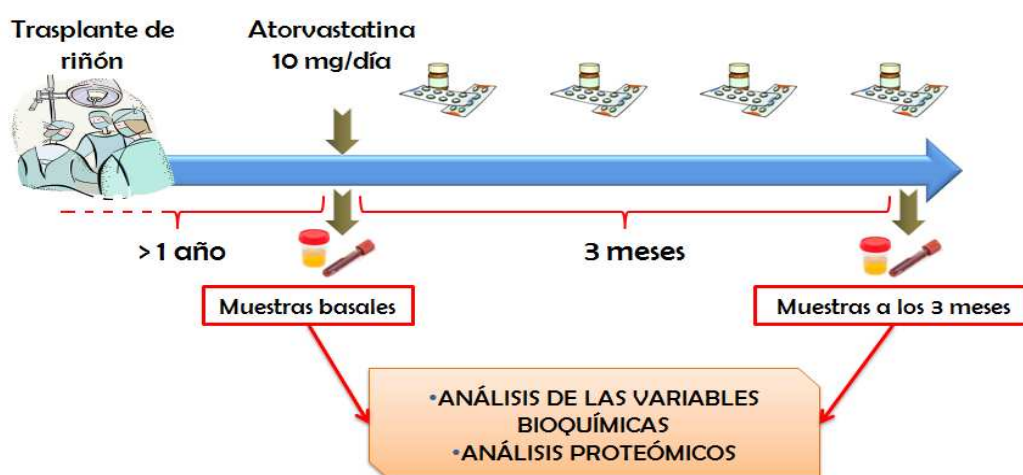


Figura 9. Diseño del estudio. Para el análisis de las variables bioquímicas y los análisis proteómicos, se recogieron muestras de sangre y orina de los pacientes trasplantados renales, en situación basal y después de 3 meses de tratamiento con atorvastatina (10 mg/día).

2.2 ANÁLISIS DE LAS VARIABLES BIOQUÍMICAS

Las variables bioquímicas se determinaron en el laboratorio de bioquímica clínica con un analizador de rutina.

- CT, TG, cHDL y creatinina sérica se determinaron por métodos enzimáticos convencionales.
- cLDL se calculó indirectamente según la fórmula de *Friedewald*, que permite averiguar su concentración (en mmol/L) del siguiente modo: $cLDL = CT - (cHDL + TG / 2.21)$
- Las concentraciones de lipoproteína (Lp) a, Apo B y proteína C reactiva (PCR) se determinaron con un nefelómetro BN-ProSpec (Dade Behring, GMBH, Marburg, Alemania).
- El aclaramiento de creatinina se calculó:

$$\frac{\text{Volumen de orina 24 horas (mL)} \times \text{concentración urinaria de creatinina} \times 1000}{\text{Creatinina sérica} \times 1440 \text{ (min)}}$$

- La proteinuria de 24 horas se midió mediante un método espectrofotométrico (rojo pirogalol).
- La concentración de TNF- α en suero se midió mediante un ensayo inmunométrico quimioluminiscente con marcaje enzimático (IMMULITE, DPC, Los Angeles, CA, EEUU).

2.3 ANÁLISIS PROTEÓMICO

2.3.1 Obtención de las muestras y procesamiento

- ORINA. Se recogió orina de 24 horas de 39 pacientes trasplantados renales, antes y después del tratamiento con atorvastatina. Se realizaron alícuotas de 10 mL, se centrifugaron a 2100g durante 10 minutos y se ajustaron a pH neutro con NH_4CO_3 1M.
- SANGRE. Se recogieron las muestras, en tubos con EDTA, de 54 pacientes trasplantados renales, antes y después del tratamiento con atorvastatina. Se centrifugaron durante 10 minutos a 1000g con el fin de recoger la fracción superior correspondiente al plasma sanguíneo y se realizaron alícuotas del mismo.

2.3.2 Extracción de la fracción peptídica

La extracción del peptidoma se llevó a cabo mediante el uso de esferas magnéticas (Figura 10).

- Para aislar el peptidoma de las muestras de orina se utilizaron esferas *Dynabeads® RPC-18* (Invitrogen, Breda, Holanda) que unen los aminoácidos hidrofóbicos de péptidos y proteínas.
- Para las muestras de plasma se utilizaron esferas *MB-IMAC Cu* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania), que capturan los péptidos según su afinidad por los iones cobre que están inmovilizados en la superficie de las esferas.

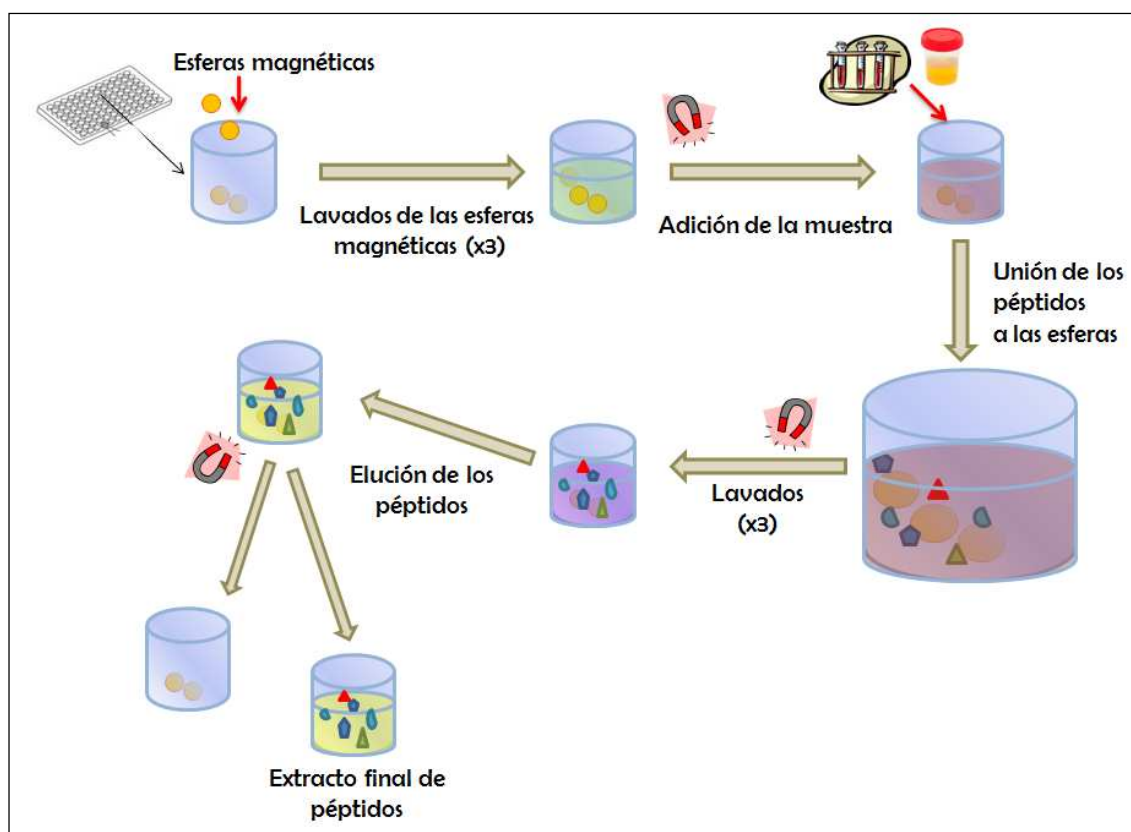


Figura 10. Esquema simplificado del protocolo seguido para extraer el peptidoma de muestras de plasma y orina mediante tecnología de esferas magnéticas.

Los protocolos que seguimos variaron según el kit de esferas magnéticas utilizado. Para las muestras de orina y plasma los protocolos fueron los siguientes:

Protocolo Muestras de Orina

1. *Pipetear las esferas magnéticas (RPC-18) hasta conseguir una suspensión homogénea.*
 2. *Pasar 10 µL de esferas a una placa de 96 pocillos (NUNC; Thermo Fisher Scientific, NUNC; Dinamarca).*
 3. *Dejar la placa sobre un imán durante 1-2 minutos y eliminar el sobrenadante.*
 4. *Sacar la placa del imán y lavar las esferas con 100 µL de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%. Al añadir el TFA homogeneizar mediante pipeteo. Tras el lavado, la placa se coloca sobre el imán para eliminar el sobrenadante.*
 5. *Repetir los pasos 3 y 4 dos veces para realizar un total de 3 lavados con TFA.*
 6. *Añadir 100 µL de cada muestra y 2,5 µL de TFA al 2% (por duplicado).*
 7. *Homogeneizar y dejar 5 minutos a temperatura ambiente (TA) para que los péptidos se unan a las esferas.*
 8. *Colocar la placa sobre el imán y eliminar el sobrenadante por aspiración.*
 9. *Realizar 3 lavados con 100 µL de TFA al 0,1%.*
 10. *Tras eliminar el sobrenadante del último lavado, añadir 15 µL de acetonitrilo (ACN) al 50%, resuspender y dejar 5 minutos a TA. Se separan de esta manera los péptidos de las esferas.*
 11. *Colocar la placa sobre el imán, recoger 10 µL del eluido de péptidos. Pasarlos a otra placa.*
 12. *Tapar la placa y congelar a -20°C.*
-

Protocolo Muestras de Plasma

1. *Hacer un vórtex de las esferas magnéticas (MB-IMAC Cu) durante al menos 1 minuto.*
 2. *Pasar 10 µL de esferas a una placa de 96 pocillos (NUNC).*
 3. *Lavar las esferas con 50 µL de la solución de unión provista en el kit. Homogeneizar y colocar la placa sobre el imán para eliminar el sobrenadante.*
 4. *Repetir el paso 3 dos veces hasta realizar un total de 3 lavados.*
 5. *Resuspender las esferas en 20 µL de solución de unión y homogeneizar.*
 6. *Añadir 80 µL de cada muestra (por duplicado). Homogeneizar y dejar 5 minutos a TA para que los péptidos se unan a las esferas.*
 7. *Colocar la placa sobre el imán y retirar el sobrenadante.*
 8. *Realizar 3 lavados con la solución de lavado provista en el kit.*
 9. *Tras eliminar el sobrenadante del último lavado, añadir 15 µL de solución de elución, resuspender y dejar 5 minutos a TA.*
 10. *Colocar la placa sobre el imán, recoger 10 µL del eluido de péptidos. Pasarlos a otra placa.*
 11. *Tapar la placa y congelar a -20°C.*
-

2.3.3 Análisis por Espectrometría de Masas MALDI-TOF

Los eluidos peptídicos obtenidos de las muestras de orina y de plasma se descongelaron a TA durante unos minutos y fueron resuspendidos 1:10 en solución de matriz dihidroxiacetofenona (1,8 mg/mL 2,6-dihidroxiacetofenona, 20% ACN, 40 mM amonio citrato dibásico).

De esta mezcla (péptidos + matriz) se utilizó 1 μ L para el punteado en la placa MALDI (AnchorChip™ 600/384, Bruker Daltonics) y se dejó secar al aire para que cristalizara. El punteado se realizó por duplicado.

- ➔ De esta manera, debido al hecho de que realizamos duplicados al realizar la extracción de péptidos y en el momento del punteado, de cada muestra obtuvimos 4 puntos en la placa MALDI.
- ➔ Así pues, de cada paciente aplicamos 8 puntos en la placa MALDI: 4 de la muestra perteneciente a la situación basal y 4 de la muestra tras los 3 meses de tratamiento con atorvastatina.

Todas las muestras se procesaron automáticamente (desde la extracción del peptidoma mediante esferas magnéticas hasta el punteado en la placa MALDI) utilizando un robot manipulador de líquidos (Freedom Evo, Tecan, Männedorf, Suiza), lo que nos permitió un mejor rendimiento y una mayor reproducibilidad.

Los análisis por MALDI-TOF se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas UltraFlex™ II TOF (Bruker Daltonics). La ionización se logró mediante la irradiación con láser de nitrógeno ($\lambda = 337$ nm), en modo lineal positivo con una tasa de repetición de 20Hz. Todos los espectros se obtuvieron mediante la suma de 300 disparos de láser en diferentes posiciones de los *spots*, con voltajes de las fuentes de iones de 20 kV a 17,35 kV; reflector 1, 21,08 kV; reflector 2, 11,85 kV; intervalo de tiempo 300 ns; energía del láser al 70%. Todos los picos con una relación señal-ruido > 3 en el rango de 1000 a 4000 Da fueron considerados. Realizamos una calibración externa mediante ClinProt Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics) obteniendo una precisión de masa inferior a 40 ppm.

2.3.4 Análisis de los Espectros

Para elegir el mejor de los cuatro espectros obtenidos por espectrometría de masas MALDI-TOF de cada muestra analizada, se realizó un análisis detallado mediante el software DataAnalysis (versión 3.4, Bruker Daltonics). Fueron seleccionados aquellos espectros con mayor número de picos y mayor intensidad (Figura 11).

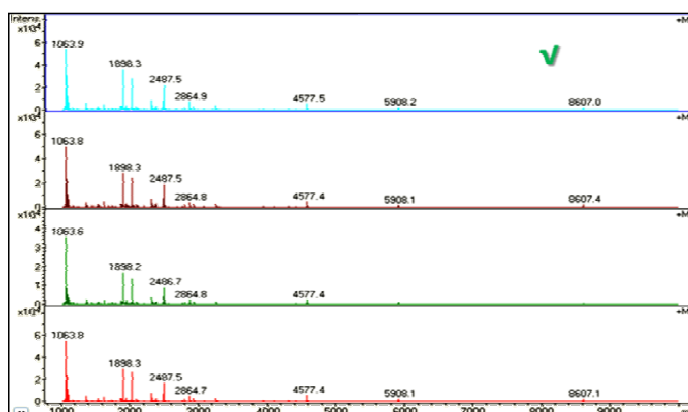


Figura 11. Mediante el software DataAnalysis se compararon los 4 espectros correspondientes a la misma muestra con el fin de seleccionar el mejor de ellos, es decir, aquél con mayor intensidad y número de picos.

Utilizamos el software ClinProTools (versión 2.0, Bruker Daltonics) en la recalibración de los espectros seleccionados, normalizándolos según el recuento total de iones. Este software además nos proporcionó el valor del área de los picos que formaban parte de cada uno de los espectros. Para las operaciones estadísticas, los datos de los espectros se convirtieron a archivos ASCII, se exportaron a hojas de cálculo Excel y, finalmente, se analizaron con el software SPSS (versión 15.0).

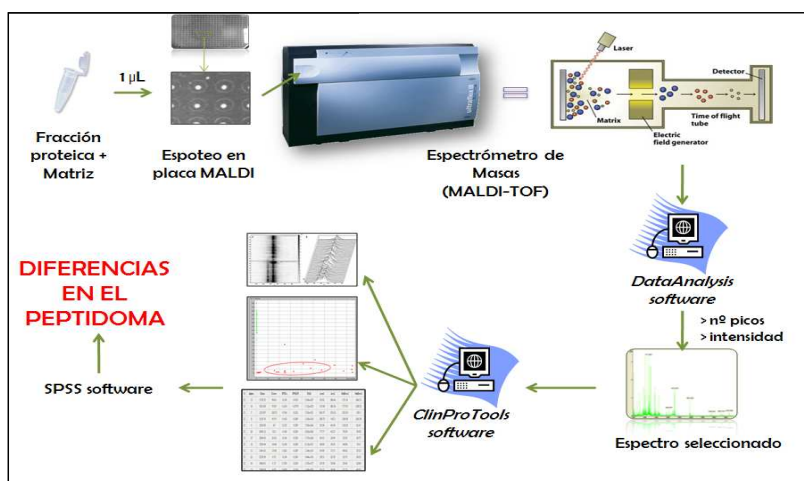


Figura 12. Esquema del análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF y del posterior análisis de los datos.

2.3.5 Identificación de los Péptidos

Los péptidos fueron punteados directamente en una placa MALDI, y analizados por MALDI-TOF/TOF de la siguiente manera.

Los péptidos fueron atrapados y desalados en una columna C18 trampa (ZipTip, Millipore). Los péptidos se puntearon sobre una placa MALDI de 576-*spots* (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU) con 3 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en 50% de ACN y 0,1% de TFA.

Se realizaron análisis por espectrometría de masas de forma automática con un analizador MALDI-TOF/TOF 4700 (Applied Biosystems). En primer lugar, los espectros de espectrometría de masas de todas las fracciones punteadas fueron adquiridos en modo reflector positivo para seleccionar los picos de interés. Hasta 8 de los iones más intensos por *spot* con S/N450 fueron seleccionados como precursores para MS/MS excluyendo picos comunes de la autólisis por tripsina de péptidos de la fracción de membrana. Hasta 6 de los iones más intensos por *spot* con S/N460 fueron seleccionados como precursores para MS/MS.

La búsqueda de los péptidos filtrados se llevó a cabo mediante el software GPS Explorer versión 3.5 (Applied Biosystems) con una versión de licencia 1.9 de MASCOT (Matrix Science, Londres, Reino Unido).

Los parámetros de búsqueda en MASCOT fueron:

- Especie: mamífero (NCBIInr)
- Número permitido de escisiones perdidas: 1
- Modificaciones variables: oxidación de la metionina
- Tolerancia de péptido: ± 150 ppm
- Tolerancia MS/MS: $\pm 0,35$ Da
- Carga del péptido: ± 1

Sólo aquellas proteínas identificadas con una puntuación con un intervalo de confianza $\geq 95\%$ fueron aceptadas. Este parámetro lo proporciona el software GPS-Explorer y se basa en la puntuación MASCOT.

2.3.6 Validación

Nefelometría

La concentración plasmática del componente C4 del complemento se determinó por nefelometría (Dade Behring, GMBH, Marburg, Alemania). Se analizaron muestras de 8 pacientes trasplantados renales (2 hombres; edad media: 48 ± 14 años) en situación basal y después de 3 meses de tratamiento con atorvastatina.

Inmunoensayo enzimático (ELISA)

La concentración plasmática de bradiquinina se determinó en muestras de 16 pacientes trasplantados renales (10 hombres; edad media: 48 ± 13 años) en situación basal y después de 3 meses de tratamiento con atorvastatina.

Se utilizó un kit de ELISA competitivo (Bradykinin EIA Kit; Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Alemania).

Principio del Inmunoensayo

El kit consta de una placa de 96 pocillos recubiertos de un anticuerpo secundario. Este anticuerpo secundario puede unirse al fragmento cristalizable (Fc) del anticuerpo primario cuyo fragmento de unión al antígeno (Fab) será unido competitivamente por bradiquinina biotinilada o bien por la bradiquinina presente en la muestra. El péptido biotinilado interactúa con estreptavidina unida a peroxidasa de rábano (SA-HRP, del inglés streptavidin-horseradish peroxidase). Al añadir 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB), el sustrato de la peroxidasa, se produce una reacción que cambia el color de azul a amarillo. De esta manera, la intensidad del color amarillo es directamente proporcional a la cantidad de complejos formados por péptido biotinilado-SA-HRP, pero inversamente proporcional a la cantidad de péptido en las muestras. Esto se debe a la competición que se da entre los péptidos biotinilados y los péptidos de las muestras por unirse a los anticuerpos primarios, es decir, se da ausencia de color amarillo en las muestras positivas, ya que el sustrato TMB no encuentra la enzima porque el antígeno marcado es desplazado por el antígeno de la muestra.

Para la realización del kit fue necesario trabajar con la fracción peptídica de las muestras por lo que realizamos la extracción del peptidoma de 32 muestras de plasma (correspondientes a 16 pacientes trasplantados renales antes y después del tratamiento con atorvastatina) mediante esferas magnéticas MB-IMAC Cu. El eluido obtenido fue evaporado en un concentrador *Speed Vac* (Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY) y posteriormente diluido 1:25 a fin de obtener valores dentro del rango de detección del kit (0 - 100 ng/mL). A partir de aquí realizamos la determinación de bradiquinina siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 13).

Las muestras se analizaron por duplicado y los valores de densidad óptica se leyeron fluorométricamente a 450nm en un lector de placas Flash Varioskan (Thermo Electron Corporation). Con el péptido estándar que proporciona el kit, de concentración conocida, se realizó una curva patrón (por duplicado) que nos permitió determinar la concentración de péptido en nuestras muestras mediante extrapolación de los valores obtenidos de DO con la curva patrón. Estos cálculos los realizamos con el software SkanIt Varioskan Flash (versión 2.4.1).

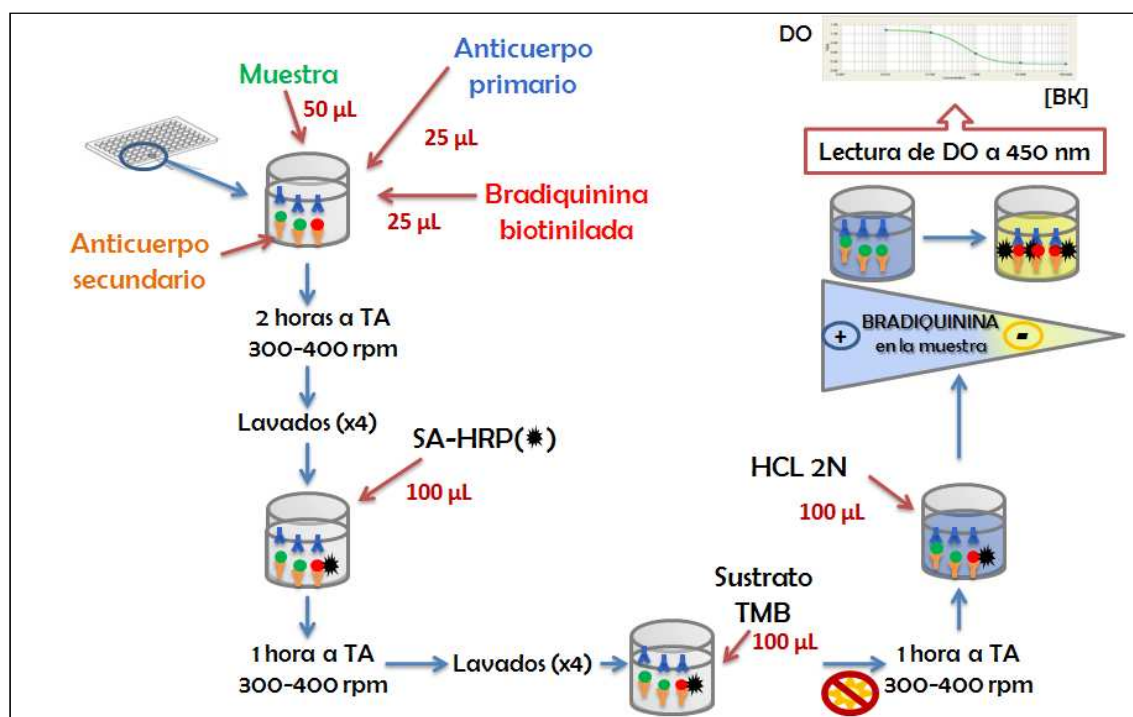


Figura 13. Esquema del procedimiento seguido para realizar el kit ELISA para determinar la concentración de bradiquinina en muestras de plasma.

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Se miró la normalidad de las variables mediante el test *Kolmogorov-Smirnov*.
- Para aquellas variables con distribución normal, los datos se expresaron como media \pm desviación estándar, y para las variables con distribución no normal como mediana (rangos intercuartiles).
- Para determinar si las variables bioquímicas y los peptidomas urinario y plasmático tras el tratamiento con atorvastatina diferían de la situación basal se realizó, según conviniera, un test *t* de *Student* para muestras pareadas o bien el test no paramétrico de *Wilcoxon*.
- Las correlaciones se determinaron mediante el test de *Spearman*.
- Las diferencias en el peptidoma plasmático según el tratamiento inmunosupresor se calcularon mediante el test no paramétrico *U* de *Mann-Whitney*.
- Todos los análisis se realizaron con la versión 15.0 del software SPSS para Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EEUU).
- Se consideró significación estadística una $P < 0.05$.

3. Resultados

3.1 EFECTO DE LA ATORVASTATINA SOBRE LAS VARIABLES BIOQUÍMICAS

Las características clínicas y bioquímicas de los pacientes trasplantados renales al inicio del estudio y después del tratamiento con atorvastatina se muestran en la Tabla 2.

	Basal	3 meses	<i>P</i> *
CT (mmol/L)	6,20 (5,70 – 7,20)	4,65 (4,10 – 5,23)	< 0,001
TG (mmol/L)	1,63 ± 0,68	1,40 ± 0,65	< 0,001
cHDL (mmol/L)	1,65 ± 0,48	1,38 ± 0,39	< 0,001
cLDL (mmol/L)	4,10 ± 0,88	2,72 ± 0,63	< 0,001
Apo B (g/L)	1,23 ± 0,22	0,90 ± 0,17	< 0,001
Lp (a) (mg/L)	41,40 (20,80 – 68,40)	29,15 (15,77 – 62,22)	NS
PCR (mg/L)	2,00 (0,74 – 5,90)	1,53 (0,61 – 3,80)	NS
TNF-α (pg/mL)	6,70 (4,90 – 7,90)	5,90 (5,13 – 7,58)	NS
Creatinina sérica (μmol/L)	131,72 ± 39,44	138,50 ± 36,78	0,006
Acl. de creatinina (mL/min)	53,90 (42,40 – 76,50)	56,30 (41,45 – 70,43)	NS
Proteinuria (g/24h)	0,21 (0,11 – 0,46)	0,21 (0,15 – 0,56)	NS

Tabla 2. Variables bioquímicas de los pacientes trasplantados renales en situación basal y después de 3 meses de tratamiento con atorvastatina.

Los resultados se muestran como media ± desviación estándar o como mediana (rangos intercuartiles), dependiendo de la normalidad de la variable. *test *t de Student* / test *de Wilcoxon* considerando significación estadística una *P* < 0,05. NS, no significativo.

CT significa colesterol total; TG, triglicéridos; cHDL, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; Apo, apolipoproteína; Lp, lipoproteína; PCR, proteína C reactiva, TNF, factor de necrosis tumoral; Acl., aclaramiento.

➤ Perfil lipídico

La administración de atorvastatina (10 mg/día) durante un periodo de 3 meses mejoró significativamente el perfil lipídico de los pacientes trasplantados renales (Figura 14).

El 75,93% y el 79,25% de los pacientes alcanzaron concentraciones de CT y cLDL dentro de los rangos de referencia, por debajo de 5,2 y 3,3 mmol/L, respectivamente.

El 50,94% de los pacientes mostró concentraciones de cLDL por debajo de 2,59 mmol/L, que es el valor recomendado por las guías de manejo de dislipemias en pacientes trasplantados renales⁸.

Se observó una correlación positiva entre las variaciones en el CT y las variaciones en cLDL ($r=0,819$; $P<0,001$), cHDL ($r=0,341$; $P=0,013$), ApoB ($r=0,336$; $P=0,015$) y ApoA ($r=0,804$; $P<0,001$).

Por otra parte, observamos que el CT mostraba una correlación negativa con la edad de los pacientes ($r=-0,386$; $P=0,004$).

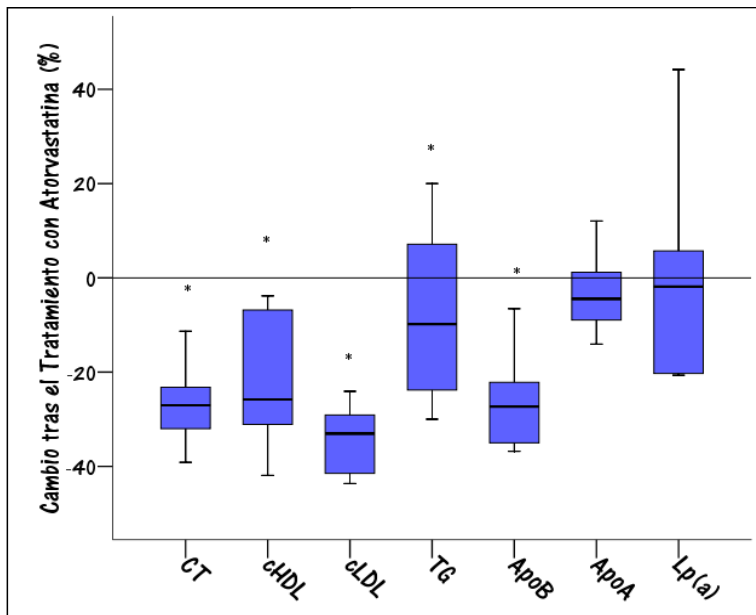


Figura 14. Mejora del perfil lipídico en pacientes trasplantados renales tras ser tratados durante 3 meses con atorvastatina.

CT significa colesterol total; cHDL, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; TG, triglicéridos; Apo, apolipoproteína; Lp, lipoproteína.

* $P<0,05$. Test no paramétrico de Wilcoxon entre las variables en estado basal y tras el tratamiento con atorvastatina.

➤ Parámetros de inflamación

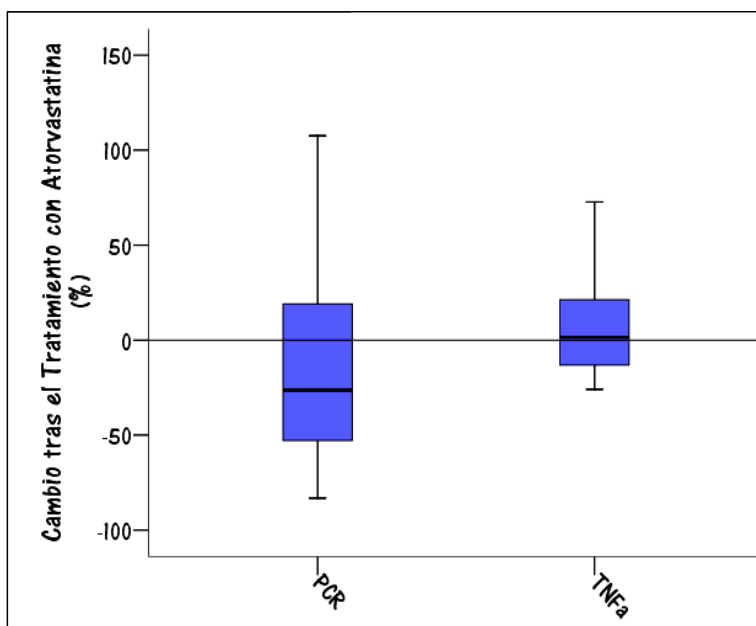


Figura 15. Disminución de los marcadores de inflamación en pacientes trasplantados renales tras ser tratados con atorvastatina durante 3 meses.

PCR significa proteína c reactiva; TNF, factor de necrosis tumoral.

➤ Función renal

La función renal se mantuvo estable, sin cambios significativos en el aclaramiento de creatinina y en la proteinuria, aunque los niveles de creatinina sérica aumentaron tras el tratamiento hipolipemiante (Tabla 2), independientemente de la edad del paciente.

3.2 EFECTO DE LA ATORVASTATINA SOBRE EL PEPTIDOMA URINARIO

El tratamiento con atorvastatina no provocó cambios significativos en el peptidoma urinario de los pacientes trasplantados renales incluidos en este estudio (Tabla 3).

Masa (m/z)	Basal	3 Meses	P*
1220	132,94 ± 188,00	275,96 ± 308,94	0,177
1719	222,60 ± 269,92	102,25 ± 171,54	0,177
3005	42,45 ± 38,48	83,47 ± 88,51	0,177
3297	25,15 ± 25,21	50,72 ± 56,69	0,177
1205	53,16 ± 61,35	96,60 ± 117,24	0,219
1914	49,42 ± 66,45	25,21 ± 29,10	0,219
2730	26,81 ± 23,51	39,74 ± 32,48	0,219

Tabla 3. Área de los picos pertenecientes a péptidos urinarios en situación basal y a los 3 meses de tratamiento con atorvastatina.

Los datos están expresados, en unidades arbitrarias, como mediana ± desviación estándar.

*Se realizó el test no paramétrico de *Wilcoxon* para determinar diferencias considerando significación estadística una $P < 0,05$.

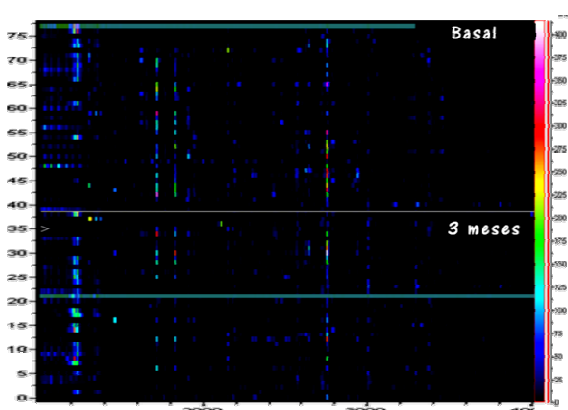


Figura 16. Vista 'tipo gel' ofrecida por el software ClinProTools. Se observan los espectros de 39 pacientes trasplantados renales en situación basal (parte superior) y después de 3 meses de tratamiento con atorvastatina (parte inferior).

El color muestra la intensidad relativa de cada pico.

Estos resultados han sido publicados en la revista *Transplantation Proceedings*¹⁷ (Perez, V.; Navarro-Munoz, M.; Bayes, B. et al., *Effect of low doses of atorvastatin on the urinary peptide profile of kidney transplant patients*. Transplant Proc 2009, 41, (6), 2111-4).

3.3 EFECTO DE LA ATORVASTATINA SOBRE EL PEPTIDOMA PLASMÁTICO

El tratamiento con atorvastatina provocó cambios estadísticamente significativos en el peptidoma plasmático de los pacientes trasplantados renales incluidos en este estudio.

Observamos que a los 3 meses de tratamiento se producía una disminución en el área de 11 picos y un aumento en el de 3 (Tabla 4).

Péptido (<i>m/z</i>)	Basal	3 Meses	<i>P</i> *
1553	3,15 (2,08 – 5,79)	8,67 (2,99 – 24,60)	< 0,001
2008	19,44 (10,96 – 31,09)	34,62 (14,37 – 98,42)	0,008
2085	33,93 (25,23 – 61,86)	63,96 (41,70 – 108,65)	< 0,001
1049	36,27 (21,28 – 64,58)	31,05 (13,02 – 40,38)	0,029
1063	670,08 (323,22 – 1102,90)	385,60 (204,04 – 545,41)	< 0,001
1079	180,03 (70,58 – 439,06)	127,24 (45,86 – 210,08)	< 0,001
1532	31,05 (10,96 – 73,34)	11,87 (7,69 – 32,25)	0,002
1741	21,25 (10,28 – 33,15)	12,11 (7,65 – 22,64)	0,011
1898	356,16 (215,35 – 573,97)	286,91 (119,85 – 438,10)	0,035
2312	128,14 (52,76 – 238,71)	67,17 (29,18 – 99,00)	< 0,001
2375	55,79 (32,99 – 81,51)	42,63 (25,52 – 57,96)	0,006
2486	196,78 (67,69 – 328,46)	104,95 (38,90 – 170,74)	0,001
2661	24,68 (16,15 – 38,66)	14,62 (9,93 – 21,97)	< 0,001
2864	116,88 (76,35 – 171,59)	50,11 (30,41 – 86,42)	< 0,001

Tabla 4. Área de los picos pertenecientes a los péptidos plasmáticos en los que se produce un cambio tras el tratamiento con atorvastatina. Los péptidos por encima y por debajo de la línea discontinua son aquellos que aumentaron o disminuyeron tras el tratamiento, respectivamente.

Los datos están expresados, en unidades arbitrarias, como mediana (rangos intercuartiles).

*Se realizó el test no paramétrico de *Wilcoxon* para determinar diferencias, considerando significación estadística una $P < 0,05$.

Mediante espectrometría de masas en tándem (MALDI-TOF/TOF) y búsqueda en base de datos

MASCOT se logró la identificación de 2 de estos péptidos.

- El péptido *m/z* 1063 fue identificado como un fragmento derivado de la proteína quinínogeno (KNG; número Swissprot: P01042; Homo sapiens). Dentro de la proteína quinínogeno, la secuencia de aminoácidos identificada es *RPPGFSPFR* (aminoácidos del 381 al 389), que

corresponde al nonapéptido bradiquinina. Tras el tratamiento con atorvastatina, se observó una reducción significativa en el área de este pico de -46,21% (-69,59% a 33,14%) (Figura 19A).

- El péptido m/z 1898 fue identificado como fragmento del componente C4 del complemento (CO4; número Swissprot: P0C0L4; Homo sapiens; secuencia de aminoácidos del 1337 al 1352). Tras el tratamiento con atorvastatina, se observó una reducción significativa en el área de este pico de -31,82% (-58,61% a 32,29%) (Figura 19B).

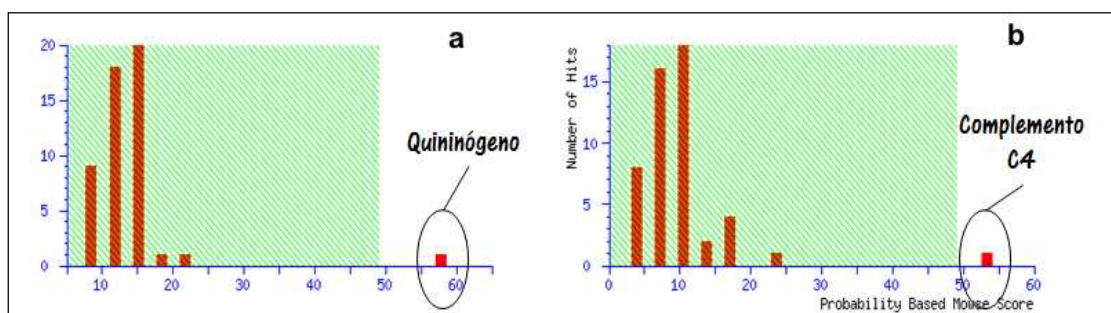


Figura 17. Resultado de la búsqueda en MASCOT. Las puntuaciones superiores a 49 son identificaciones significativas ($P < 0.05$). a) Se identifica el péptido m/z 1063 como quinínogeno (puntuación = 58); b) Se identifica el péptido m/z 1898 como componente C4 del complemento (puntuación = 54).

Los cambios en el área de los picos m/z 1063 y 1898 son independientes del tratamiento inmunosupresor que recibieron los pacientes durante el período de estudio.

La validación del péptido bradiquinina mediante ELISA mostró que, después del tratamiento hipolipemiante con estatinas, hubo una reducción en la concentración de este péptido en las muestras de plasma del 61% de los pacientes analizados (Figura 19C).

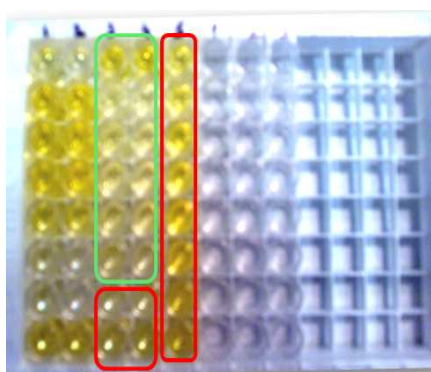


Figura 18. Determinación de la concentración de bradiquinina mediante inmunoensayo enzimático. Los pocillos con el borde en verde y rojo pertenecen a muestras de plasma en situación basal y tras 3 meses de tratamiento con atorvastatina, respectivamente. Las dos primeras columnas corresponden a las diluciones de péptido estándar para la obtención de la recta patrón. La intensidad del color amarillo es inversamente proporcional a la cantidad de bradiquinina en las muestras. Se observa mayor intensidad de color en las muestras a los 3 meses, lo que muestra una reducción en la cantidad de bradiquinina con respecto a las muestras en situación basal.

En la validación del componente C4 del complemento por nefelometría, observamos que, después de la terapia con estatinas, hubo una reducción de este péptido en las muestras de plasma del 75% de los pacientes analizados (Figura 19D).

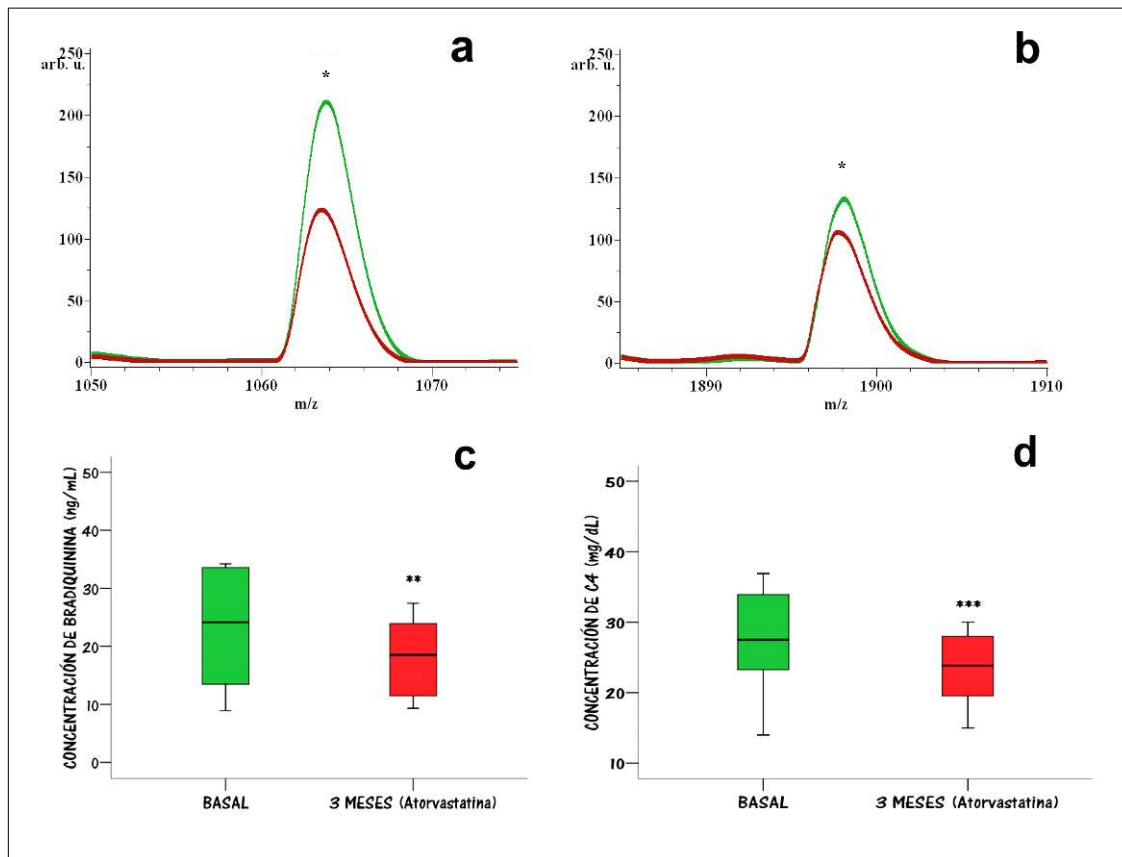


Figura 19. a, b) Intensidad media (unidades arbitrarias) de los péptidos m/z 1063 y 1898 en 54 pacientes sometidos a trasplante renal; c) Concentración plasmática de bradiquinina en 16 pacientes trasplantados renales, determinada por inmunoensayo enzimático; d) Concentración plasmática del componente C4 del complemento, en 8 pacientes trasplantados renales, determinada por nefelometría.

a, b, c, d) El color verde corresponde a la situación basal y el rojo a los 3 meses de tratamiento con atorvastatina.

Test no paramétrico de Wilcoxon entre el estado basal y a los 3 meses: * $P < 0,05$; ** $P = 0,010$; *** $P = 0,050$.

Encontramos una correlación positiva entre la reducción del CT y del cLDL con la disminución del péptido m/z 1898 ($r = 0,375$, $P = 0,005$ y $r = 0,376$, $P = 0,006$, respectivamente). Por el contrario, no hubo correlación entre los cambios en el péptido m/z 1063 con los cambios en el perfil lipídico.

Los cambios de intensidad de los péptidos m/z 1063 y 1898 no correlacionaron con los cambios en la función renal o con los cambios en los marcadores de inflamación analizados.

4. *Discusión*

Tratando de ir más allá en el conocimiento de los efectos pleiotrópicos de las estatinas propusimos para este estudio una interesante metodología proteómica que nos permitió identificar modificaciones en el peptidoma plasmático de un grupo de pacientes trasplantados renales tratados durante 3 meses con atorvastatina.

Tal y como esperábamos, debido a que las estatinas reducen la síntesis de colesterol endógeno, en nuestro estudio el tratamiento con atorvastatina provocó una excelente respuesta hipolipemiente, mejorando el perfil lipídico de los pacientes.

Se ha demostrado además que el tratamiento con estatinas aumenta la tasa de supervivencia incluso en sujetos con niveles normales de colesterol, lo que sugiere que sus beneficios son mayores de lo que cabría esperar sólo por la capacidad de reducir los niveles de colesterol. Con respecto a la función renal, en nuestro estudio el aclaramiento de creatinina y la proteinuria se mantuvieron estables después del tratamiento, aunque la creatinina sérica aumentó significativamente. Este incremento puede ser debido al tratamiento de los pacientes con inhibidores de la calcineurina (ciclosporina y tacrolimus), de los cuales se han descrito reacciones adversas que incluyen nefrotoxicidad.

En este estudio no hemos observado los efectos reno-protectores descritos para las estatinas, pero debemos tener en cuenta que los pacientes incluidos en el estudio tenían una función renal normal, con niveles de proteinuria por debajo del rango nefrótico. Además, el beneficio reno-protector parece estar relacionado con la dosis y el tiempo de tratamiento, por lo que sería necesaria una dosis más alta de atorvastatina durante un período más largo de tiempo para obtener una mejora en la función renal²⁴.

Otro de los hipotetizados efectos pleiotrópicos de las estatinas es el anti-inflamatorio, una cuestión importante ya que la inflamación desempeña un papel principal en el desarrollo de la placa de ateroma. Los niveles de PCR predicen el riesgo cardiovascular y diversos estudios han sugerido que las estatinas reducen los niveles de esta proteína de manera independiente a la reducción de los niveles de colesterol^{25,26}. TNF- α es una citoquina implicada en la inflamación

sistémica que estimula la reacción de fase aguda. Nuestro estudio mostró una disminución de estos marcadores inflamatorios, pero sin alcanzar significación estadística. Cabe destacar que las acciones anti-inflamatorias de las estatinas son dependientes de la dosis administrada y que la mayoría de estudios sobre este fármaco, que muestran reducciones de PCR y TNF- α , están diseñados con dosis más elevadas de atorvastatina o bien durante un período más largo de tiempo. Un estudio reciente concluyó que las acciones anti-inflamatorias de las estatinas se limitaban a aquellos pacientes cuyos marcadores de inflamación estaban elevados al inicio del estudio, pero de nuestro trabajo no podemos sacar esta misma conclusión²⁷.

La espectrometría de masas ha sido previamente utilizada con el fin de aclarar los efectos del tratamiento con estatinas en humanos¹⁴⁻¹⁶. Estos estudios han proporcionado valiosa información sobre los posibles efectos pleiotrópicos del fármaco, pero, hasta donde sabemos, ésta es la primera vez que el efecto de una estatina se estudia el plasma y orina de pacientes trasplantados renales.

En el presente estudio dos péptidos, que encontramos que disminuían en plasma tras el tratamiento con atorvastatina, fueron identificados como fragmentos derivados del quinínogeno y del componente C4 del complemento. Los péptidos bradiquinina y C4 se generan en procesos proteolíticos que ocurren ex-vivo, debido a la activación de las cascadas de coagulación y de complemento. Para la recogida de las muestras sanguíneas utilizamos tubos que contenían EDTA; este anticoagulante inhibe la vía de coagulación pero no impide que se auto-active el factor XII por contacto con una superficie cargada negativamente (paredes del tubo). El factor XII activa a su vez la calicreína, que libera el péptido bradiquinina del quinínogeno de alto peso molecular. Además, el factor XII activa la vía clásica del complemento. Sin embargo, y puesto que todas las muestras de este estudio fueron procesadas de la misma manera, las diferencias estadísticamente significativas observadas en la intensidad de estos péptidos tras el tratamiento con estatinas pueden ser un reflejo de la cantidad de las proteínas no hidrolizadas en la sangre, es decir, quinínogeno y componente C4 del complemento.

El quininógeno es una proteína que actúa en la cascada de coagulación y en el sistema calicreína-quinina. Su escisión por la calicreína plasmática libera la hormona bradiquinina, un importante mediador inflamatorio. La bradiquinina tiene efectos vasodilatadores e hipotensores debido a que estimula la liberación de óxido nítrico, prostaglandina I₂, factor de hiperpolarización del músculo liso y superóxido. La bradiquinina también aumenta la permeabilidad capilar e induce edema; además causa natriuresis al estimular la liberación de la hormona antidiurética y participa en el mecanismo del dolor. Se debe tener en cuenta que ningún paciente de nuestro estudio recibió inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA), los cuales es bien sabido que aumentan los niveles de bradiquinina en sangre al inhibir su degradación²⁸. Se ha publicado recientemente un estudio en pacientes diabéticos en el que no han encontrado ningún efecto de las estatinas sobre el sistema calicreína-quinina²⁹.

El sistema de complemento está implicado en la patogénesis de la aterosclerosis; el componente C4, que forma parte de la vía clásica de activación del complemento, juega un papel importante en la eliminación de complejos inmunes que conducen a la inflamación vascular y aterosclerosis. La proteína se expresa como un precursor de cadena única que se escinde proteolíticamente en un trímero de cadenas alfa, beta y gamma. La división de la cadena alfa da lugar a la liberación de la anafilotoxina C4 (C4a), un mediador de inflamación local. Los niveles séricos de C4 se han descrito como un poderoso predictor de accidente cerebrovascular³⁰ y se ha demostrado que otros componentes de la cascada pueden predecir eventos vasculares: el componente C5a se ha demostrado que predice eventos cardiovasculares en pacientes con aterosclerosis avanzada, y C3 se ha asociado con eventos vasculares en mujeres con enfermedad severa de la arteria coronaria pre-existente^{31,32}. Incluso se han sugerido los niveles séricos de C4 en la monitorización de los efectos anti-inflamatorios de las estatinas en pacientes con enfermedad arterial coronaria³³.

5. Conclusiones

- ✓ La administración durante 3 meses de 10 mg/día de atorvastatina en pacientes trasplantados renales con hipercolesterolemia mejoró su perfil lipídico.
- ✓ Aunque este tratamiento no produjo una reducción significativa de los marcadores de inflamación analizados, mediante técnicas proteómicas observamos una disminución en plasma de dos péptidos pertenecientes a moléculas implicadas en inflamación vascular. De esta manera, teniendo en cuenta que C4a y bradiquinina son potentes mediadores de inflamación, este estudio podría ayudar a profundizar en el conocimiento de los mecanismos anti-inflamatorios atribuidos a las estatinas, por los que estos fármacos podrían mejorar el estado clínico de los pacientes.
- ✓ Los datos preliminares obtenidos en este estudio sugieren una posible aplicación de la espectrometría de masas MALDI-TOF, posterior al fraccionamiento con esferas magnéticas del peptidoma de diferentes muestras biológicas, como una eficaz metodología en la investigación de los efectos de un tratamiento farmacológico, siendo una interesante y novedosa manera para los investigadores de estudiar la pleiotropía o posibles nuevas dianas de los fármacos.

•	ACN	Acetonitrilo
•	Apo	Apolipoproteína
•	C4a	Anafilotoxina C4
•	cHDL	Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad
•	cLDL	Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad
•	CT	Colesterol total
•	HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
•	LP	Lipoproteína
•	MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
•	m/z	Masa / carga
•	TFA	Ácido trifluoroacético
•	TG	Triglicéridos

1. Rigatto, C., Clinical epidemiology of cardiac disease in renal transplant recipients. *Semin Dial* 2003, 16, (2), 106-10.
2. Locsey, L.; Asztalos, L.; Kincses, Z.; Gyorfi, F.; Berczi, C., Dyslipidaemia and hyperlipidaemia following renal transplantation. *Int Urol Nephrol* 1996, 28, (3), 419-30.
3. Kasiske, B. L.; Guijarro, C.; Massy, Z. A.; Wiederkehr, M. R.; Ma, J. Z., Cardiovascular disease after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 1996, 7, (1), 158-65.
4. Barbagallo, C. M.; Pinto, A.; Gallo, S.; Parrinello, G.; Caputo, F.; Sparacino, V.; Cefalu, A. B.; Novo, S.; Licata, G.; Notarbartolo, A.; Averna, M. R., Carotid atherosclerosis in renal transplant recipients: relationships with cardiovascular risk factors and plasma lipoproteins. *Transplantation* 1999, 67, (3), 366-71.
5. Roodnat, J. I.; Mulder, P. G.; Zietse, R.; Rischen-Vos, J.; van Riemsdijk, I. C.; JN, I. J.; Weimar, W., Cholesterol as an independent predictor of outcome after renal transplantation. *Transplantation* 2000, 69, (8), 1704-10.
6. Ong, C. S.; Pollock, C. A.; Caterson, R. J.; Mahony, J. F.; Waugh, D. A.; Ibels, L. S., Hyperlipidemia in renal transplant recipients: natural history and response to treatment. *Medicine (Baltimore)* 1994, 73, (4), 215-23.
7. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002, 106, (25), 3143-421.
8. Kasiske, B.; Cosio, F. G.; Beto, J.; Bolton, K.; Chavers, B. M.; Grimm, R., Jr.; Levin, A.; Masri, B.; Parekh, R.; Wanner, C.; Wheeler, D. C.; Wilson, P. W., Clinical practice guidelines for managing dyslipidemias in kidney transplant patients: a report from the Managing Dyslipidemias in Chronic Kidney Disease Work Group of the National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. *Am J Transplant* 2004, 4 Suppl 7, 13-53.
9. Massy, Z. A.; Keane, W. F.; Kasiske, B. L., Inhibition of the mevalonate pathway: benefits beyond cholesterol reduction? *Lancet* 1996, 347, (8994), 102-3.
10. Davignon, J., Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* 2004, 109, (23 Suppl 1), III39-43.
11. Wang, C. Y.; Liu, P. Y.; Liao, J. K., Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med* 2008, 14, (1), 37-44.
12. Tirumalai, R. S.; Chan, K. C.; Prieto, D. A.; Issaq, H. J.; Conrads, T. P.; Veenstra, T. D., Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol Cell Proteomics* 2003, 2, (10), 1096-103.
13. Richter, R.; Schulz-Knappe, P.; Schrader, M.; Standker, L.; Jurgens, M.; Tammen, H.; Forssmann, W. G., Composition of the peptide fraction in human blood plasma: database of circulating human peptides. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999, 726, (1-2), 25-35.
14. Duran, M. C.; Martin-Ventura, J. L.; Mohammed, S.; Barderas, M. G.; Blanco-Colio, L. M.; Mas, S.; Moral, V.; Ortega, L.; Tunon, J.; Jensen, O. N.; Vivanco, F.; Egido, J., Atorvastatin modulates the profile of proteins released by human atherosclerotic plaques. *Eur J Pharmacol* 2007, 562, (1-2), 119-29.
15. Alonso-Orgaz, S.; Moreno, L.; Macaya, C.; Rico, L.; Mateos-Caceres, P. J.; Sacristan, D.; Perez-Vizcaino, F.; Segura, A.; Tamargo, J.; Lopez-Farre, A., Proteomic study of plasma from moderate hypercholesterolemic patients. *J Proteome Res* 2006, 5, (9), 2301-8.

16. Barderas, M. G.; Tunon, J.; Darde, V. M.; De la Cuesta, F.; Jimenez-Nacher, J. J.; Tarin, N.; Lopez-Bescos, L.; Egido, J.; Vivanco, F., Atorvastatin modifies the protein profile of circulating human monocytes after an acute coronary syndrome. *Proteomics* 2009, 9, (7), 1982-93.
17. Perez, V.; Navarro-Munoz, M.; Bayes, B.; Lauzurica, R.; Pastor, M. C.; Troya, M.; Bonet, J.; Ibernnon, M.; Navarro, M.; Serra, A.; Nunez, A.; Romero, R., Effect of low doses of atorvastatin on the urinary peptide profile of kidney transplant patients. *Transplant Proc* 2009, 41, (6), 2111-4.
18. Villanueva, J.; Philip, J.; Entenberg, D.; Chaparro, C. A.; Tanwar, M. K.; Holland, E. C.; Tempst, P., Serum peptide profiling by magnetic particle-assisted, automated sample processing and MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 2004, 76, (6), 1560-70.
19. Baumann, S.; Ceglarek, U.; Fiedler, G. M.; Lembcke, J.; Leichtle, A.; Thiery, J., 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* 2005, 51, (6), 973-80.
20. West-Nielsen, M.; Hogdall, E. V.; Marchiori, E.; Hogdall, C. K.; Schou, C.; Heegaard, N. H., Sample handling for mass spectrometric proteomic investigations of human sera. *Anal Chem* 2005, 77, (16), 5114-23.
21. Fiedler, G. M.; Baumann, S.; Leichtle, A.; Oltmann, A.; Kase, J.; Thiery, J.; Ceglarek, U., 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, (3), 421-8.
22. Callesen, A. K.; Christensen, R.; Madsen, J. S.; Vach, W.; Zapico, E.; Cold, S.; Jorgensen, P. E.; Mogensen, O.; Kruse, T. A.; Jensen, O. N., Reproducibility of serum protein profiling by systematic assessment using solid-phase extraction and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008, 22, (3), 291-300.
23. Sekiyama E, M. Y., Higo D, Nirasawa T, Ikegawa M, et al. , Applying Magnetic Bead Separation / MALDI-TOF Mass Spectrometry to Human Tear Fluid Proteome Analysis. *J Proteomics Bioinform* 2008, 1, 368-373.
24. Toso, A.; Maioli, M.; Leoncini, M.; Gallopin, M.; Tedeschi, D.; Micheletti, C.; Manzone, C.; Amato, M.; Bellandi, F., Usefulness of atorvastatin (80 mg) in prevention of contrast-induced nephropathy in patients with chronic renal disease. *Am J Cardiol* 2010, 105, (3), 288-92.
25. Albert, M. A.; Danielson, E.; Rifai, N.; Ridker, P. M., Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA* 2001, 286, (1), 64-70.
26. Nawawi, H.; Osman, N. S.; Yusoff, K.; Khalid, B. A., Reduction in serum levels of adhesion molecules, interleukin-6 and C-reactive protein following short-term low-dose atorvastatin treatment in patients with non-familial hypercholesterolemia. *Horm Metab Res* 2003, 35, (8), 479-85.
27. Horiuchi, Y.; Hirayama, S.; Soda, S.; Seino, U.; Kon, M.; Ueno, T.; Idei, M.; Hanyu, O.; Tsuda, T.; Ohmura, H.; Miida, T., Statin therapy reduces inflammatory markers in hypercholesterolemic patients with high baseline levels. *J Atheroscler Thromb* 2010, 17, (7), 722-9.
28. Tschope, C.; Schultheiss, H. P.; Walther, T., Multiple interactions between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems: role of ACE inhibition and AT1 receptor blockade. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002, 39, (4), 478-87.

29. Campbell, D. J.; Kladis, A.; Zhang, Y.; Jenkins, A. J.; Prior, D. L.; Yui, M.; Kenny, J. F.; Black, M. J.; Kelly, D. J., Increased tissue kallikrein levels in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2010, 53, (4), 779-85.
30. Cavusoglu, E.; Eng, C.; Chopra, V.; Ruwende, C.; Yanamadala, S.; Clark, L. T.; Pinsky, D. J.; Marmur, J. D., Usefulness of the serum complement component C4 as a predictor of stroke in patients with known or suspected coronary artery disease referred for coronary angiography. *Am J Cardiol* 2007, 100, (2), 164-8.
31. Speidl, W. S.; Exner, M.; Amighi, J.; Kastl, S. P.; Zorn, G.; Maurer, G.; Wagner, O.; Huber, K.; Minar, E.; Wojta, J.; Schillinger, M., Complement component C5a predicts future cardiovascular events in patients with advanced atherosclerosis. *Eur Heart J* 2005, 26, (21), 2294-9.
32. Szeplaki, G.; Prohaszka, Z.; Duba, J.; Rugonfalvi-Kiss, S.; Karadi, I.; Kokai, M.; Kramer, J.; Fust, G.; Kleiber, M.; Romics, L.; Varga, L., Association of high serum concentration of the third component of complement (C3) with pre-existing severe coronary artery disease and new vascular events in women. *Atherosclerosis* 2004, 177, (2), 383-9.
33. Sampietro, T.; Bigazzi, F.; Rossi, G.; Dal Pino, B.; Puntoni, M. R.; Sbrana, F.; Chella, E.; Bionda, A., Upregulation of the immune system in primary hypercholesterolaemia: effect of atorvastatin therapy. *J Intern Med* 2005, 257, (6), 523-30.