
This is the **published version** of the master thesis:

García Rodríguez, David Andrés; Martínez Martínez, Cristina , dir. Aproximación hacia la diversidad funcional a partir de multiómica comparativa entre pacientes pediátricos con Síndrome Nefrótico Idiopático a través del estado clínico y el genotipo de haptoglobina. 2025. 32 pag. (Màster Universitari en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina)

This version is available at <https://ddd.uab.cat/record/320183>

under the terms of the  license

Aproximación hacia la diversidad funcional a
partir de multiómica comparativa entre
pacientes pediátricos con Síndrome Nefrótico
Idiopático a través del estado clínico y el
genotipo de haptoglobina

Autor: David Andrés García Rodríguez
Directora: Cristina Martínez Martínez

4 DE JULIO DE 2025
VALL D'HEBRON INSTITUT DE RECERCA
Grupo de Fisiopatología Renal
Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina
Facultad de Biociencias
Universitat Autònoma de Barcelona

Resumen

El Síndrome Nefrótico Idiopático (INS) es una enfermedad renal rara, cuya etiología permanece incierta, resaltando la necesidad de encontrar biomarcadores. En este contexto, se postula al genotipo de haptoglobina (Hp), una proteína expresada desde tres genotipos funcionales (Hp1-1, Hp1-2 y Hp 2-2), como posible candidato. Previamente se ha asociado Hp 2-2 a procesos inflamatorios e INS se ha asociado a altas concentraciones de Hp y a disbiosis. Este estudio tuvo como objetivo determinar las diferencias entre los perfiles del microbioma nasofaríngeo e intestinal y el metaboloma fecal entre controles sanos (Ctrl) y pacientes pediátricos con INS, según estado clínico de actividad y remisión, y su genotipo de Hp. La composición microbiana se realizó mediante análisis metagenómicos con PCR de las regiones V3 y V4 del gen ARNr16S y las concentraciones fecales de metabolitos se cuantificaron mediante espectroscopía H-NMR. No se observó disbiosis en ninguno de los perfiles microbianos, pero sí diferencias de la composición taxonómica y funcional entre Ctrl e INS y entre actividad y remisión. El hallazgo principal reveló mayores concentraciones fecales de hipoxantina en los pacientes con Hp 1-2 ($p < 0.05$), en comparación con Hp 1-1. Así mismo, se identificaron correlaciones negativas entre estas concentraciones y la abundancia relativa de *g_Veillonella* ($r = -0.65$, $p = 0.001$) y algunas vías de funciones inferidas relacionadas a factores de virulencia. Estos resultados sugieren la existencia de diferencias significativas halladas en pacientes y entre los diferentes estados clínicos de los perfiles metagenómico y metabolómico que podrían estar moduladas por el genotipo de Hp; sin embargo, es necesario replicar estos métodos en estudios que presenten una muestra de mayor tamaño.

Abreviaturas

BEI: Barrera epitelial intestinal

BFG: Barrera de Filtración Glomerular

Ctrl: Controles sanos

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño tisular

EC: Endotelio capilar

FSGS: Glomeruloesclerosis focal segmentada

GALT: Tejido linfático asociado al intestino

Hp: Haptoglobina

IL: Interleucina

IMG: Genoma Integrado Microbiano

INS: Síndrome Nefrótico Idiopático

KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes

KEGG: Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto

KO: Identificador de ortología KEGG

LPS: Lipopolisacárido

MBG: Membrana Glomerular Basal

MCD: Enfermedad de cambios mínimos

NAMLAA: N- acetil muramoil-L-alanina

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos

PPR: Patrones de reconocimiento

SCFA: Ácidos grasos de cadena corta

sIgA: Inmunoglobulina A secretada

SRNS: Pacientes resistentes a corticoesteroides

SSNS: Pacientes dependientes a corticoesteroides

Th: Linfocitos T colaboradores

TJ: Uniones estrechas

TK: Linfocitos T citotóxicos

Treg: Linfocitos T reguladores

ZO-1: zónula occludens-1

Índice

Título	Página
1. Introducción	2-10
1.1 Implicaciones en la investigación de enfermedades raras	2
1.2 Generalidades del riñón y fisiología del glomérulo	2-4
1.3 Síntomas de INS y tratamiento	4
1.4 El sistema inmunitario y su relación con la haptoglobina	5-6
1.5 La barrera epitelial, un modulador del sistema inmunitario innato	6-7
1.7 El microbioma como parte de la barrera epitelial y una extensión del sistema inmune	7-10
2. Hipótesis-Objetivos	10
2.1 Razonamiento inductivo	10
2.2 Hipótesis	10
2.3 Objetivos	10
2.2.1. Objetivo General	10
2.3.2. Objetivos específicos	10
3. Materiales y métodos	10-13
3.1. Sujetos de estudio	10-11
3.1.1. Criterios de inclusión	11
3.1.2. Criterios de exclusión	11
2.2. Obtención de muestras	11
2.2.1. Muestras nasofaríngeas	11
2.2.2. Muestras fecales	11-12
2.2.3. Extracciones sanguíneas	12
2.3. Aislamiento de ADN	12
2.4. Genotipado de Hp	12
2.5. Análisis metagenómico	13
2.6. Análisis metabolómico	13
2.7. Análisis estadístico	13
3. Resultados	13-22
3.1. Genotipado de Hp	13
3.2. Metagenómica	14-20
3.2.1. Muestras nasofaríngeas	14-17
3.2.1.1. Diversidad alfa y beta	14-15
3.2.1.2. Composición del microbioma nasofaríngeo	15-16
3.2.1.3. Perfil de inferencia funcional	16-17
3.2.2. Muestras fecales	17-20
3.2.2.1. Diversidad alfa y beta	17-18
3.2.2.2. Composición del microbioma fecal	18-19
3.2.2.3. Perfil de inferencia funcional	19-20
3.3. Metabolómica	20-21
3.4. Análisis de correlación	21-22
4. Discusión	22-25
5. Conclusiones	25-28
6. Bibliografía	25-28

1. Introducción

1.1. Implicaciones en la investigación de enfermedades raras.

Según la Unión Europea, una enfermedad rara se define como aquella que afecta a menos de 5 personas por cada 10 000 habitantes dentro de la Comunidad (1). En la actualidad, se estima que existen más de 6000 enfermedades raras, cuya baja prevalencia representan un gran desafío para el sector sanitario, dado que limitan el interés por parte de la industria farmacéutica para el desarrollo de nuevas terapias que puedan remediar o mitigar sus síntomas (2). Como resultado, la investigación en enfermedades raras depende en gran medida de incentivos provenientes de programas públicos; prueba de ello es que, entre 2007 y 2020, se invirtieron más de 3 200 millones EUR destinados a proyectos y programas orientados a su diagnóstico, tratamiento y comprensión (1). A su vez, la limitada experiencia de muchos médicos reconociendo este tipo de enfermedades, conlleva a que se produzcan diagnósticos tardíos o que son prematuramente erróneos. Esta situación compromete la calidad de vida del paciente y supone una carga económica y psicológica para sus cuidadores (3).

Se estima que existen cerca de 150 condiciones comprendidas como enfermedades raras renales, de las cuales la mayoría tienen un origen hereditario. No obstante, algunas poseen etiologías complejas o incluso desconocidas, lo que complica la obtención de un diagnóstico clínico preciso (4). Varios factores como fenotipos clínicos heterogéneos, clasificaciones diagnósticas desactualizadas o la escasez de biomarcadores que sirvan para monitorear la progresión de la enfermedad, limitan los avances terapéuticos dentro de este grupo de enfermedades raras (5). Es por esta razón que en este trabajo se estudió el síndrome nefrótico idiopático (INS), una enfermedad rara renal cuya etiología permanece aún desconocida (6). Esta enfermedad carece de biomarcadores clínicos confiables y no existe un consenso sobre una clasificación adecuada que permita estratificar su progresión. Dado que esta enfermedad afecta directamente la función del riñón, es fundamental comprender la estructura y fisiología de este órgano, así como su relación con la sintomatología presentada (5).

1. 2. Generalidades del riñón y fisiología del glomérulo.

El riñón es un órgano vascularizado y fundamental para la homeostasis del cuerpo dado que ejerce varias funciones como regular la presión arterial, estimular la producción de eritrocitos, filtrar la sangre y eliminar los productos de degradación del metabolismo en forma de orina. Esta última función consiste en tres procesos: la ultrafiltración del plasma, realizada en el glomérulo; seguida de la reabsorción y la secreción de componentes selectivos en los túbulos renales (7).

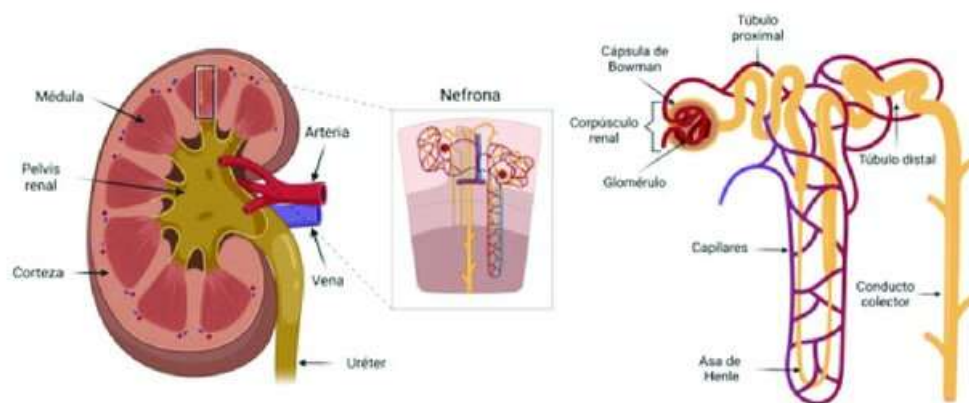


Figura 1. Estructura y localización de la nefrona en el riñón. Imagen obtenida desde la publicación hecha por Centurión *et al.* 2023 (*Enfoques Transdisciplinarios: Ciencia Y Sociedad*, 1(1), 69-82.) (DOI:10.5281/zenodo.1281000)

La unidad funcional del riñón es la nefrona, cuya estructura clave es el glomérulo, un corpúsculo renal ubicado al interior de la cápsula de Bowman (Fig. 1) (8). El glomérulo consiste en una red compleja de capilares, irrigada por la arteriola aferente y drenada por la eferente, cuya estructura permite la ultrafiltración pasiva del plasma proveniente de los capilares hacia el espacio de Bowman, resultando en un ultrafiltrado con una concentración proteica inferior a la del plasma original (7). Este proceso es mediado por la Barrera de filtración glomerular (BFG) dividida en tres capas: el endotelio capilar fenestrado (EC), la membrana basal glomerular (MBG) y los podocitos (9).

En dirección del flujo del ultrafiltrado, el EC permite el paso de agua y solutos de bajo peso molecular, restringiendo macromoléculas como la albúmina y células sanguíneas (7). Rodeando esta capa se encuentra la MBG, una matriz porosa trilaminar con carga negativa que actúa como una barrera fisicoquímica adicional y está formada por colágeno y fibrillas de proteoglicano, secretados por los podocitos y las células endoteliales (9). Próximos al espacio de Bowman y apoyados sobre la MBG se encuentran los podocitos, unas células altamente diferenciadas con prolongaciones denominadas pedículos (Fig. 2). Dichas formaciones están separadas por hendiduras de filtración cubiertas por una delgada membrana conocida como diafragma de hendidura (10). Este diafragma está constituido por complejos de proteínas que incluye nefrina, Neph1, podocina y proteínas ancladas al citoesqueleto del podocito, como *zonula occludens-1* (ZO-1), y participan en la regulación de la permeabilidad selectiva de la BFG. Adicionalmente, la estructura física de las hendiduras restringe el tránsito de proteínas y macromoléculas por tamaño, mientras que las glicoproteínas aniónicas de la MBG lo hacen por carga (11). El ultrafiltrado resultante se transporta del espacio de Bowman a los túbulos renales que componen el resto de la nefrona, lugar donde se llevan a cabo procesos de reabsorción y secreción que completan la formación de orina (8).

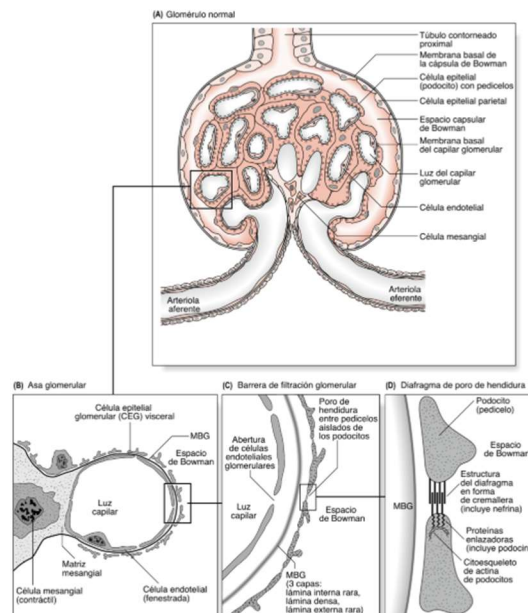


Figura 2. Estructura del podocito y de la Barrera de filtración glomerular. MBG: Membrana basal glomerular. Imagen elaborada por LEE, Vincent. El sistema renal. Elsevier Health Sciences, 2024, p.73 Figura 6.2

Aunque en la formación de orina están involucrados varios procesos, la función de los podocitos es clave para entender las glomerulopatías que generan la pérdida de proteínas a través de la orina. De hecho, se ha comprobado que mutaciones en la expresión de alguna de las proteínas clave para la formación de los diafragmas, como la nefrina, pueden ocasionar un daño irreversible en el podocito, además de la traslocación masiva de proteínas hacia la orina (12) Con esto se entiende que cualquier alteración que pueda sufrir alguno de los componentes de la BFG, compromete la función selectiva de moléculas y termina generando la manifestación de síntomas como proteinuria masiva, hipoalbuminemia, edema e hiperlipidemia, evidenciados en el síndrome nefrótico.

1.3. Síntomas de INS y tratamiento.

El síndrome nefrótico es una enfermedad renal rara caracterizada por proteinuria masiva, definida como una tasa proteína/creatinina en orina ≥ 2000 mg/g que genera una disminución significativa de la concentración de proteínas en sangre y, que además, se manifiesta junto a hipoalbuminemia, edema e hiperlipidemia (4). Esta patología se clasifica según su etiología en congénita, cuando es causada por factores genéticos; secundaria, cuando se manifiesta por una enfermedad sistémica; o idiopática, donde están implicadas glomerulopatías primarias con etiología desconocida (13). Esta última es la forma es la más frecuente, afectando principalmente a pacientes pediátricos, aunque también puede presentarse en adultos.

Aunque el origen de esta enfermedad permanece incierto, Noone *et al.* reconocen que el daño está en el glomérulo, específicamente en los podocitos y en los componentes restantes de la BFG (6). Estudios recientes sugieren que el INS comparte varias características con otros trastornos autoinmunes, basándose en la identificación de anticuerpos dirigidos contra la nefrina y una disregulación de linfocitos B durante la fase activa de la enfermedad, lo cual contribuye a la producción de anticuerpos perjudiciales para el podocito (14).

Según las guías *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO), el tratamiento para alcanzar la remisión en los pacientes con INS consiste en la administración de corticosteroides, específicamente prednisona, una vez descartadas o tratadas infecciones. La respuesta terapéutica permite clasificar a los pacientes en sensibles a los corticosteroides (SSNS), cuando alcanzan remisión completa, con una tasa proteína/creatinina < 2000 mg/g

en 4 semanas o resistentes (SRNS), si la proteinuria masiva persiste (4). Pese a la remisión, entre el 80-90 % de los SSNS presenta al menos una recaída y cerca de la mitad de estos casos desarrolla dependencia a corticosteroides o recaídas frecuentes (5). Esta dependencia se caracteriza por presentar dos recaídas consecutivas, en días alternos durante el tratamiento o en las dos semanas siguiente tras su suspensión. Las recaídas frecuentes se definen como dos o más recaídas en 6 meses o cuatro o más en un año. Para estos casos, se administra un tratamiento con inmunosupresores alternativos como inhibidores de calcineurina (i.e. ciclosporina) o el anticuerpo monoclonal anti-CD20 Rituximab, que incrementan la probabilidad de mayor exposición a efectos adversos e infecciones oportunistas (15).

Aunque la mayoría de los pacientes pediátricos no requieren biopsia, estudios de análisis histopatológicos distinguen diferentes grados de lesión podocitaria, destacando enfermedad de cambios mínimos (MCD), caracterizada por un borramiento de los pedículos y esclerosis focal segmental (FSGS), con pérdida de los podocitos causada por o desprendimiento de estos (16). Tradicionalmente los SSNS se han asociado con MCD y los SRNS con FSGS (6). Sin embargo, esta distinción no siempre es correcta debido a que los SRNS pueden manifestar ambas condiciones histopatológicas y se ha propuesto que MCD puede representar una fase temprana y reversible antes de evolucionar a FSGS (17).

Frentes a estos retos terapéuticos, surge la necesidad de identificar biomarcadores predictivos que anticipen la eficacia del tratamiento o alerten de posibles efectos adversos en fases tempranas del INS (biomarker). Teniendo en cuenta que las recaídas percibidas durante el tratamiento suelen coincidir con episodios de activación inmunitaria, como infecciones respiratorias, vacunas o reacciones alérgicas; se ha sugerido que existe una interacción patológica entre la BFG y las respuestas inmunitarias del huésped (18).

1.4. El sistema inmunitario y su relación con la haptoglobina.

En el INS la respuesta inmunitaria combina mecanismos innatos y adaptativos. El sistema inmunitario innato se activa tras el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o al daño tisular (DAMP). Estas señales son reconocidas por receptores de patrones de reconocimiento (PPR), presentes en células como macrófagos, células dendríticas y células NK que, tras ser activadas, secretan citoquinas proinflamatorias y eliminan activamente patógenos mediante la fagocitosis. Aunque la activación de PPR es eficiente, en caso de ser desregulado podría causar inflamación sistémica (19).

El sistema inmunitario adaptativo se ajustado para la defensa del huésped contra antígenos específicos. Dentro de sus componentes principales están los linfocitos B, un conjunto de células, con diversas funciones, entre las cuales destacan la producción de anticuerpos que puedan reconocer cualquier molécula orgánica, el reconocimiento de antígenos por cuenta propia, las respuestas inmunes humorales de la mucosa o la formación de centros germinales.

Otro componente principal del sistema inmunitario adaptativo son los linfocitos T, detectoras de proteínas antígeno expuestos por las células presentadoras especializadas. Estas células se dividen en tres subtipos principales con distintas funciones: los linfocitos T citotóxicos (TK), encargados de la destrucción de células infectadas por virus; los reguladores (Treg), que modulan la respuesta inmune; y los colaboradores (Th) que sirven de soporte al sistema inmunitario mediante la secreción de citocinas pro o antiinflamatorias, como las interleucinas (IL) o TNF- α (19-20). Sin embargo, la producción de citocinas no se restringe solo a las Th, sino que también puede ser ejercida por otro tipo de células, incluyendo a los linfocitos B, generando una modulación recíproca.

Citocinas, como la IL-6 y TNF- α , inducen la síntesis hepática de haptoglobina (Hp), una proteína de fase aguda, cuya función principal es la captación de hemoglobina libre para el daño oxidativo durante la hemólisis (21). Sin embargo, existen evidencias de que esta proteína

también puede modular la respuesta del sistema inmunitario a través de la interacción con varias células inmunitarias como macrófagos, células dendríticas o linfocitos, impactando significativamente en su activación y función. (22).

La Hp tiene un locus polimórfico con dos alelos denominados como 1 y 2 que se expresan en tres genotipos, Hp 1-1, Hp 2-2 y Hp 1-2, con funciones biológicas diferentes. De estos, Hp 1-1 se caracteriza por tener una mayor velocidad de captación de hemoglobina libre, así como por tener más propiedades antioxidantes que los demás genotipos de Hp (22). Guetta *et al* proponen que los productos proteicos de los alelos Hp 1 y Hp2 tienen papeles opuestos en la modulación de macrófagos tras la hemorragia. Más adelante añaden, basándose sus resultados, que individuos con el genotipo Hp -1 presentan un acople entre el complejo Hp-Hb-1 y el receptor CD163, induciendo la secreción de citocinas antiinflamatorias emitidas por Th1. Por otro lado, mencionan que individuos con el genotipo Hp-2 evidencian que el complejo Hp-Hb-2, produce especies reactivas de oxígeno, lo que podría ocasionar daño vascular e induce la producción de citocinas inflamatorias por parte de Th2 (23)

Stempkowska *et al*, confirman este patrón en enfermedades metabólicas con afectación renal, encontrando que pacientes portadores del genotipo Hp 1-1 presentaron niveles más altos de CD163 e IL-10, mientras que los portadores de Hp 2-2 mostraron niveles más altos de la proteína p53 que puede incrementar la inflamación y agravar enfermedades inflamatorias (24). Así mismo, en un estudio realizado en muestras séricas de pacientes con INS se identificaron concentraciones significativamente más elevadas de TNF- α , IL-6 y Hp en comparación con los controles sanos, proponiendo a la Hp como biomarcadores predictivos de la respuesta hacia el tratamiento (25).

Además de ser moduladores de procesos inflamatorios, las citocinas median la comunicación entre el sistema inmunitario y otros compartimentos celulares, incluida la barrera epitelial intestinal (BEI) (19). Esta estructura, compuesta por células epiteliales y uniones intercelulares no solo actúan como barrera física, sino que también regula la respuesta inmunitaria innata (26). En este contexto, estudios proponen que la prehaptoglobina2, una molécula precursora del alelo Hp2, podría modular la integridad de la BEI, especialmente en condiciones proinflamatorias, sugiriendo un posible vínculo entre el genotipo de Hp, la estabilidad de la BEI y la progresión del INS (27). Esto justifica la necesidad de comprender el funcionamiento y estructura de esta barrera como un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad.

1.5. La barrera epitelial, un modulador del sistema inmunitario innato.

La barrera epitelial es una estructura biológica que restringe el tránsito de microorganismos patógenos hacia el interior del organismo. Entre sus diferentes tipos, BEI destaca por ser la superficie con mayor exposición a alérgenos y agentes externos, como los microorganismos provenientes de la dieta. Además de su función protectora, participa activamente en la absorción de nutrientes que provienen de los alimentos (26).

La BEI está conformada en múltiples capas, con funciones específicas y útiles para su integridad. Desde una orientación basal hacia la superficie luminal, se organizan en tres capas principales. La primera, compuesta por la *lamina propria*, alberga el sistema nervioso entérico, el tejido conectivo y células del sistema inmunitario innato y adaptativo, que interactúan entre sí y que conforman el tejido linfático asociado al intestino (GALT) (28).

Sobre esta capa se encuentra el epitelio, una monocapa de células adyacentes que actúa como barrera física y que está compuesta células especializadas incluyendo enterocitos con microvellosidades (absorción), células Goblet (secreción mucosa), células de Paneth (producción de péptidos antimicrobianos) y sobre las placas de Peyer, las células M que participan en la vigilancia inmunológica de la mucosa y en la secreción de células plasmáticas

de IgA (26). Estas células están unidas entre sí por sistemas de complejos de adhesión que permiten mantener la arquitectura y funcionalidad de la barrera (29) (Fig. 4) Dentro de estos sistemas, los desmosomas y las uniones adherentes tienen como objetivo la adhesión mecánica; entre tanto, las uniones de hendidura permiten la comunicación intercelular (28).

Las uniones estrechas (TJ), están conformadas por proteínas transmembranales que regulan la permeabilidad paracelular (28). Las claudinas regulan vía del poro, permitiendo el paso selectivo de iones pequeños y moléculas no cargadas, mientras que las ocludinas y las ZO-1 median la vía de fuga que permite el flujo limitado de moléculas de mayor tamaño (30). La capa luminal está compuesta por moco secretado por las células Goblet, que sirve como protector de la BEI frente a patógenos ya que posee un alto contenido en IgA secretada (sIgA) y péptidos antimicrobianos (29). Sin embargo, factores como la exposición a antibióticos, contaminantes ambientales, consumo de alcohol o la presencia de infecciones pueden erosionar y afectar su composición, comprometiendo la integridad de la BEI (31,32,33).

La degradación de la mucosa facilita la proliferación de bacterias patógenas y la penetración de alérgenos, lo que incrementa la exposición de las células epiteliales y las TJ a factores proinflamatorios. Esta exposición compromete la estabilidad de la BEI, promueve la activación de la respuesta inmunitaria sistémica y facilita la translocación de componentes bacterianos, como metabolitos y toxinas (34). El incremento en la permeabilidad de la BEI, caracterizado por la pérdida de selectividad paracelular, se ha asociado con manifestaciones clínicas en órganos distantes. Esta observación respalda la hipótesis del eje intestino-órgano y sugiere al intestino como un modulador fundamental para la homeóstasis (29).

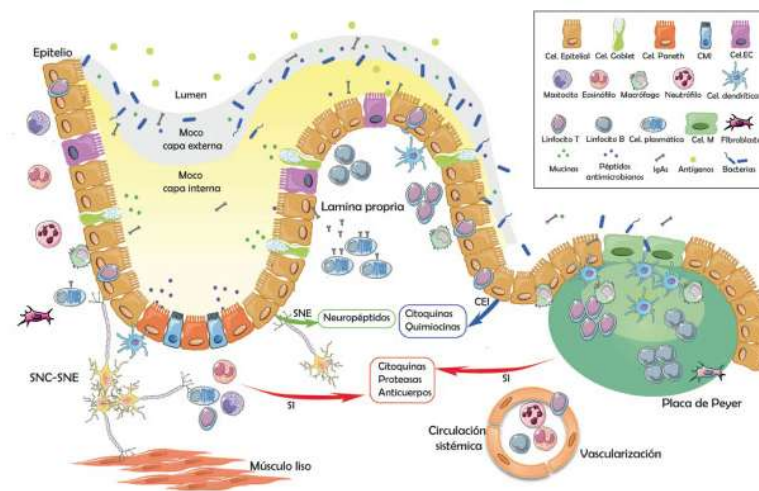


Figura 4. Anatomía y componentes de la barrera epitelial intestinal. Imagen obtenida de Salvo-Romero *et al.* Rev Esp Enferm Dig. 2015 Nov;107(11):686-96. doi: 10.17235/reed.2015.3846/2015.

Sin embargo, las uniones estrechas también podrían estar moduladas por factores genéticos, entre ellos la sobreexpresión de zonulina o prehaptoglobina-2 (27). Esta molécula fue identificada inicialmente en estudios realizados con la bacteria *Vibrio cholerae*, donde se identificó una alta similitud estructural con la toxina Zot, la cual está asociada a la degradación de las TJ y a un aumento de la permeabilidad intestinal (35). La zonulina se caracteriza por inducir la traslocación de las proteínas ZO-1 y ocludina, mediante procesos de fosforilación, lo que promueve el desacople de las TJ y un incremento en la permeabilidad de la BEI (36). Niveles elevados de esta proteína se han relacionado con una disrupción de la BEI en enfermedades inmunes, cardiovasculares y renales. Adicionalmente, se ha demostrado

que la exposición a ciertos antígenos bacterianos y al gluten en el epitelio, pueden elevar las concentraciones de secreción de zonulina (27).

En pacientes con síndrome nefrótico se han encontrado niveles plasmáticos elevados de zonulina en comparación con los controles sanos y se ha observado que la implementación de una dieta libre de gluten puede reducir dichos niveles (37). No obstante, aunque se ha propuesto su participación en la disrupción de la BEI, su uso como biomarcador es controvertido. Los inmunoensayos disponibles no distinguen esta proteína de forma específica y los niveles analizados no se correlacionan con el genotipo de haptoglobina, sugiriendo que la molécula analizada podría corresponder a otras proteínas con estructuras parecidas, como la properdina (38). A pesar de ello, el genotipo de haptoglobina Hp 2-2 se ha asociado a respuestas inmunitarias proinflamatorias y a eventos de translocación, como la endotoxemia (39). Esto hace que se posicione como un posible marcador indirecto de disrupción de la BEI.

Dado que ciertos antígenos bacterianos pueden inducir la secreción de zonulina, así como alterar la funcionalidad de la BEI y la respuesta inmunitaria sistémica, es importante estudiar el papel que juega el microbioma en esta barrera. El microbioma es uno de los componentes estructurales y funcionales de la BEI y varios estudios han relacionado alteraciones en su composición en su función y diversidad con la disrupción de esta barrera y el posible desarrollo de varias enfermedades (29, 31, 32).

1.6. El microbioma como parte fundamental en la barrera epitelial y en la expresión de enfermedades

Según Hou et al, el microbioma se define como la colección de genomas de una comunidad microbiana en un ambiente determinado e incluye no solamente a los taxones encontrados, sino también sus productos metabólicos, componentes estructurales y las condiciones del ambiente (40). El microbioma se encuentra localizado en la zona más luminal de la BEI, lugar donde interactúa con el huésped ofreciéndole varias funciones cruciales entre las cuales destacan el aporte de metabolitos, la regulación energética, la adquisición de nutrientes, la modulación de respuestas inflamatorias, la reparación epitelial y la angiogénesis (28).

Su diversidad está condicionada por una serie de factores genéticos y ambientales. Entre los factores genéticos, se ha observado que ciertas mutaciones pueden alterar los mecanismos de defensa antimicrobiana del huésped. En cuanto a los factores ambientales, los eventos perinatales son determinantes en la colonización inicial del intestino del huésped. Entre estos se incluyen la microbiota materna durante la gestación, el tipo de parto y la lactancia. Otros factores relacionados a factores ambientales tardíos como la dieta, la exposición a infecciones, el uso de medicamentos y los estilos de vida durante la infancia y a lo largo de la vida adulta, también continuarán generando cambios en el microbioma y en el sistema inmune a lo largo de la vida (41). El establecimiento del microbioma intestinal influye sobre la maduración del sistema inmunitario mediante la diferenciación, expansión y desarrollo de Treg, la inducción de Th17 y la regulación de macrófagos intestinales. Otras interacciones entre el microbioma y el sistema inmune como la homeostasis de los linfocitos T intraepiteliales y las interacciones con las células dendríticas sirven de apoyo para mejorar la respuesta inmunitaria (34).

Aunque su composición varía según la región anatómica, se han identificado taxones comunes entre el intestino y otras mucosas, como la nasofaríngea, sugiriendo interacciones que refuerzan la hipótesis del eje intestino-órgano (29, 42). Por ejemplo, Martín-Castaño *et al.* describen una interacción entre el microbioma nasofaríngeo y el intestinal, basándose en el hallazgo de taxones bacterianos comunes, como los *phyla* bacterianos *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidota* y *Firmicutes*; afectados de manera similar durante estados de infección y asociados con la sintomatología y el perfil metabólico del paciente (42). Dado

que los pacientes con INS presentan una mayor susceptibilidad a infecciones, especialmente respiratorias (18), analizar el microbioma nasofaríngeo podría aportar información útil sobre los cambios en la composición y funcionalidad microbiana de estos pacientes y su vínculo con la respuesta al tratamiento. Estas observaciones refuerzan la necesidad de comprender el cuerpo humano como un ecosistema interconectado, cuya homeostasis depende en gran parte de la composición y funcionalidad del microbioma. La alteración de estos factores (disbiosis), potencialmente podrían tener un impacto negativo en la estabilidad de este ecosistema, influenciando, desde una perspectiva clínica, sobre el desarrollo de diversas enfermedades (43).

A pesar de ser un campo emergente, el efecto de la disbiosis se ha asociado a la degradación de la barrera epitelial, a la desregulación de respuestas inmunes y al desarrollo de varias enfermedades. De forma similar a la BEI, existen varios estudios que correlacionan una disbiosis en el intestino con el desarrollo de enfermedades que afectan a otros órganos, como el Alzheimer, las enfermedades cardiovasculares y respiratorias (29, 44). Una posible explicación es que, en condiciones de disbiosis, algunas bacterias oportunistas proliferan descontroladamente; favoreciendo la formación de biofilms y la secreción de compuestos como metabolitos, enzimas y toxinas, capaces de afectar a la composición y funcionamiento de la mucosa (45).

Entre estos compuestos destaca el Lipopolisacárido (LPS), cuya acumulación afecta la expresión de proteínas de TJ como ZO-1, e incrementa la permeabilidad de la BEI. En condiciones de disbiosis, la erosión en la composición de la mucosa y un mal funcionamiento de la fosfatasa alcalina intestinal, permiten la interacción directa del LPS con el epitelio. Bajo estas condiciones, se activan receptores como el TLR4 mediante el complejo LPB/CD14 y se promueve la cascada de señalización molecular de NF- κ B. Estas activaciones finalizan con la liberación de citocinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-13, las cuales pueden inducir a la disrupción de la permeabilidad paracelular, mediante la desregulación de la expresión de claudina-2. Una vez comprometida la BEI, el LPS puede translocarse hacia el torrente sanguíneo, fenómeno conocido como endotoxemia, incrementando la respuesta inflamatoria sistémica (46). Resultados preliminares obtenidos en el laboratorio evidenciaron una mayor concentración de LPS en los pacientes con INS en recaídas, especialmente en los SRNS. Así mismo, se observaron efectos inhibitorios del sobrenadante fecal de los pacientes y del LPS sobre la expresión de ZO-1. Estos hallazgos sugieren que el microbioma puede tener componentes bacterianos que podrían contribuir a la alteración de la BEI en estos pacientes.

Al igual que en la barrera epitelial, la alimentación y los patrones en los estilos de vida son factores que modulan los balances en el microbioma (31, 41). Se ha encontrado que una alimentación rica en grasas y proteínas estimula el crecimiento poblacional de bacterias proteolíticas productoras de metabolitos que pueden transformarse en compuestos urémicos. Estos compuestos involucran la activación de factores inflamatorios y aumentan la demanda funcional sobre el riñón. Por lo contrario, una dieta rica en fibra y verduras induce el crecimiento celular de bacterias sacarolíticas productoras de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), característicos por su capacidad antiinflamatoria (44). Los SCFA tienen efectos beneficiosos para el tracto intestinal ya que incrementan la motilidad y el flujo sanguíneo, regulan el pH, aumentando la recaptación y absorción de nutrientes; regulan la inmunidad de la mucosa y estimulan la producción de Treg y Th, además de la respuesta inmune antimicrobiana (29, 34). Estas observaciones resaltan la importancia de no solamente estudiar la diversidad taxonómica, sino también funcionalidad microbiana. Conocer la funcionalidad que estos taxones desempeñan en el ecosistema humano, podría significar avanzar en el entendimiento etiológico de ciertas enfermedades. En este aspecto, el análisis del metaboloma, permite cuantificar metabolitos derivados de la actividad microbiana y vincularlos con estados fisiológicos o patológicos.

Utilizando este método, Wang *et al.* demostraron que ciertos taxones, como las especies *Eggerthella lenta* y *Fusobacterium nucleatum* incrementan la producción de toxinas urémicas, lo cual agravaba la fibrosis renal y el estrés oxidativo en los pacientes con fallo renal, mientras que en los ratones promueve progresión a enfermedad renal crónica. Por otro lado, especies probióticas como *Bifidobacterium animalis* mostraron un efecto protector al reducir los niveles de abundancia las bacterias patógenas y los niveles de toxinas, así como la severidad de la enfermedad en las ratas (47).

En contexto de INS varios estudios han estudiado el microbioma intestinal y su papel en la producción de SCFA. Tsuji *et al.* identificaron niveles bajos de CD4, Tregs, junto con una reducción de las concentraciones de SCFA y una disminución de bacterias productoras de este compuesto en pacientes pediátricos con recaídas, en comparación con quienes no las presentaban (48). Por su parte, Kang *et al.* no encontraron diferencias antes y después del tratamiento en la riqueza, ni en la diversidad del microbioma; sin embargo, evidenciaron un incremento de algunas bacterias productoras de SCFA y vincularon rutas metabólicas inferidas con una mayor frecuencia de recaídas (49).

Estudios posteriores confirmaron pacientes con recaídas presentaban un perfil con disbiosis intestinal, caracterizado por una proporción más baja de bacterias productoras y un crecimiento más bajo de Tregs desde el debut, o primer episodio, hasta la remisión. En adultos con INS se observó disbiosis intestinal, mayor abundancia de taxones relacionados con parámetros clínicos relevantes para la enfermedad como los índices de proteinuria, albumina, nitrógeno uréico en sangre o creatinina sérica. (50).

Más adelante, Wang *et al.*, demostraron que las alteraciones en el microbioma intestinal caracterizadas por alteraciones en la abundancia de bacterias productoras y no productoras de SCFA, en pacientes con INS desaparecen tras el tratamiento de glucocorticoides (51). Sin embargo, pese a haber hallado diferencias en la inferencia funcional de este microbioma, no profundizaron en las implicaciones fisiopatológicas de dichas alteraciones. Estos resultados resaltan la utilidad que puede tener estudiar la composición funcional del microbioma y su reacción con la estabilidad de la BEI, la inmunoregulación y la respuesta terapéutica.

Además, estos hallazgos promueven nuevos cuestionamientos sobre la posible interacción entre genotipo de Hp y la composición y funcionalidad del microbioma en pacientes con INS. Considerar estas variables en función del estado clínico del paciente podría ser esencial para evaluar el impacto que tienen el microbioma y el genotipo de Hp sobre la respuesta al tratamiento o la progresión de la enfermedad.

2. Hipótesis-Objetivos

2.1. Hipótesis.

Los pacientes pediátricos con INS y genotipo Hp 2-2 presentan una mayor abundancia relativa tanto de taxones bacterianos intestinales y nasofaríngeos asociados a procesos inflamatorios, como de funciones potenciales inferidas asociadas a rutas metabólicas proinflamatorias y menores concentraciones fecales de SCFA, en comparación con los pacientes portadores de los genotipos Hp 1-1 y Hp 1-2.

2.2. Objetivos.

2.2.1. Objetivo General

Determinar si existen diferencias significativas entre la abundancia relativa de taxones bacterianos y funciones inferidas del microbioma intestinal y nasofaríngeo, así como en las concentraciones fecales de metabolitos, entre pacientes pediátricos con INS y controles sanos,

considerando el estado clínico (actividad vs. remisión) y el genotipo de Hp de los pacientes (Hp 1-1, 1-2 y 2-2).

2.2.2. Objetivos específicos

Para alcanzar este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar el genotipo de Hp de los pacientes con INS y los controles sanos.
2. Caracterizar y comparar la abundancia relativa de la composición taxonómica y de funciones inferidas del microbioma intestinal y nasofaríngeo en controles sanos y pacientes con INS, considerando su estado clínico y según el genotipo de Hp.
3. Cuantificar y comparar las concentraciones de metabolitos fecales entre controles sanos y pacientes con INS, tipos de estado clínico y entre los genotipos de Hp.
4. Examinar correlaciones entre la abundancia de taxones y de funciones inferidas del microbioma y las concentraciones de metabolitos fecales en pacientes con INS, estratificados según el genotipo de Hp y estado clínico, para identificar posibles interacciones entre el microbioma y el metaboloma del huésped implicados en la progresión y remisión del paciente.

3. Materiales y métodos

3.1. Sujetos de estudio.

Este estudio se llevó a cabo con muestras de pacientes pediátricos provenientes de las instituciones Hospital Sant Joan de Deu y Hospital de Vic. El tamaño de la muestra estaba compuesto por 47 individuos de los cuales 20 fueron clasificados como controles sanos (Ctrl) dado que correspondían a hermanos que no presentaban la enfermedad. Las 27 muestras restantes pertenecían a pacientes con síndrome nefrótico idiopático (INS).

A su vez, los pacientes fueron clasificados según su estado clínico en el momento de la recolección de muestras, identificándose en remisión (n= 16) aquellos que presentasen niveles de proteinuria restablecidos indicados por la tasa proteína-creatinina <2000mg/g; y en actividad (n= 11) quienes aún presentaban índices de proteinuria masiva (>2000mg/g) compatibles con la patología en actividad.

El diagnóstico fue realizado y descrito clínicamente por nefrólogos, basándose en los índices de proteinuria y edema expuestos en las guías KDIGO para pacientes pediátricos (4).

3.1.1. Criterios de inclusión

Se tomaron muestras de pacientes con edades comprendidas entre >4 y <18 años, con diagnóstico de síndrome nefrótico confirmado y con un origen de la enfermedad idiopático.

El estudio incluyó pacientes que hubieran presentado enfermedades crónicas como celiaquía o alergias respiratorias/alimenticias o algún cuadro infeccioso relacionado con recaídas, dentro de los 3 meses previos al muestreo. Los individuos sin síntomas de patologías renales, digestivas o respiratorias conformaron el grupo control.

Para la toma de muestras fue necesaria la firma del consentimiento legal escrito por el paciente. En caso de que fuese menor de 12 años, cualquiera de los progenitores o tutores legales debía firmarlo.

3.1.2. Criterios de exclusión

Dentro de este estudio se descartaron aquellas muestras que presentaban mutaciones monogénicas en genes asociados a podocitopatías hereditarias. También se descartaron las

muestras de pacientes que hayan estado bajo tratamiento de antibióticos, antiinflamatorios no esteroideos, antihistamínicos, anticolinérgicos, salicilatos, opioides o cualquier medicamento que aliviase síntomas de diarrea dentro de las cuatro semanas previas a la toma de las muestras.

De igual manera, quedaron excluidos los casos donde se evidenciaron características que indicasen una causa secundaria de enfermedad glomerular u otras enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares, obesidad (IMC > 95° percentil), diabetes o síndrome del intestino irritable.

3.2. Obtención de muestras

Se recolectaron muestras nasofaríngeas, fecales y sanguíneas de todos los individuos reclutados.

3.2.1. Muestras nasofaríngeas.

La recolección de muestras nasofaríngeas se realizó mediante frotis nasal utilizando hisopos estériles que fueron introducidos inmediatamente en tubos criogénicos con medio de preservación del material genético. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

3.2.2. Muestras fecales.

Las muestras fecales fueron recolectadas por los pacientes y controles en su domicilio, congeladas inmediatamente tras la deposición y transportadas en la siguiente visita clínica en dos tipos de contenedores, destinados al análisis metagenómico y metabolómico. Una vez recibidas en el laboratorio, las muestras fueron homogeneizadas, alicuotadas y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

3.2.3. Extracciones sanguíneas

Las muestras sanguíneas de los pacientes se recolectaron durante la visita médica en tubos EDTA y se usaron para la extracción del ADN de los pacientes.

3.3. Aislamiento de ADN.

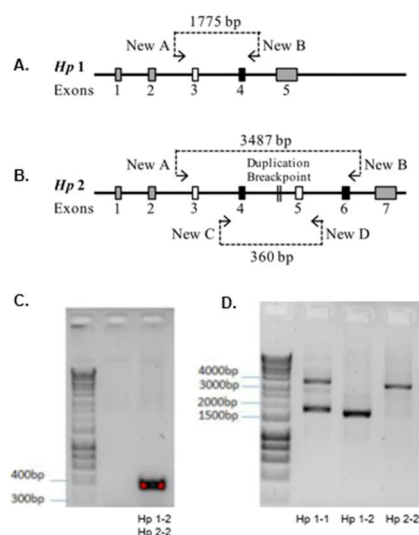
El ADN fue extraído a partir de sangre total, siguiendo el protocolo del kit Gentra Puregene (Qiagen, Hilden, Alemania).

3.4. Genotipado de Hp.

Una vez obtenido el ADN de las muestras sanguíneas de los pacientes se realizó el genotipado de Hp, utilizando para ello la metodología empleada por Cupaioli *et al.* (Fig. 5). En resumen, se realizó una PCR, para determinar el genotipo de Hp, utilizando para ello el kit “Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix”.

Durante este proceso, se emplearon dos parejas primers diferentes. La primera consistió en los primers NewA (5'- GGGGTTCCCTGCCAGAAATGA -3') y NewB (5'- CCCTGGCTGGTGAAGTGTATT -3') que sirvieron para amplificar la región específica de los alelos Hp1 que proporcionan una banda de 1757 pb y de Hp2, con una banda de 3481 pb.

La segunda pareja de primers fue utilizada con el fin de verificar los casos dudosos, donde la banda de Hp2 se observaba muy tenue. Para ello se utilizaron los primers NewC (5'- ATGCCAACCTGCCTCGTATT -3') y NewD (5'- CGAACCGAGTGCTCCACATA -3') que amplificaron una secuencia específica de 360pb correspondiente a Hp2. El patrón de bandas esperado se muestra en la Fig. 5.



1. **Figura 5.** Estructura de los alelos de Hp y sus primers utilizados en la PCR. (A) Alelo Hp 1 con la región de amplificación de 1775 pb utilizadas por NewA y NewB. (B) Alelo Hp 2 y sus las regiones de amplificación de 3847 pb para NewA y NewB y de 360 pb para NewC y NewD. Geles de agarosa al 1% que evidencia la presencia de los amplicones de 360 pb donde se usó NewC y NewD (C) y de los amplicones de 1775 pb y 3487 pb, con los primers NewA y NewB (D). Imagen obtenida por Cupaioloi *et al.* Con modificaciones CUPAIOLI, *et al. Sci Rep* **10**, 7758 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64679-w>

3.5. Análisis metagenómico.

Los análisis de diversidad, composición microbiana e inferencia del perfil funcional fueron realizados en colaboración con Microomics SL. Para su desarrollo, se analizaron las comunidades microbianas a través de la amplificación mediante PCR de las regiones variables V3-V4 del gen de ARNr16S y secuenciación en la plataforma Illumina Miseq. Después, las secuencias forward y reverse desmultiplexadas se procesaron utilizando QIIME2.

El cálculo de la diversidad alfa fue elaborado usando las métricas de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUS) observadas, para estimar la riqueza y el índice de Pielou para evaluar la homogeneidad. Con respecto a la diversidad beta, se emplearon análisis de coordenadas principales (PcoA) basándose en la disimilitud de las distancias de Jaccard para medidas cualitativas e índices de distancia Bray Curtis, para medidas cuantitativas.

3.6. Análisis metabólico.

Este procedimiento se realizó con el apoyo de Biosfer Teslab para evaluar la interacción entre el microbioma intestinal y el metabolismo humano. Para ello, se envió una alícuota con 100 mg de muestras fecales que fue analizada mediante espectrofotometría espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-H1), utilizando fosfato trisódico como estándar químico. El pico de concentración interna del vehículo se utilizó como referencia para determinar la concentración de cada metabolito.

La identificación de los metabolitos se llevó a cabo teniendo en cuenta su peso molecular. El resultado de los datos obtenidos permitió identificar la concentración de los metabolitos obtenidos y su clasificación en distintas categorías: SCFA, aminoácidos y metabolismo

energético o de nucleótidos. También, se tuvo en cuenta la identificación de diferentes tipos de lípidos como el colesterol, ácidos grasos, fosfolípidos y glicéridos.

3.7. Análisis estadístico.

Una vez obtenidos los datos correspondientes al genotipo de Hp y los análisis metagenómicos y metabolómicos, se realizaron comparaciones teniendo en cuenta el estado de la enfermedad, así como el tipo de Hp.

Por medio de una prueba de normalidad de *Shapiro-Wilk* se verificó si los datos eran paramétricos. De ser así, se usarían la *t* de student para el análisis comparativo de dos grupos y ANOVA donde hubiese más de dos. Para los datos que no cumplieron los criterios de normalidad, se utilizaron pruebas *U* de Mann-Whitney. Por otro lado, para las comparaciones según el genotipo de Hp (Hp1-1, Hp1-2 y Hp2-2), se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

Finalmente, se realizó una prueba de correlación entre los datos hallados en los análisis metagenómicos y en los metabolómicos, utilizando el coeficiente de Spearman cuando no se cumplía la normalidad, y el de Pearson en caso. Se tomaron como válidas aquellas correlaciones donde $r \geq 0.5$. Se consideró significación estadística cuando $p \leq 0.05$.

4. Resultados

4.1. Genotipado de Hp.

El genotipo de Hp 1-2 fue el más frecuente, habiendo sido observado en 18 pacientes, mientras que cinco evidenciaron el genotipo Hp 1-1 y tres el genotipo Hp 2-2.

4.2. Metagenómica

4.2.1. Muestras nasofaríngeas.

4.2.1.1. Diversidad alfa y beta.

Se tomaron 38 muestras, distribuidas en 13 Ctrl y 25 pacientes con INS. De estos pacientes, nueve se encontraban en estado clínico de actividad y 14 en remisión.

No se observaron diferencias significativas en la riqueza cuando se comparó entre la diversidad alfa de los grupos Ctrl e INS ($p=0.29$), ni entre pacientes en Actividad y remisión ($p=0.51$) (Fig. 6-A). De igual manera, tampoco se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en términos de homogeneidad en ninguna de las dos comparaciones ($p=0.80$, $p=0.14$, respectivamente) (Fig. 6-B).

Debido al tamaño muestral limitado, no se realizaron análisis estadísticos entre genotipos de Hp; únicamente se evaluaron posibles tendencias. Sin embargo, no se identificaron diferencias entre ellas. Estos resultados sugieren que, en cada una de las comparaciones, los grupos comparten una diversidad alfa similar en el microbioma nasofaríngeo.

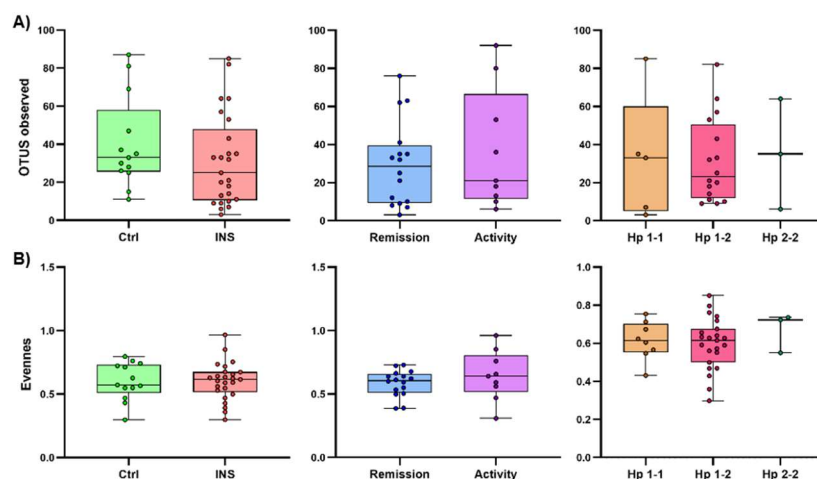


Figura 6. Diversidad alfa del microbioma nasofaríngeo. (A) Riqueza medida por el número de OTUS observados. (B) Homogeneidad según el índice de Pielou.

Con respecto a la diversidad beta, no se observaron diferencias significativas entre Ctrl e INS, ni entre pacientes en actividad y remisión. Los índices de Jaccard y Bray Curtis, evaluados mediante Permanova, tampoco evidenciaron variaciones significativas entre controles y pacientes con INS (Jaccard $p=0.177$, Bray Curtis $p=0.255$) (Fig. 7 A-B). Tampoco se observaron cambios entre los pacientes activos y los que estaban en remisión (Jaccard $p=0.221$, Bray Curtis $p=0.255$) (Fig. 7 C-D). Esto propone que la diversidad beta del microbioma nasofaríngeo no varía entre controles sanos y pacientes, ni entre los diferentes estados de la enfermedad.

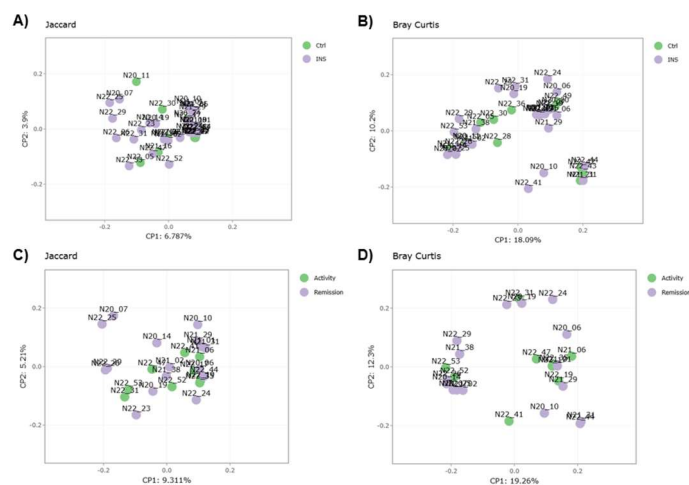


Figura 7. Análisis coordinado principal (PCoA) de la diversidad beta nasofaríngeo para medir la disimilitud entre controles sanos y pacientes según el índice de Jaccard (A) y Bray Curtis (B) y entre pacientes en estado actividad y remisión de acuerdo con los índices Jaccard (C) y Bray Curtis (D).

4.2.1.2. Composición del microbioma nasofaríngeo

El microbioma de las muestras nasofaríngeas estuvo compuesto por un total de 15 *phyla*, 26 clases, 71 órdenes, 118 familias y 239 géneros. Los *phyla* con mayor porcentaje de frecuencia relativa estaban conformados por *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*, coincidiendo con la estructura microbiana del bioma nasofaríngeo (Fig. 8).

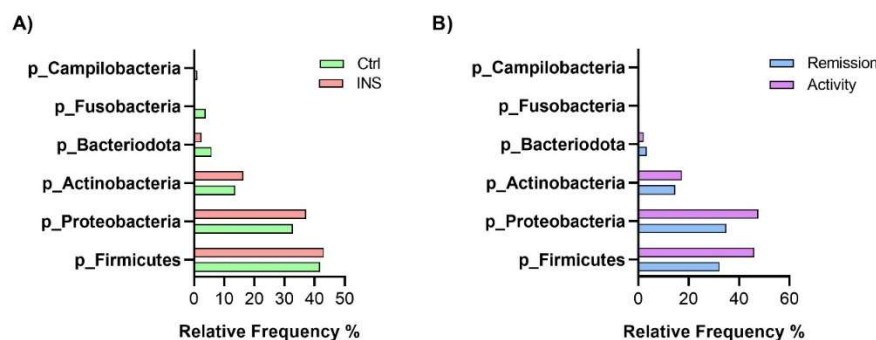


Figura 8. Comparación de la composición microbiana nasofaríngea nivel de phylum entre (A) controles sanos y pacientes y (B) pacientes en estado clínico de remisión y actividad.

Solamente se encontró una diferencia significativa, a nivel de género, en la composición del microbioma entre el microbioma de Ctrl e INS, correspondiente a una disminución de *g_Prevotella* en los pacientes ($p = 0.00088$) (Fig. 9-A).

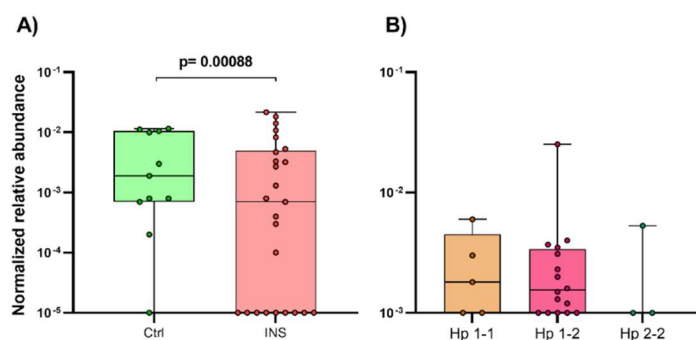


Figura 9. Gráfico de cajas de la abundancia relativa normalizada del género *Prevotella* en las muestras nasofaríngeas de A) Ctrl vs. INS y B) según el genotipo de Hp.

4.2.1.3. Perfil de inferencia funcional

El perfil de inferencia funcional fue analizado con el fin de predecir el potencial funcional de la comunidad microbiana. Para ello se utilizó como estrategia un enfoque basado en el gen marcador de la subunidad del ARN ribosómico 16S (ARNr16S), donde las secuencias se alinearon con un árbol de referencia basado en genes 16S de la base de datos del Genoma Integrado Microbiano (IMG). La anotación funcional de estos genomas se basó en la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG) y fue representado mediante el identificador de ortología KEGG (KO).

En total, se hallaron 6752 perfiles funcionales KO entre Ctrl y INS, de las cuales 92 evidenciaron diferencias significativas. Entre pacientes en actividad y remisión, se observaron 6412 perfiles funcionales KO, con 63 que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$). A partir de estos resultados, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional con las vías que presentaron significancia.

En la comparativa entre Ctrl e INS, se distinguieron 15 vías KEGG con valores significativos (p ajustado < 0.05) (Fig. 10-A), destacando con una diferencia más marcada (p ajustado < 0.01) las vías de Biosíntesis de Aminoácidos, Biosíntesis de Cofactores y Metabolismo de Carbono. El análisis de relaciones funcionales, representado mediante dotplot, mostró que la mayoría de los KO asociados estaban enriquecidos en Ctrl a excepción de la vía de Biosíntesis de Penicilina y Cefalosporina que se encontraron en INS.

Por otra parte, el análisis comparativo entre subgrupos de pacientes mostró 6 vías de KEGG (p ajustado <0.05) (Fig. 10-B), resaltando con una mayor significancia (p ajustado < 0.001) las vías de Sistema de Dos Componentes (p ajustado $= <0,000001$), Quimiotaxis Bacteriana (p ajustado $= 0,00054$), Formación de Biofilms en *Pseudomonas aeruginosa* (p ajustado $= 0,00074$), Formación de Biofilms en *Vibrio cholerae* (p ajustado $= 0,01331$) y Metabolismo de Sulfuro (p ajustado $= 0,01331$).

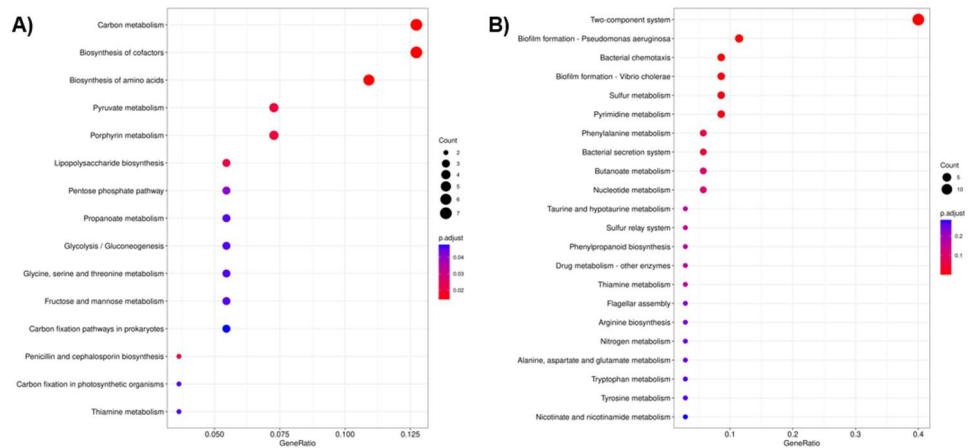


Figura 10. Dot plot de las 30 vías KEGG de perfiles de inferencia funcional más representadas en (A) Ctrl vs. INS y (B) entre pacientes en actividad y en remisión.

Aunque la mayoría de KO asociados a estas vías se predijo relativamente más abundante en los pacientes que se encontraban en actividad, la vía KEGG del Metabolismo de Sulfuro infirió una mayor abundancia relativa de KO en el estado clínico de remisión.

4.2.2. Muestras fecales

4.2.2.1. Diversidad alfa y beta

Al igual que en la diversidad alfa analizada en el microbioma nasofaríngeo, no se observaron diferencias significativas en términos de riqueza entre las comparativas Ctrl e INS ($p=0.65$), ni entre actividad y remisión ($p=0.47$) (Fig. 11-A). Del mismo modo, la homogeneidad del microbioma intestinal tampoco evidenció diferencias entre Ctrl e INS ($p=0.59$), ni entre pacientes en actividad y en remisión ($p=0.29$) (Fig. 11-B).

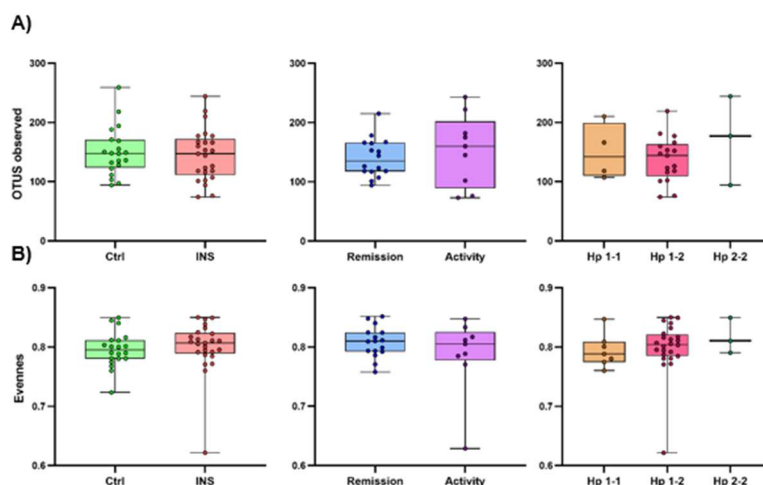


Figura 11. Diversidad alfa del microbioma fecal. (A) Riqueza medida por el número de OTUs observados. (B) Homogeneidad según el índice de Pielou.

Del mismo modo, no se encontraron diferencias en la diversidad beta al comparar entre Ctrl e INS en el índice de Jaccard ($p=0.67$), ni en el índice de Bray Curtys ($p=0.21$). Resultados similares se obtuvieron en el análisis comparativo entre pacientes en actividad y remisión, sin evidenciar diferencias significativas en ninguno de los dos índices (Jaccard $p=0.18$; Bray Curtys $p=0.25$). Esto podría indicar que la composición de la diversidad microbiana intestinal es similar tanto cualitativa, como cuantitativamente entre controles y pacientes, así como entre los subgrupos de pacientes.

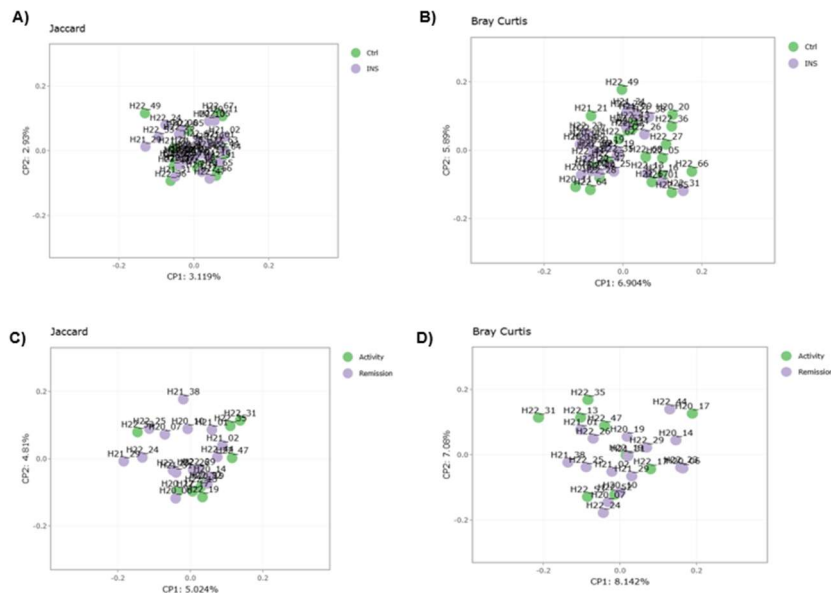


Figura 12. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la diversidad beta en muestras fecales. Comparación entre controles sanos y pacientes según el índice de disimilitud de Jaccard (A) y Bray Curtys (B) y entre pacientes en actividad y remisión de acuerdo con los índices Jaccard (C) y Bray Curtys (D).

4.2.2.2. Composición del microbioma fecal.

Se identificaron 17 *phyla*, 24 clases, 49 órdenes, 84 familias y 223 géneros al analizar Ctrl vs. INS, mientras que entre pacientes se encontraron 16 *phyla*, 22 clases, 47 órdenes, 79 familias y 201 géneros. Como suele evidenciar el microbioma intestinal, los *phyla* más dominantes en ambas comparaciones fueron *Firmicutes*, *Bacteroidota* y *Proteobacteria* (Fig. 13).

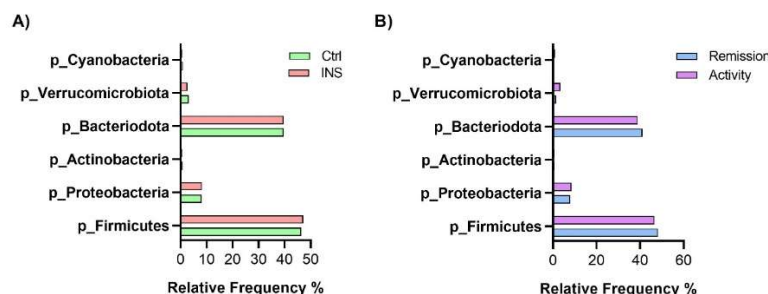


Figura 13. Comparación de la composición microbiana fecal a nivel de *phylum* entre (A) controles sanos y pacientes y (B) pacientes en estado clínico de remisión y actividad.

Diferencias significativas fueron encontradas entre los géneros *Collinsella* ($p= 0.002$), *Streptococcus* ($p= 0.01$), *Anaerostipes* ($p= 0.025$), *Clostridium* ($p= 0.03$) y *Granulicatella* ($p= 0.03$) al comparar Ctrl vs. INS. La mayoría de estos géneros, se observaron presentes en INS, a excepción de *Collinsella*, cuya abundancia relativa fue mayor en los controles sanos (Fig. 14-A).

Al comparar entre pacientes en actividad vs. remisión, se encontraron índices de abundancia relativa de los géneros *Fusicatenibacter* ($p= 0.002$), *Erysipelatoclostridium* ($p=0.003$) y *Agathobacter* ($p= 0.01$) más altos en remisión, mientras que el género *Veillonella* tuvo una abundancia relativa significativamente mayor ($p=0.01$) en los pacientes en estado clínico de actividad (Fig.14 -B). Pese a no contar con un análisis estadístico a causa del tamaño de muestral, en la comparativa según el tipo de haploglobina se reportó una tendencia de abundancia relativa predominante en el genotipo Hp 1-1 (Fig. 14-C).

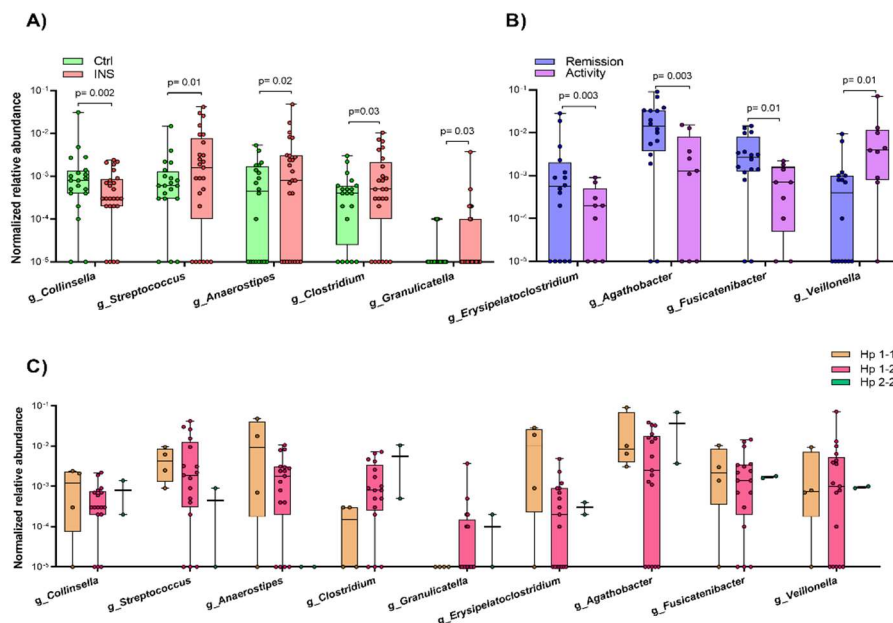


Figura 14. Comparación de la composición microbiana fecal a nivel de genero entre (A) controles sanos y pacientes (B) pacientes en estado clínico de remisión y actividad y (C) según el genotipo de haploglobina de los pacientes.

4.2.2.3. Perfil de inferencia funcional.

Las pruebas fecales determinaron un total de 4245 perfiles funcionales de KO, de los cuales 255 mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en su abundancia. Por su parte, los pacientes revelaron un total de 3763 perfiles funcionales de KO, con diferencias significativas ($p < 0.05$) en 370 de ellos.

El análisis de enriquecimiento de inferencia funcional reveló 15 vías KEGG (p ajustado < 0.05) (Fig. 15), entre las que destacaban por su índice de significancia (p ajustado $< 1 \times 10^{-5}$) las vías de Sistema de Fosfotransferasa (PTS), Sistema de Secreción Bacteriana, Metabolismo de Sulfuro, Metabolismo de Fructosa y Manosa, Sistema de Dos Componentes y Metabolismo de Galactosa.

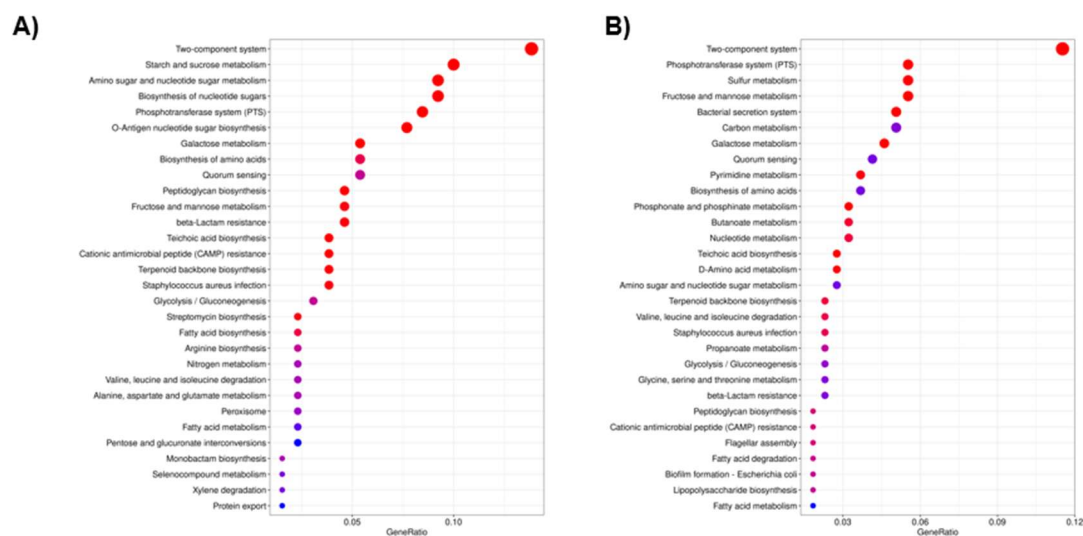


Figura 15. Dot blot con las 30 vías KEGG de perfiles de inferencia funcional más representadas en (A) Ctrl vs. INS y (B) entre pacientes en actividad vs. remisión.

En el análisis de enriquecimiento se predijeron 18 vías de KEGG con valores significativos (p ajustado <0.05). De estas, 11 tuvieron KO asociados que se predijeron con mayor abundancia relativa en INS, incluyendo a la vía del Metabolismo de Galactosa (presentado cuatro de siete KO). Las siete vías restantes evidenciaron una mayor dominancia asociada al grupo Ctrl.

Aunque varios KO asociados fueron inferidos con una abundancia relativa mixta en las vías KEGG, siete de ellas estuvieron conformadas por KEGGs solamente identificados en INS como las vías de Sistema de Fosfotransferasa, Resistencia de Péptido Cationico Antimicrobiano (CAMP) o Resistencia a Beta-Lactámicos. La vía de Biosíntesis del Azúcar Nucleotídico del Antígeno-O”, fue la única compuesta por KO cuya abundancia relativa predominaba en el grupo Ctrl.

En la comparativa realizada entre pacientes, 21 vías KEGGs arrojaron diferencias significativas (p ajustado <0.05). Entre estas vías, la de Infección de *Staphylococcus aureus* tuvo una abundancia relativa más alta de los KO que se predijeron en pacientes en remisión a comparación de los pacientes que estaban en actividad. Las vías de Fosfonato y Fosfinato, Secreción Bacterial y Formación de Biofilms de *Escherichia coli*, estuvieron conformadas por KO mayoritariamente detectados en los pacientes en remisión.

Las 17 vías de restantes tenían una conformación de KO con dominancia de predicción mixta en su abundancia relativa. Entre ellas, ocho estuvieron compuestas con una mayoría de KO que se predijeron relativamente más abundantes en pacientes en actividad, como la Biosíntesis de LPS. Las otras nueve estuvieron dominadas por KO predecidos con mayor abundancia relativa en los pacientes en remisión, como el Metabolismo de Butanoato.

4.3. Metabolómica.

Por medio del análisis de metabolómica, se pudieron identificar diferencias significativas en las concentraciones fecales de lisina, mayoritariamente identificada en INS ($p=0.001$) y en pacientes en actividad ($p=0.03$) (Fig. 16-A). Así mismo, se evidenció una mayor concentración de SCFA en los Ctrl, específicamente de Acetato ($p=0.003$), Valerato ($p=0.05$), Butirato ($p=0.02$) e Isobutirato ($p=0.001$) (Fig. 16-B). En el análisis de lipidómica se

observaron diferencias significativas en el fosfolípido Fosfatidiletanolamida, presente en su mayoría en INS ($p=0.0074$) (Fig. 16-C).

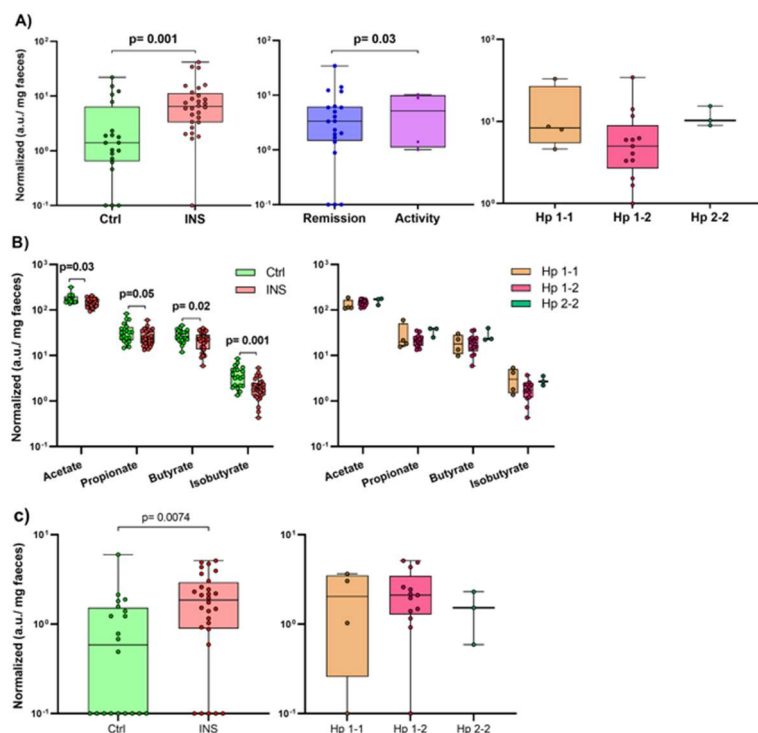


Figura 16. Concentración en muestras fecales de A) lisina, B) ácidos grasos de cadena corta y C) Phosphatidil etanolamina.

Aunque ningún otro metabolito fue observado con diferencias significativas dentro del análisis del total de las muestras, al estratificarlas según el genotipo de Hp de los pacientes, se reveló una mayor concentración fecal de hipoxantina en Hp 1-2, con respecto a Hp 1-1 ($p=0.04$), pero semejantes con las concentraciones halladas en el genotipo Hp 2-2 (Fig. 17).

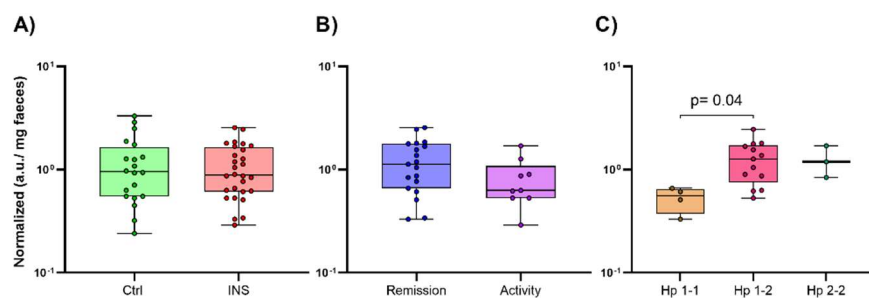


Figura 17. Comparación de concentraciones de Hipoxantina entre A) Ctrl vs. INS B) pacientes según el estado clínico: remisión vs. actividad y C) su genotipo de haptoglobina.

4.4. Análisis de correlación.

Para valorar como podría influir el microbioma en el metaboloma, se realizaron análisis de correlación entre las bacterias y los metabolitos encontrados; así como, entre estos últimos y los KO asociados a las vías de KEGG del análisis de inferencia funcional.

Se observaron correlaciones negativas en dos metabolitos. Por una parte, las concentraciones fecales de lisina solamente mostraron una correlación negativa (r de Spearman = -0.5564, $p=$

0.0072) con la abundancia relativa inferida de alfa galactosidasa, KO asociado a la vía del Metabolismo de la Galactosa (Fig. 18).

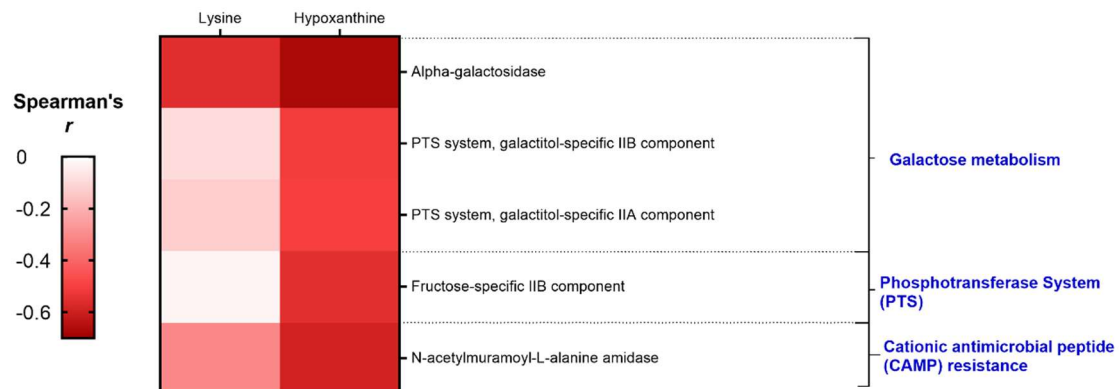


Figura 18. Mapa de calor que muestra la correlación entre KEGG del perfil de inferencia funcional y las concentraciones de lisina e hipoxantina

Las concentraciones fecales de hipoxantina evidenciaron un mayor número de correlaciones, aunque todas ellas fueron negativas. La más fuerte, se observó con la abundancia relativa del género *Veillonella* (r de Spearman= -0.6588, p = 0.0012) (Fig. 19).

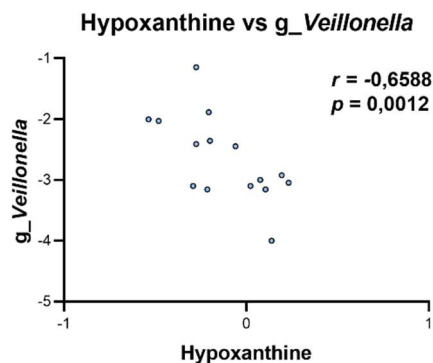


Figura 19. Análisis de correlación de Spearman entre las concentraciones de Hipoxantina y la abundancia relativa de *g_Veillonella*

Así mismo, se obtuvieron correlaciones de este metabolito con los niveles de abundancia relativa de los KO inferidos Alpha galactosidasa (r de Spearman= -0.6504, p = 0.0014) y componentes IIA e IIC del sistema PTS específico para galactitol (r de Spearman= -0,5606, p = 0,0082), asociados a la vía del Metabolismo de Galactosa; N- acetil muramoil-L-alanina amidasa (NAMLAA) (r de Spearman = -0,5607, p = 0,0082), implicado en la vía de Resistencia a CAMP; y componente IIB, específico para fructosa (r de Spearman= -0,5606, p = 0,0082), correspondientes a las vías del sistema PTS (Fig. 18).

5. Discusión

El desconocimiento de la etiología del INS dificulta el desarrollo de dirigidas que eviten efectos secundarios adversos en los pacientes (5, 6, 15). Desde esta perspectiva se ha propuesto el eje intestino-riñón, como posible vía fisiopatológica, mediada por la disrupción de la BEI. Esta alteración se ha asociado a disbiosis, incremento de la permeabilidad paracelular y traslocación de componentes bacterianos proinflamatorios que afectan la homeostasis inmunitaria y renal (29, 44, 47). Aunque se ha sugerido que la susceptibilidad de

la barrera intestinal podría estar influenciada por la expresión del precursor de Hp (27) la relación entre el genotipo de Hp con la composición y funcionalidad bacteriana ha sido escasamente explorada. Los resultados de este estudio sugieren una interacción entre la alteración de la composición taxonómica y funcionalidad inferida del microbioma intestinal y las variaciones en las concentraciones fecales metabolitos de los pacientes con INS, vinculada al genotipo de Hp.

En este estudio no se evidenciaron diferencias significativas en la diversidad alfa del microbioma intestinal, en concordancia con lo reportado por Kan *et al.* Sin embargo, se identificaron alteraciones en la composición taxonómica a nivel de género, particularmente en pacientes con INS en estado clínico de actividad (49). Destaca la abundancia de géneros patobiontes en el microbioma intestinal, cuya predominancia coincidió con la manifestación de la patología y su estado clínico de actividad. Entre estos géneros destacan *Veillonella*, asociado a recaídas y a liberación de citocinas proinflamatorias mediadas por LPS y los géneros *Streptococcus* y *Granulicatella*, asociados a la disrupción de claudinas y a lesiones en la glomerulonefritis, una inflamación en el glomérulo que desencadena proteinuria masiva (52, 53, 54). En contraste a lo descrito por Tsuji *et al.*, quienes evidenciaron una predominancia del género *Clostridium*, asociada a la producción de SCFA, en controles sanos, presentó mayor abundancia en pacientes con INS, lo que podría explicarse por la implicación de ciertas especies en la producción de biofilms patógenos (48, 55). No obstante, si se hallaron similitudes con este estudio, dado que los pacientes presentaron una reducción significativa de especies identificadas como productoras de SCFA como *Collinsella*, *Fusicatenibacter* y *Agathobacter*, que también han sido relacionadas con mecanismos antiinflamatorios que sirven como protección a la BEI (56, 57, 58). Estos hallazgos sugieren un efecto sinérgico que afecta a la función de la barrera mediante la promoción de factores proinflamatorios y la reducción de mecanismos antiinflamatorios asociados a la respuesta clínica del tratamiento en el paciente.

Complementariamente, la alteración en la abundancia relativa del género *Prevotella*, evidenciada en el microbioma nasofaríngeo, sirve como soporte a la hipótesis que asocia a la BEI como eje central regulador. Los resultados confirman la importancia de este género al revelar una disminución de su abundancia relativa en pacientes con INS, dado que esta alteración ha sido previamente asociada a la manifestación de infecciones virales respiratorias, como el virus de la Influenza, la neumonía o la sinusitis, posiblemente causada por la disminución de citocinas protectoras que son promovidas por este género (59, 60). La hipótesis de interacción entre el microbioma intestinal y el nasofaríngeo se soporta por el enriquecimiento de rutas comunes asociadas a factores de virulencia como el sistema de dos componentes, así como resultados en los obtenidos por He *et al.* quienes describen una reducción de este género en el microbioma intestinal de pacientes pediátricos con INS (50).

Así mismo, el análisis de inferencia funcional reveló un enriquecimiento de rutas metabólicas asociadas a componentes bacterianos con estas características, incluyendo las vías de biosíntesis de ácido teicoico biosíntesis de peptidoglicano que fueron más representadas en pacientes en estado clínico activo. Estas posibles funciones, comunes en bacterias grampositivas, están vinculadas a componentes bacterianos que podrían comprometer la función de las TJ y facilitar su translocación, promoviendo la inflamación sistémica por medio de la afección de leucocitos (61, 62). En contraste, pacientes en remisión predijeron rutas asociadas al metabolismo de fosfonatos y fosfinatos, capaces de disminuir la producción de TNF- α inducida por LPS (63). Estos datos coinciden con los efectos evaluados en la composición taxonómica, implicando que el incremento asociado a factores de virulencia y la reducción de vías protectoras podrían asociarse a un efecto sinérgico en la disrupción de la BEI.

Contrario a la hipótesis planteada que asociaba al alelo de Hp2-2 a taxones y funciones asociadas con procesos proinflamatorios influido por la expresión del alelo Hp2 (25, 26, 27, 36), los resultados encontrados en este estudio revelan una tendencia con mayor abundancia relativa de estos en Hp 1-1. Este hallazgo es consistente con una disminución significativa de las concentraciones fecales de hipoxantina evidenciadas en este genotipo, en comparación con el genotipo Hp 1-2. Este compuesto se relaciona funcionalmente con un aumento en la peristalsis, la liberación de enzimas digestivas y la resistencia de la BEI; indicando que Hp 2-2 podría no estar asociado a alteraciones del ecosistema intestinal en pacientes con INS. Aunque no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de este compuesto cuando se compararon los pacientes por el estado clínico, los datos hallados en la estratificación por genotipo pueden apoyarse con la tendencia observada a presentarse mayoritariamente en los pacientes en fase clínica de remisión (64, 65).

Desde un punto de vista metabólico y en consistencia con lo descrito en estudios previos, los pacientes con INS presentaron una reducción en las concentraciones fecales de SCFA, como el butirato (48, 49). Por otro lado, se apreció un incremento significativo de las concentraciones fecales de lisina, un aminoácido precursor de productos finales de glicación avanzada que promueven la disfunción de las TJ y del podocito mediante la vía STAT3 (66, 67). Así mismo, en estos pacientes se identificaron concentraciones altas de PE, cuyas lisoformas se asocian con factores de virulencia que afectan la función de la BEI (68, 69).

Es destacable la fuerte correlación negativa detectada entre las concentraciones fecales de hipoxantina y las abundancias relativas del patobionte g_*Veillonella*, así como la potencial abundancia de NAMLAA, factor de virulencia útil para la evasión del sistema inmune por parte de la bacteria (70). Así mismo, destaca el hecho de que el genotipo de Hp 1-1 mostrara mayores las tendencias de alteraciones en la composición taxonómica y funcional del microbioma intestinal. Estos hallazgos sugieren una interacción, donde el microambiente del genotipo parece favorecer la proliferación de patobiontes, mientras que los efectos de las altas concentraciones fecales de hipoxantina en portadores de Hp1-2 podrían tener funciones que limitan la proliferación de factores patógenos en la BEI. De hecho, a pesar de haberse vinculado con una mayor capacidad antioxidante y una mejor captación de hemoglobina libre, este genotipo también se ha asociado con la proliferación de ciertas bacterias gram-positivas patógenas, lo que respalda aún los resultados obtenidos (71).

Este estudio resalta la importancia de considerar al genotipo de Hp como un factor importante en la función de la BEI como eje funcional, proponiéndolo como un biomarcador predictivo no invasivo y al genotipo Hp1-1 como un potencial promotor de su disrupción. Además, pese a la relevancia que tienen las concentraciones que ha tenido el análisis de los SCFA en los estudios hechos en pacientes con INS, se destaca la necesidad de evaluar las concentraciones de otros metabolitos que podrían estar implicados en la disrupción de la BEI y en el desarrollo de esta patología. Adicionalmente, los hallazgos encontrados en las posibles funciones inferidas proponen que, al evaluar las alteraciones en el microbioma, no solo se tengan en cuenta índices de diversidad taxonómica para designar disbiosis, sino que también se consideren otras medidas como la redundancia funcional, dado que, si una especie desaparece, otras con funciones similares pueden tomar su lugar, manteniendo la funcionalidad del ecosistema y, por ende, la homeostasis (72).

Sin embargo, también se destacan limitaciones dentro de esta investigación, como el tamaño muestral, restringido por la naturaleza de enfermedad huérfana del INS. Aumentar el tamaño de la muestra o realizar un estudio en cohorte favorecería el desarrollo de un análisis estadístico más exhaustivo y con mayor poder que permita establecer relaciones causales. Del mismo modo, las funciones metabólicas identificadas fueron inferidas computacionalmente y junto a la identificación de taxones, se realizaron mediante secuenciaciones basadas en el gen de ARNr16S, metodología que conlleva limitaciones basados en la dependencia de bases

de datos imprecisas, que dificulta la identificación correcta a nivel de especie o cepa (73). Además, la inferencia funcional derivada de estos datos no proporciona suficiente evidencia para identificar vías metabólicas o funciones activas a causa de la diversidad funcional intraespecífica, dado que esta permite a las cepas o las especies adaptarse y modificar las condiciones del microambiente, mediante el uso de diferentes sustratos (73). No obstante, estos resultados pueden promover nuevas vías de investigación destinadas a usar métodos más exhaustivos que puedan corroborar esta información, como el análisis metagenómico y metatranscriptómico, basado en *shotgun*; así como modelos *in vitro* en cultivos de células epiteliales que puedan evaluar el impacto directo de los componentes bacterianos identificados sobre la función de la BEI.

6. Conclusiones

En este estudio se identificaron diferencias significativas en la abundancia relativa de taxones bacterianos, funciones metabólicas inferidas y concentraciones fecales de metabolitos entre controles sanos y pacientes pediátricos con INS, considerando el estado clínico de la patología y el genotipo de haptoglobina. Además, se evidenció una correlación negativa entre algunos factores de virulencia inferidos y las concentraciones de hipoxantina, cuando se estratifican a los pacientes según el genotipo de haptoglobina. A pesar de que el tamaño de la muestra limitado no permitió un análisis estadístico en la comparación por genotipo del microbioma, las tendencias observadas concluyen que, a diferencia de los pacientes portadores del genotipo Hp 1-1, aquellos con Hp 2-2 no presentan alteraciones en la composición taxonómica y ni en funcionalidad inferida microbiana asociados a factores proinflamatorios. Tampoco se observaron diferencias en las concentraciones fecales de metabolitos asociados a procesos antiinflamatorios.

7. Bibliografía

1. Reglamento (CE) N° 141/2000 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 1999, sobre medicamentos huérfanos. Boletín Oficial del Estado
2. ROESSLER, Helen I., *et al.* Drug repurposing for rare diseases. Trends in pharmacological sciences, 2021, vol. 42, no 4, p. 255-267.
3. OKPERE, Augustina, *et al.* The Diagnostic journey of childhood Idiopathic nephrotic syndrome: perspectives of children and their caregivers. Canadian journal of kidney health and disease, 2022, vol. 9, p. 20543581221139025.
4. AYMÉ, Ségolène, *et al.* Common elements in rare kidney diseases: conclusions from a kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) controversies conference. Kidney international, 2017, vol. 92, no 4, p. 796-808.
5. CATTRAN, Daniel C., *et al.* kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) glomerulonephritis work group. KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis. *Kidney International Supplements*, 2012, vol. 2, no 2, p. 139-274.
6. NOONE, Damien G.; IJIMA, Kazumoto; PAREKH, Rulan. Idiopathic nephrotic syndrome in children. The Lancet, 2018, vol. 392, no 10141, p. 61-74.
7. BRENNER, Barry M.; RECTOR, Floyd C. *Brenner y Rector, el riñón*. Elsevier España, 2018.
8. KOEPPEN, Bruce M.; STANTON, Bruce A. *Renal Physiology E-Book: Renal Physiology E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2018.
9. ARIF, Ehtesham; NIHALANI, Deepak. Glomerular filtration barrier assembly: an insight. Postdoc journal: a journal of postdoctoral research and postdoctoral affairs, 2013, vol. 1, no 4, p. 33.
10. GARG, Puneet. A review of podocyte biology. American journal of nephrology, 2018, vol. 47, no Suppl. 1, p. 3-13.
11. KOCYLOWSKI, Maciej K., *et al.* A slit-diaphragm-associated protein network for dynamic control of renal filtration. Nature Communications, 2022, vol. 13, no 1, p. 6446.

12. KAWACHI, Hiroshi; FUKUSUMI, Yoshiyasu. New insight into podocyte slit diaphragm, a therapeutic target of proteinuria. *Clinical and experimental nephrology*, 2020, vol. 24, no 3, p. 193-204.
13. KANEKO, Kazunari. Gut dysbiosis as a susceptibility factor in childhood idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatrics & Neonatology*, 2025, vol. 66, p. S2-S7.
14. AL-AUBODAH, Tho-Alfakar, *et al.* The autoimmune architecture of childhood idiopathic nephrotic syndrome. *Kidney International*, 2024.
15. HEVIA, Pilar, *et al.* Síndrome nefrótico idiopático: recomendaciones de la Rama de Nefrología de la Sociedad Chilena de Pediatría. Parte 2. *Revista chilena de pediatría*, 2015, vol. 86, no 4, p. 291-298.
16. RAVAGLIA, Fiammetta, *et al.* The pathology lesion patterns of podocytopathies: how and why?. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, vol. 10, p. 838272.
17. MAAS, Rutger J., *et al.* Minimal change disease and idiopathic FSGS: manifestations of the same disease. *Nature Reviews Nephrology*, 2016, vol. 12, no 12, p. 768-776.
18. KARAKAYA, Deniz, *et al.* Complications related to childhood idiopathic nephrotic syndrome, its treatment and the associated risks in patients. *Cureus*, 2023, vol. 15, no 8, p. e43929.
19. SOMPAYRAC, Lauren M. How the immune system works. John Wiley & Sons, 2022.
20. NILSSON, Jan; GONÇALVES, Isabel; EDSFELDT, Andreas. Chronic inflammation and atherosclerosis. En *Early Vascular Aging (EVA)*. Academic Press, 2015. p. 157-167.
21. BURBEA, Zvi, *et al.* Role of haptoglobin phenotype in end-stage kidney disease. *Nephron Experimental nephrology*, 2004, vol. 97, no 2, p. e71-e76
22. CHENG, Chun-Han; HAO, Wen-Rui; CHENG, Tzu-Hurng. Multifaceted role of haptoglobin: Implications for disease development. *World Journal of Hematology*, 2024, vol. 11, no 3.
23. GUETTA, Julia, *et al.* Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. *Atherosclerosis*, 2007, vol. 191, no 1, p. 48-53.
24. STEMPKOWSKA, Anna, *et al.* Hp1-1 as a genetic marker regulating inflammation and the possibility of developing diabetic complications in patients with type 2 diabetes—cohort studies. *Genes*, 2020, vol. 11, no 11, p. 1253.
25. ROCA, Neus, *et al.* Activation of the acute inflammatory phase response in idiopathic nephrotic syndrome: association with clinicopathological phenotypes and with response to corticosteroids. *Clinical kidney journal*, 2021, vol. 14, no 4, p. 1207-1215.
26. YÜKSEL, Hasan; TUNCA, Seda. Destiny of airway disease: interplay between epithelial barrier and the innate immune system. *Tissue Barriers*, 2022, vol. 10, no 4, p. 2020706.
27. VERES-SZÉKELY, Apor, *et al.* Zonulin as a potential therapeutic target in microbiota-gut-brain axis disorders: encouraging results and emerging questions. *International journal of molecular sciences*, 2023, vol. 24, no 8, p. 7548.
28. SALVO ROMERO, Eloisa, *et al.* The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev Esp Enferm Dig*, 2015, vol. 107, no 11, p. 686-96.
29. DI TOMMASO, Natalia; GASBARRINI, Antonio; PONZIANI, Francesca Romana. Intestinal barrier in human health and disease. *International journal of environmental research and public health*, 2021, vol. 18, no 23, p. 12836 S
30. HEN, Le, *et al.* Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annual review of physiology*, 2011, vol. 73, no 1, p. 283-309.
31. SAWAED, Jasmin, *et al.* Antibiotics damage the colonic mucus barrier in a microbiota-independent manner. *Science Advances*, 2024, vol. 10, no 37, p. eadp4119.
32. GILLOIS, Kévin, *et al.* Mucus: an underestimated gut target for environmental pollutants and food additives. *Microorganisms*, 2018, vol. 6, no 2, p. 53.

33. BAEK, Su-Min, *et al.* Disrupted intestinal mucosal barrier mediated by alcohol consumption aggravates systemic microplastic accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2023, vol. 262, p. 115342
34. SMITH, Philip D., *et al.* Principles of Mucosal Immunology. CRC Press Taylor & Francis Group, 2020, 2nd Edition.
35. FASANO, Alessio. Regulation of intercellular tight junctions by zonula occludens toxin and its eukaryotic analogue zonulin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000, vol. 915, no 1, p. 214-222.
36. VANUYTSEL, Tim; VERMEIRE, Séverine; CLEYNEN, Isabelle. The role of Haptoglobin and its related protein, Zonulin, in inflammatory bowel disease. *Tissue barriers*, 2013, vol. 1, no 5, p. e27321.
37. YU, Jie; SHEN, Ying; ZHOU, Nan. Advances in the role and mechanism of zonulin pathway in kidney diseases. *International Urology and Nephrology*, 2021, vol. 53, p. 2081-2088.
38. SCHEFFLER, Lucas, *et al.* Widely used commercial ELISA does not detect precursor of haptoglobin2, but recognizes properdin as a potential second member of the zonulin family. *Frontiers in endocrinology*, 2018, vol. 9, p. 22.
39. RAJU, Swathi M., *et al.* Haptoglobin improves acute phase response and endotoxin tolerance in response to bacterial LPS. *Immunology Letters*, 2019, vol. 207, p. 17-27.
40. HOU, Kaijian, *et al.* Microbiota in health and diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, 2022, vol. 7, no 1, p. 135.
41. KOREN, Omry, *et al.* The maternal gut microbiome in pregnancy: implications for the developing immune system. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2024, vol. 21, no 1, p. 35-45.
42. MARTIN-CASTAÑO, Benita, *et al.* The relationship between gut and nasopharyngeal microbiome composition can predict the severity of COVID-19. *Elife*, 2025, vol. 13, p. RP95292. JORDÁN, Ferenc, *et al.*
43. Diversity of key players in the microbial ecosystems of the human body. *Scientific reports*, 2015, vol. 5, no 1, p. 15920.
44. WOZNIAK, Hannah, *et al.* The central and biodynamic role of gut microbiota in critically ill patients
45. ARIAS, Sandra L.; BRITO, Ilana L. Biophysical determinants of biofilm formation in the gut. *Current opinion in biomedical engineering*, 2021, vol. 18, p. 100275.
46. GHOSH, Siddhartha S., *et al.* Intestinal barrier dysfunction, LPS translocation, and disease development. *Journal of the Endocrine Society*, 2020, vol. 4, no 2, p. bvz039.
47. WANG, Xifan, *et al.* Aberrant gut microbiota alters host metabolome and impacts renal failure in humans and rodents. *Gut*, 2020, vol. 69, no 12, p. 2131-2142.
48. TSUJI, Shoji, *et al.* Gut microbiota dysbiosis in children with relapsing idiopathic nephrotic syndrome. *American Journal of Nephrology*, 2018, vol. 47, no 3, p. 164-170.
49. KANG, Yulin, *et al.* Compositional alterations of gut microbiota in children with primary nephrotic syndrome after initial therapy. *BMC nephrology*, 2019, vol. 20, p. 1-9.
50. HE, Hanchang, *et al.* Gut microbiota profile in adult patients with idiopathic nephrotic syndrome. *BioMed Research International*, 2021, vol. 2021, no 1, p. 8854969.
51. WANG, Chenwei, *et al.* Primary nephrotic syndrome relapse within 1 year after glucocorticoid therapy in children is associated with gut microbiota composition at syndrome onset. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2023, vol. 38, no 9, p. 1969-1980.
52. CLARKE, Thomas B., *et al.* Invasive bacterial pathogens exploit TLR-mediated downregulation of tight junction components to facilitate translocation across the epithelium. *Cell host & microbe*, 2011, vol. 9, no 5, p. 404-414.
53. AYDIN TEKE, Türkan, *et al.* *Granulicatella adiacens* infections in children: a single-center retrospective study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2025, p. 1-6.

54. MATERA, Giovanni, *et al.* Receptor recognition of and immune intracellular pathways for *Veillonella parvula* lipopolysaccharide. *Clinical and vaccine immunology*, 2009, vol. 16, no 12, p. 1804-1809
55. ENGEVIK, Melinda A., *et al.* Characterizing mucus-based biofilms in human *Clostridium difficile* infection. *The FASEB Journal*, 2020, vol. 34, no S1, p. 1-1.
56. FIRRMAN, Jenni, *et al.* The impact of environmental pH on the gut microbiota community structure and short chain fatty acid production. *FEMS Microbiology Ecology*, 2022, vol. 98, no 5, p. fiac038.
57. LEE, Da Bin; HWANG, In Seon. Macronutrient balance determines the human gut microbiome eubiosis: insights from in vitro gastrointestinal digestion and fermentation of eight pulse species. *Frontiers in Microbiology*, 2025, vol. 15, p. 1512217.
58. NISHIWAKI, Hiroshi, *et al.* Short chain fatty acids-producing and mucin-degrading intestinal bacteria predict the progression of early Parkinson's disease. *npj Parkinson's Disease*, 2022, vol. 8, no 1, p. 65.
59. EDOUARD, Sophie, *et al.* The nasopharyngeal microbiota in patients with viral respiratory tract infections is enriched in bacterial pathogens. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 2018, vol. 37, p. 1725-1733.
60. LARSEN, Jeppe Madura, *et al.* Divergent pro-inflammatory profile of human dendritic cells in response to commensal and pathogenic bacteria associated with the airway microbiota. *PloS one*, 2012, vol. 7, no 2, p. e31976.
61. WELLNITZ, Olga, *et al.* Differential loss of bovine mammary epithelial barrier integrity in response to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Journal of dairy science*, 2016, vol. 99, no 6, p. 4851-4856.
62. KAESLER, Susanne, *et al.* *Staphylococcus aureus*-derived lipoteichoic acid induces temporary T-cell paralysis independent of Toll-like receptor 2. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2016, vol. 138, no 3, p. 780-790. e6.
63. MORADOV, Dorit, *et al.* The Anti-Inflammatory Activity of a Novel Fused-Cyclopentenone Phosphonate and Its Potential in the Local Treatment of Experimental Colitis. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015, vol. 2015, no 1, p. 939483.
64. XIAO, Yang, *et al.* Bacteria-Derived Hypoxanthine Accelerates Gastrointestinal Transit. *The FASEB Journal*, 2022, vol. 36.
65. LEE, J. Scott, *et al.* Hypoxanthine is a checkpoint stress metabolite in colonic epithelial energy modulation and barrier function. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, vol. 293, no 16, p. 6039-6051.
66. QIANG, Xin, *et al.* Advanced glycation end products (AGEs) impair the intestinal epithelial barrier via STAT3 activation mediated by macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 2024, vol. 192, p. 114966.
67. NISHAD, Rajkishor, *et al.* Advanced-glycation end-products induce podocyte injury and contribute to proteinuria. *Frontiers in Medicine*, 2021, vol. 8, p. 685447.
68. BOLDYREVA, Lidiya V., *et al.* Fat of the gut: epithelial phospholipids in inflammatory bowel diseases. *International journal of molecular sciences*, 2021, vol. 22, no 21, p. 11682.
69. CAO, Xuefeng, *et al.* *Campylobacter jejuni* permeabilizes the host cell membrane by short chain lysophosphatidylethanolamines. *Gut Microbes*, 2022, vol. 14, no 1, p. 2091371.
70. GARCÍA, Ernesto. Structure, Function, and Regulation of LytA: The N-Acetylmuramoyl-l-alanine Amidase Driving the "Suicidal Tendencies" of *Streptococcus pneumoniae*—A Review. *Microorganisms*, 2025, vol. 13, no 4, p. 827.
71. WASSERZUG, Oshri, *et al.* Haptoglobin 1-1 genotype and the risk of life-threatening streptococcus infection: Evolutionary implications. *Journal of Infection*, 2007, vol. 54, no 4, p. 410.
72. TIAN, Liang, *et al.* Deciphering functional redundancy in the human microbiome. *Nature communications*, 2020, vol. 11, no 1, p. 6217.

73. MATCHADO, Monica Steffi, *et al.* On the limits of 16S rRNA gene-based metagenome prediction and functional profiling. *Microbial Genomics*, 2024, vol. 10, no 2, p. 001203.